

PGS POR aCGH EN BLASTOCISTO Y TRANSFERENCIA EN CICLO DIFERIDO: ESTRATEGIA PARA EL LOGRO DEL EMBARAZO EVOLUTIVO EN MUJERES MAYORES DE 40 AÑOS.

Introducción:

En la actualidad, cada vez es más frecuente la infertilidad relacionada con la edad de la mujer, debido a los cambios laborales y profesionales responsables de la postergación de la maternidad. A pesar de que las mujeres de hoy tienen mejor calidad de vida, el reloj biológico no se ha modificado, por lo que no se puede contrarrestar la declinación natural de la fertilidad relativa a la edad. Es sabido que la disminución de la fertilidad se relaciona con la reserva de folículos ováricos y la calidad de los mismos en cuanto a su potencial embriogénico. La fertilidad disminuye gradualmente a partir de los 30 años, sobre todo después de los 35 años. La probabilidad de embarazo a los 30 años es alrededor del 20%, en cambio, a los 40 cae al 5%. Las mujeres mayores de 35 años tienen más chance de tener embarazos aneuploides debido al aumento en la tasa de aneuploidías en ovocitos, ya que estos siempre van a tener la edad de la mujer, a diferencia de los espermatozoides que son producidos cada 65 – 75 días. La detención tan prolongada de la profase meiótica en las mujeres contribuyen principalmente con la aneuploidía por decaer la calidad de los componentes de la maquinaria meiótica y por los potenciales efectos injuriantes recibidos durante tanto tiempo. La disminución en el número y distribución de los quiasmas durante la profase I como la débil cohesión centromérica son en definitiva los responsables de la aneuploidía. Además con el aumento de la edad materna se ve incrementada la tasa de abortos espontáneos por aneuploidías (1-2). Sin dudas el factor principal para el logro de un embarazo evolutivo es la implantación de un embrión euploide. Por lo tanto, la mejor manera de conseguirlo sería estudiando la constitución cromosómica embrionaria. Las mujeres alrededor de los 40 años que recurren a los procedimientos de fertilización asistida para el logro del embarazo podrían beneficiarse con el mencionado estudio. Al inicio del PGS el screening se

efectuaba en los cuerpos polares de los ovocitos y en las blastómeras de embriones de día 3 de desarrollo, utilizando la técnica del FISH para la enumeración de un número limitado de cromosomas. Posteriormente el meta-análisis de 10 ensayos clínicos controlados en forma aleatoria demostró que la tasa de nacidos en el grupo de los embriones analizados versus los no analizados, no solo no mejoraba sino que en varios estudios empeoraba los resultados (3-9). Gracias a la mejora de las incubadoras de última generación, a los nuevos medios de cultivo que permiten el desarrollo hasta blastocisto y al cambio de la congelación lenta por la vitrificación han permitido comprobar la mejora de los resultados con la transferencia de blastocistos desvitrificados en ciclos diferidos al de la estimulación ovárica (10-11). Los adelantos en los estudios del cariotipo molecular en pocas células como lo es el array de CGH y la biopsia en el máximo estadio de desarrollo embrionario in vitro (blastocisto) está cambiando la metodología del PGS. Varios ensayos clínicos controlados y aleatorios en poblaciones de buen pronóstico han señalado una mejora sustancial en los resultados (12-13), pero prácticamente no hay datos en parejas de edad avanzada con mala respuesta a la estimulación ovárica (14).

Objetivo:

Presentar los resultados del acopio de blastocistos para estudio cromosómico molecular en mujeres mayores de 40 años hasta obtener un numero que otorgue la chance de obtener embriones euploides indispensable el logro del embarazo evolutivo.

