

SEGONA BIÒPSIA D'EMBRIONS AMB RESULTATS DE PGS NO CONCLOENTS

Marina Sumarroca^{1,*}, Mònica Parriego¹, Lluc Coll¹, Montserrat Boada¹, Sílvia Mateo¹, Bonaventura Coroleu¹, Marta Devesa¹, Anna Veiga^{1,2}

¹Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció, Hospital Universitari Dexeus, Barcelona, Espanya. *marinasumarroca@gmail.com

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

Resum

En el context del diagnòstic genètic preimplantacional, la biòpsia del trofòctoderm de blastocists ha demostrat presentar importants avantatges respecte la biòpsia d'un únic blastòmer en D+3. Una de les més destacables, és la disminució significativa del percentatge d'embrions que queden sense diagnòstic (SD) posteriorment a la biòpsia i la realització de l'anàlisi genètica. Tanmateix, determinades pacients es poden veure especialment afectades per aquest percentatge residual d'embrions SD. L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar si la re-biòpsia i re-vitrificació de blastocists és un procediment vàlid, segur i raonable per ser aplicat en casos en que no ha estat possible l'obtenció de resultats a partir de la primera anàlisi.

Un total de 33 blastocists de 31 pacients van ser descongelats i se'ls hi va realitzar una segona biòpsia i anàlisi. Un 87.9% dels embrions van sobreviure a la descongelació i un 86.2% d'aquests es van re-expandir i van poder ser biopsiats. Dels blastocists re-biopsiats, un 92.0% es van diagnosticar amb èxit, amb una taxa d'euploidia del 69.6%. Vuit blastocists euploides re-biopsiats i re-vitrificats han estat transferits fins a data d'avui, amb una taxa de supervivència i re-expansió post-descongelació del 100%. S'han aconseguit un total de 5 gestacions clíniques: 3 evolutives i 2 que van acabar en avortament espontani. Malgrat que el nombre de blastocists re-biopsiats transferits és encara limitat, els resultats senyalen que l'estratègia de re-biòpsia i re-vitrificació de blastocists SD pot ser una opció vàlida, recomanable i que pot oferir bons resultats. Així doncs, la re-biòpsia d'embrions inicialment SD permet rescatar i transferir embrions euploides, i millorar la taxa d'embaràs acumulada per cicle.

Paraules clau: PGS, blastocist, biòpsia de trofòctoderm, vitrificació.

Abstract

In the context of preimplantation genetic diagnosis, trophoctoderm biopsy has shown to offer significant advantages over blastomere biopsy on D+3. One of the most remarkable ones is the notable decrease in the percentage of undiagnosed embryos after performing the biopsy and genetic analysis. However, patients with few or no euploid embryos can be specially affected by this residual percentage of diagnosis failure. The aim of this study was to assess whether blastocist re-biopsy and re-vitrification is a reasonable and safe procedure to be applied in cases of inconclusive or no results after the first PGS analysis. A total of 33 blastocysts from 31 patients were warmed to perform a second biopsy and genetic analysis. Among them, 87.9% survived after warming, and 86.2% of them re-expanded and could be biopsied again. Out of the re-biopsed blastocysts, 92% could be successfully diagnosed, with an euploidy rate of 69.6%. Eight euploid re-biopsed and re-vitrified blastocysts have been transferred to date, with a survival and re-expansion rate of 100% after warming. Five clinical pregnancies have been achieved with 3 ongoing pregnancies and 2 miscarriages. Although few transfers of re-biopsed and re-vitrified blastocysts have been performed to date, our preliminary results show that the re-biopsy and re-vitrification of undiagnosed blastocysts is a safe and reasonable approach, as it ultimately allows the transfer of euploid embryos and good clinical outcomes.

Key words: PGS, blastocyst, trophoctoderm biopsy, vitrification.

INTRODUCCIÓ

Les millores introduïdes en els darrers anys en els cicles de Fecundació *In Vitro* (FIV) i, en particular, en els cicles de FIV amb diagnòstic genètic amb cribatge d'aneuploidies (PGS), han suposat l'inici d'una nova

era pel PGS (revisat per Sermon et al, 2016) i han permès una millora dels resultats obtinguts (Forman et al., 2013; Schoolcraft et al., 2010; Yang et al., 2014).

