

## DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL PER CRIBRATGE D'ANEUPLOÏDIES. RESULTATS PER INDICACIONS

Clara Mangrané,<sup>1\*</sup> Mònica Parriego,<sup>1</sup> Francesca Vidal,<sup>2</sup> Marta Sánchez,<sup>1,2</sup> Montserrat Boada,<sup>1</sup> Anna Veiga,<sup>1</sup> Pere N. Barri<sup>1</sup>

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.  
Tel. 932 274 700. Fax 932 057 966. Adreça electrònica: [claman@dexeus.com](mailto:claman@dexeus.com).

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.  
Bellaterra. Barcelona.

---

### Resum

**Objectius.** Comparar els percentatges d'embrions anormals entre els diferents grups establerts per indicacions. Conèixer si els cromosomes implicats en les anomalies observades varien en funció de la indicació. **Materials i mètodes.** Van analitzar-se 444 embrions procedents de quaranta-set cicles de FIV-DGP per a les següents indicacions: avortaments de repetició (AR), factor masculí (FM), fallada d'implantació (FI), concepcions prèvies afectes (CPA). Van aplicar-se dues rondes consecutives d'hibridació, i es van avaluar en la primera els cromosomes 13, 16, 18, 21, 22; en la segona, els sexuals i el 15. **Resultats.** En tots els grups estudiats s'ha trobat un elevat grau d'alteracions cromosòmiques, sense trobar-se diferències significatives entre si. El percentatge d'anomalies per als cromosomes sexuals observat va ser significativament superior en els casos de FM, mentre que les anomalies per al cromosoma 15 van observar-se amb més freqüència en els casos de AR i FI. **Conclusions.** L'elevat percentatge d'anomalies trobat justifica l'ús del diagnòstic genètic preimplantacional en aquests grups de pacients de mal pronòstic. Els nostres resultats indicarien que existeix certa relació entre la indicació i els cromosomes implicats en les alteracions.

**Paraules clau** Cribratge d'aneuploidies, FISH-DGP, avortaments de repetició, fallada d'implantació, factor masculí.

### Abstract

**Objectives.** To compare abnormal embryo percentage among different groups established by indications. To know whether the chromosomes implied in anomalies vary in relation to the indication. **Materials and Methods.** 444 embryos from 47 IVF-PGD cycles have been analysed under the indications: Recurrent miscarriage (RM), implantation failure (IF), male factor (MF), previous affected pregnancies (PAP). Two consecutive rounds of FISH were used to evaluate chromosomes 13, 16, 18, 21, 22 and 15, X and Y, respectively. **Results.** High percentage of abnormal embryos have been observed in all groups. No statistically differences have been found among indications, although sex chromosomes in MF and chromosome 15 in RM and IF were statistically different from the rest. **Conclusions.** The high percentage of abnormality found in all groups of patients should justify the PGD. Our results show certain relationship between the chromosomes affected and PGD indication.

**Key words** Aneuploidy screening, FISH-PGD, recurrent miscarriages, implantation failure, male factor.

---

## INTRODUCCIÓ

L'aplicació del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) ha variat significativament des dels seus inicis. El perfeccionament de les tècniques de micromanipulació i de cultiu embrionari ha permès tant una

important millora en els resultats obtinguts com també una expansió en l'aplicació de la tècnica.

Actualment, ja no solament les parelles amb un elevat risc genètic es beneficien dels programes de DGP, sinó que els principals candidats que s'orienten envers cicles de FIV-DGP resulten ésser parelles infèrtils, en les quals s'estima que la producció d'embrions anor-

**Taula 1** Percentatge d'anormalitat per cromosoma en funció de la indicació ( $\chi^2 P < 0,05$ ).

Cromosoma	13	15	16	18	21	22	Sexuals
AR	46,3 %	48,8 %**	55,4 %	37,5 %	47,4 %	66,1 %	29,5 %
FM	44,7 %	20,0 %	52,0 %	48,7 %	42,9 %	56,0 %	48,6 %*
FI	45,1 %	45,5 %**	58,0 %	38,5 %	55,6 %	47,5 %	33,3 %
EPC	54,2 %	20,0 %	58,3 %	39,1 %	34,8 %	54,2 %	30,8 %
<b>Total</b>	46,2 %	38,3 %	55,5 %	41,6 %	47,5 %	55,3 %	38,2 %

\* Significativament diferent en la columna.