Pacientes y métodos:

Trabajo observacional, retrospectivo llevado a cabo en una serie de 5 pacientes que accedieron al programa Screening de Aneuploidías Embrionarias (PGS, la sigla en inglés) con acopio de blastocistos. Las parejas tenían previsto realizar entre dos y tres ciclos. Tres de ellas realizaron 2 ciclos de PGS con transferencia embrionaria y 2 hasta el presente con un solo ciclo sin transferencia. La edad de las pacientes varió de 41 a 44, siendo el promedio 42.2 años.

Las pacientes accedieron al programa por esterilidad y/o infertilidad inherente a la edad.

Previo al PGD en las mujeres se evaluó el perfil hormonal (FSH, LH, E2 y HAM), recuento de folículos antrales y realización de Histerosalpingografía (HSG). En los varones se realizó espermograma con espermocultivo completo. El requisito para acceder fue un recuento de folículos antrales no menor de 6, FSH no mayor de 12 UI/ml y HSG normal. En el varón el requisito fue que eyacularan espermatozoides y con espermocultivo negativo.

La estimulación ovárica se realizó con gonadotrofinas recombinantes y agonistas del GnRH. La aspiración folicular se realizó por vía transvaginal post 36 hs. de la aplicación de HCG, con anestesia local y neuroleptoanalgesia.

En todos los casos se realizó ICSI, no por estar indicado en todos sino por el protocolo del programa PGS.

Los ovocitos fecundados normales se cultivaron durante 5 o 6 días hasta alcanzar el estado de blastocisto expandido. En día 4 a los embriones que alcanzaron más de 12 células se les perforó la zona pelúcida con disparos láser para favorecer la eclosión del blastocisto y facilitar la remoción del trofoblasto protruido (ver Fig. 1). Para efectuar la biopsia, se prepararon placas de biopsia con una hilera de 4 microgotas conteniendo 25 ul de medio de biopsia sin calcio ni magnesio. En la primer microgota se colocó el blastocisto y con ayuda del microscopio micromanipulativo, se sostuvo al mismo con una micropipeta sujetora del lado opuesto al de las células protruidas, las cuales fueron cortadas con la ayuda de unos disparos láser y aspiradas con una micropipeta de biopsia de 25um de diámetro (ver Fig. 2). Realizada la biopsia, todos los blastocistos biopsiados fueron vitrificados en cryolooks de acuerdo al protocolo de Kuwayama modificado y las células del trofoblasto removidas de cada blastocisto fueron lavadas en las tres microgotas restantes y colocadas en un tubo para su posterior estudio del cariotipo molecular. Se utilizó la plataforma 24 Sure V3 Aneuploidy de BlueGnome-Illumina®. Sucitamente el estudio consistió en varios pasos: a- Amplificación de todo el genoma, b- Marcado de la muestra a estudiar y muestra de referencia con los fluorocromos Cy3 (verde) y Cy5 (rojo) respectivamente, c-

Preparación de la mezcla de hibridación, d-Hibridación de la mezcla sobre la plataforma de BlueGnome-Illumina®, e- Lavado, f- Lectura en el scanner de arrays (Innopsys®) y g- Interpretación de los datos con el Software BlueFuse® (ver Fig. 3)

Los blastocistos euploides fueron desvitrificados y transferidos en un ciclo diferido al estimulado, preparando el endometrio de manera estándar con estrógenos y progesterona. Solo se transfirió un blastocisto euploide por paciente.

Resultados:

En todos los ciclos se recuperaron ovocitos, variando los mismos de 3 a 12, siendo el promedio 4.4 ovocitos por paciente. El número de ovocitos fecundados normales varió de 3 a 6, siendo el promedio 1.6 por paciente. Tres parejas realizaron dos ciclos y obtuvieron 1 blastocisto euploide (ver Fig. 4). Dos parejas hasta el presente realizaron un solo ciclo y no obtuvieron blastocistos euploides (ver Fig.5).

En la tabla 1 se encuentran resumidos los principales resultados del estudio.