Una de les modificacions metodològiques més importants, juntament amb l'aplicació de tècniques d'anàlisi cromosòmica completa, ha estat el canvi en el mo-

ment de la biòpsia de D+3 a l'estadi de blastocist. La biòpsia de trofòderm presenta diversos beneficis respecte a la biòpsia d'un sol blastòmer en D+3. Per una banda, s'ha demostrat que, el procediment és menys perjudicial per l'embrió i per tant hi ha menys risc d'afectar-ne la viabilitat (Scott et al., 2013). A més, el fet de seleccionar els embrions per cultiu fins a blastocist prèviament a la biòpsia suposa un increment en el cost-eficiència de la tècnica, ja que el nombre d'embrions a biopsiar és menor (Adler et al., 2014). Finalment, l'anàlisi de múltiples cèl·lules (4-8) respecte l'anàlisi d'un sol blastòmer en biòpsies d'embrions en D+3 s'associa a una major robustesa diagnòstica. Una altra de les avantatges associades al major nombre de cèl·lules disponibles per l'anàlisi en la biòpsia de trofòderm és la disminució significativa en el percentatge d'embrions que queden sense diagnòstic concloent després de l'anàlisi genètica (del 10% amb biòpsia de blastòmer fins a menys del 5% amb biòpsia de trofòderm) (Forman et al., 2012). Tot i així, les pacients sense o amb pocs embrions euploides, es poden veure especialment afectades per aquest percentatge residual de fallada de diagnòstic.

La desvitrificació i re-biòpsia de blastocists sense diagnòstic concloent (SD) pot representar una solució per a pacients de PGS amb embrions sense diagnòstic que, pel risc augmentat de generar embrions aneuploides, no solen voler assumir la seva transferència sense disposar de diagnòstic.

L'objectiu d'aquest estudi ha estat conèixer si la re-biòpsia i re-vitrificació de blastocists és un procediment justificat i segur que es pot aplicar en casos en què no s'han obtingut resultats a partir de la primera anàlisi de PGS.

MATERIAL I MÈTODES

Estimulació ovàrica, recuperació d'òcits i cultiu embrionari:

Les pacients van ser sotmeses a un tractament inductor de l'ovulació amb agonistes o antagonistes de la GnRH. Tant els protocols per l'estimulació ovàrica com per 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 recuperació dels òcits es va realitzar sota control ecogràfic transvaginal 36 hores després de l'administració de l'hCG.

Per la manipulació i el cultiu de gàmetes i embrions al laboratori es van utilitzar els medis de la sèrie Global® seguint estrictament les instruccions d'ús recomanades. El cultiu dels embrions es va realitzar en un incubador Embryoscope® amb tecnologia time-lapse, a

37°C de temperatura i concentracions de CO₂ i O₂ del 6% i 5% respectivament.

Biòpsia de trofòderm:

Tant per l'obertura de la zona pelúcida en D+3 com per a la biòpsia dels blastocists (D+5/+6 o +7) es va emprar metodologia làser (Veiga et al., 1997, Boada et al., 1998). Tots els embrions que van assolir l'estadi de blastocist i van herniar, es van biopsiar, obtenint-se de 4 a 8 cèl·lules de cada trofòderm embrionari. Immediatament després de la biòpsia, els blastocists es van vitrificar emprant els medis i protocols habituals al nostre centre (Solé et al., 2013).

Les cèl·lules biopsiades van rentar-se amb una solució de PBS (Phosphate Buffered Saline) al 0.1% de PVA (Polyvinyl Alcohol) i van dipositar-se en condicions estèrils en tubs de PCR en 1.5 µl de PBS. Van mantenir-se congelades a -80°C fins al moment de l'anàlisi genètica.

Les mostres van ser processades per amplificar tot el genoma (WGA, *Whole Genome Amplification*). Es va utilitzar el kit comercial Sureplex® DNA Amplification (Illumina®) seguint les instruccions descrites pel fabricant. Les mostres de DNA amplificades es van processar per a la seva anàlisi mitjançant arrays de CGH emprant el kit comercial 24Sure® Microarray Pack (Illumina®) seguint el protocol recomanat. Per l'anàlisi dels arrays es va utilitzar un escàner Innopsys 70 i les imatges van ser interpretades emprant el software facilitat per la casa comercial (Bluefuse®, Illumina®). Els embrions van ser classificats com normals, anormals o sense diagnòstic concloent (si no s'havia produït amplificació o els perfils obtinguts no eren interpretables).

Segona biòpsia de trofòderm:

Des de gener de 2015 va oferir-se a les pacients de PGS que disposaven d'embrions sense diagnòstic concloent (SD) sotmetre aquests embrions a un segon procés de biòpsia.

