

CRIBRATGE GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL PER A FACTOR MASCULÍ D'ORIGEN GENÈTIC

Anna Bujarrabal,¹ Natàlia Rives,¹ Mònica Parriego,¹ Josep M. Vendrell,¹ Montserrat Boada,¹
Francesca Vidal² i Anna Veiga^{1,3}

¹Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Barcelona.
ambuj@dexeus.com, natriv@dexeus.com.

²Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

³Banc de Línies Cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

L'objectiu del present estudi ha estat analitzar els resultats dels cicles de cribratge genètic preimplantacional (PGS, *preimplantation genetic screening*) per a factor masculí d'origen genètic. S'han analitzat 857 embrions procedents de 106 cicles de PGS per a aquesta indicació. Han estat avaluats els resultats finals dels cicles, així com la incidència i el tipus de les anomalies cromosòmiques presents en els embrions.

Paraules clau: anomalies cromosòmiques, espermatozoides, hibridació *in situ* fluorescent (FISH), meiosi, cribratge genètic preimplantacional (PGS).

Abstract

The aim of the present study was to analyze the results of preimplantation genetic screening (PGS) cycles due to a genetic male factor. 857 embryos from 106 PGS cycles have been studied. The final outcome as well as the incidence and type of the chromosomal abnormalities observed have been evaluated.

Key words: chromosome abnormalities, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), meiosis, preimplantation genetic screening (PGS), spermatozoa.

INTRODUCCIÓ

El cribratge genètic preimplantacional (PGS) consisteix en un cribratge cromosòmic d'embrions obtinguts per fecundació *in vitro* (FIV) abans de transferir-los a l'úter matern. La seva finalitat és reduir el risc de concepcions trisòmiques i d'avortament, així com millorar les taxes d'implantació mitjançant la selecció per a la transferència d'exclusivament embrions caracteritzats com a normals per als cromosomes analitzats. Aquesta tècnica està indicada per a parelles estèrils o infèrtils que es considera que produeixen un percentatge d'embrions cromosòmicament anormals superior a la població general: parelles amb avortaments de repetició, amb fallades repetides de FIV, dones d'edat avançada (Thornhill *et al.*, 2005). Des dels inicis de la seva aplicació, el nombre de casos de SGP ha augmentat considerablement (Goossens *et al.*, 2008). Un altre grup que s'ha incorporat més recentment entre els candidats a beneficiar-se del PGS són les parelles amb factor mas-

culí d'origen genètic (Aran *et al.*, 2004). El diagnòstic d'aquest factor pot veure's mitjançant estudis meiótics en teixit testicular o bé d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) en espermatozoides. Les anomalies meiótiques repercutiran en la producció d'espermatozoides (Egozcue *et al.*, 2005; Sarrate *et al.*, 2009) i els espermatozoides cromosòmicament anormals donaran com a conseqüència un augment del nombre d'embrions amb anomalies cromosòmiques en aquestes parelles.

L'objectiu del present estudi ha estat avaluar la incidència i el tipus de les anomalies cromosòmiques presents en els embrions procedents de cicles de PGS per a factor masculí d'origen genètic. S'ha intentat establir la possible correlació entre el resultat de l'estudi meiótic o de la FISH espermàtica i les anomalies cromosòmiques dels embrions.

Taula 1. Diagnòstic dels embrions segons la indicació de PGS per a factor masculí

Indicació	Nre. cicles	Embrions biopsiats	Embrions diagnosticats	Embrions normals	Embrions anormals
FISH anormal	15	107	95	28 (29,5 %)	67 (70,5 %)
Anomalies sinàptiques	77	628	588	211 (35,9 %)	377 (64,1 %)
Bloqueig meiótic	14	122	109	38 (34,9 %)	71 (65,1 %)
Totals	106	857	792	277/792 (35 %)	515/792 (65 %)

Taula 2. Tipus d'anomalies observades segons la indicació de PGS per a factor masculí

Indicació	Embrions anormals	Simplex	Complexes	Haploides	Poliploides
FISH anormal	67	15 (22,4 %)	29 (43,3 %)	11 (16,4 %)	12 (17,9 %)
Anomalies sinàptiques	377	151 (40,1 %)	151 (40,1 %)	41 (10,9 %)	34 (9,0 %)
Bloqueig meiótic	71	37 (52,1 %)	26 (36,6 %)	2 (2,8 %)	6 (8,5 %)
Totals	515	203 (39,4 %)	206 (40,0 %)	54 (10,5 %)	52 (10,1 %)

Taula 3. Cromosomes afectats en els embrions amb anomalies simples

	13	15	16	18	21	22	Sexuals
Nre. embrions	24	30	47	22	24	40	17
%	11,8	14,8	23,2	10,8	11,8	19,7	8,4

MATERIAL I MÈTODES

S'han analitzat retrospectivament els resultats obtinguts de 106 cicles de FIV-ICSI-PGS per al factor masculí de causa genètica realitzats en el nostre centre entre gener de 2004 i desembre de 2008.

