

ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN EMBRIONS PROCEDENTS DE CICLES DE MADURACIÓ *IN VITRO*

Dolores Tuñón,¹ Mònica Parriego,¹ Gemma Arroyo,¹ Montse Boada,¹ Rosa Tur,¹ Pere N. Barri¹ i Anna Veiga^{1,2}

¹Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.
Gran Via Carles III, 71-73. 08028 Barcelona. doltun@dexeus.com.

²Banc de Línies Cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

Objectius: L'objectiu de l'estudi ha estat conèixer la dotació cromosòmica dels embrions descartats en cicles de maduració *in vitro* (MIV). **Material i mètodes:** Trenta embrions considerats no aptes per a la transferència o congelació procedents de cicles de MIV van ser analitzats cromosòmicament mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH). **Resultats:** Es va observar una elevada taxa d'embrions multinucleats (86,7 %). Únicament un 10 % dels embrions van resultar normals per als cromosomes analitzats. Tots els embrions anormals amb més d'una cèl·lula diagnosticada (73,3 %) van ser classificats com a mosaics caòtics. **Conclusions:** El deficient desenvolupament embrionari i la relativament baixa taxa d'implantació observada en els cicles de MIV sembla que es relaciona amb un increment de la incidència d'anomalies cromosòmiques. La utilitat del cribratge d'aneuploidies en cicles MIV per determinar l'estat cromosòmic dels embrions transferits hauria de ser valorada.

Paraules clau: maduració *in vitro*, anomalies cromosòmiques, hibridació *in situ* fluorescent, aneuploidia.

Abstract

Background: The objective of this study was to assess the chromosomal constitution of discarded embryos derived from *in vitro* maturation cycles (IVM). **Material and methods:** Thirty embryos considered as unsuitable for transfer or cryopreservation from IVM cycles were analysed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Results:** A high percentage of multinucleated embryos (86.7%) was observed. Only 10% of the embryos were normal for the chromosomes analysed. All the abnormal embryos with diagnosis in more than one cell (73.3%) were chaotic mosaics. **Conclusions:** Poor embryonic development and low implantation rates can be related to the high incidence of chromosomal abnormalities found in IVM embryos. The usefulness of aneuploidy screening (PGS) in IVM cycles should be ascertained.

Key words: *in vitro* maturation, chromosomal abnormalities, fluorescence *in situ* hybridization, aneuploidy.

INTRODUCCIÓ

La tècnica de maduració *in vitro* d'òcits es presenta actualment com una alternativa a la fecundació *in vitro* (FIV) convencional per a determinats grups de pacients, com ara dones amb risc d'hiperestimulació ovàrica o en aquelles diagnosticades de síndrome d'ovari policístic (SOP) (Li *et al.*, 2006; Tur *et al.*, 2007). Tot i que els resultats quant a taxes d'implantació (8 % vs. 22 %) i embaràs (25 % vs. 50 %) obtingudes són inferiors a les de FIV convencional (Li *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 2007), els avantatges amb la simplificació del tractament i la disminució del risc d'hiperestimulació per a les pacients amb SOP han fet que sigui una tècnica d'aplicació creixent.

Ja Edwards i col·laboradors van demostrar que els òcits humans en estadis immadurs podien assolir l'estadi de metafase i fora de l'ambient preovulatori (Edwards, 1965), però l'aplicació clínica de la MIV ha anat lligada al desenvolupament de medis de cultiu específics que afavoreixen la maduració dels òcits al laboratori. Per tal que els òcits immadurs assoleixin l'estadi de metafase II (MII) és essencial que es doni tant la maduració nuclear com la citoplasmàtica. Una asincronia entre els dos processos s'ha relacionat amb una disminució de la capacitat de desenvolupament i un increment de les anomalies cromosòmiques en els embrions resultants, ja sigui per defectes del fus meiótic o per alteració en la síntesi o funcionament de proteïnes citoplasmàtiques

(DeScisciolo *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2000). Tot i això, poc es coneix encara de la constitució cromosòmica dels embrions obtinguts per MIV.

En el present estudi s'ha analitzat la constitució nuclear i cromosòmica d'embrions procedents de cicles MIV no utilitzables per a transferència o criopreservació.