Les pacients van rebre informació específica en relació al procediment a realitzar i a la possibilitat de pèrdua embrionària degut a la manipulació addicional. Aquelles que van accedir van signar un consentiment informat.

En tots aquests casos, els blastocists SD es van desvitrificar seguint el protocol habitual del centre. Els blastocists supervivents es van deixar en cultiu fins a la re-expansió i, en els casos en que es va produir, va realitzar-se una segona biòpsia seguida d'una re-vitrificació. La metodologia emprada tant per a la re-biòpsia com per a la re-vitrificació va ser la mateixa utilitzada per dur a terme el primer procediment.

El processat de les cèl·lules biopsiades i l'anàlisi genètica també van realitzar-se emprant els protocols utilitzats prèviament i que ja han estat descrits.

Criotransferència dels embrions euploides:

La preparació endometrial i els procediments de laboratori dels cicles de criotransferència van ser els emprats habitualment en el nostre centre i han estat descrits prèviament (Martínez et al., 2006). La transferència va realitzar-se amb seguiment ecogràfic (Coroleu et al., 2002). El primer control d'embaràs va realitzar-se 10 dies post-transferència.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Van desvitrificar-se 33 blastocists procedents de 31 pacients per dur a terme una segona biòpsia. Van sobreviure 29 blastocists que es van cultivar (29/33, 87.9%), 25 dels quals es van re-expandir (25/29, 86.2%) i es van poder re-biopsiar. Va obtenir-se un diagnòstic concloent de 23 dels blastocists analitzats (23/25, 92.0%), dels quals 16 van resultar euploides (16/23, 69.6%) i es van mantenir congelats per a ús reproductiu.

El motiu del no diagnòstic inicial dels 33 blastocists desvitrificats va ser en 19 casos la manca d'amplificació després d'aplicar el protocol de WGA i en 14 casos la baixa qualitat dels resultats obtinguts.

La taxa d'euploidia obtinguda després de la re-biòpsia dels embrions inicialment SD a causa d'absència d'amplificació genòmica va ser del 50% (7/14). A diferència, la taxa d'euploidia va resultar del 100% (9/9) en els casos de baixa confiança dels perfils obtinguts a partir del DNA amplificat de la primera biòpsia.

A dia d'avui, 8 dels 16 blastocists re-biopsiats caracteritzats com a euploides han estat descongelats per a ús reproductiu. Els 8 blastocists van sobreviure a la descongelació, es van re-expandir després del cultiu *in vitro* i es van transferir a 8 pacients. Es van aconseguir 5 gestacions clíniques, 2 de les quals van acabar en avortament, i les 3 restants evolucionen favorablement i ja han superat el segon trimestre de gestació.

Les nostres dades, han mostrat una taxa de supervivència a la descongelació dels blastocists SD pautats per a re-biopsiar inferior a la observada en els blastocists euploides del nostre programa de PGS (87.9% vs 97.8%). A més, hi ha un cert percentatge de blastocists que tot i sobreviure a la desvitrificació, no van aconseguir re-expandir-se, no resultant aptes per a la re-biòpsia (13.8% dels que sobreviuen a la descongelació). És possible que la causa de no resultat inicial en aquests blastocists fos intrínseca de l'embrió, i vindria associada a una qualitat compromesa dels blastocists que no

permetria l'obtenció d'un resultat concloent després de la primera biòpsia (trofoectoderms amb molt poques cèl·lules, mala qualitat del DNA de les cèl·lules biopsiades...). Seria útil en aquest sentit, doncs, transmetre la informació en relació a la qualitat dels blastocists als pacients per evitar generar falses expectatives. Malgrat tot, la gran majoria dels embrions que van sobreviure a la descongelació, es van re-expandir, i van ser biopsiats per segona vegada, podent ser diagnosticats amb èxit. Així, el percentatge d'embrions que després d'una segona biòpsia romanen no concloents és residual.

Tot i que 16 embrions re-biopsiats han estat caracteritzats com a euploides, fins al moment només se n'han transferit 8. Cal tenir en compte que, en el cas que la pacient disposés d'altres embrions euploides, sotmesos a un únic procediment de biòpsia, es va prioritzar la transferència d'aquests per davant de la transferència dels embrions re-biopsiats.

