

ESTUDIOS CROMOSOMICOS EN OVOCITOS Y ZIGOTOS HUMANOS DENTRO DE UN  
PROGRAMA DE FERTILIZACION "IN VITRO".

G. Calderon, A. Veiga, F. Martinez, P. N. Barri.

Servicio de Medicina de la Reproducción

Departamento de Obstetricia y Ginecología

Instituto Dexeus, Pº Bonanova, 67

08017 Barcelona

SUMMARY

Chromosome studies have been carried out in 536 oocytes and zygotes in our IVF programme.

The incidence of aneuploidy in unfertilized oocytes, taken as twice the level of hyperhaploidy, was 24%. The efficiency of the method in our series is 62,8%. 13 oocytes showed fragmented metaphase II chromosome. The incidence of unreduced oocytes, due to a lack of extrusion of the first polar body was 6,5%. Parthenogenesis was observed in 6 cases.

Thus the total number of potentially aneuploid, polyploid or non-viable zygotes due to chromosome aberrations in the oocyte was 35,5%.

folicular se realizó por Laparoscopia o por punción ecográfica transvaginal 35 horas después de la administración de HCG.

Los ovocitos fueron cultivados en Menezo B2 (Bio Merriex) durante 3 ó 4 horas antes de proceder a su inseminación con aproximadamente 100.000 espermatozoides móviles. Entre 17-20 horas después de la inseminación se procedió a la liberación, de forma mecánica, de los restos de células del cúmulo que habían quedado adheridas a los ovocitos y de esta forma observar los signos de fertilización.

La muestra estudiada consiste en (Tabla II):

- Ovocitos no fertilizados.
- Ovocitos polipenetrados
- Embriones degenerados.

Los ovocitos aparentemente no fertilizados y los embriones degenerados fueron procesados directamente para la obtención de preparaciones cromosómicas siguiendo el método propuesto por Tarkowski en 1966.

Los ovocitos polispermicos fueron cultivados previamente a su fijación con Sulfato de Vinblastina  $10^{-7}$  M en Menezo B2 durante 20 horas.

Las preparaciones cromosómicas fueron teñidas con Giemsa al 10% en buffer de Sorensen. A algunas preparaciones se les realizó bandas G. (Fig. 1).

Para calcular la incidencia de aneuploidia no se tuvieron en cuenta las metafases hipochaploides, para excluir los posibles artefactos de la técnica. De esta forma, el índice de aneuploidia se consideró como el doble de la hiperploidia.

## RESULTADOS

De los 265 ovocitos analizados (Tabla III), 127 resultaron ser aproximadamente haploides.

En 91 ovocitos no fertilizados se pudieron contar 23 cromosomas en metafase II y 11 ovocitos resultaron ser hiperhaploides (Fig. 2), lo que nos lleva a una tasa de aneuploidia del 24%.

- 13 ovocitos estaban en metafase II pero mostraban roturas cromosómicas o una fragmentación total.

- 17 ovocitos sin carpúsculo polar mostraron 2 n cromosomas en metafase II.

Se observó partenogénesis en 6 ovocitos.

La tabla IV muestra las características cromosómicas de 14 ovocitos aparentemente no fertilizados que fueron clasificados finalmente como cigotas. Las preparaciones cromosómicas de estos ovocitos muestran 2 tipos distintos de cromosomas en 10 casos (cromosomas en metafase II y filamentos) y en dos casos singamia (cromosomas mitóticos). Estos cigotas detenidos representan un 5% del número total de ovocitos no fertilizados.

En la tabla V podemos ver los resultados obtenidos en los embriones polispérmicos estudiados.

Tan solo 2 cigotas con 2 pronúcleos, donados para investigación fueron estudiados y muestran dos sets cromosómicos normales (Fig. 3).

14 cigotas con 3 pronúcleos fueron estudiados encontrando que 4 eran diploides y 8 eran triploides. 2 de estos cigotas resultaron ser tetraploides debido a los fenómenos de endoreduplicación cromosómica.

