Biologia de la reproducció
Vol. 16, p. 69-74 (2019)

TEST GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL PER A AVORTAMENTS DE REPETICIÓ: IDENTIFICACIÓ DE FACTORS PRONÒSTIC

Adriana Muntané, Mònica Parriego, Lluc Coll, Montse Boada, Bonaventura Coroleu, Anna Veiga*

* Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció, Hospital Universitari Quirón Dexeus. Barcelona.

adrmun@dexeus.com

Resum

Els avortaments de repetició (AR) es defineixen com dos o més embarassos clínics fallits documentats per ecografia o examen histopatològic. Està descrit que la principal causa de pèrdua embrionària en les primeres setmanes de gestació és la presència d'alguna anomalia cromosòmica a l'embrió. Tot i així, cal descartar altres possibles causes (anatòmiques, immunològiques, endocrines, hematològiques o infeccioses). La realització d'un Test Genètic Preimplantacional d'aneuploïdies (PGT-A) pot ser d'utilitat en els casos de AR en els que s'han descartat causes no cromosòmiques. L'objectiu d'aquest treball és avaluar si existeix una associació entre els antecedents reproductius de les pacients amb indicació de AR i els resultats del cicle de PGT-A. No s'ha detectat correlació entre el nombre d'avortaments previs al cicle i la taxa d'euploïdia dels embrions generats. No obstant, després de la transferència d'embrions euploides s'ha observat que les pacients amb 2 o 3 avortaments previs tenen millor pronòstic de gestació en el cicle de PGT-A que aquelles que n'havien patit 4 o mes. La taxa d'avortament després de la realització d'un cicle de PGT-A per AR ha estat molt reduïda (<11%) i no s'han observat diferències significatives en relació al nombre d'avortaments previs.

Paraules clau: Test genètic preimplantacional (PGT), avortament de repetició, aneuploïdia.

Abstract

Recurrent miscarriages (RM) are defined as two or more failed clinical pregnancies documented by ultrasound or histopathological examination. It is described that the main cause of embryonic loss in the first weeks of gestation is the presence of some chromosomal abnormality in the embryo. However, other possible causes (anatomical, immunological, endocrine, hematological or infectious) must be ruled out. The realization of a Pre-implantation Genetic Test of aneuploidies (PGT-A) may be useful in RM cases in which non-chromosomal causes have been excluded. The objective of this work is to evaluate whether there is an association between the reproductive history of the patients with indication of RM and the results of the cycle of PGT-A. There was no correlation between the number of miscarriages prior to the cycle and the euploidy embryo rate of the embryos generated. However, after the transfer of euploid embryos it has been observed that patients with 2 or 3 previous abortions have a better prognosis of gestation in the PGT-A cycle than those who had suffered 4 or more miscarriages. The abortion rate after PGT-A cycle for RM was very low (<11%) and no significant differences were observed in relation to the number of previous abortions.

Key words: Preimplantation genetic test (PGT), recurrent miscarriage (RM), aneuploidy.

INTRODUCCIÓ

L'avortament es defineix com aquella pèrdua gestacional que ocorre abans de les 20 setmanes de gestació o abans que el fetus assoleixi un pes de 500 grams, i sol comportar, una important càrrega tant física com emocional a les parelles que el pateixen.

S'estima que entre el 2% i el 5% de les parelles en edat reproductiva i buscant un embaràs experimenten aquest fenomen en alguna ocasió (Palter 2009). No obstant, s'ha descrit que quan una parella ha patit dos avortaments, la probabilitat de patir-ne un tercer incrementa fins al 25-30% (Al-Asmar et al. 2012; Ford et al., 2009). Per aquest motiu, el diagnòstic clínic d'avortaments de repetició es defineix com la pèrdua de 2 o més embarassos clínics intrauterins documentats bé per ecografia o bé per anàlisi histopatològica. (Practice Commitee of ASRM 2013; Guideline of the ESHRE, 2017).

Hi ha diversos factors que poden causar AR a una pacient, per la qual cosa està indicada la realització d'un

estudi específic complet per tal d'intentar identificar la causa i poder evitar la recurrència en futures gestacions.

