

PARÀMETRES DE BON PRONÒSTIC EN CICLES DE DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

Sílvia Mateo,¹ Mònica Parriego,¹ Montserrat Boada,¹ Ventura Coroleu,¹ Pere N. Barri¹
i Anna Veiga^{1,2}

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.
Gran Via de Carles III, 71-75. 08028 Barcelona. silmat@dexeus.com.

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

Resum

L'anàlisi de les dades del cicles de fecundació *in vitro* és una font d'informació per la millora dels futurs tractaments. En el present estudi s'han avaluat 54 cicles de diagnòstic genètic preimplantacional / cribratge genètic preimplantacional (DGP/SGP), amb taxa d'implantació del 100 % per determinar quins paràmetres són indicadors del potencial d'èxit d'un cicle. En aquestes pacients es va observar una bona resposta ovàrica (valor mitjà de E₂ el dia de la hCG: 2.648,5 pg/m) i un bon desenvolupament embrionari en dia 2 (83,3 % dels embrions amb ≥ 4 cèl·lules i ≤ 25 de fragmentació citoplasmàtica), en dia 3 (79,6 % dels embrions amb ≥ 8 cèl·lules i ≤ 25 de fragmentació) i en el dia 5, en què tots els embrions transferits estaven en estadi de mòrula o blastocist. Aquests resultats mostren que una bona estimulació ovàrica i un desenvolupament embrionari adequat són essencials per obtenir bons resultats en els cicles de DGP.

Paraules clau: diagnòstic genètic preimplantacional (DGP), qualitat embrionària, implantació, estimulació hormonal.

Abstract

Data from *in vitro* fertilization treatments is an appreciate source of information to improve the future cycles. In this study we evaluated 54 cycles of preimplantation genetic diagnosis and screening (PGD-PGS) with a 100% implantation rate, to elucidate which parameters can predict the final outcome of these cycles. It was observed a good ovarian response (mean level of E₂ the day of hCG administration: 2,648.5 pg/m) and a good embryo development on day 2 (83,3% of the embryos with ≥ 4 cells and ≤ 25 of cytoplasmatic fragmentation), on day 3 (79,6% of the embryos with ≥ 8 cells and ≤ 25 of cytoplasmatic fragmentation) and on day 5, where all embryos transferred were either on morula or blastocyst stage. These results demonstrate that a good ovarian stimulation and an adequate embryo development are essential to achieve good results in PGD-PGS cycles.

Key words: preimplantation genetic diagnosis and screening (PGD-PGS), embryo quality, implantation, hormonal stimulation.

INTRODUCCIÓ

La tècnica de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) s'ha convertit en els darrers anys en una part important dels programes de fecundació *in vitro* (FIV).

Des dels inicis de la seva aplicació, diversos autors han buscat la relació entre el desenvolupament del embrions cultivats *in vitro* i la seva dotació cromosòmica. Sabem, gràcies a aquests estudis, que factors com el retard en la divisió cel·lular (Magli *et al.*, 2007), la presència de fragmentació citoplasmàtica (Alikani *et al.*, 1999) o de cèl·lules multinucleades (Balakier *et al.*, 1997; Munné, 2006) són factors

correlacionats amb un augment de les anomalies cromosòmiques.

L'objectiu d'aquest treball és analitzar retrospectivament les dades de 34 cicles de DGP en els quals es van obtenir el mateix nombre de sacs gestacionals que d'embrions transferits (taxa d'implantació del 100 %), per establir quines són les característiques que pronostiquen l'èxit d'un tractament.

MATERIAL I MÈTODES

Entre gener de 2002 i desembre de 2007 es van dur a terme 546 cicles de DGP en el nostre centre. Es van

incloure un total de 34 cicles en els quals es va aconseguir un embaràs de tants sacs gestacionals com embrions s'havien transferit. En aquests 34 cicles es van transferir un total de 54 embrions.

