

## DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTS AMB MEIOSI MASCULINA ALTERADA

Montserrat Sabaté,<sup>1\*</sup> Begoña Aran,<sup>1</sup> Francesca Vidal,<sup>2</sup> Mònica Parriego,<sup>1,2</sup> Anna Veiga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Institut Universitari Dexeus. Passeig Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona. Tel. 932 274 700. Fax. +34 932 057 966. Adreça electrònica: [monsab@dexeus.com](mailto:monsab@dexeus.com).

<sup>2</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

---

### Resum

Les indicacions per al diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) han augmentat en els últims anys. En aquest treball s'estudia si les parelles afectades de meiosi masculina alterada sotmeses a cicles de fecundació *in vitro* (FIV) milloren els resultats amb la selecció dels embrions amb DGP. També s'avalua la morfologia dels embrions diagnosticats com a normals enfront dels anormals. Les taxes d'embaràs per transferència (46,6 vs. 43,9%) i implantació (29,6% vs. 23,5%) són més altes en el grup de pacients amb meiosi alterada i DGP que en el grup control (meiosi alterada però sense DGP), però no de manera significativa. Tampoc trobem diferències significatives pel que fa a la morfologia dels embrions normals respecte dels anormals. Així doncs, tot i que els pacients amb meiosi alterada presenten una alta proporció d'anomalies cromosòmiques, no es troba una millora dels resultats si s'aplica DGP. Una possible estratègia seria buscar sondes específiques per a aquests pacients.

**Paraules clau** DGP, meiosi alterada, morfologia embrionària.

### Abstract

**Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities** Indications for preimplantation genetic diagnosis (PGD) have increased recently. This study evaluates if couples undergoing *in vitro* fertilization (IVF) because of male meiotic abnormalities can improve results by selecting embryos through PGD. We also analyze embryo morphology in those normal diagnosed embryos versus abnormal ones. Pregnancy per transfer (46.6% vs. 43.9%) and implantation rates (29.6% vs. 23.5%) were higher in the group with meiotic abnormalities and PGD compared with the group with meiotic abnormalities but without PGD, although no significant differences were found. No statistically significant differences in morphology were observed between normal and abnormal embryos. Even though patients with meiotic abnormalities obtain a high frequency of chromosome abnormalities, no improvements in the results are obtained after PGD. A possible strategy could be found more specific probes for these patients.

**Key words** PGD, meiotic abnormalities, embryo morphology.

---

La primera aplicació clínica del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) es remunta a quinze anys enrere. Des de llavors, les indicacions per a aplicar el DGP han augmentat considerablement, no solament per a evitar la transmissió d'anomalies genètiques als descendents, sinó també per a millorar els resultats de fecundació *in vitro* (FIV) en determinats grups de pacients (Gianaroli *et al.*, 1999). Un d'aquests grups de parelles que es podria veure beneficiat per l'aplicació

d'aquesta tècnica és aquell que presenta una meiosi masculina alterada (Aran *et al.*, 2002, 2004).

Les anomalies meiotiques són alteracions limitades a la línia germinal que es produeixen durant l'aparellament i recombinació dels bivalents durant la meiosi, en la gametogènesi (revisat per Egozcue *et al.*, 2000). Si es produeixen durant l'oogènesi, només és possible estudiar-les a través del DGP dels embrions. En el cas que el problema sigui en la meiosi masculina, la millor via d'estudi és a partir de l'anàlisi citogenè-

tica d'espermatoïcits obtinguts per biòpsia testicular. La importància determinant del resultat fa que s'inclouï en alguns protocols d'escaneig de la infertilitat masculina.

Segons Egozcue *et al.* (1983) un 6% dels pacients estèrils presenta anomalies meiòtiques. Aquest percentatge augmentava fins al 17% en pacients amb oligoastenoteratozoospermia (OAT) i al 66% en aquells pacients en què el comptatge d'espermatozoides era inferior a  $1 \times 10^6$  esp/ml, fet que justifica l'estudi citogenètic en pacients amb oligospermia greu (Vendrell *et al.*, 1999; Egozcue *et al.*, 2000).

Així doncs, les indicacions que ens poden fer sospitar d'una meiosi anòmala són un seminograma alterat, però també errades d'implantació, mala morfologia embrionària, avortaments de repetició o esterilitat de llarga evolució.