Discusión:

Un estudio piloto de cariotipo molecular en cuerpo polar I comunicado por el PGD Consortium de la ESHRE (15) evidenció que las mujeres de 40 o más años tienen una tasa de aneuploidías del 75%, significando que es necesario alrededor de 10 ovocitos para tener la chance de originar dos o tres embriones euploides para transferir. Es común que las mujeres de 40 o más años tengan una reserva ovárica comprometida, produciendo pocos ovocitos luego de la estimulación, por lo que es necesario realizar más de una estimulación para lograr embriones euploides. La experiencia reportada sobre la tasa de aneuploidía embrionaria en día 3 coincide con la tasa de aneuploidía ovocitaria por la edad pero no es así con respecto a la tasa de aneuploidías encontrada en día 5 que es sustancialmente menor, significando que un porcentaje importante de aneuploidías no alcanza el estadio de blastocisto por su letalidad muy temprana. También, la cantidad de embriones que llegan a blastocisto rara vez supera el 50% de los ovocitos

fecundados. Por lo tanto se podría inferir que la cantidad de blastocistos necesarios para hallar los euploides sería menor que la cantidad de embriones clivados de día 3. En la presente serie se obtuvieron 13 blastocistos, siendo 6 de buena calidad. Tres de los seis blastocistos de buena calidad tuvieron cariotipos normales (50%), mientras que los siete de mala calidad todos fueron cromosómicamente anormales (100%). Estos valores concuerda con lo comunicado por Figueira et al. (16) quienes evidenciaron que los blastocistos expandidos con un buen macizo celular interno (MCI) y trofoblasto tenían menos aneuploidías que los blastocistos no totalmente expandidos o con pocas células en el MCI o Trofoblasto, al igual que lo inferido con las pautas del desarrollo de los cultivos en el embrioscope®. La realización en D5 también se traduce en un menor costo de estudios genéticos. Lamentablemente los estudios cromosómicos moleculares son costosos. La realización de los mismos en un embrión que ha alcanzado el estado máximo de desarrollo in vitro, significa que no se atravesara por la incertidumbre de la posterior evolución o no cuando se realiza la biopsia en D3 y que se está haciendo en un blastocisto potencialmente transferible. En D3 solamente se pueden remover una o dos células, significando que el estudio se realiza en una o dos moléculas de ADN con el inconveniente de que no siempre se puede llegar a tener un resultado. Con la biopsia en día quinto/sexta, como se aspiran una decena o más células del trofoblasto, siempre se obtiene un resultado más robusto. Un dato no menor es que la biopsia del día 3 tiene un efecto perjudicial sobre la implantación embrionaria, mientras que la del día 5/6 es inocua (17). La biopsia del trofoblasto del blastocisto se la puede considerar equivalente a la biopsia de vellosidades coriónicas (ver Fig. 6), ergo la certeza diagnóstica sería similar, alrededor del 99%, mientras que con la biopsia de blastómeras en D3 es entre 90 y 95% de acuerdo con los datos de la ESHRE (18). Si bien la serie es muy pequeña, la buena tasa de embarazo obtenida con la transferencia diferida de un solo blastocisto euploide es muy halagueña, además de convertir al programa de PGD en mucho más eficiente y amigable para el personal biomédico (19). Probablemente la mejor tasa de embarazo que se está observando con la transferencia de blastocistos desvitrificados se deba a la sincronización blasto-

endometrio y a la mejor receptividad endometrial en ausencia de niveles hormonales en dosis farmacológicas como lo sostiene Haouzi et al. (20) y a la falta de efectos indeseables de los estrógenos sobre el desarrollo epigenético preimplantación y embrionario (21-22). De acuerdo con los datos de la ESHRE la mayoría de los estudios preimplantatorios son con biopsia en D3 y en cuerpos polares. Solo un 2,3% es en blastocistos (ver Fig. 7). Seguramente hará falta muchos más datos para aseverar lo observado, y sobre todo conocer la tasa de falsos positivos y negativos que tiene el PGS con ensayos clínicos bien diseñados.