Entre les causes més comuns associades a avortaments es troben alteracions cromosòmiques en l'embrió, factors immunològics, factors anatòmics de l'úter i el cèrvix, causes endocrinològiques, factors hematològics, desequilibris en el microbioma endometrial, o, fins i tot, infeccions (Al-Asmar 2018). Hi ha també un cert percentatge d'avortaments que són de causa desconeguda. La causa més freqüent en avortaments primerencs és la presència d'alteracions cromosòmiques en l'embrió. S'ha observat que fins en un 70% dels casos d'AR dels quals s'han pogut analitzar les restes abortives, els embrions mostraven anomalies citogenètiques (Marquard et al. 2010). Per aquest motiu, i havent descartat prèviament causes no cromosòmiques, el test genètic preimplantacional d'aneuploïdies (PGT-A) pot ser una opció vàlida per millorar el pronòstic en pacients amb AR. Diversos autors han descrit un efecte beneficiós del PGT-A en pacients amb algun avortament previ degut a aneuploïdies en el fetus (Fiorentino et al. 2014; Rubio et al. 2009; Scott et al. 2013). Tot i això, cap d'aquests estudis ha aprofundit en l'existència d'una relació entre els antecedents reproductius de la pacient amb AR i els resultats obtinguts després de la realització d'un cicle de PGT-A per aquesta indicació.

L'objectiu d'aquest estudi ha estat avaluar si el antecedents reproductius de les pacient amb AR condicionen la taxa d'embrions euploides obtinguts en el cicle de FIV PGT-A. Per altra banda, també s'ha analitzat si existeix una associació entre els antecedents reproductius de les pacients i l'èxit del cicle de PGT-A.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu observacional amb 84 cicles de FIV PGT-A per avortaments de repetició (AR) realitzats a 69 pacients des de 2015 fins a 2019.

Totes les pacients incloses en aquest estudi havien patit un mínim de 2 avortaments previs documentats per ecografia (2.89 ±1.03).

Per a la realització del cicle de FIV les pacients van ser sotmeses a un tractament farmacològic inductor de l'ovulació amb agonistes o antagonistes de la GnRH. Tant els protocols per l'estimulació ovàrica com la monitorització del creixement fol·licular mitjançant ecografia i nivells hormonals d'estradiol en sang perifèrica van ser els emprats habitualment al nostre centre i han estat descrits prèviament (Barri et al., 2002). La descàrrega ovulatòria es va realitzar mitjançant l'administració subcutània d'HCG i 36 hores després es va dur a terme la punció fol·licular. La punció fol·licular, la recuperació dels oòcits en el laboratori de FIV i el cultiu de gàmetes i embrions es van realitzar seguint els procediments estandarditzats en el nostre centre (Arroyo et al. 2007). Breument, els embrions van cultivar-se en incubadors time-lapse (Geri®) a baixa concentració d'oxigen i utilitzant medis de cultiu únics (Global Total® de LifeGlobal® o G-TL de Vitrolife®). El tercer dia de desenvolupament es va realitzar una obertura a la zona pel·lúcida dels embrions evolutius. Aquells embrions que van assolir l'estadi de blastocist es van biopsiar entre el cinquè i setè dia de desenvolupament utilitzant tecnologia làser (Coll et al. 2018). Es van obtenir de 3 a 8 cèl·lules del trofectoderm que van ser aïllades en condicions estèrils i mantingudes a -80ºC fins el moment del seu processat. Els blastòcits biopsiats van ser vitrificats, immediatament després de la biòpsia, emprant els medis i protocols habituals al nostre centre (Solé et al., 2008).

L'amplificació total del genoma es va portar a terme mitjançant el sistema Sureplex® (Illumina®). Fins a setembre de 2017, l'anàlisi genètica dels DNAs amplificats es va realitzar amb array-CGH utilitzant els kits i protocols d'Illumina®. La tècnica de seqüenciació massiva d'última generació com a tècnica d'anàlisi cromosòmica es va implementar al laboratori l'octubre de 2017. Des d'aleshores, l'anàlisi genètica es va realitzar mitjançant els kits, software, hardware i protocols de Illumina® (VeriSeq™ PGS Kit-MiSeq, MiSeq® sequencer, and BlueFuse Multi®).

La transferència d'embrions diagnosticats com a euploides va realitzar-se en un cicle diferit. La preparació endometrial i els procediments de criotransferència van ser els emprats habitualment en el nostre centre i han estat descrits prèviament (Coroleu et al. 2006; Parriego et al. 2007).

