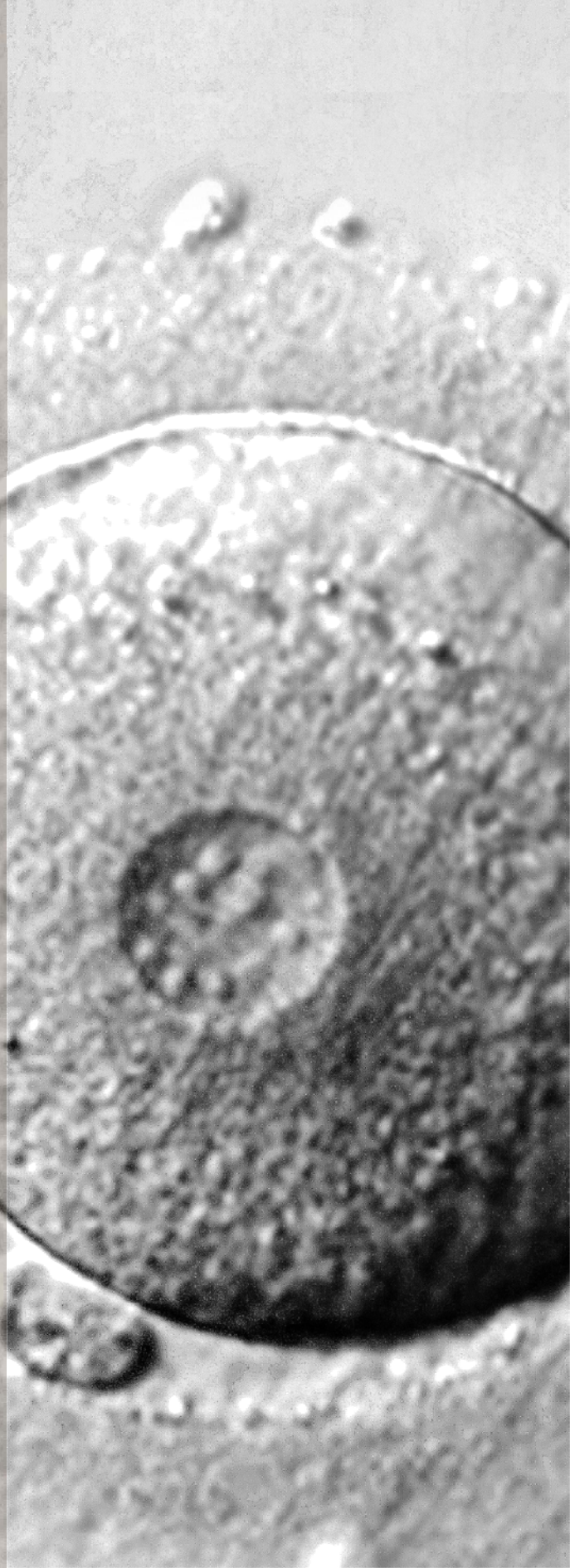


**Zigots
monopronucleats:
origen,
desenvolupament
i constitució
cromosòmica**

Sílvia Mateo Cuadros

Tesi Doctoral

Novembre 2017



prematura de cromosomes (Fig 3, a, II) (Flaherty *et al.*, 1998). Les causes poden ser degudes a l'alteració insuficient de la membrana de l'espermatozoide (en els casos d'ICSI) o a un error en la funció dels factors activadors de l'oòcit (Dozortsev *et al.*, 1994; Flaherty *et al.*, 1995, 1998; Azevedo *et al.*, 2014). Els embrions que resulten d'aquests mecanismes són haploides, en els casos on hi ha extrusió del segon CP, i diploides (digínics), si no hi ha extrusió del segon CP o, si tot i haver-lo extruït, hi ha una endoduplicació del material genètic.

Origen patern

Els zigots androgenètics són producte de la correcta formació del pronucli masculí, però amb el manteniment de la placa metafàsica de l'oòcit impeding el reinici de la meiosi femenina (Fig. 3, b, I) (Azevedo *et al.*, 2014; Kai *et al.*, 2015), o a l'extrusió completa del material genètic femení en el segon CP (Fig. 3, b, II) (Van Der Heijden *et al.*, 2009; Iwata i Mio, 2016). En aquestes situacions l'embrió que en deriva és haploide. Els casos de zigots 1PN diàndrics són el producte de la fecundació per part d'un espermatozoide diploide o per la fecundació d'un espermatozoide haploide amb posterior endoduplicació del nucli masculí (Azevedo *et al.*, 2014; Kai *et al.*, 2015).