\*\* Significativament diferents de les altres dues indicacions de la columna.

mals és superior a l'habitual (Zenzes i Casper, 1992). D'aquesta manera, la selecció dels embrions caracteritzats com a normals per als cromosomes analitzats tindria l'objectiu, per una banda, d'augmentar la taxa d'implantació embrionària i, per l'altra, de disminuir la d'avortament amb la qual cosa, en definitiva, hi hauria una millora de les taxes de nens nascuts vius i sans. Tot i això, en tractar-se d'una tecnologia relativament recent, les parelles candidates que s'orienten a un cribratge d'aneuploïdies varien entre els centres, ja que els resultats que hi ha fins al moment no són del tot concloents. Un estudi de Rubio *et al.* publicat el 2003 va mostrar un increment significatiu en el percentatge d'embrions anormals en parelles que havien tingut dos o més avortaments previs (AR), i suggereix la utilitat de l'aplicació d'aquesta tècnica en aquestes parelles. A diferència d'això, en un altre estudi recent (Staessen *et al.*, 2004) no observen un benefici en l'aplicació de DGP quan la indicació és l'edat materna avançada (AMA) i no hi ha restriccions en el nombre d'embrions a transferir. Poden trobar-se resultats discordants quan la indicació és la presència d'un factor masculí sever (FM) (Silber *et al.*, 2003; Aran *et al.*, 2004), o en parelles amb fallada d'implantació (FI) (Pehlivan *et al.*, 2002; Gianaroli *et al.*, 1999). Per finalitzar, una última indicació que augmenta en freqüència és la de parelles que han tingut dues o més concepcions prè-

vies afectes de cromosomopaties (CPA) (Munné *et al.*, 2004). En el nostre centre són orientats envers DGP per cribratge d'aneuploïdies les parelles amb AR, FM, FI i CPA.

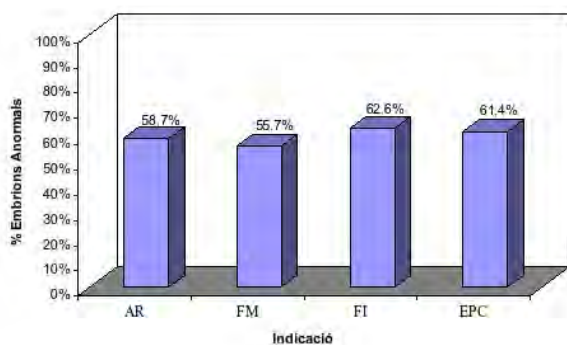
Els objectius d'aquest estudi han estat:

- Comparar els percentatges d'embrions anormals entre els diferents grups establerts per indicacions.
- Conèixer si els cromosomes implicats en les anomalies observades varien en funció de la indicació.

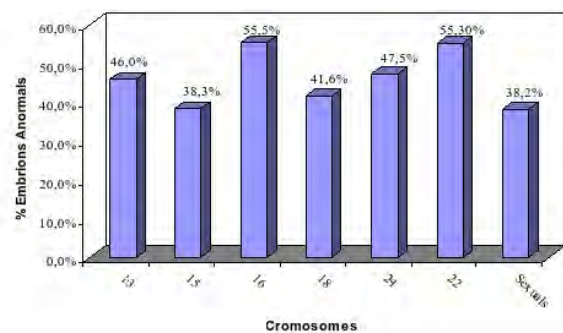
## MATERIALS I MÈTODES

Des de gener de 2004 fins a març de 2005 van realitzar-se quaranta-set cicles de FIV- DGP per cribratge d'aneuploïdies en el nostre centre: *a)* onze per AR ( $\geq 2$  avortaments previs); *b)* dinou per FM (anomalies meiótiques); *c)* onze per FI ( $\geq 3$  cicles anteriors de FIV sense èxit); i *d)* sis per CPA ( $\geq 2$  concepcions prèvies afectes). L'edat de les pacients incloses en l'estudi estava compresa entre els vint-i-sis i els quaranta-cinc anys, amb una mitjana de  $36,41 \pm 4,41$  anys.

Els protocols d'estimulació ovàrica de les pacients i les característiques dels protocols de laboratori emprats van ser els habituals del nostre centre (Barri *et al.*, 1988; Carreras *et al.*, 1994; Calderón *et al.*, 1995). La tècnica d'inseminació utilitzada va ser la microin-



**Figura 1** Percentatge d'embrions anormals en funció de la indicació. Ns.



**Figura 2** Percentatge d'embrions anormals per a cada cromosoma estudiat.

jecció espermàtica en tots els casos, independentment de la qualitat de la mostra espermàtica.