5 cigotas con 4 pronúcleos fueron analizadas encontrando que 4 eran tetraploides y 1 era pentaploide.

#### DISCUSION

En esta serie, la tasa de aneuploidia es del 24% pero también hay que tener en cuenta los ovocitos que no han extraído el primer corpúsculo polar (6,5%) y que además un 5% de los ovocitos estudiados presentaron roturas cromosómicas o una fragmentación total del material. Todo esto nos lleva a un 35,5% como tasa de anomalías cromosómicas en los ovocitos humanos no fertilizados. Este porcentaje es mucho más alto que el encontrado en espermatozoides o en ovocitos de otros mamíferos. Todo esto hace pensar que muchos de los fallos de implantación embrionaria en los programas de fertilización "in vitro" se deben a este alto porcentaje de anomalías cromosómicas en los ovocitos.

Se debe tener en cuenta que estos ovocitos proceden de parejas con problemas de esterilidad y que han estado sometidas a un tratamiento inductor de la ovulación que también puede ser el responsable de alguna de estas anomalías como se ha demostrado en ratones, Santaló et al., (1986).

En un reciente estudio multicéntrico llevado a cabo conjuntamente con 2 grupos franceses se ha intentado relacionar estas anomalías cromosómicas con diferentes parámetros y tan sólo se ha encontrado relación con la edad materna, Plochat et al., Montagut et al., Veiga et al. (1988).

Es de todos conocido que la incidencia de anomalías cromosómicas en los abortos de la especie humana es muy elevada, aproximadamente del 60% según Boué (1982). De acuerdo con los datos presentados anteriormente se puede decir que muchas de estas anomalías se producen durante la meiosis del gameto femenino.

#### CONCLUSIONES

Este tipo de estudios son de gran utilidad para establecer la tasa de aneuploidía en los ovocitos humanos pero deben ser complementados con estudios cromosómicos en ovocitos que proceden de ciclos espontáneos.

También son de gran utilidad desde el punto de vista clínico ya que pueden ser muy útiles para establecer un pronóstico en las parejas sometidas a fertilización "in vitro".

#### BIBLIOGRAFIA

BOUE, A and BOUE, J.G. Histoire naturelle de la fécondation humaine et de ses échecs. In Mérfeux, M. (ed) : Transfer d'embryons chez les mammifères. 2nd. International Congress at Annecy (France), pag. 381-390, 1982.

McBAIN, J.C. and MARTIN, M.J. Temporal aspects of ovarian stimulation for IVF. 4th. World Conference on IVF. Melbourne, Australia, 1985.

- McINTOSH, J.E.A., MATTHEW, C.O., CROKER, J.M., BROWN, T.J., and COX, L.W. Predicting the luteinizing hormone surge: relationship between the duration of the follicular luteal phases and length of the human menstrual cycle. *Fertil. Steril.*, 34: 125-130, 1980.
- MARTIN, R.H., BALKAR, W., BURNS, K., RADEMAKER, A.W., LIN, C.C and RUDD, N.L. The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Hum. Genet.* 63: 305-309, 1983.
- PLACHOT, M., JUNCA, A.M., MANDELBAUM, J., DE GROUCHY, J., SALAT-BAROUX, J., COHEN, J. Chromosome investigations in early life. I. Human oocytes recovered in an IVF programme. *Human Reprod.*, 1, 547-551, 1986.
- PLACHOT M., VEIGA, A., MONTAGUT, J., DE GROUCHY, J., CALDERON, G., LEPRETRE, S., JUNCA, A.M., SANTALO, J., CARLES, E., MANDELBANN, H., BARRI, P.N., DEGOY, J., COHEN, J., EGOZCUE, J., SABATIER, J.C, and SALAT-BAROUX, J. Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Human Reprod.* 3, 627-635, 1988.
- SANTALO, J., ESTOP, A.M. and EGOZCUE, J. The chromosome complement of first cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. *J of IVF and E.T.* 3: 99-105, 1986.
- TARKOWSKI, A.C. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics*, 5, 394-400, 1966.