Origen biparental

L'observació de zigots monopronucleats amb origen biparental pot ser deguda a diversos mecanismes (Fig. 3, c). La formació asincrònica dels dos pronuclis sembla ser una de les causes més freqüents en cicles de FIVc (Staessen *et al.*, 1993), i pot ser identificada en molts casos amb una segona observació, 4-6h posteriors a la primera valoració de la fecundació. Segons Azevedo i col·laboradors (Azevedo *et al.*, 2014), el trencament prematur de la membrana d'un dels dos pronuclis podria ser una altra causa d'observació de zigots monopronucleats. En aquest treball, els autors van identificar, en el citoplasma de l'oòcit, material genètic corresponent al pronucli masculí i al pronucli femení, on només un dels dos pronuclis estava embolcallat per membrana. No es pot descartar, però, que l'absència d'embolcall pronuclear pugui ser deguda a la incompetència de l'oòcit per formar la membrana i completar el desenvolupament d'un dels dos pronuclis (Fig.3,c,I) (Tesarik i Kopečný, 1989). La fusió dels dos materials genètics s'ha proposat com un altre possible mecanisme

1. INTRODUCCIÓ

d'aparició de zigots 1PN amb origen biparental (Levron *et al.*, 1995; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Kai *et al.*, 2015). La fusió inicial, prèvia a la formació dels embolcalls pronuclears, podria ser deguda a l'entrada de l'espermatozoide per la zona pròxima a la placa metafàsica de l'oòcit (Fig.3,c,II) (Levron *et al.*, 1995; Flaherty *et al.*, 1998). Van Der Heijden i col·laboradors (Van Der Heijden *et al.*, 2009) van demostrar l'agregació de les dues masses de cromatina (materna i paterna) en un únic PN adquirint dues possibles conformacions: fusionades entre si, o polaritzades/separades en dos dominis (Fig. 3,c,II). En els casos de FIVc l'espermatozoide podria penetrar l'oòcit per la regió adjacent a la placa metafàsica, ja que no existeix un bloqueig d'aquesta zona tal i com passa en hámster o ratolí (Elder i Dale, 2011). En els casos d'ICSI, tot i que l'espermatozoide s'injectarà allunyat del primer CP, no es pot descartar que finalment quedi situat molt pròxim a la placa metafàsica, degut a la rotació de l'oòcit dins la zona pel·lúcida (Hardarson *et al.*, 2000; Rienzi *et al.*, 2003). El mecanisme de fusió tardana (Fig.3,c,III), posterior a la formació dels embolcalls pronuclears, s'ha confirmat gràcies a l'ús de tecnologia *time-lapse*, observant-se la formació de dos pronuclis i posterior fusió en un únic pronucli de major volum (Montag *et al.*, 2016).

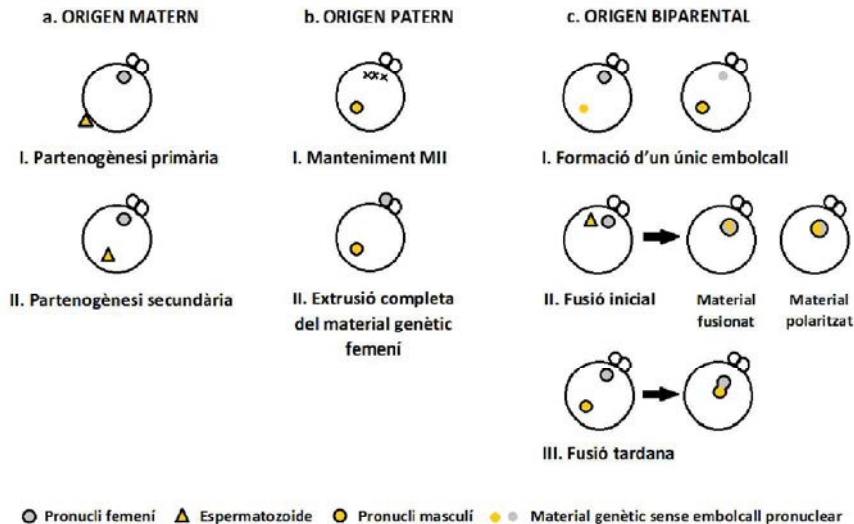


Figura 3. Esquema dels possibles mecanismes de formació dels zigots monoproneuclats. Adaptat a partir de Levron *et al.*, 1995; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2014.

1.1.3.2. Desenvolupament *in vitro*

Els errors del procés de fecundació en els zigots monopronucleats poden comprometre el seu desenvolupament *in vitro*.

Són pocs els estudis que valorin el potencial de desenvolupament fins a estadi de blastocist dels zigots 1PN, ja que la majoria de treballs tenen com a objectiu principal l'anàlisi de la ploïdia dels embrions resultants, i aquests es realitzen majoritàriament en estadis primerencs de desenvolupament.

Les dades publicades sobre la capacitat d'aquests zigots de desenvolupar-se *in vitro* mostren taxes de blastocist que oscil·len entre el 3,6% i el 26,9% (Liao *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2016). Els zigots 1PN que provenen de FIVc presenten un major potencial de desenvolupament que els provinents d'ICSI (26% vs 13,8%), però en ambdós casos mostren taxes més baixes que les observades en embrions derivats de zigots 2PN (Otsu *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2017).

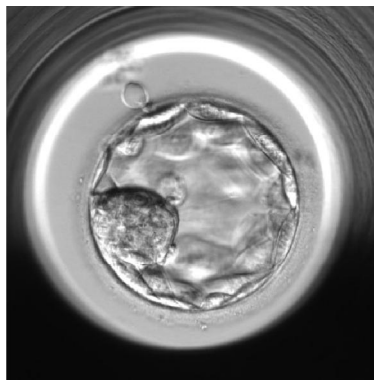


Figura 4. Blastocist provinent d'un zigot monopronucleat d'ICSI (D+5).

1.1.3.3. Característiques citogenètiques

Els zigots monopronucleats han estat objecte de nombrosos estudis principalment dirigits a avaluar la ploïdia dels embrions resultants.