Tenint en compte el risc que tenen aquests pacients amb meiosi alterada de produir espermatozoides cromosòmicament anormals, l'aplicació del DGP podria ser útil per a ells. En aquest context, l'anàlisi citogenètica d'aquests embrions i la posterior transferència dels diagnosticats com a normals per a les sondes estudiades podria portar a un augment de les taxes d'implantació i embaràs, i també a una disminució de naixements amb anomalies genètiques. Així doncs, el DGP es va introduir com a tractament en parelles amb factor masculí greu associat a anomalies meiòtiques, per tal d'avaluar si el seu ús resultava en una millora dels èxits en reproducció assistida.

Des que el 1992 es va publicar el primer embaràs a partir d'ICSI, aquesta tècnica ha esdevingut un mètode per a tractar les esterilitats greus de causa masculina, ja que permet saltar algunes fases del procés de fecundació, però continua el debat pel risc implícit que té de transmetre alteracions genètiques d'origen masculí (Meschede *et al.*, 1997). Teòricament, aquest risc podria estar augmentat en pacients amb OAT amb meiosi alterada, per la possibilitat de generar embrions cromosòmicament anormals a causa de la microinjecció d'espermatozoides alterats.

En aquest treball ens centrarem en l'estudi de les parelles en les quals l'home és el portador d'aquestes alteracions. Compararem la morfologia embrionària, les taxes d'implantació i embaràs en parelles amb meiosi masculina alterada a les quals s'ha realitzat l'estudi de DGP, enfront d'un grup control, el qual també presenta anomalies meiòtiques, però que s'ha sotmès a cicles de FIV-ICSI sense DGP.

## MATERIALS I MÈTODES

El grup estudi (grup A) inclou quaranta-quatre parelles que van arribar al Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus per consultes d'esterilitat i a les quals es diagnosticà en l'home una oligoastenoteratozoospermia i anomalies meiòtiques a partir de l'estudi citogenètic. Aquestes parelles se sotmeten a quaranta-nou cicles de FIV-ICSI-DGP-SA (escaneig d'aneuploidies). El grup control (grup B) està format per quaranta-quatre parelles que també presenten oligoastenoteratozoospermia i meiosi alterada, i els practiquen seixanta-sis cicles de FIV-ICSI, però sense DGP.

L'estimulació fol·licular, la punció fol·licular, la preparació de les mostres seminals i dels oòcits, la microinjecció intracitoplasmàtica, la comprovació de la fecundació, el cultiu, la transferència i la criopreservació embrionària, el suport durant la fase lútea i la valoració de l'embaràs es fan seguint procediments anteriorment descrits del Servei (Calderón *et al.*, 1995).

L'estudi citogenètic de meiosis s'indica seguint el protocol del Servei, d'acord amb el criteri andrològic. La mostra a estudiar s'obté en tots els casos a partir de biòpsia testicular unilateral amb anestèsia local. La mostra es processa d'acord amb la tècnica d'Evans *et al.*, (1964).

La valoració de la morfologia embrionària el dia 3 es fa seguint l'*score* del laboratori mateix, que té en compte la taxa de divisió, la simetria cel·lular i el grau de fragmentació. El resultat és un valor comprès entre el 0 i el 10, i el 10 és la valoració màxima per embrió.

## DGP

La biòpsia embrionària es fa a partir del dia 3. Cada embrió es manipula individualment en medi EB (Vitrolife, Göteborg, Suècia) recobert d'oli (Ovoil, Vitrolife). La zona pellúcida es forada (25-30  $\mu$ m de diàmetre) amb làser, per fototermòlisi (Fertilase). El blastòmer s'aspira suaument amb una pipeta de vidre (Humagen, Charlottesville, EUA) i es fixa amb una lleugera modificació del mètode de Tarkowski (1966).

Els blastòmers es processen per escaneig d'aneuploidies (Vidal *et al.*, 1998). Per a l'avaluació dels cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X i Y s'usa un panell de sondes PB multicolor seguit d'una segona ronda de FISH amb sondes de DNA satèl·lit per als cromosomes X i Y (Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA).

La transferència dels embrions del grup A que es diagnostiquen com a normals per a les sondes estudiades es transfereixen el dia 5. Els embrions normals

**Taula 1** Característiques generals i resultats dels cicles de FIV de les parelles amb anomalies meiòtiques amb i sense DGP.