En tots els casos es va realitzar prèviament un cariotip en sang perifèrica d'ambdós membres de la parella per descartar la presència d'anomalies cromosòmiques.

Les biòpsies testiculars es van realitzar amb anestèsia local i es van processar i analitzar segons es descriu a Egozcue *et al.* (1983). Els estudis de FISH en espermatozoides es van dur a terme d'acord amb el que es descriu prèviament a Vidal *et al.* (1993) i Blanco *et al.* (1996), i es van avaluar els cromosomes 13, 18, 21, X i Y.

Els protocols d'estimulació ovàrica, així com els de cultiu de gàmetes i embrions, van ser els utilitzats habitualment en el nostre centre (Barri *et al.*, 1993; Calderón *et al.*, 1995). La biòpsia embrionària, la fixació dels blastòmers i l'estudi citogenètic dels nuclis va realitzar-se segons procediments estandaritzats al nostre laboratori (Boada *et al.*, 1998). Van avaluar-se els cromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y mitjançant FISH.

Al cinquè dia de desenvolupament els embrions diagnosticats com a normals per als cromosomes analitzats i amb bona morfologia es van transferir o congelar. Van transferir-se un màxim de tres embri-

ons tenint en compte les característiques de la pacient i del cicle.

L'anàlisi estadística va realitzar-se mitjançant el programa SPSS. Es van aplicar els tests de Games-Howell i de *t*-Student per avaluar l'existència de diferències entre grups. La significació va establir-se en $p < 0,05$.

RESULTATS

Dels 106 cicles inclosos a l'estudi es van biopsiar un total de 857 embrions (mitjana de 8,1 embrions per cicle). Van ser diagnosticats 792 embrions (92,4 %): 277 van resultar cromosòmicament normals (35 %) i 515 foren anormals (65 %). De 65 embrions no es va poder obtenir un diagnòstic conclouent (7,6 %) (vegeu la taula 1). El 40 % dels embrions anormals (206/515) presentava anomalies numèriques complexes en què dos o més cromosomes es trobaven afectats, mentre que un 39,4 % (203/515) mostrava una aneuploidia simple. La resta d'embrions anormals van resultar haploides (54/515, 10,5 %) i poliploides (52/515, 10,1 %) (vegeu la taula 2). En les aneuploidies simples el cromosoma que es trobava afectat en un major percentatge de casos era el 16 (23,2 %), seguit del 22 (19,7 %) (vegeu la taula 3).

Segons el diagnòstic genètic del factor masculí es van establir tres grups: FISH en espermatozoides alterat (15 cicles, 14,2 %), anomalies sinàptiques (77

cicles, 72,6 %) i bloqueig meiótic (14 cicles, 13,2 %). La mitjana d'edat de les pacients va ser de 34 anys (rang: 21-45) i resultava comparable entre els tres grups. El percentatge d'embrions normals i anormals entre els diferents grups estudiats no va mostrar diferències estadísticament significatives (vegeu la taula 1). Tampoc no es van observar diferències significatives en el tipus d'anomalia observada en funció del grup (vegeu la taula 2).

Noranta-quatre dels 106 cicles van arribar a transferència (88,7 %). Es van transferir un total de 170 embrions ($\bar{x} = 1,8$), que van donar lloc a 30 embarassos (taxa d'embaràs per transferència: 31,9 %). La taxa d'implantació va ser del 21,8 % (37 sacs gestacionals/170 embrions transferits). La taxa d'embaràs múltiple va resultar del 20 % i la d'avortament del 16,7 %. No van trobar-se diferències estadísticament significatives entre els diferents grups d'estudi.

DISCUSSIÓ

Tot i que, segons les últimes dades publicades pel PGD Consortium de l'ESHRE, el factor masculí sever (FMS) és una indicació de pes per a la realització de PGS (~11 % dels casos de PGS, Goossens *et al.*, 2008), són poques les publicacions que aporten resultats detallats per a aquest grup de pacients i la comparació de les dades és difícil.