Els treballs que analitzen la dotació cromosòmica de zigots 1PN han mostrat percentatges variables de diploïdia segons la tècnica d'inseminació de la qual provenen, essent més elevats en FIVc que en ICSI. Així, el percentatge d'embrions diploides provinents de zigots 1PN després de FIVc es troba entre el

1. INTRODUCCIÓ

37,5% i el 86,7%, mentre que en ICSI no superen el 30% (0%-30,3%) (Balakier *et al.*, 1993b; Levron *et al.*, 1995; Macas *et al.*, 1996a; Van Der Heijden *et al.*, 2009; Rosenbusch, 2014).

En l'estudi d'embrions en estadis primerencs de desenvolupament provinents de zigots monopronucleats, els percentatges de diploïdia reportats no difereixen dels observats en estadi de zigot. D'aquesta manera, la taxa de diploïdia entre els embrions provinents de FIVc varia entre el 13%-80,5%, mentre que en ICSI se situa entre el 14,3% i el 37,5% (Plachot *et al.*, 1989; Staessen *et al.*, 1993; Sultan *et al.*, 1995; Staessen i Van Steirteghem, 1997; Lim *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2010).

S'ha observat que el percentatge de diploïdia entre els embrions derivats de zigots 1PN es veu incrementat entre aquells embrions que tenen major capacitat de desenvolupament. En conseqüència, les taxes de diploïdia reportades augmenten d'un 38,9% en estadis primerencs fins a un 78% en blastocist o poden arribar a representar el 100% en casos de FIVc (Otsu *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2009).

1.1.3.4. Implicacions en la pràctica clínica

La utilització amb finalitats reproductives dels embrions derivats de zigots monopronucleats és diferent segons la seva procedència.

Diverses publicacions descriuen el naixement de nounats sans provinents d'embrions derivats de zigots 1PN de FIVc, pel que el seu ús reproductiu es pot considerar en els cicles on no es disposi d'embrions provinents de zigots amb un patró de fecundació amb 2PN i 2CP (Staessen *et al.*, 1993; Gras i Trounson, 1999; Dasig *et al.*, 2004; Itoi *et al.*, 2015; Bradley *et al.*, 2017).

Pel contrari, la transferència d'embrions provinents de zigots monopronucleats d'ICSI tradicionalment ha estat desaconsellada degut als baixos percentatges de diploïdia que s'associen a aquests embrions i a la poca casuística de naixements. Fins el moment, només s'ha reportat el naixement d'un nen i una nena sans després de la transferència d'embrions derivats de zigots 1PN d'ICSI (Barak *et al.*, 1998; Bradley *et al.*, 2017).

1.2. SELECCIÓ EMBRIONÀRIA EN TÈCNiques DE REPRODUCCIÓ ASSISTIDA

Existeixen diversos paràmetres del desenvolupament embrionari *in vitro* que poden ser avaluats i que tenen com a objectiu la selecció dels embrions òptims per ser transferits. La morfologia de l'embrió en els primers dies de desenvolupament, la cinètica de divisió i la constitució cromosòmica dels embrions preimplantacionals en són els més habituals, tot i que n'existeixen d'altres com l'estudi de la metabòlica, la proteòmica o l'índex de DNA mitocondrial (Katz-Jaffe *et al.*, 2006; Singh i Sinclair, 2007; Botros *et al.*, 2008; Gardner *et al.*, 2015; Diez-Juan *et al.*, 2017).

1.2.1. Avaluació de la morfologia

L'avaluació dels paràmetres morfològics embrionaris ha estat, i és, un dels principals mètodes de valoració de la qualitat embrionària.

Tradicionalment, les observacions es realitzen el segon (D+2) (43-45 hpi), tercer dia (D+3) (67-69 hpi) i cinquè dia (D+5) (114-118 hpi) de desenvolupament, respectant les hores d'observació establertes, per tal de garantir homogeneïtat en les dades obtingudes i assegurar una correcta classificació embrionària que en permeti la posterior selecció (ASEBIR, 2015).

Els paràmetres avaluats en D+2 i D+3 són habitualment el número i simetria dels blastòmers, la presència i percentatge de fragmentació citoplasmàtica, el número de nuclis cel·lulars i/o presència de multinucleació. Altres paràmetres que es poden tenir en compte són les anomalies citoplasmàtiques (anell citoplasmàtic o vacuoles), les anomalies de la zona pel·lúcida (ZP) i el grau d'adhesió o compactació cel·lular prematura (ASEBIR, 2015). Els embrions amb un desenvolupament òptim són aquells que en D+2 presenten 4-5 cèl·lules i 7-8 cèl·lules en D+3, un baix percentatge de fragmentació citoplasmàtica (<10%) i absència de multinucleació (Gerris *et al.*, 1999; Munné, 2006; Gardner i Balaban, 2016). S'ha descrit que un ritme més ràpid o més lent en la divisió cel·lular pot estar associat a menors taxes d'implantació (Van Royen *et al.*, 1999). En relació a la fragmentació citoplasmàtica, s'ha observat que el desenvolupament embrionari no es veurà afectat en els casos que l'embrió presenti percentatges inferiors al 10-15% del volum embrionari. Pel contrari, percentatges de fragmentacions més elevats, han estat relacionats amb aneuploidies