	<b>Grup A</b> (anomalies meiòtiques amb DGP)	<b>Grup B</b> (anomalies meiòtiques sense DGP)
Nre. parelles	44	44
Nre. cicles	49	66
Mitjana edat home (rang)	34,7 (27-51)	34,9 (21-59)
Mitjana edat dona (rang)	31,9 (24-39)	33,1 (20-41)
Mitjana oòcits recuperats (total)	17,3 (848)	13,9 (916)
Mitjana oòcits 2PN (total)	10,0 (491)	7,5 (496)
Taxa fecundació	74,5 %	67,5 %
Transferències	45	66
Mitjana nre. embrió/transfer.	1,9	2,8
Nre. embarassos	21	29
Taxa embaràs/dona	47,7 %	65,9 %
Taxa embaràs/transfer.	46,6 %	43,9 %
Taxa embaràs/cicle	42,8 %	43,9 %
Taxa d'implantació	29,6 %	23,5 %
Nre. avortaments (%)	5 (23,8 %)	3 (10,3 %)

sobrants que arriben fins a l'estadi de blastocist es criopreserven. En el grup control els embrions es transfereixen el dia 2, d'acord amb el protocol normal del laboratori.

La comparació estadística entre els dos grups es fa amb el test d'exactitud de Fisher al 5 % de significació.

## RESULTATS

A la taula 1 trobem descrites les característiques generals de les parelles i els resultats dels cicles de FIV-ICSI. En el grup A (parelles que fan FIV amb DGP), la mitjana d'edat de les dones és de 31,9 anys. La mitjana d'edat dels homes és de 34,7 anys. Es van recuperar un total de 848 oòcits (mitjana de 17,3), dels qual es van microinjectar 659 (mitjana de 10,0). 491 (74,5 %) van presentar dos pronuclis a les 16-20 h post-microinjecció. En el grup B (grup control sense DGP), la mitjana d'edat de les dones era de 33,1 anys i la dels l'homes 34,9 anys. Es van recuperar 916 oòcits (mitjana de 13,9), 735 oòcits van ser microinjectats (mitjana d'11,1) i es va observar la presència de dos pronuclis en 496 (67,5 %).

En el grup A, es van fer quaranta-cinc transferències, amb una mitjana de 1,9 embrions/transferència, de les quals hi va haver vint-i-un embarassos. Això significa un 29,6 % de taxa d'implantació, un 42,8 % d'embaràs/cicle i un 46,6 % d'embaràs/transferència. Cinc embarassos (un 23,8 %) varen acabar en avortament. En el grup B, es van aconseguir vint-i-nou embarassos de seixanta-sis cicles de FIV-ICSI, la qual

cosa significa una taxa d'implantació del 23,5 %, i unes taxes d'embaràs/cicle i embaràs/transferència del 43,9 %. La taxa d'avortament va ser del 10,3 %.

A la taula 2 se sintetitzen els resultats de DGP realitzats a les parelles pertanyents al grup A. Es van biopsiar 424 embrions, 344 dels quals van poder ser analitzats (81,1 %). 161 embrions eren normals per als cromosomes analitzats (46,8 % dels analitzats, 51,6 % dels diagnosticats), mentre que 151 van resultar anormals (43,8 % dels analitzats, 48,4 % dels diagnosticats). En trenta-dos embrions no es va aconseguir un diagnòstic, en la majoria dels casos per resultats no informatius d'algun parell de cromosomes. A causa de les característiques del nucli després de la fixació, vuitanta embrions no es van poder analitzar.

La taula 3 presenta els resultats en percentatge de la valoració de la morfologia embrionària en dies posteriors al 3. Dins del grup d'embrions diagnosticats com a normals per a les sondes usades, trobem un 61,3 % d'embrions amb qualitat considerada com a òptima o força òptima (8-10), un 29,9 % d'embrions de qualitat regular (5-7) i un 8,8 % d'embrions de mala qualitat (< 5). Dels embrions anormals, el 51,5 % dels embrions són de qualitat òptima o força bona, el 35,4 % presenta una qualitat regular i el 13,1 % són embrions de baixa qualitat.

No es van trobar diferències significatives en les taxes d'embaràs, implantació ni avortament entre els dos grups. Tampoc en la comparació morfològica dels embrions.

**Taula 2** Resultats de l'anàlisi dels embrions.

Nre. cicles	49
Nre. embrions biopsiats	424
Nre. embrions analitzats	344 (81,1 %)
Nre. embrions diagnosticats	312 (90,7 %)
Nre. embrions normals	161 (51,6 %)
Nre. embrions anormals	151 (48,4 %)
Nre. embrions sense diagnòstic	32 (9,3 %)

**Taula 3** Morfologia embrionària dels embrions normals i anormals.

Puntuació	10	9	8	7	6	5	< 5
Normals (%)	19,7	14,6	27,0	7,3	16,0	6,6	8,8
Anormals (%)	10,8	11,5	29,2	16,1	13,1	6,2	13,1

## DISCUSSIÓ

De les dades d'aquesta sèrie deduïm que els pacients amb meiosi alterada sotmesos a ICSI-DGP presenten una alta taxa d'anomalies cromosòmiques (48,4%), una mica més elevada que l'observada per Kahraman el 2002 (41,3%) quan va realitzar DGP en pacients amb causa masculina greu.