La mitjana d'edat de les pacients va ser de 32,8 anys (rang: 27-40). Les indicacions per a la inclusió en el programa de DGP/SGP van ser: factor masculí d'origen genètic ($n = 11$), reorganitzacions cromosòmiques ($n = 7$), malalties lligades al cromosoma X ($n = 6$), avortaments de repetició ($n = 4$), fallades repetides d'implantació ($n = 4$) i portadors de malalties gèniques ($n = 2$).

El protocol d'estimulació de l'ovulació, així com el cultiu de gàmetes i embrions, van ser els estàndards utilitzats en el nostre centre (Calderón *et al.*, 1995).

Els embrions es van biopsiar el tercer dia de desenvolupament mitjançant metodologia làser (Bodada *et al.*, 1998). Només els embrions amb cinc blastòmers o més i un màxim del 30 % de fragmentació citoplasmàtica van ser considerats aptes per a la biòpsia. Es van biopsiar un o dos blastòmers, tenint en compte les característiques del nucli fixat, així com el nombre de cèl·lules de l'embrió abans de la biòpsia. El mètode de fixació va ser el de Tarkowski lleugerament modificat (Santaló *et al.*, 1986) i els nuclis fixats van ser analitzats mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (FISH). Les sondes que es van utilitzar van ser les següents: en els casos de SGP es van realitzar dues rondes d'hibridació amb sondes específiques per als cromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y, (MultiVysion PB Probe Ref. 30-111085, Vysis® / X Y 15: *homemade*); en els casos de malalties lligades al cromosoma X es van emprar sondes específiques per als cromosomes sexuals i un autosome per al control de ploïdia; per detectar possibles productes desequilibrats en els embrions de pacients amb reorganitzacions cromosòmiques es va realitzar un disseny personalitzat amb sondes específiques per als cromosomes implicats en la reorganització. La detecció de malalties gèniques es va realitzar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) aplicant protocols específics per a cada cas.

En tots els casos la transferència dels embrions caracteritzats com a normals es va realitzar en dia +5.

La prova d'embaràs es va realitzar catorze dies després de la punció fol·licular mitjançant la quantificació de la β HCG en sang perifèrica. Dues setmanes més tard es va confirmar ecogràficament mitjançant la presència de batec cardíac.

RESULTATS

Cicles

Dels 34 cicles estudiats, el nivell mitjà d'estradiol el dia de l'administració de la hCG va ser de 2.648,5 pg/ml (rang: 840-5.862 pg/ml), i es va observar ecogràficament una mitjana de 15,9 fol·licles (rang: 6-32).

El dia de la punció fol·licular es van obtenir 15,1 oòcits madurs per pacient (rang: 3-44). La taxa de fecundació obtinguda va ser del 78,8 %.

Es va biopsiar una mitjana de 10,1 embrions per pacient (rang: 3-24), i es va obtenir com a resultat de l'anàlisi genètica que el 40,4 % dels embrions van resultar genèticament normals (mitjana de 4,1; rang: 1-10), el 47,4 % van ser anormals (mitjana: 4,8; rang: 0-12), i el 12,2 % no van tenir un diagnòstic conclouent (mitjana: 1,2; rang: 0-9).

Les transferències dels embrions diagnosticats com a normals/no afectes va realitzar-se el cinquè dia de desenvolupament, en estadi de mòrula o blastocist. Les transferències van ser selectives en un 67,6 % (24/34) dels casos, mentre que en un 32,4 % dels cicles (11/34) no es van poder seleccionar els embrions a transferir. La mitjana d'embrions transferits va ser de 1,6 per pacient.

De les 34 gestacions, 15 van resultar úniques, 18 van ser bessonades i un cicle va donar lloc a una gestació triple.

Embrions

Dels 54 embrions estudiats, el 94,4 % presentaven 2 pronuclis a les 18 hores (+2 h) postinseminació. Es va observar que si s'avaluaven els embrions a les 25 hores (+2 h), el 90 % presentava divisió primerenca (*early cleavage*, EC).