1. INTRODUCCIÓ

cromosòmiques i a una menor viabilitat embrionària (Van Royen *et al.*, 2001; Munné, 2006; Racowsky *et al.*, 2009). La presència de blastòmers multinucleats també havia estat correlacionada amb un menor potencial de desenvolupament fins a estadi de blastocist i amb la presència d'anomalies cromosòmiques (Kligman *et al.*, 1996; Staessen i Van Steirteghem, 1998; Alikani *et al.*, 2000; Magli *et al.*, 2001). Malgrat tot, els embrions on s'ha observat multinucleació poden desenvolupar-se correctament, implantar i donar lloc al naixement de nounats sans, per la qual cosa actualment no es descarten únicament per aquest fet (Balakier i Cadesky, 1997; Munné, 2006; Parriego *et al.*, 2013).

Els paràmetres avaluats en D+5 en aquells embrions que encara no han assolit l'estadi de blastocist són el grau de compactació (parcial o total) i/o l'inici de blastulació. En els que ja han assolit l'estadi de blastocist es valora el grau d'expansió del blastocel, la mida i compactació de la massa cel·lular interna (MCI), i el número, forma i grau de cohesió de les cèl·lules del trofectorma (TE). Un blastocist amb morfologia òptima és aquell que presenta en D+5 un TE homogeni amb cèl·lules abundants, un blastocel expandit i una MCI ovalada amb cèl·lules compactades i una mida entre 1900-3800 μm^2 (ASEBIR, 2015). La capacitat d'assolir l'estadi de blastocist s'ha correlacionat amb majors taxes d'implantació en comparació amb embrions en estadis més primerencs (Racowsky *et al.*, 2011). Per aquest motiu el cultiu prolongat fins a aquest estadi es considera una bona estratègia de selecció embrionària (ALPHA Scientists In Reproductive Medicine i ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011; Racowsky *et al.*, 2011; ASEBIR, 2015).

S'han proposat diversos esquemes de categorització per unificar la valoració dels embrions preimplantacionals i poder-los classificar segons tinguin un major o menor potencial d'implantació. N'és un exemple la classificació proposada per ASEBIR on els embrions se separen en quatre categories (A, B, C o D) segons les seves característiques morfològiques i evolució embrionària, sent A la classificació que correspon als embrions amb millor qualitat i D la classificació que reben els embrions amb pitjors característiques (ASEBIR, 2007, 2015).

L'any 2011 embriòlegs experts de la *ALPHA Scientists in reproductive medicine* i la *European Society of Human Reproduction* (ESHRE) van elaborar un document de consens on es descrivia la informació mínima necessària per avaluar el desenvolupament embrionari. El propòsit d'aquest treball va ser, no només definir la terminologia utilitzada, sinó també estandarditzar les pràctiques dels laboratoris de TRA per a millorar la comparativa entre els resultats de diferents

centres. En aquesta trobada es van definir tres categories per la morfologia embrionària (*good, fair, poor*) que unificaven les proposades per associacions de diferents països (ALPHA Scientists In Reproductive Medicine i ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011).

1.2.2. Avaluació de la morfocinètica

La tecnologia de monitorització dinàmica es basa en la captura d'imatges seriadades per després ser reproduïdes en una seqüència contínua. En el camp de les TRA les imatges són preses en rangs establerts de temps (5-15 minuts) i en diversos plans focals (3-5) mitjançant un equip de microscopia amb una càmera acoblada, i tot situat dins un incubador. La visualització contínua de les imatges permet avaluar el desenvolupament embrionari durant tot el seu cultiu (Payne *et al.*, 1997). La utilització dels sistemes TL augmenta el nombre d'observacions aconseguint una valoració del desenvolupament embrionari contínua i més acurada, alhora que es mantenen les condicions de cultiu (temperatura i ph) més estables que amb la valoració morfològica convencional (Montag *et al.*, 2011; Meseguer *et al.*, 2012).

L'estudi de la morfocinètica combina la informació relativa a la morfologia embrionària amb la cinètica del desenvolupament embrionari, avaluant el moment i la durada dels diferents estadis embrionaris (Fig 5) (Ciray *et al.*, 2014). També permet identificar esdeveniments anòmals com les divisions irregulars (divisió directe de 1 a 3 cèl·lules, o fusió cel·lular) (Rubio *et al.*, 2012; Athayde Wirka *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014b; Lagalla *et al.*, 2017) i la presència de multinucleació i fragmentació citoplasmàtica.

Per calcular els paràmetres morfocinètics generalment es pren com a inici (t_0) el moment de la inseminació (ICSI o FIVc). No obstant, alguns autors consideren més acurat utilitzar el moment de la desaparició dels pronuclis com a t_0 (Liu *et al.*, 2015), per tal d'eliminar les diferències en la morfocinètica degut a les diferències en el moment de la fecundació entre les tècniques d'inseminació.