El primer control d'embaràs es va dur a terme mesurant el nivell de βHCG en sang 15 dies després de la punció fol·licular. La confirmació de gestació clínica es va realitzar mitjançat la visualització ecogràfica de sac fetal amb batec cardíac positiu, entre 3-5 setmanes després de la transferència.

Els antecedents reproductius de les pacients incloses (nombre d'avortaments previs) es van correlacionar amb la taxa d'euploïdia. Així mateix, també es van correlacionar amb els resultats reproductius després de la transferència d'embrions euploides. La verificació de la independència de les variables es va realitzar mitjançant el test khi quadrat de Pearson, regressió lineal i test de Wilcoxon i Mann-Whitney. El nivell de significació estadística s'ha determinat a $p<0.05$ amb un nivell de confiança del 95%.

Les taxes referents a la primera criotransferència (1a CT) obtingudes al llarg de l'estudi s'han calculat en base a la primera transferència embrionària del primer

cicle de DGP realitzat. Les dades referents al total de criotransferències s'ha obtingut a partir de totes les transferències derivades de tots els cicles de PGT-A de les pacients incloses.

RESULTATS

Es van analitzar els resultats de 84 cicles de FIV-PGT-A realitzats a 69 pacients amb indicació d'avortaments de repetició (AR). La mitjana d'edat de les pacients va ser de 36.4 ± 4.01 anys i la mitjana d'avortaments previs al tractament de PGT-A va ser de 2.9 ± 1.03. Del total de pacients, 30 havien tingut 2 avortaments previs, 24 pacients n'havien tingut 3 i 15 pacients n'havien tingut quatre o més.

Es van biopsiar i analitzar 458 embrions obtenint un diagnòstic concloent en 442. Un 39.36% (174/442) dels embrions diagnosticats van ser caracteritzats com a euploides. (Taula I).

Taula I. Resultats de l'anàlisi embrionària.

	n (%)
Embrions biopsiats	458
Diagnosticats	442 (95.5)
Euploides	174 (39.36)
Aneuploides	268 (60.63)

Es va observar un percentatge superior d'embrions euploides en aquelles pacients que havien patit menys avortaments previs al cicle. No obstant, aquestes diferències no van assolir significació estadística (p-valor=0.06) (Taula II).

Taula II. Percentatge d'embrions diagnosticats com a euploides en els cicles de PGT-A en funció del nombre d'avortaments previs.

No avortaments previs	n	Taxa d'euploïdia
2	30	49.49 ± 30.40
3	24	37.87 ± 26.42
>3	15	35.05 ± 29.30

Un 81.1% de les pacients (56/69) van generar algun embrió euploide en el primer cicle de PGT-A. D'aquests cicles, van transferir-se 59 embrions a 55 pacients (1.07 ± 0.26). Una pacient està pendent de transferència. Un 69.1% de les pacients va quedar gestant (38/55) però 5 gestacions no van resultar evolutives (Taula III).

Taula III. Resultats obtinguts després de la primera criotransferència

	n (%)
Transferències	55
Embrions transferits	59
Embarassos (%)	38 (69.1)
Sacs (%)	38 (66.3)
Avortament (%)	4 (10.5)
Embarassos ectòpics (%)	1 (2.6)

Les pacients que no van aconseguir gestació i tenien més embrions euploides van realitzar subsegüents criotransferències. Per altra banda, 15 pacients que no havien tingut embrions euploides en el primer cicle de PGT-A van realitzar-ne un segon. L'origen de les 33 transferències d'aquests cicles es mostren a la taula IV.

Taula IV. Origen de les subsegüents criotransferències.

Cicle pgt-a	CT	n
1r	2a	14
1r	3a	4
2n	1a	9
2n	2a	5

Del total de cicles de PGT-A realitzats el 76.2% van tenir algun embrió transferible (34/84). Tenint en compte el total de criotransferències (primeres, segones i terceres de tots els cicles de PGT-A realitzats) es van transferir 92 embrions en 87 procediments. Els detalls dels resultats es resumeixen a la Taula V.