References:

- 1- Hultén M, Baker H, Tankimanova M (2005). Meiosis and meiotic errors. In Enciclopedia of Genetics, Genomics and Bioinformatics. Published Online: 15 NOV 2005. Wiley online library. DOI: 10.1002/047001153X.g102206
- 2- Chiang T, Schultz RM, Lampson MA (2012). Meiotic origins of maternal age-related aneuploidy. *Biology of Reproduction*, 86(1): 3, 1-7
- 3- Stevens J, Wale P, Surrey ES, Schoolcraft WB(2004). Is aneuploidy screening for patients aged 35 or over beneficial? A prospective randomized trial. *Fertil Steril*, 82 suppl 2: 249
- 4- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Steirteghem A (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 19(12): 2849-58
- 5- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al(2007). In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*, 357: 9-17
- 6- Jansen RP, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB and McArthur SJ (2008)What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod* 23:1476-1478.
- 7- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, Reisner E, Borg K, Wikland M, Bergh C (2008). Preimplantation genetic screening in

women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 23(12):2806-2812

8- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P (2008). Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod*, 23: 2818–2825

9- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe M, Stevens J, Rawlins M, Munné S (2009). Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril*, 92(1):157-62

10- Shapiro B, Daneshmand S, De Leon L, Garner FC, Aguirre M and Hudson C (2012) Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 98:1490-1494.

11- Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, Checa MA (2013). Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 99(1): 156-152

12- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, Peck AC, , Scott Sills E, Salem RD (2012). Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with arrayCGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics*, 5: 24

13- Yang z, , Salem SA, , Liu X, Kuang Y, Salem RD, Liu J (2013). Selection of euploid blastocysts for cryopreservation with array comparative genomic hybridization (aCGH) results in increased implantation rates in subsequent frozen and thawed embryo transfer cycles. *Molecular Cytogenetics*, 6: 32

14- Schoolcraft WB and Katz-Jaffe MG (2013) Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril* 100:615-619.

15- Geraedts J (2013) Still too early to take a conclusive view on technique or patients in aneuploidy screening. *Focus Reprod*, September 2013:16-17.

16- Figueira RCS, Setti AS, Braga DPAF, Ferreira RC, Iaconelli A Jr, Borges E (2012). Blastocyst morphology holds clues concerning the chromosomal status of the embryo. *Fertil Steril*, 98 (3),Supplement: Pages S141-S142.

- 17- Scott RT, Upham KM, Forman EJ and Zhao T (2013) Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 100:624-630.
- 18- Traeger-Synodinos J, Coonen E, Goossens V (2013). Data from the ESHRE PGD Consortium. *Hum Reprod*, 28, Issue Suppl 1 > Pp i18-i19
- 19- Coco R, Mondadori A, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F, Neuspiller S, Gismondi FL, Neuspiller N (2012). Preimplantation diagnosis in blastocyst biopsy and deferred cycle transfer. *JBRA Assit Reprod* 2012; 16(5): 268-270.
- 20- Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J and Hamamah S (2010) Controlled ovarian hyperstimulation for *In Vitro* Fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod* 82:679-686.
- 21- Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, Haan EA, Chan A (2012). Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects. *N Engl J Med*, 366:1803-1813
- 22- Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharva S (2012). Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 98(2): 368-377

Tablas y Figuras

Tabla I: Resumen de los principales resultados obtenidos

Parejas	N° Ciclos	N° Blastocitos	Cariotipos	Transfer	Embarazo
1	1	1	45,XX,-21	No	
2	2	2	46,XX 44,XX,-18,-21	Si No	No
3	2	2	46,XX 47,XX,+2	Si ?	Si
4	1	2	47,XY,+15 45,XX,-21	No No	
5	2	6	46,XY 46,XY,-10,-11,+9,+13 45,XX,-14,-19,+20 45,XX,-2,-5,-6,-18,+4 47,XX,-17,+1,+19 44,XY,-2,-12,-13,-17,-21,+8,+9,+20	Si No No No No No	Si
Total	8	13		3	2