MATERIAL I MÈTODES

Es van incloure un total de set cicles de MIV realitzats entre març de 2008 i gener de 2009 en el nostre centre. Les pacients van seguir protocols de cicle espontani o d'estimulació mínima amb rFSH segons les seves característiques (Tur *et al.*, 2007). La punció ovàrica es va dur a terme a les 36 h post hCG. Els oòcits van ser classificats al laboratori segons el seu grau de maduresa i aquells que van resultar immadurs es van cultivar *in vitro* entre 24 i 76 hores fins que van assolir l'estadi MII (Arroyo *et al.*, 2007). Només els oòcits madurs van ser inseminats per microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI). La valoració de la fecundació i del desenvolupament embrionari es va efectuar segons protocols estandaritzats. La transferència embrionària i la congelació van realitzar-se en el tercer dia de cultiu.

Un total de 30 embrions van ser considerats no aptes i van ser inclosos en l'estudi després d'obtenir el consentiment escrit de la parella. Els motius per ser descartats van ser: retard o aturades en la divisió cel·lular, presència de multinucleació en alguna cèl·lula o bé elevat percentatge de fragmentació citoplasmàtica. Els embrions analitzats van ser tractats amb pronasa per induir la hidròlisi de la zona pel·lúcida i posteriorment els blastòmers van ser aïllats utilitzant un medi sense cations divalents (PBS sense Ca ni Mg). Cada blastòmer es va fixar de manera individualitzada en un portaobjectes prèviament desengreixat mitjançant la tècnica de Tarkovski modificada utilitzant un microscopi invertit. L'anàlisi cromosòmica es va dur a terme mitjançant FISH utilitzant un *kit* comercial que permet el diagnòstic simultani de cinc cromosomes: 13, 16, 18, 21 i 22 (MultiVysion PB Probe, Abbot®). Es van analitzar els portaobjectes hibridats mitjançant microscopi d'epifluorescència (Olympus BX61) equipat amb filtres específics.

RESULTATS

Dels 7 cicles de MIV estudiats es van recuperar un

total de 110 oòcits ($15,7 \pm 8,5$ oòcits/pacient). L'edat mitjana de les pacients era de 32,3 anys. Dos dels 110 oòcits es van recuperar en estadi de MII, mentre que 108 van resultar vesícules germinals (VG). 79 VG van madurar fins a MII (73,1 %): 49/79 van fer-ho durant les 24 primeres hores de cultiu, 29/79 durant les 48 hores i 1/79 no ho va fer fins a les 76 hores. La taxa de fecundació obtinguda en els oòcits madurats *in vitro* va ser del 69,6 %. Un total de 30 embrions van ser considerats no aptes (54,5 %).

Es van fixar un total de 122 blastòmers. D'aquests, 23 (18,9 %) van mostrar un únic nucli, 51 (41,8 %) presentaven diversos nuclis o múltiples fragments de cromatina, 38 (31,1 %) van resultar anucleats, en nou casos (7,4 %) es van obtenir cromosomes, i es va perdre un únic blastòmer (0,8 %) durant la fixació. El percentatge d'embrions amb alguna cèl·lula multinucleada va resultar del 86,7 %. Només tres embrions (10 %) van resultar cromosòmicament normals per als cromosomes estudiats. Tots tres embrions procedien d'oòcits que havien assolit l'estadi de MII després de 24 hores de cultiu. Tots els embrions amb diagnòstic anormal en més d'una cèl·lula analitzada mostraven un complement cromosòmic a l'atzar i van ser classificat com a mosaics caòtics (22/30, 73,3 %).

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Segons les nostres dades, el percentatge d'embrions descartats en els cicles de MIV és més elevat que l'obtingut en el programa de FIV (54,5 % vs. 32,2 %, dades de l'IU Dexeus). Aquests resultats coincideixen amb els descrits per altres grups (Vlaisavljević *et al.*, 2006). En general en els cicles de MIV els embrions presenten una menor qualitat, una elevada multinucleació i un increment d'anomalies cromosòmiques (Nogueira *et al.*, 2000). S'han suggerit com a possibles causes els defectes en la divisió meiótica, tals com una alteració del fus meiótic en la metafase, que interferiria en la segregació cromosòmica alterada incrementant la taxa d'aneuploidies, encara que hi ha certa controvèrsia en els resultats (Boiso *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006).