Taula V. Resultats obtinguts tenint en compte el total de criotransferències

	n (%)
Transferències	87
Embrions transferits	92
Embarassos (%)	63 (72.4)
Sacs (%)	63 (68.5)
Avortament (%)	11 (17.5)
Embarassos ectòpics (%)	1 (1.6)

Les pacients que havien patit dos o tres avortaments previs al cicle de PGT-A van assolir unes taxes de gestació després de la primera criotransferència superiors a

aquelles que havien experimentat 4 o més avortaments previs (p-valor= 0.04)(Figura I, gràfic a). A diferència, els avortaments produïts amb posterioritat al tractament per PGT-A no va mostrar associació amb el nombre d'avortaments previs que havien sofert les pacients (p-valor=0.29)(Figura I, gràfic b).

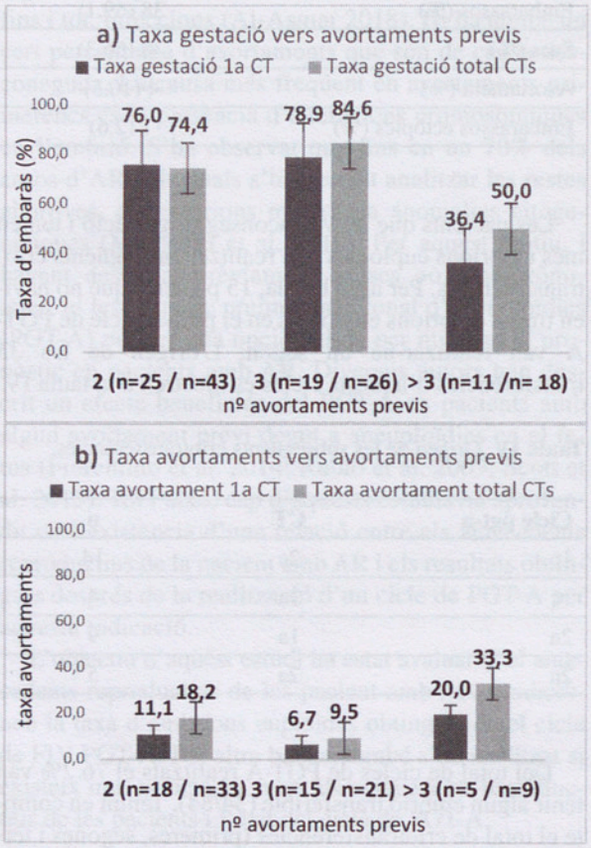

Figura I. a) Taxa de gestació segons el nombre d'avortaments previs [p-valor $_{1a\ CT}$ = 0.04 / p-valor $_{total\ CTs}$ = 0.03]; b) Taxa d'avortament segons el nombre d'avortaments previs [p-valor $_{1a\ CT}$ = 0.29/ p-valor $_{total\ CTs}$ = 0.69].

DISCUSSIÓ

En el nostre treball s'han avaluat els resultats obtinguts en els cicles de PGT-A en pacients amb avortaments de repetició (AR) intentant determinar la possible influència de la seva història reproductiva prèvia.

La taxa d'euploïdia observada (39.4%) és inferior al que ha estat descrit pel grup d'edat d'aquestes pacients: als 36 anys s'observa un 55.8% d'euploïdia segons Harton i col·laboradors, i un 64.5% segons Franasiak i col·laboradors. El fet que aquestes pacients amb AR generin un percentatge d'embrions aneuploides superior a la població control podria explicar la seva història reproductiva desfavorable.

Teòricament, semblaria que pacients amb històries reproductives molt desfavorables podrien generar un percentatge d'embrions aneuploides molt elevat que justificaria l'alt nombre d'avortaments previs soferts. A partir de les nostres dades, tot i observar-se una certa tendència de més euploïdia quan s'han produït menys avortaments previs, els resultats no assoleixen significació estadística. Per tant, no resulta possible donar un pronòstic en quant a taxa d'euploïdia d'una pacient segons el nombre d'avortaments previs que ha patit.

La taxa d'embaràs aconseguida després d'un cicle de PGT-A en aquestes pacients ha estat molt elevada (69.1% després de la primera transferència, 72.4% després de les transferències acumulades). Aquests percentatges de gestació són superiors als obtinguts globalment en els cicles de PGT-A per a totes les indicacions (62.5%, dades pròpies). Cal tenir en compte que aquestes pacients ja havien aconseguit gestacions prèvies fet que explicaria aquest percentatge incrementat.