Fig. 1: Blastocisto eclosionando parte del trofoblasto

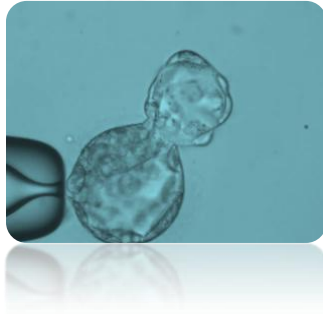


Fig. 2: Aspiración de varias células del trofoblasto del blastocisto eclosionando.
Ver video: <https://www.youtube.com/watch?v=tuBsiuXXuAk>

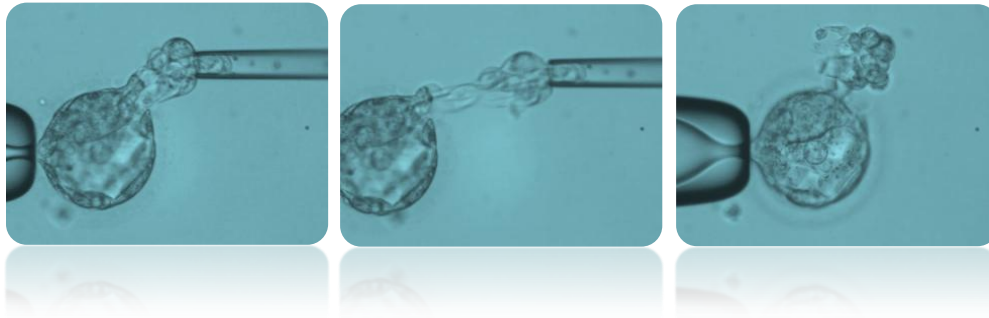
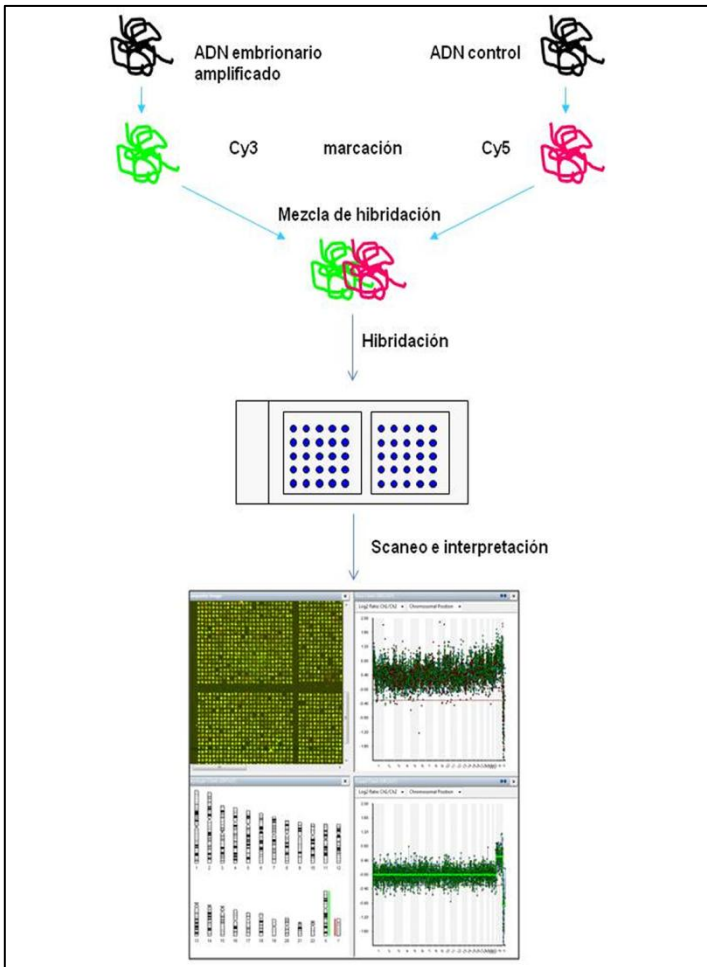


Fig. 3: Esquema de la determinación del array de CGH o cariotipo molecular.