Les biòpsies embrionàries van realitzar-se el tercer dia de desenvolupament (D+3). Els embrions aptes per a la biòpsia van col·locar-se individualment en microgotetes de medi sense calci ni magnesi (EB o G-PGD, Vitrolife®, Sweden) cobertes per oli mineral. La zona pel·lúcida es va perforar mitjançant tecnologia làser (Fertilase®) (Boada *et al.*, 1998) i van aspirar-se una o dues cèl·lules, en funció del nombre de blastòmers que tenia l'embrió o de la presència i qualitat del nucli fixat. La fixació va realitzar-se mitjançant el mètode de Tarkowsky (1996) lleugerament modificat (Santaló *et al.*, 1986) i els portaobjectes van ser processats per FISH. Van aplicar-se dues rondes consecutives d'hibridació, i es van avaluar en la primera els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 (PB *multicolour probe panel*, Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA), i en la segona, X, Y i 15 (CEP Vysis Inc.).

Els embrions de bona morfologia i caracteritzats com a sans pels cromosomes analitzats van transferir-se en D+5. La resta d'embrions cromosòmicament normals que assoliren l'estadi de blastocist van ser congelats.

Totes les dades s'han treballat estadísticament mitjançant el test de  $\chi^2$  de Pearson, i  $F$  de Fisher. Per a tots els casos, es va considerar  $\alpha < 0,05$  com a nivell de significació.

## RESULTATS

Van ser processats per FISH un total de 444 embrions distribuïts de la següent manera: 104 corresponents a AR, 149 a FM, 147 a FI i 44 a CPA. Van ser diagnosticats un total de 399 embrions (89,9%), dels quals 136 (34,1% dels diagnosticats, 30,6% dels analitzats) van ser classificats com a normals per als cromosomes estudiats. Es van transferir un total de setanta embrions caracteritzats com a normals, que van donar lloc a dotze embarassos, cosa que va suposar una taxa d'embaràs per transferència embrionària del 27,9% i una taxa d'implantació global del 18,6%.

No es van trobar diferències significatives en comparar el percentatge d'embrions anormals en funció de cada indicació estudiada. (vegeu la figura 1).

Més de la meitat dels embrions anormals presentaven anomalies per als cromosomes 22 o 16, mentre que els cromosomes 21 i 13 mostraven anomalies de distribució en menor freqüència; els cromosomes que mostraven els percentatges d'aneuploidia més baixos van ser els sexuals, el 15 i el 18. (vegeu la figura 2).

Va avaluar-se la possible correlació entre la incidència d'aneuploidies per cada cromosoma en funció de

les diferents indicacions. La incidència d'anomalies per als cromosomes sexuals va resultar ser significativament superior en els casos de FM que en la resta d'indicacions ( $P < 0,05$ ); també va trobar-se significació estadística en les anomalies pel cromosoma 15, i es van trobar més freqüentment en les indicacions FI i AR que en les altres dues indicacions. D'altra banda, la incidència d'anomalies per al cromosoma 22 semblava superior en els casos d'AR respecte de la resta d'indicacions, tot i que les diferències no eren estadísticament significatives ( $P = 0,062$ ). Els cromosomes 13, 16, 18 i 21 van mostrar percentatges d'anormalitat similars en les quatre indicacions estudiades. Els resultats detallats poden consultar-se a la taula 1.

## DISCUSSIÓ

L'elevat percentatge d'embrions cromosòmicament anormals observat en aquests pacients (59,2% dels analitzats, 65,9% dels diagnosticats), i les taxes d'embaràs per transferència aconseguides, concorden amb dades de la bibliografia (Munné *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2003; Wilton *et al.*, 2003) i justifiquen l'ús del diagnòstic genètic preimplantacional en aquests grups de pacients de mal pronòstic (Pellicer *et al.*, 1999). Per a totes les indicacions analitzades, el percentatge d'embrions anormals observat s'ha situat per sobre del 50%, i no s'han trobat diferències estadísticament significatives entre si.

Els resultats obtinguts revelen que els dos cromosomes que es troben en més freqüència en anomalies en D+3 (el 16 i el 22) continuen essent els més freqüentment anormals en avortaments espontanis (Hassold i Jacobs, 1984), i en nounats no es troba cap anomalia d'aquests cromosomes, ja que no són compatibles amb la vida (Munné *et al.*, 1998). Tot i això, cal tenir en compte que tant en avortaments com en nounats les úniques anomalies autosòmiques que s'observen són trisomies, mentre que en etapes preimplantacionals s'observen també moltes monosomies i, fins i tot, nul·lisomies per a tots els cromosomes estudiats. Aquestes anomalies serien poc compatibles amb etapes posteriors del desenvolupament i s'eliminarien en etapes pre o periimplantacionals.