VEIGA, A., CALDERON, G., SANTALO, J., BARRI, P.N. and ECOZCUE, J.

Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF programme.  
Human Reprod. 2, 425-430, 1987.

MARTIN, R.H., BALKAR, W., BURNS, K., RAJAN, A.M., LIM, C. and

RUD, N.L. The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa.  
Hum. Genet. 53: 305-309, 1983.

BLANCHOT, M., JUNCA, A.M., MONTAGUT, J., DE GROUCHY, J., DE

COHEN, J. Chromosome investigations in early life. IV. Human  
recovered in an IVF programme. Human Reprod. 1, 517-521, 1986.

BLANCHOT, M., VEIGA, A., MONTAGUT, J., DE GROUCHY, J., DE

REPETRE, S., JUNCA, A.M., SANTALO, J., CALDERON, G., BARRI, P.N.,

ECOZCUE, J., DE GROUCHY, J., DE COHEN, J., BARRI, P.N. and

SAJAT-BANOKIX, J. are clinical and biological IVF parameters  
correlated with chromosomal alterations in early life? a multicentric  
study. Human Reprod. 3, 427-432, 1988.

SANTALO, J., ESTOP, A.M. and ECOZCUE, J. The chromosome constitution of  
first cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. J. Reprod. Med.

and Fert. 31: 99-103, 1986.

TARKOWSKI, A.C. An air-drying method for chromosome preparation in  
mouse eggs. Cytogenetics, 5, 364-400, 1986.

Tabla I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Nº de ovocitos y cigotos

- Estudiados : 536
- Analizados : 303
- Sin cromosomas : 34

62,8% redimiento de la técnica.

Tabla II

CARACTERÍSTICAS DE LOS OVOCITOS Y EMBRIONES ESTUDIADOS

- Ovocitos no fertilizados
- Ovocitos polipenetrados
- Embriones degenerados



## Tabla III

## CARACTERÍSTICAS CROMOSÓMICAS DE LOS OVOCITOS NO FERTILIZADOS

• Metástases II aprox. haploides	: 127 ovocitos
• Metafase II aprox. 23 cromosomas	: 91 ovocitos
• Metafase II hiperhaploides	: 11 ovocitos
24% aneuploidia (doble de la hiperploidia)	
• Metafase II con fragmentación total	
Roturas cromosómicas	: 13 ovocitos
• Metafase II sin extrusión 1er. corpúsculo polar	: 17 ovocitos
• Partenogénesis	: 6 ovocitos

## Tabla IV

## CARACTERÍSTICAS CROMOSÓMICAS DE OVOCITOS

## APARENTEMENTE NO FERTILIZADOS

Número de ovocitos aparentemente no fertilizados : 12 (5%)

## CARACTERÍSTICAS

- 2 tipos distintos de cromosomas : 10  
(metafase II + filamentos)
- cigotos después de singamia : 2