La hibridación conjunta de la mezcla del ADN control marcado con rojo y del ADN embrionario marcado con verde sobre la plataforma 24 Sure V3 Aneuploidy, conformada por miles de sondas correspondientes a segmentos cromosómicos del genoma humano normal, permite detectar ausencia y/o duplicación de cualquier cromosoma, que se traducirá en un exceso de color rojo cuando se trata de deficiencia y verde cuando está duplicado respectivamente, debido a que si el ADN embrionario tiene una deficiencia tendrá más chance de hibridar el ADN control, en cambio si tuviera un exceso tendría más chance de hibridar que el control. El idiograma es obtenido con un software que permite el análisis de la imagen de la hibridación comparada.

Fig. 4: Blastocito de buena calidad con cariotipo normal

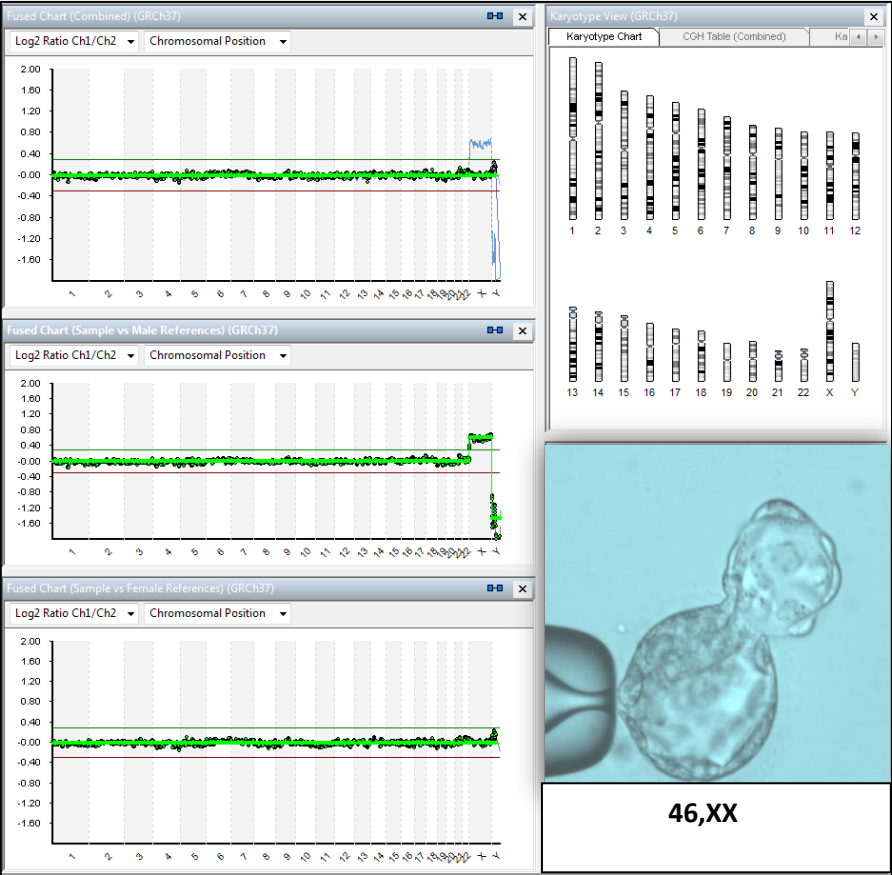


Fig. 5: Blastocisto de mala calidad con cariotipo anormal

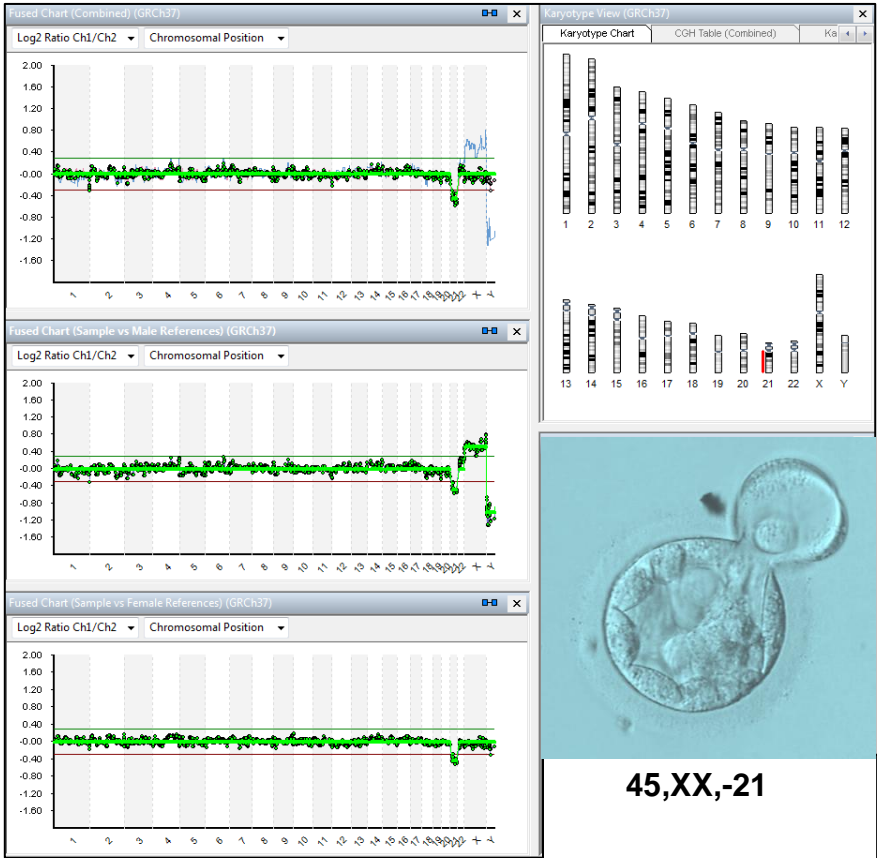


Fig. 6: Biopsia del blastocisto y su equivalencia con la aspiración de vellosidades coriónicas

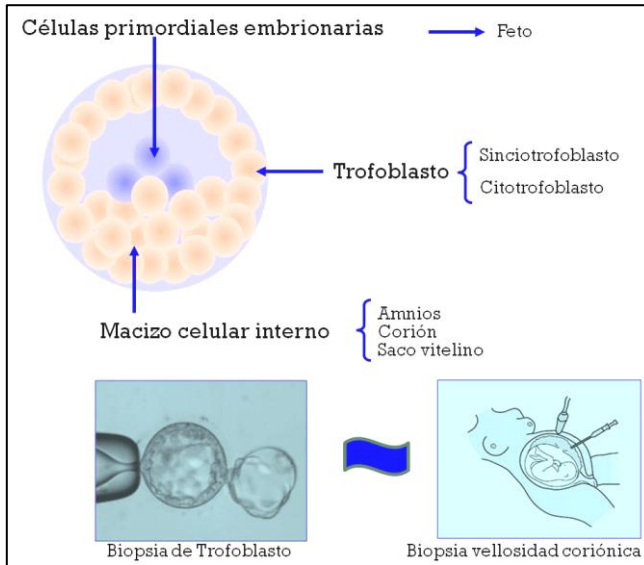


Fig. 7: Biopsias preimplantación de acuerdo con *Data Collection I-XIV PGD Consortium ESHRE*