La disminució de la qualitat embrionària pot estar relacionada amb una incorrecta maduració oocitària al citoplasma. La immaduresa citoplasmàtica implica una falta d'estructures essencials, necessàries per a un correcte desenvolupament (Combelles *et al.*, 2002).

L'origen de la multinucleació observada en els

embrions de cicles MIV pot ser molt divers. Pot ser deguda a una fragmentació parcial del nucli en la interfase, a la dissociació entre cariocinesi i citocinesi o bé a un defecte en la segregació cromosòmica durant l'anafase mitòtica (Kligman *et al.*, 1996; Staessen *et al.*, 1998). Tal i com hem vist en el nostre estudi, la presència de multinucleació es correlaciona amb l'increment d'anomalies cromosòmiques i amb un alt percentatge de cèl·lules anucleades (31,2 %).

La utilitat del cribratge d'aneuploidies en cicles MIV (Ao *et al.*, 2006) s'hauria de valorar en els casos en què hi hagués un nombre mínim d'embrions per analitzar. D'altra banda, caldria ampliar les dades sobre la constitució cromosòmica dels embrions transferits.

Cal aconseguir millorar les condicions de cultiu per MIV per tal d'assolir una maduració citoplasmàtica i nuclear adequada, que resulti en oòcits competents i embrions amb un elevat potencial de desenvolupament i implantació.

BIBLIOGRAFIA

- AO, A.; JIN, S.; RAO, D.; SON, W. Y.; CHIAN, R. C. (2006). «First successful pregnancy outcome after preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in embryos generated from natural-cycle in vitro fertilization combined with an in vitro maturation procedure». *Fertil. Steril.*, 86(5): 1510-1511.
- ARROYO, G.; BELIL, I.; MARTÍNEZ, F.; TUR, R.; CARRERAS, O.; BOADA, M.; VEIGA, A. (2007). «Primer nacimiento en España después de la transferencia de embriones procedentes de ovocitos madurados in vitro». *Rev. Iberoamer. Fertil.*, 2: 125-130.
- BOISO, I.; MÁRQUEZ, C.; VEIGA, A.; MUNNÉ, S. (1998). «Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes». *Assist. Reprod. Rev.*, 7: 160-164.
- COMBELLES, C. M.; CEKLENIK, N. A.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D. F. (2002). «Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes». *Hum. Reprod.*, 17(4): 1006-1016.
- DESCISCILO, C.; WRIGHT, D. L.; MAYER, J. F.; GIBBONS, W.; MUASHER, S. J.; LANZENDORF, S. E. (2000). «Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17(5): 284-292.
- EDWARDS, R. G. (1965). «Maturation in vitro of human ovarian oocytes». *Lancet*, 2: 926-929.
- KLIGMAN, I.; BENADIVA, C.; ALIKANI, M.; MUNNE, S. (1996). «The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities». *Hum. Reprod.*, 11(7): 1492-1498.
- LI, Y.; FENG, H. L.; CAO, Y. J.; ZHENG, G. J.; YANG, Y.; MULLEN, S.; CRITSER, J. K.; CHEN, Z. J. (2006). «Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro». *Fertil. Steril.*, 85(4): 827-832.
- NOGUEIRA, D.; STAESSEN, C.; VELDE, H. VAN DER; STEIRTEGHEM, A. VAN (2000). «Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes». *Fertil. Steril.*, 74(2): 295-298.
- STAESSEN, C.; STEIRTEGHEM, A. VAN (1998). «The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres». *Hum. Reprod.*, 13(6): 1625-1631.
- TUR, R.; MARTÍNEZ, F.; ARROYO, G.; CARRERAS, O.; BELIL, I.; COROLEU, B.; VEIGA, A. (2007). «Estado actual de la maduración in vitro (MIV)». *Rev. Iberoamer. Fertil.*, 2: 113-122.
- VLAISAVLJEVIĆ, V.; CIZEK-SAJKO, M.; KOVAC, V. (2006). «Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes». *Fertil. Steril.*, 86(2): 487-489.
- WANG, W. H.; KEEFE, D. L. (2002). «Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope». *Fertil. Steril.*, 78(5): 1077-1081.