Els percentatges de normalitat cromosòmica de la nostra sèrie resulten lleugerament inferiors (35 % *vs.* 39,5 %) als del grup de FMS del Consortium (Goossens *et al.*, 2008). Això podria explicar-se per diferències en el nombre de cromosomes analitzats i també per l'heterogeneïtat dels pacients que probablement formen part del recull de l'ESHRE. El percentatge de cicles que arriba a transferència resulta superior en la nostra sèrie (88,7 % *vs.* 82,7 %). Això s'explicaria pel fet que en els nostres cicles es biopsia un nombre superior d'embrions (8,1 *vs.* 6,6). Els resultats pel que fa a taxes d'embaràs per cicle i per transferència (28,3 % i 31,9 % IU Dexeus *vs.* 26 % i 32 % Goossens *et al.*, 2008) resulten comparables, així com les taxes d'implantació (21,8 % *vs.* 23 %).

El percentatge d'anomalies complexes dels embrions de la nostra sèrie resulta superior al descrit en altres treballs en què s'analitzen embrions anormals de cicles de PGS (Abdelhadi *et al.*, 2003). Cal tenir en compte que una bona part dels nostres embrions possiblement haurien estat categoritzats com a mosaics si s'haguessin analitzat totes les cèl·lules, i això podria explicar aquestes diferències. Per altra banda,

no podem descartar que siguin degudes a un comportament peculiar dels casos de factor masculí d'origen genètic. S'ha trobat concordança amb les dades publicades pel que fa als cromosomes més implicats en la generació d'aneuploidia. En el nostre treball no s'han detectat diferències de comportament entre els tres grups de diagnòstic masculí. Tot i això, i a causa del baix nombre relatiu de casos inclosos en cada grup, caldria ampliar la sèrie per corroborar aquests resultats.

BIBLIOGRAFIA

- ABDELHADI, I.; COLLS, P.; SANDALINAS, M.; ESCUDERO, T.; MUNNÉ, S. (2003). «Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes». *Reprod. Biomed. Online*, 6(2): 226-231.
- ARAN, B.; VEIGA, A.; VIDAL, F.; PARRIEGO, M.; VENDRELL, J. M.; SANTALO, J.; EGOZCUE, J.; BARRI, P. N. (2004). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities». *Reprod. Biomed. Online*, 8(4): 470-476.
- BARRI, P. N. (1993). *Respuesta anómala a la estimulación de la maduración folicular en fecundación in vitro*. [Tesi doctoral]
- BLANCO, J.; EGOZCUE, J.; VIDAL, F. (1996). «Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization». *Hum. Reprod.*, 11: 722-726.
- CALDERON, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; MARTINEZ, F.; PARERA, N.; COROLEU, B.; PENELLA, J. (1995). «Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results». *Hum. Reprod.*, 10: 2835-2839.
- EGOZCUE, J.; SARRATE, Z.; CODINA-PASCUAL, M.; EGOZCUE, S.; OLIVER-BONET, M.; BLANCO, J.; NAVARRO, J.; BENET, J.; VIDAL, F. (2005). «Meiotic abnormalities in infertile males». *Cytogenetic and Genome Research*, 111: 337-342.
- EGOZCUE, J.; TEMPLADO, C.; VIDAL, F.; NAVARRO, J.; MORER-FARGAS, F.; MARINA, S. (1983). «Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males». *Hum. Genet.*, 65: 185-188.
- 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(12): 2629-2645.
- SARRATE, Z.; VIDAL, F.; BLANCO, J. (2009). «Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance». *Fertil. Steril.* [En premsa]
- THORNHILL, A. R.; DE DIE-SMULDERS, C. E.; GERAEDETS, J. P.; HARPER, J. C.; HARTON, G. L.; LAVERY, S. A.; MOUTOU, C.; ROBINSON, M. D.; SCHMUTZLER, A. G.; SCRIVEN, P. N.; SERMON, K. D.; WILTON, L. (2005). «ESHRE PGD Consortium 'Best

- practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)». *Hum. Reprod.*, 20: 35-48.
- VIDAL, F.; MORAGAS, M.; CATALÀ, V.; TORELLO, M. J.; SANTALO, J.; CALDERON, G.; GIMENEZ, C.; BARRI, P. N.; EGOZCUE, J.; VEIGA, A. (1993). «Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study». *Hum. Reprod.*, 8: 1740-1743.