1. INTRODUCCIÓ

tPB2	Temps d'aparició del segon CP
tPNa	Temps d'aparició del primer PN
tPNf	Temps de desaparició dels PN
tPNv	Temps de PN visibles
t2-t9	Temps de divisió a 2-9 cèl·lules
tSC	Temps de primers signes de compactació
tM	Temps de compactació complerta
tSB	Temps dels primers signes de blastulació
tB	Temps de blastocist
tEB	Temps d'inici d'expansió
tHB	Temps de blastocist ecllosionat
s1	Temps entre PNf i la següent divisió a 2 cèl·lules
s2	Temps entre la divisió a 3 i la divisió a 4 cèl·lules
s3	Temps entre la divisió a 5 i la divisió a 8 cèl·lules
cc2	Duració del segon cicle cel·lular (t3-t2)
cc3	Duració del tercer cicle cel·lular (t5-t3)

Figura 5. Paràmetres morfofocinètics més freqüentment avaluats.
s: sincronia; cc: durada del cicle cel·lular.

Adaptat a partir de Ciray *et al.*, 2014; Basile *et al.*, 2015; Storr *et al.*, 2015.

La majoria de treballs basats en morfofocinètica han tingut com a objectiu principal predir la capacitat de desenvolupament dels embrions en els primers estadis de desenvolupament. Diversos autors han trobat correlació entre la capacitat dels embrions de realitzar les primeres divisions cel·lulars en un temps més curt i la capacitat d'assolir l'estadi de blastocist (Wong *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2012; Milewski *et al.*, 2015). És possible que les variacions observades en el desenvolupament embrionari siguin pacient dependents, pel que serien necessaris nous estudis on es tinguessin en compte els factors que podrien estar influenciant els resultats (Kirkegaard *et al.*, 2015b).

Els estudis realitzats amb tecnologia de monitorització dinàmica també s'han adreçat a l'optimització de la selecció embrionària per tal de millorar les taxes d'implantació (Lemmen *et al.*, 2008). Amb aquesta finalitat el grup de Meseguer i col·laboradors (Meseguer *et al.*, 2011) va proposar un model multivariable de selecció embrionària que combinava la selecció morfològica amb l'ús de paràmetres cinètics que havien demostrat un major valor predictiu d'implantació. Aquest model va ser reafirmat posteriorment en un estudi prospectiu del mateix grup (Rubio *et al.*, 2014). No obstant, les diferències en les condicions de cultiu i les rutines de laboratori fan aconsellable la creació d'un algoritme propi per a cada centre (Best *et al.*, 2013; Kirkegaard *et al.*, 2014; Carrasco *et al.*, 2017).

Alguns autors també han proposat la utilització de sistemes TL per estudiar la relació entre la morfocinètica embrionària i la presència d'aneuploïdes. El retard en les primeres divisions embrionàries s'ha correlacionat amb anomalies cromosòmiques, i s'han proposat diversos models per seleccionar els embrions amb major probabilitat de ser cromosòmicament normals (Davies *et al.*, 2012; Campbell *et al.*, 2013a, 2013b; Montag, 2013; Swain, 2013; Basile *et al.*, 2014). La validesa dels resultats obtinguts en aquests treballs s'ha posat en entredit degut a la gran quantitat de variables que afecten més enllà de la morfocinètica (Kramer *et al.*, 2014; Kirkegaard *et al.*, 2016).

Tot i que existeixen molts estudis a favor de l'ús d'aquesta tecnologia en la rutina clínica (Basile *et al.*, 2015; Kirkegaard *et al.*, 2015a), hi ha autors que qüestionen el benefici dels sistemes TL, degut a la manca de paràmetres que mostrin millores en les taxes d'implantació (Kaser i Racowsky, 2014; Racowsky *et al.*, 2015). Aquests autors recomanen que els sistemes de monitorització dinàmica es mantinguin com a una eina de recerca fins que nous treballs prospectius demostrin la seva seguretat i millora en els resultats dels tractaments de TRA. Malgrat tot, la utilització d'aquests sistemes s'ha estès àmpliament en molts laboratoris de TRA estant present, a dia d'avui, en més de 49 països diferents (Montag *et al.*, 2016).

1.2.3. Avaluació de la dotació cromosòmica

El diagnòstic genètic preimplantacional i el cribratge o *screening* genètic preimplantacional permeten la caracterització genètica dels embrions abans de la seva transferència.

1. INTRODUCCIÓ

L'objectiu inicial del PGD va ser proporcionar una alternativa a les parelles portadores de malalties genètiques o de reorganitzacions cromosòmiques per tenir descendència sana (Handyside *et al.*, 1990). Més endavant, es va proposar que el PGS podria beneficiar a parelles sotmeses a cicles de FIV. Amb aquesta estratègia es pretendria seleccionar els embrions cromosòmicament normals per tal d'evitar gestacions amb anomalies cromosòmiques alhora que es millorarien les taxes d'embaràs. Tot i que diversos treballs han demostrat que un elevat percentatge dels embrions preimplantacionals humans presenten anomalies cromosòmiques (50-70%) i que la selecció cromosòmica podria suposar un benefici per parelles amb un risc incrementat de tenir embrions aneuploides (casos de fallades repetides d'implantació, avortaments recurrents, gestacions prèvies afectes o dones d'edat avançada) les tècniques de diagnòstic genètic utilitzades i l'estadi embrionari on es realitzarà l'anàlisi són dos aspectes importants per a maximitzar els beneficis del PGS (Munne *et al.*, 1995; Munné *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 2009; Fragouli i Wells, 2011; Yang *et al.*, 2012; Harton *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013b).