La taxa de supervivència i re-expansió dels blastocists re-biopsiats en els 8 cicles pautats per a la transferència va resultar del 100%, podent ser transferits tots els embrions descongelats. Els resultats clínics obtinguts després de la transferència d'embrions re-biopsiats resulten satisfactoris tot i que, la baixa casuística disponible fins al moment fa necessari de continuar fent el seguiment de les gestacions procedents d'embrions re-biopsiats.

Per últim, no es pot descartar que l'ús de tècniques diagnòstiques més sensibles, com la seqüenciació massiva, haguessin permès obtenir un diagnòstic concloent a partir de la primera biòpsia en alguns dels embrions que no van poder ser diagnosticats mitjançant la tècnica emprada, sense la necessitat de realitzar una segona biòpsia. No obstant, això no seria possible en la majoria dels casos, ja que el no resultat venia donat per una absència d'amplificació.

CONCLUSIÓ

El nombre d'embrions re-biopsiats que han estat transferits fins a dia d'avui és limitat. Tanmateix, els resultats obtinguts indiquen que la re-biòpsia i re-vitrificació d'embrions que havien quedat sense diagnòstic a partir del primer anàlisi pot ser una aproximació vàlida i recomanable, que ofereix uns bons resultats clínics. Així doncs, el procediment de re-biòpsia permet rescatar euploides amb finalitats reproductives, i en conseqüència, millorar la taxa d'embaràs acumulada per cicle.

REFERÈNCIES

Adler A, Lee HL, McCulloh DH, Ampeloquio E, Clarke-Williams M, Wertz BH, Grifo J (2014) Blastocyst

- culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophoectoderm biopsies. *Reprod. Biomed. Online* 28, 485-491.
- Barri PN, Martínez F, Coroleu B, Tur R (2002) The role of GnRH antagonists in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 5 Suppl. 1, 4-19.
- Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A (1998) Successful Use of a Laser for Human Embryo Biopsy in Preimplantation Genetic Diagnosis: Report of Two Cases. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 302-307.
- Capalbo A, Romanelli V, Cimadomo D, Girardi L, Stoppa M, Dovere L, Dell'Edera D, Ubaldi FM, Rienzi L (2016) Implementing PGD/PGD-A in IVF clinics: considerations for the best laboratory approach and management. *J Assist Reprod Genet* 33, 1279-1286.
- Coroleu B, Barri PN, Carreras O, Martínez F, Veiga A, Balasch J (2002) The usefulness of ultrasound guidance in frozen-thawed embryo transfer: a prospective randomized clinical trial. *Hum. Reprod.* 17, 2885-90.
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, Treff NR, Scott RT (2013) In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility* 100, 100-107.
- Forman EJ, Hong KH, Treff NR, Scott RT (2012) Comprehensive Chromosome Screening and Embryo Selection: Moving Toward Single Euploid Blastocyst Transfer. *Semin Reprod. Med.* 30, 236-242.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Espósito F, Fasolino MC (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Human Reproduction* 19, 1163-1169.
- Magli MC, Pomante A, Cafueri G, Valerio M, Crippa A, Ferraretti AP, Gianaroli L (2016) Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoectoderm cells, or blastocytic fluid?. *Fertility and Sterility* 105, 676-683.
- Martínez F, Boada M, Coroleu B, Clua E, Parera N, Rodríguez I, Barri PN. (2006) A prospective trial comparing oocyte donor ovarian response and recipient pregnancy rates between suppression with gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRHa) alone and dual suppression with a contraceptive vaginal ring and GnRH. *Hum Reprod* 21, 2121-5
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munné S, Katz-Jaffe MG, Wells D (2010) Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility* 94, 1700-6.
- Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR (2013) Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility*. 100, 624-630.
- Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, DeRycke M, De Vos A, Delhanty J, Fiorentino F, Gleicher N, Griesinger G, Grifo J, Handyside A, Harper J, Kokkali G, Mastenbroek S, Meldrum D, Meseguer M, Montag M, Munné S, Rienzi L, Rubio C, Scott K, Scott R, Simon C, Swain J, Treff N, Ubaldi F, Vassena R, Vermeesch JR, Verpoest W, Wells D, Geraedts J (2016) The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists and embryologists. *Molecular Human Reproduction* 0, 1-13.
- Solé M, Santaló J, Boada M, Clua E, Rodríguez I, Martínez F, Coroleu B, Barri PN, Veiga A (2013) How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod.* 28, 2087-2092
- Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, Barri PN, Ménézo Y (1997) Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 5, 351-354
- Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, Liu J (2014) Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Med Genomics*. 22, 1-13.