Els nostres resultats han mostrat que les pacients que havien sofert 4 o més avortaments previs al cicle de PGT-A tenen una taxa d'embaràs inferior després de la transferència d'un embrió euploide en comparació a les pacients que n'havien sofert menys (2 o 3). Una possible explicació d'aquesta davallada podria ser el factor uterí. Els raspats uterins són freqüents després d'un avortament i poden malmetre la cavitat uterina dificultant la següent gestació. Desconeixem si aquest subgrup de pacients ha estat exposat a més raspats uterins per poder corroborar aquestes dades. Altres estudis també han descrit pitjors resultats en la taxa d'implantació a partir de 5 avortaments (Rubio et al. 2009). Cal dir que el nombre de casos del nostre estudi no ha permès fer classificacions més enllà de >3 avortaments degut a la limitada mida mostral, si bé les nostres dades assoleixen significació estadística a partir de 4 avortaments.

La taxa d'avortament després del cicle de PGT-A ha estat acceptable (10.5% després de la primera criotransferència, 17.5% després de les transferències acumulades) similar la observada després de PGT-A per altres indicacions (dades pròpies). No s'han detectat diferències significatives en la taxa d'avortament en funció del nombre d'avortaments previs experimentats.

Com a limitació de l'estudi cal dir que no s'ha tingut en compte el període temporal des del primer fins a l'últim avortament. Per tant no podem assegurar que pacients amb 2 avortaments n'haguessin pogut patir més si haguessin trigat més temps a començar el tractament.

Els avortaments de repetició constitueixen una causa comú d'infertilitat en pacients en edat reproductiva. El PGT-A resulta una estratègia útil per aquestes pacients oferint elevades taxes d'embaràs i reduïdes taxes d'avortament. Una història reproductiva de 4 avorta-

ments o més influeix negativament en el pronòstic del cicle reduint probabilitat de gestació.

BIBLIOGRAFIA

AL-ASMAR, NASSER et al. 2012. «Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage». *Fertility and Sterility* 98: 145-150.

AL-ASMAR, NASSER. 2018. *Importancia del estudio cromosómico de los restos abortivos mediante técnicas de secuenciación masiva (NGS) y arrays de CGH para un adecuado consejo reproductivo*. Ph. D. diss. Universitat de València.

ARROYO, GEMMA, ANNA VEIGA, JOSEP SANTALÓ, I PERE NOLASC BARRI. 2007. «Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: Usefulness of pronuclear scoring». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 24(5): 173-181.

COLL, LLUC et al. 2018. «Transition from blastomere to trophectoderm biopsy: comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies». *Zygote* 26(3): 191-198.

COROLEU, BUENAVENTURA et al. 2006. «Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study». *Human Reproduction* 21(7): 1809-1815.

ESHRE. 2017 «Recurrent pregnancy loss». *ESHRE Early Pregnancy Guideline Development Group*. 15-17.

FIORENTINO, FRANCESCO et al. 2014. «Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles». *Human Reproduction* 29(12): 2802-2813.

FORD, HOLLY B, I DANNY J SCHUST. 2009. «Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy.» *Reviews in obstetrics & gynecology* 2(2): 76-83.

FRANASIAK, JASON M.et al. 2014 «The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening» *Fertility and Sterility* 101(3): 656-663.

HARTON, GARY L. et al. 2013. «Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization» *Fertility and Sterility* 100(6): 1695-1703.

MARQUARD, KERRI, LYNN M. WESTPHAL, AMIN A. MILKI, I RUTH B. LATHI. 2010. «Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years». *Fertility and Sterility* 94(4): 1473-1477.

PALTER, STEVEN F. 2009. «Hysteroscopy for Evaluating and Treating Recurrent Pregnancy Loss». *Hysteroscopy*: 157-169.

PARRIEGO, M. et al. 2007. «Birth after transfer of frozen-thawed vitrified biopsied blastocysts». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 24(4): 147-149.

PRACTICE COMMITEE OF ASRM, 2013;. «Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion». *Fertility and Sterility.* 99(1): 63.

RUBIO, CARMEN et al. 2009. «Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss» *Reproductive Healthcare Ltd* 18(5): 687-693.

SCOTT, RICHARD T. et al. 2013. «Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial». *Fertility and Sterility* 100(3): 697-703.

SOLÉ, MIQUEL, MONTSE BOADA, I ANNA VEIGA. 2008. 59 «Criopreservació i tècniques de reproducció assistida.» *Biologia de la Reproducció.* 59: 233-248.