1.2.3.1. Biòpsia embrionària

Per poder realitzar la biòpsia, és necessària l'obertura de la zona pel·lúcida per on s'extraurà el material a analitzar. Clàssicament, la utilització de sol·lució d'àcid Tyrode o la dissecció mecànica eren les tècniques més emprades per a la obertura de la zona pel·lúcida. La introducció del làser va suposar una millora en aquest procés per la seva simplicitat, rapidesa i seguretat (Boada *et al.*, 1998).

Existeixen diferents estadis de desenvolupament on es pot realitzar la biòpsia embrionària per dur a terme l'estudi genètic preimplantacional (Scott *et al.*, 2013a; Cimadomo *et al.*, 2016). La biòpsia en estadis de desenvolupament primerencs, generalment realitzada el tercer dia de cultiu embrionari (D+3), ha estat el mètode de biòpsia escollit clàssicament per un major nombre de centres (Moutou *et al.*, 2014; Rycke *et al.*, 2015). L'anàlisi, en aquest moment del desenvolupament, permet detectar les anomalies d'origen matern, patern i post-zigòtic, alhora que permet realitzar la transferència embrionària en el mateix cicle de FIV. S'ha descrit que la biòpsia en D+3 podria influir negativament en el desenvolupament embrionari, retardant els temps de compactació i blastulació, limitant-ne la seva viabilitat i potencial de implantació (Kirkegaard *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013c; Bar-El *et al.*, 2016). Per tal de

minimitzar l'impacte en la viabilitat embrionària s'aconsella la biòpsia d'un nombre reduït de cèl·lules (1-2 blastòmers). No obstant, en els casos on la biòpsia sigui d'un únic blastòmer, no serà possible detectar la presència de mosaïcisme embrionari.

La biòpsia de trofectorma (TE) està essent incorporada recentment en molts laboratoris. El diagnòstic realitzat en aquest estadi permet analitzar un nombre més elevat de cèl·lules (3-8), obtenir un resultat més robust i detectar certs graus de mosaïcisme embrionari (Cimadomo *et al.*, 2016). En aquest cas, també és possible detectar anomalies d'origen matern, patern i post-zigòtic. A diferència de la biòpsia en estadis previs de desenvolupament, s'ha descrit que la biòpsia en estadi de blastocist disminueix l'impacte negatiu en la viabilitat embrionària (de Boer *et al.*, 2004; Forman *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013c). La biòpsia de trofectorma comporta en la majoria dels casos la necessitat de criopreservar els embrions biopsiats. La incorporació de la tècnica de vitrificació ha permès millorar notablement les taxes de supervivència embrionària post-descongelació i, per tant, ha estat clau en l'establiment de la biòpsia de TE (Kuwayama *et al.*, 2005; Kuwayama, 2007; Parriego *et al.*, 2007).

1.2.3.2. Tècniques diagnòstiques per a cribratge d'aneuploidies

Existeixen diverses tècniques utilitzades per a l'anàlisi citogenètica dels embrions preimplantacionals.

La Hibridació *In Situ* Fluorescent (FISH) ha estat la tècnica de diagnòstic més àmpliament utilitzada des dels inicis del PGS (revisat per Zamora *et al.*, 2011). Es basa en la utilització de sondes de DNA específiques amb marcatge fluorescent que hibriden en les regions homòlogues del cromosoma estudiat. Aquesta tècnica pot ser aplicada en tots els estadis de desenvolupament, permetent l'anàlisi de nuclis que es trobin en interfase. En els inicis d'aplicació de la tècnica, la limitació de fluorocroms disponibles i el nombre d'hibridacions seqüencials que es podien realitzar sobre un mateix nucli va fer que el nombre de cromosomes estudiats fos limitat. D'aquesta manera, l'anàlisi quedava restringit a l'estudi dels 5-9 cromosomes més freqüentment implicats en avortaments espontanis de primer trimestre i en nounats portadors d'aneuploidies (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y). La utilització de la tècnica de FISH per als cicles de PGS ha creat controvèrsia degut a la falta d'evidència de la millora dels resultats en cicles realitzats a dones d'edat avançada (Staessen *et al.*, 2004; Mastenbroek *et*

1. INTRODUCCIÓ

al., 2007, 2011; Hardarson *et al.*, 2008). Malgrat que la introducció de modificacions en el protocol de FISH aplicat a cicles de PGS permet, en aquests moments, realitzar l'anàlisi dels 24 cromosomes, la necessitat d'obtenir nuclis de bones característiques després de la biòpsia per tal de poder fer una correcta interpretació dels resultats, segueix sent un aspecte limitant en l'aplicació d'aquesta tècnica (Munné *et al.*, 1996, 2010, Velilla *et al.*, 2002, 2011; Simpson, 2008; Fernández *et al.*, 2015).

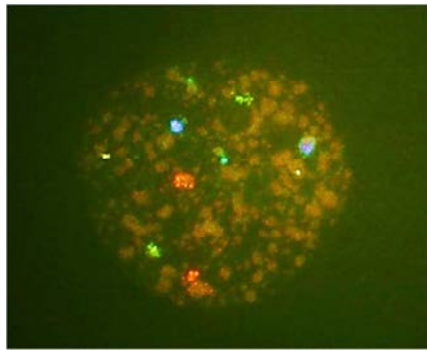


Fig 6. Nucli d'un blastòmer embrionari processat per FISH: cromosoma 13 (vermell), 16 (turquesa), 18 (blau), 21 (verd) i 22 (groc).