En comparació amb les taxes d'anormalitat publicades en estudis sobre DGP per a altres indicacions, aquestes són més baixes, tot i haver usat les mateixes sondes (Silber *et al.*, 2003). Això podria explicar-se perquè potser aquest grup de pacients presenta aneuploidies en altres cromosomes que no són els estudiats i, per tant, s'hauria d'avaluar si seria més indicat l'ús d'altres sondes que podrien caracteritzar millor aquest grup. A més, seria necessari ajustar les sondes a utilitzar per cada indicació de DGP.

Tot i no ser significatives, la taxa d'implantació i d'embaràs per transferència són més altes en les parelles del grup A (parelles amb anomalies meiotiques sotmeses a DGP), en les quals es transferien embrions considerats normals per als cromosomes estudiats. Si fos possible seleccionar els embrions normals a partir de l'ús de les sondes adequades, les taxes d'embaràs i implantació potser podrien arribar a augmentar de manera estadísticament significativa. Encara que tampoc no sigui significativa, l'elevada taxa d'avortament s'explicaria per la baixa mida poblacional.

Del fet que la comparació de la valoració morfològica embrionària en dies posteriors al 3 no presenti unes diferències estadísticament significatives es conclou que no ens podem basar en cap criteri morfològic per a inferir la normalitat cromosòmica dels embrions que provenen de pacients amb meiosi alterada, fet que reforça l'opció d'aplicar el DGP en aquests casos.

És molt important l'escaneig exhaustiu dels pacients

abans que aquests se sotmetin a cicles de FIV, per tal d'informar-los i assessorar-los correctament del risc genètic. Això fa que els estudis de meiosi siguin molt recomanables i, per tant, hauria d'estar considerat com a part de l'estudi genètic en aquest grup de pacients.

Correlacions entre aquests estudis i els resultats amb sèries més grans i aleatòries de pacients ajudaran a determinar la utilitat real del DGP en parelles amb OAT greu i meiosi alterada. Els resultats obtinguts amb els estudis genètics han de servir per a donar consell genètic als pacients i valorar l'aplicació de DGP en aquells casos en què el risc genètic sigui més elevat, per tal d'augmentar la probabilitat de transferència d'embrions cromosòmicament normals i les taxes d'embaràs.

## BIBLIOGRAFIA

- ARAN, B.; VEIGA, A.; VIDAL, F. [*et al.*] (2004). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities». *Reproductive BioMedicine Online*, 8:470-476.
- ARAN, B.; VIDAL, F.; VENDRELL, J. M. [*et al.*] (2002). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with meiotic abnormalities». *18<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Viena, Àustria*. [Abstract p-156]
- CALDERON, G.; BELIL, I.; ARÁN, B. [*et al.*] (1995). «Intracytoplasmic sperm injection versus conventional *in vitro* fertilization: first results». *Human Reproduction*, 10:2835-2839.
- EGOZCUE, J.; TEMPLADO, C.; VIDAL, F. [*et al.*] (1983). «Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males». *Human Genetics*, 65:185-188.
- EGOZCUE, S.; VENDRELL, J. M.; GARCÍA, F.; *et al.* (2000). «Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17:307-309.
- EVANS, E. P.; BRECKON, G.; FORD, C. E. (1964). «An air-drying method of meiotic preparations from mammalian testes». *Cytogenetics*, 3:289-294.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, M. C.; FERRARETI, A. P. (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». *Fertility and Sterility*, 72:837-844.
- KAHRAMAN, S.; KUMTEPE, Y.; SERTYEL, S.; *et al.* (2002). «Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility». *Human Reproduction*, 17:3193-3200.
- MESCHEDE, D.; HORST, J. (1997). «Genetic counselling for infertile male patients». *International Journal of Andrology*, 20:20-30.
- SILBER, S.; ESCUDERO, T.; LENAHAN, K. [*et al.*] (2003). «Chromosomal abnormalities in embryos derived from

- testicular sperm extraction». *Fertility and Sterility*, 79:30-38.
- TARKOWSKI, A. K. (1966). «An Air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs». *Cytogenetics*, 5:394-400.
- VENDRELL, J. M.; GARCÍA, F.; VEIGA, A.; *et al.* (1999). «Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia». *Human reproduction*, 14:375-378.
- VIDAL, F.; GIMENEZ, C.; RUBIO, C. [*et al.*] (1998). «Fish preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15:310-313.