D'acord amb les dades observades en aquest estudi, les diferents indicacions tenen incidències d'anomalies per a certs cromosomes, que varien entre si (cromosomes sexuals-MF; cromosoma 15-IF/AR). Tot i que comencen a aplicar-se tècniques d'hibridació genòmica comparada (CGH) (Wilton *et al.*, 2003), el temps necessari per a aquest tipus d'anàlisi en cèl·lules úniques no permet tenir resultats dins del cicle en fresc, de manera que el cribratge d'aneuploidies que es re-

alitzada en la clínica actualment és mitjançant FISH, cosa que limita el diagnòstic a un màxim de nou cromosomes. Com a conseqüència, la informació sobre incidència d'anomalies obtinguda a partir de les dades de la majoria d'estudis realitzats, inclòs el present, no és completa i queda limitada als cromosomes analitzats. Caldria fer una valoració exhaustiva dels altres cromosomes no analitzats en aquest estudi i potser podrien arribar a establir-se bateries de cromosomes a analitzar en els casos de DGP específiques per a cada grup.

## AGRAÏMENTS

Laura Sarabia Cos, per tot el seu suport. Nacho Rodríguez, Servei d'Estadística de l'Institut Universitari Dexeus.

## BIBLIOGRAFIA

- ARAN, B.; VEIGA, A.; VIDAL, F.; PARRIEGO, M.; VENDRELL, J. M.; SANTALÓ, J.; EGOZCUE, J.; BARRI, P. N. (2004). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities». *RBMOnline*, 8:470-476.
- BOADA, M.; CARRERA, M.; DE LA IGLESIA, C.; SANDALINAS, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. (1998). «Successful use of laser for human biopsy in preimplantation genetic diagnosis: Report of Two cases». *J. Ass. Reprod. Genet.*, 15:305-307.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, C.; FERRARETTI, A.; MUNNÉ, S. (1999). «Preimplantation Diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed». *Fertil. Steril.*, 72:837-844.
- MUNNÉ, S.; MÁRQUEZ, C.; REING, A.; GARRISI, J.; ALIKANI, M. (1998). «Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: X,Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22». *Prenat. Diagn.*, 18:1459-1466.
- MUNNÉ, S.; SANDALINAS, M.; ESCUDERO, T.; VELILLA, E.; WALMSLEY, R.; SADOWI, S.; COHEN, J.; SABLE, D. (2003). «Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy». *RBMOnline*, 7:91-97.
- MUNNÉ, S.; SANDALINAS, M.; MAGLI, C.; GIANAROLI, L.; COHEN, J.; WARBURTON, D. (2004). «Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions». *Prenat. Diagn.*, 24:638-643.
- PEHLIVAN, T.; RUBIO, C.; RODRIGO, L.; ROMERO, J.; REMOHÍ, J.; SIMON, C.; PELLICER, A. (2003). «Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients». *RBMOnline*, 6:232-237.
- PELLICER, A.; RUBIO, C.; VIDAL, F.; MINGUEZ, Y.; EGOZCUE, J.; REMOHL, J.; SIMON, C. (1999). «In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos». *Fertil. Steril.*, 71:1033-1039.
- RUBIO, C.; SIMÓN, C.; VIDAL, F.; RODRIGO, L.; PEHLIVAN, T.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. (2003). «Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples». *Hum. Reprod.*, 18:182-188.
- SANTALÓ, J.; ESTOP, A. M.; EGOZCUE, J. (1986). «The chromosome complement of first cleavage mouse embryos after in vitro fertilization». *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer.*, 3:99-105.
- STAESSEN, C.; PLATTEAU, P.; VAN ASSCHE, F.; MICHIELS, A.; TOURNAYE, H.; CAMUS, M.; DEVROEY, P.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. (2004). «Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial». *Hum. Reprod.*, 19:2849-2858.
- SILBER, S.; ESCUDERO, T.; LENAHAN, K.; ABDELHADI, I.; KILANI, Z.; MUNNÉ, S. (2003). «Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction». *Fertil. Steril.*, 79:30-38.
- WILTON, L.; VOULLAIRE, L.; SARGEANT, P.; WILLIAMSON, R.; MCBAIN, J. (2003). «Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure». *Fertil. Steril.*, 80:860-868.
- ZENZES, M. T.; CASPER, R. F. (1992). «Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization». *Hum. Genet.*, 88:367-375.