El desenvolupament i aplicació en cicles de PGS de noves tècniques que permeten l'anàlisi cromosòmic complert (*comprehensive chromosome screening; CCS*) pretén sobreposar les limitacions observades amb l'anàlisi per FISH (Wilton *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2008; Schoolcraft *et al.*, 2010).

Un exemple de les tècniques que permeten l'estudi de la dotació cromosòmica completa d'un embrió són la hibridació genòmica comparada (CGH) i els *arrays* de CGH (aCGH). Aquestes tècniques es basen en el principi de cohibridació de dues mostres de DNA (test i control) marcades amb fluorocroms diferents. La senyal de fluorescència és analitzada per obtenir el diagnòstic de la mostra estudiada. La intensitat de senyal diferent en un cromosoma concret serà interpretat com una aneuploidia d'aquest cromosoma (revisat per Handyside, 2013 i Gardner *et al.*, 2015). Aquestes tècniques podran ser aplicades en biòpsies de CP, blastòmers o cèl·lules del TE. En els casos de PGS, degut a la baixa quantitat de DNA que conté la biòpsia (1-8 cèl·lules), és necessària l'amplificació

del DNA (Wells *et al.*, 1999). L'ús dels aCGH per al cribratge d'aneuploidies s'ha estès en els darrers anys degut a la relativa facilitat d'aplicació en la pràctica clínica, reproductibilitat i fiabilitat diagnòstica (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2011; Handyside, 2013; Gardner *et al.*, 2015).

Una altra tècnica per a l'anàlisi cromosòmic complet són els *arrays* de polimorfismes d'un únic nucleòtid (aSNP; array single-nucleotide polymorphism). Existeixen més de 40 milions de SNP identificats al llarg del genoma humà (especialment en regions no codificants) i molts d'ells poden ser genotipats simultàniament gràcies als aSNP. El càlcul de les ràtios entre dos al·lels (en SNP bial·lèlics) o l'ús d'anàlisis mendelians, permeten detectar aneuploidies totals o parcials en la mostra analitzada, així com detectar disomies uniparentals (DUP) (revisat per Handyside, 2013 i Gardner *et al.*, 2015). La durada de la tècnica i el seu alt cost econòmic han estat una limitació per a la seva implementació de manera generalitzada.

Dins les tècniques de CCS també es troba la PCR quantitativa en temps real (qPCR). Aquesta consisteix en la preamplificació de 4 *loci* per cromosoma (96 posicions en tot el genoma), que després són quantificats en reaccions individuals de qPCR. La comparació al llarg de tot el genoma del producte de la qPCR amb la mostra control, permet el diagnòstic de la mostra analitzada. L'aplicació d'aquesta tècnica està limitada a biòpsies de TE. Gràcies a no ser necessària una amplificació del genoma, és una de les tècniques més econòmiques i ràpides que existeixen. El procés complet pot finalitzar-se en 4 hores i, per tant, permet la transferència en fresc dels blastocists analitzats. Malgrat tot, el nombre reduït de mostres que es poden analitzar en un únic experiment (dos per anàlisi) és una important limitació per a la seva aplicació (revisat per Handyside, 2013 i Gardner *et al.*, 2015).

La tecnologia de *next-generation sequencing* (NGS) també permet l'estudi cromosòmic complet. Aquesta tècnica combina l'anàlisi simultani d'un gran nombre de mostres, a un baix cost i amb una elevada fiabilitat diagnòstica. Recentment han aparegut diverses tecnologies totes elles basades, de manera general, en l'amplificació i fragmentació del DNA a analitzar. Les seqüències de DNA obtingudes són marcades amb oligonucleòtids que actuaran com a identificadors de cada mostra. Després, els fragments de DNA són seqüenciats i alineats en el genoma control per identificar el nombre de cromosomes en la mostra analitzada (Handyside, 2013; Gardner *et al.*, 2015). L'aplicació d'aquesta tècnica en el cribratge d'aneuploidies preimplantacionals s'ha implementat

1. INTRODUCCIÓ

ràpidament a molts centres, degut als avantatges esmentats anteriorment (Fiorentino *et al.*, 2014a, 2014b; Yang *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2017).

La situació actual del cribratge d'aneuploidies en embrions preimplantacionals sembla indicar que la millor estratègia per millorar els resultats obtinguts en els cicles de PGS és la combinació de la biòpsia en estadi de blastocists juntament amb les tècniques d'anàlisi cromosòmic complert (Schoolcraft *et al.*, 2010; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012, 2014; Scott *et al.*, 2013b; Forman *et al.*, 2014; Dahdouh *et al.*, 2015).