En dia 2 (48 h + 2 h) es va observar que el 83,3 % dels embrions presentaven un mínim de 4 cèl·lules (rang: 2-8) i un màxim del 25 % de fragmentació citoplasmàtica. El tercer dia de cultiu (72 h + 2 h) el 79,6 % dels embrions presentaven un mínim de 8 cèl·lules (rang: 6-16) i un màxim del 25 % de fragments citoplasmàtics (vegeu la taula 1).

El dia de la biòpsia embrionària (dia 3) només es van biopsiar els embrions amb ≥ 5 blastòmers i $\leq 30\%$ de fragments. Es va biopsiar una cèl·lula en el 31,5 % dels casos i dues en el 68,5 %. Dels 54 embrions, no es va observar cap embrió amb 6 cèl·lules en què s'hagués biopsiat més d'una cèl·lula.

El dia de la transferència embrionària (dia 5) el 88,9 % dels embrions estaven en estadi de blastocist

Taula 1. Estadi embrionari en dia 2 i 3 de desenvolupament

	< 4 blastòmers		4 blastòmers		> 4 blastòmers	
	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments
Dia 2	1 (2 %)	1 (2 %)	39 (72 %)	6 (11 %)	6 (11 %)	1 (2 %)
	< 8 blastòmers		8 blastòmers		>8 blastòmers	
	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments
Dia 3	8 (14,8 %)	2 (3,7 %)	28 (51,9 %)	3 (5,55 %)	10 (18,5 %)	3 (5,55 %)

Taula 2. Estadi embrionari previ a la transferència (dia 5)

	Mòrula	Blastocist inicial	Blastocist expandit	Blastocist hatching
N (%)	6 (11,1)	17 (31,5)	4 (7,4)	27 (50)

(48/54), i l'11,1 % restant en estadi de mòrula (6/54) (vegeu la taula 2).

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Els resultats d'aquest treball posen de manifest que els cicles i els embrions estudiats són d'òptima qualitat, tant pel que fa a les característiques de les pacients com a la resposta a l'estimulació ovàrica i l'evolució embrionària. Aquests paràmetres afavoreixen la recuperació d'un nombre elevat d'òcits competents, de manera que els embrions que s'obtenen resulten de bona qualitat i amb un elevat potencial de desenvolupament.

S'ha observat que el percentatge d'embrions normals del nostre grup d'estudi és lleugerament superior al general descrit dels cicles de SGP en la literatura (35,8 %, Goossens *et al.*, 2008). El fet que la mitjana d'edat de les pacients incloses en l'estudi sigui més jove, seria l'explicació més factible. El fet de disposar d'un nombre superior d'embrions caracteritzats com a normals permet realitzar una doble selecció genètica i morfològica en el moment de la transferència, que es reflecteix en un alt percentatge d'embrions transferits en estadi de blastocist.

Aquest estudi és una aproximació preliminar per intentar dilucidar quins paràmetres poden predir l'èxit o no d'un cicle de DGP. Una bona elecció del protocol d'estimulació ovàrica, un cultiu embrionari optimitzat i una bona selecció embrionària en el moment de la transferència poden millorar els resultats dels cicles de DGP.

BIBLIOGRAFIA

- BOADA, M.; CARRERA, M.; IGLESIA, C. DE LA; SANDALINAS, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. (1998). «Successful use of laser for human embryo biopsy in preimplantational genetic diagnosis: report of two cases». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15: 302-307.
- CALDERÓN, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; MARTÍNEZ, F.; PARERA, N.; COROLEU, B.; PENELLA, J.; BARRI, P. N. (1995). «Intracytoplasmatic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results». *Hum. Reprod.*, 10: 2835-2839.
- GOOSSENS, V.; HARTON, G.; MOUTOU, C.; SCRIVEN, P. N.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; SERMON, K.; HARPER, J. C. (2008). «ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006». *Hum. Reprod.*, 23: 2629-2645.
- MAGLI, M. C.; GIANAROLI, L.; FERRARETTI, A. P.; LAPPI, M.; RUBERTI, A.; FARFALLI, V. (2007). «Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement». *Fertil. Steril.*, 87: 534-541.
- MUNNÉ, S. (2006). «Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos». *RBM Online*, 12: 234-253.
- 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.