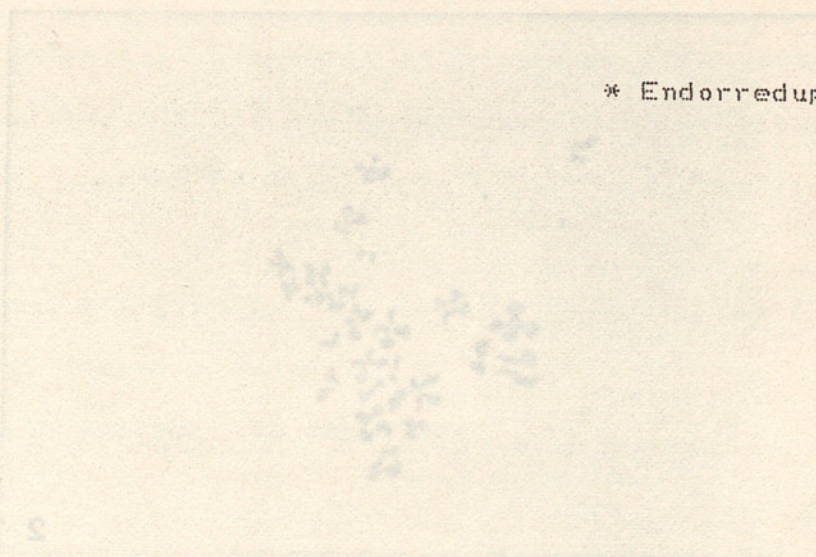
Tabla V

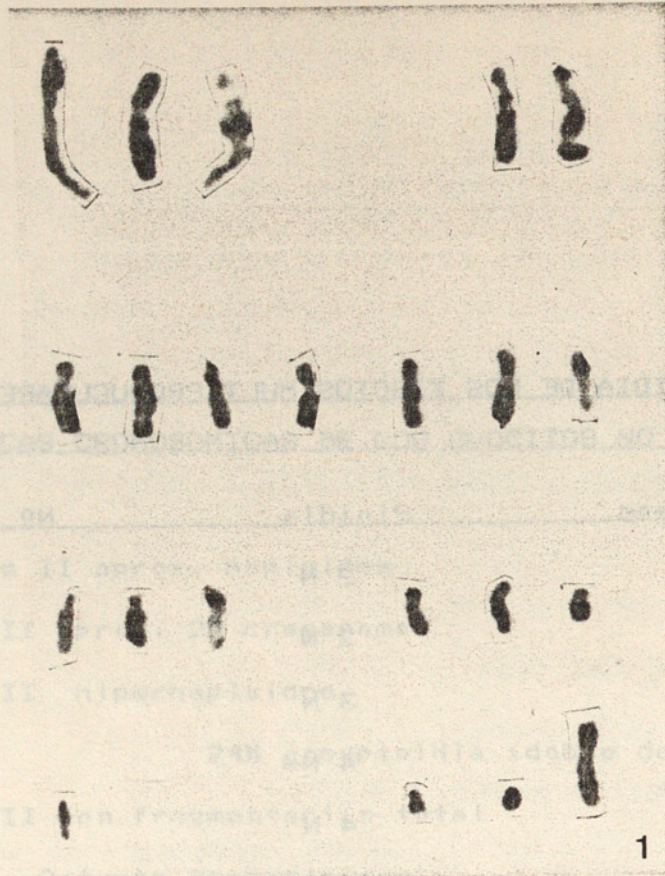
PIES DE FIGUERA

ELOIDIA DE LOS ZIGOTOS MULTINUCLEARES

Nº de pronúcleos	Eloidia	Nº de zigotos
2 PN	2 N	2
3 PN	2 N	4
3 PN	3 N	0
3 PN	4 N*	2
4 PN	4 N	4
4 PN	5 N	1

\* Endorreduplicación





PIES DE FIGURA PRELIMINARS I RESULTATS PRELIMINARS

Fig. 1 : Cariotipo con bandas G de un ovocito partenogenético.

1.- Servei de Medicina de la Reproducció.

Fig. 2 : Ovocito humano hiperhaploide

08017 Barcelona.

Fig. 3 : Set mitótico de un embrión humano poliploide.

de Barcelona, 08193 Bellaterra.

SUMMARY

Preimplantational diagnosis is necessary for some couples with high reproductive risk to avoid the natural abortion.

We have started working in this field by analyzing blastocysts to blastocyst embryos not suitable for replacement. The preliminary results show differences in the chromosomal constitution between blastocysts of the same embryo.

Recent bibliography is reviewed.

Key words : IVF, preimplantational diagnosis.