1.2.3.3. Anomalies cromosòmiques en les primeres etapes del desenvolupament embrionari

La presència d'anomalies cromosòmiques és un fenomen habitual entre els embrions preimplantacionals humans. S'ha descrit que l'edat materna, la baixa qualitat embrionària i el bloqueig en el desenvolupament embrionari estan relacionats amb un increment d'aneuploidies (Munné *et al.*, 1995; Munné, 2006; Magli *et al.*, 2007; Harton *et al.*, 2013; Franasiak *et al.*, 2014). Tot i que s'havia proposat que el cultiu fins a blastocist podria disminuir la incidència d'aneuploidies, l'anàlisi dels embrions que assoleixen aquest estadi segueix mostrant anomalies cromosòmiques (Sandalinas *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2007; Fragouli i Wells, 2011; Capalbo *et al.*, 2014). Moltes de les dades presentades en estudis on s'ha analitzat la dotació cromosòmica dels embrions preimplantacionals han estat obtingudes de cicles de PGS amb una única cèl·lula analitzada, i per tant infravalorant els resultats respecte a les característiques cromosòmiques de tot l'embrió.

La presència de mosaïcisme ha estat descrita en estadis inicials del desenvolupament i en estadi de blastocist, i es considera que és un fenomen habitual entre els embrions preimplantacionals provinents de TRA (Munné *et al.*, 1994, 2016; Delhanty *et al.*, 1997; Magli *et al.*, 2000; Bielanska *et al.*, 2002; Daphnis *et al.*, 2005; Fragouli *et al.*, 2011; van Echten-Arends *et al.*, 2011; Mertzaniidou *et al.*, 2013). Entre les línies cel·lulars observades en mosaic es considera normal la presència de cèl·lules tetraploides (4n), provinents de la endoreduplicació de cèl·lules diploides (Daphnis *et al.*, 2005). La presència de cèl·lules haploides també ha estat descrita en embrions preimplantacionals i es considera que en seria un possible origen la divisió de cèl·lules binucleades (Delhanty *et al.*, 1997).

El percentatge de cèl·lules amb dotació cromosòmica anòmala presents en un embrió preimplantacional pot ser variable. En estudis realitzats amb FISH es va postular que un percentatge inferior al 50% de cèl·lules cromosòmicament anormals podria no comprometre el desenvolupament post-implantacional d'un embrió (Munné *et al.*, 2004; Daphnis *et al.*, 2005). Recentment la implicació clínica de les aneuploïdies observades en mosaic ha creat controvèrsia arrel del naixement de 6 nounats sans provinents de la transferència d'embrions diagnosticats com a mosaics aneuploides (Greco *et al.*, 2015; Gleicher *et al.*, 2016; Munné *et al.*, 2016). Aquests resultats semblen donar suport a la teoria que la procedència de cèl·lules aneuploides en mosaic no impediria el desenvolupament embrionari i el naixement de descendència sana, tot i que podria dependre dels cromosomes implicats. La detecció de mosaïcisme dependrà del nombre de cèl·lules biopsiades així com de la tècnica utilitzada per al diagnòstic. La biòpsia en blastocist i la introducció de tècniques de CCS han permès detectar mosaïcisme en embrions que haurien estat classificats com euploides per altres metodologies d'anàlisi (Fragouli *et al.*, 2015).

Altres anomalies cromosòmiques observades en embrions preimplantacionals són les que afecten a la ploïdia de l'embrió, com és el cas dels embrions haploides (n) i triploides (3n) (Plachot *et al.*, 1989; Staessen i Van Steirteghem, 1997). S'ha observat una alteració en el desenvolupament *in vitro* d'aquests embrions. En el cas dels embrions haploides, s'ha descrit que són seleccionats negativament al llarg del cultiu *in vitro* fins a estadi de blastocist (Gras i Trounson, 1999; Liao *et al.*, 2009). Per altra banda, els embrions triploides, tot i tenir un ritme més lent de divisió (Yao *et al.*, 2016), poden desenvolupar-se *in vitro* fins a estadi de blastocist i primeres setmanes de gestació (Steptoe *et al.*, 1980).

En els casos de disomies uniparentals (DUP), les anomalies cromosòmiques venen donades per què les dues còpies d'un cromosoma tenen el mateix origen parental (Soler *et al.*, 2015). Existeixen DUP que afecten un cromosoma complert, DUP parcials o segmentals, que afecten a una regió del cromosoma, o DUP del genoma complert. En aquest darrer cas, tot i que l'embrió presenti dotació cromosòmica diploide euploide, el desenvolupament embrionari es veurà greument afectat degut a l'origen uniparental del material genètic. En els casos de DUP paterna, el desenvolupament embrionari sol donar lloc a una mola hidatiforme, mentre que en els casos d'origen matern dóna lloc a un teratoma (Gardner *et al.*, 2012). S'ha descrit que el mecanisme més freqüent de formació

1. INTRODUCCIÓ

de les DUP d'un únic cromosoma és el rescat de trisomies. En els casos de disomia uniparental del genoma complet es considera que l'origen és degut a una fecundació anòmala, com podrien ser els casos de zigots 1PN d'origen uniparental. Tot i la baixa incidència de DUP (1/3500 nounats vius; Robinson, 2000) s'ha estimat que pot existir un risc incrementat en embrions anòmals o provinents de zigots amb patrons pronuclears atípics (Xu *et al.*, 2015).

CAPÍTOL 2

HIPÒTESI INICIAL

Els embrions derivats de zigots amb un sol pronucli, obtinguts per microinjecció espermàtica (ICSI), poden ser en alguns casos cromosòmicament normals, desenvolupar-se *in vitro* fins a l'estadi de blastocist i, si són transferits, donar lloc al naixement de nens sans.

