

# Screening diagnostico preimpianto: applicazioni e risultati

**Ermanno Greco<sup>1</sup>, Alessandra Ruberti, Elisabetta Cursio, Romualdo Polese, Maria Giulia Minasi**

**1** Centro di Medicina della Riproduzione  
European Hospital - Roma

L'impianto embrionario è uno dei passaggi fondamentali in tutti i programmi di fecondazione assistita, tale da condizionarne in maniera drastica le percentuali di successo. Il trasferimento di un embrione "vitale" in un endometrio "molecolarmente recettivo" è la condizione fondamentale nel determinare il tasso di gravidanza di un programma FIVET-ICSI.

Attualmente, si calcola che solo il 15% degli embrioni prodotti nei programmi FIVET-ICSI si impianti e che solo il 30% dei cicli di fecondazione in vitro eseguiti al mondo dia luogo a gravidanze (1).

Diversi studi hanno recentemente dimostrato che le aneuploidie embrionarie rappresentano una delle cause più importanti di mancato impianto e di abortività (2).

La qualità embrionaria è stata a lungo considerata come la principale responsabile dell'impianto (3). Per questa ragione, la messa a punto di una valida strategia di selezione embrionale è di importanza critica, soprattutto quando viene realizzato un programma di trasferimento embrionario singolo (SET) al fine di evitare l'insorgenza di gravidanze multiple.

Storicamente, la valutazione morfologica dell'embrione è stato il criterio di selezione più largamente utilizzato per identificare l'embrione con maggiori possibilità di impianto. A livello di "cleavage stage", vengono normalmente valutati il numero di cellule, la loro simmetria e la percentuale di frammentazione. A livello di blastocisti, vengono invece valutati il grado di espansione, la qualità e la coesione della

massa cellulare interna e del trofoectoderma (4). Per effettuare tali valutazioni, diventa però necessaria l'osservazione degli embrioni in tempi prestabiliti, con la conseguente esposizione a condizioni non ideali per il loro sviluppo.

Inoltre, vi è oggi un largo consenso scientifico sul fatto che l'aspetto morfologico di un embrione sia legato solo debolmente alla sua vitalità e, soprattutto, non sembra esserci nessuna correlazione tra morfologia embrionaria e normalità genetica (5).

A tale proposito, un recente studio scientifico condotto nei "pazienti a buona prognosi", evidenzia come, anche quando le colture embrionali vengono protrate fino allo stadio di blastocisti, rimane sempre un rischio elevato di aneuploidie cromosomiche embrionarie, tanto maggiore quanto maggiore è l'età della donna (6).

Pertanto, al fine di valutare in maniera più precisa la vitalità embrionaria, sono state proposte diverse metodologie come la metabolomica, la proteomica e soprattutto la morfocinetica embrionaria.

Grazie allo sviluppo di incubatori più moderni dotati di time-lapse monitoring (TLM), che permettono di combinare l'acquisizione di immagini frequenti degli embrioni con condizioni di coltura stabili, è infatti diventato possibile acquisire moltissime informazioni sullo sviluppo dinamico degli embrioni. Tuttavia, nonostante la gran mole di modelli proposti da diversi centri in tutto il mondo, c'è ancora un grande disaccordo su quale sia il

parametro, o la combinazione di parametri, che possano essere determinanti nell'ottenere un miglioramento della percentuale di successo nei cicli PMA (7).

Anche nelle pazienti in cui si effettua un transfer di embrioni di ottima qualità (secondo il metodo tradizionale o con la tecnologia TLM) è possibile, infatti, che si verifichi o una mancata gravidanza o un aborto precoce (8).

In seguito alla diffusione di nuovi mezzi di coltura e all'uso di incubatori che utilizzano una bassa concentrazione di ossigeno, l'estensione della coltura embrionale allo stadio di blastocisti è diventata sempre più efficace e diffusa.

Il laboratorio deve essere attrezzato con un numero di incubatori abbastanza elevato e proporzionato al numero di cicli svolti, così da garantire colture embrionali il più stabili possibile; inoltre, è di fondamentale importanza anche che il personale sia numeroso, competente e altamente formato.

Uno studio recente ha evidenziato come la frequenza dei "no result" dopo biopsia ed analisi genetica, ovvero embrioni per i quali non è possibile amplificare il DNA al fine di valutarne lo status genetico, sia maggiore nei centri in cui il personale è meno addestrato (9). Ciò nonostante, prolungare la coltura embrionale fino alla quinta giornata, selezionando così blastocisti di buona qualità per effettuare il transfer, non è di per sé garanzia di successo. È stato, infatti, dimostrato che neanche l'analisi morfologica delle blastocisti può essere utilizzata per assicurare il transfer di embrioni normali da un punto di vista cromosomico, in quanto gran parte degli embrioni aneuploidi è in grado di raggiungere lo stadio di blastocisti di ottima morfologia, mentre è possibile che alcuni embrioni euploidi abbiano invece una morfologia più scarsa (10).

La coltura a blastocisti dovrebbe essere quindi associata all'analisi genetica in seguito a biopsia embrionale per permettere migliori percentuali di successo.

Lo screening delle aneuploidie embrionali (PGS: Preimplantation Genetic Screening), offre alle coppie che si sottopongono a cicli di PMA uno strumento per valutare l'assetto cromosomico embrionale, permettendo così di trasferire

un singolo embrione (SET), aumentando la percentuale di impianto e riducendo le percentuali di aborto e il rischio di gravidanze plurigemellari (11).

Inizialmente, la PGS è stata effettuata attraverso la tecnica FISH (Fluorescence in Situ Hybridization), con la quale però veniva analizzato soltanto un numero ridotto di cromosomi (cinque, nove o dodici) che si ritenevano essere maggiormente coinvolti nel mancato impianto o negli aborti precoci.

Un gran numero di studi prospettici randomizzati, tuttavia, ha dimostrato la scarsa efficacia nell'aumentare le percentuali di bambini nati dalla PGS effettuata mediante metodica FISH sugli embrioni al terzo giorno di coltura (allo stadio di 6-8 cellule), rispetto ai cicli non PGS. Una delle cause di tale insuccesso potrebbe essere spiegata dall'elevata percentuale di mosaicismi cromosomici che caratterizza gli embrioni nella terza giornata di sviluppo (12). Un altro motivo può essere trovato nel basso numero di cromosomi analizzati: è stato infatti dimostrato che l'anomalia cromosomica può riguardare tutti i cromosomi (13).

Inoltre, la procedura necessaria per effettuare la tecnica FISH è piuttosto complessa e un qualsiasi errore può causare problemi di lettura del risultato, con conseguenti falsi positivi o falsi negativi (14,15).

Le tecniche ormai correntemente utilizzate per la PGS sono la WGA (Whole Genome Amplification) seguita da Array CGH (Array-Comparative Genomic Hybridization o aCGH) o la Next Generation Sequencing (NGS) e la Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (rtq-PCR o qPCR), metodi di indagine che permettono oggi di visualizzare l'intero pannello cromosomico (16,17,18).

Il prelievo del materiale genetico, mediante biopsia, può essere effettuato a tre differenti stadi: sugli ovociti o sugli zigoti (biopsia del/ dei corpo/i polare/i), su embrioni a 6-10 cellule (biopsia del blastomero) o sulle blastocisti (biopsia del trofoblasto). Indipendentemente dalla tecnica utilizzata, la biopsia prevede due fasi: 1) l'apertura della zona pellucida (ZP) che può essere effettuata chimicamente, meccanicamente o con un laser a diodi e 2) la

rimozione della/e cellula/e (19).

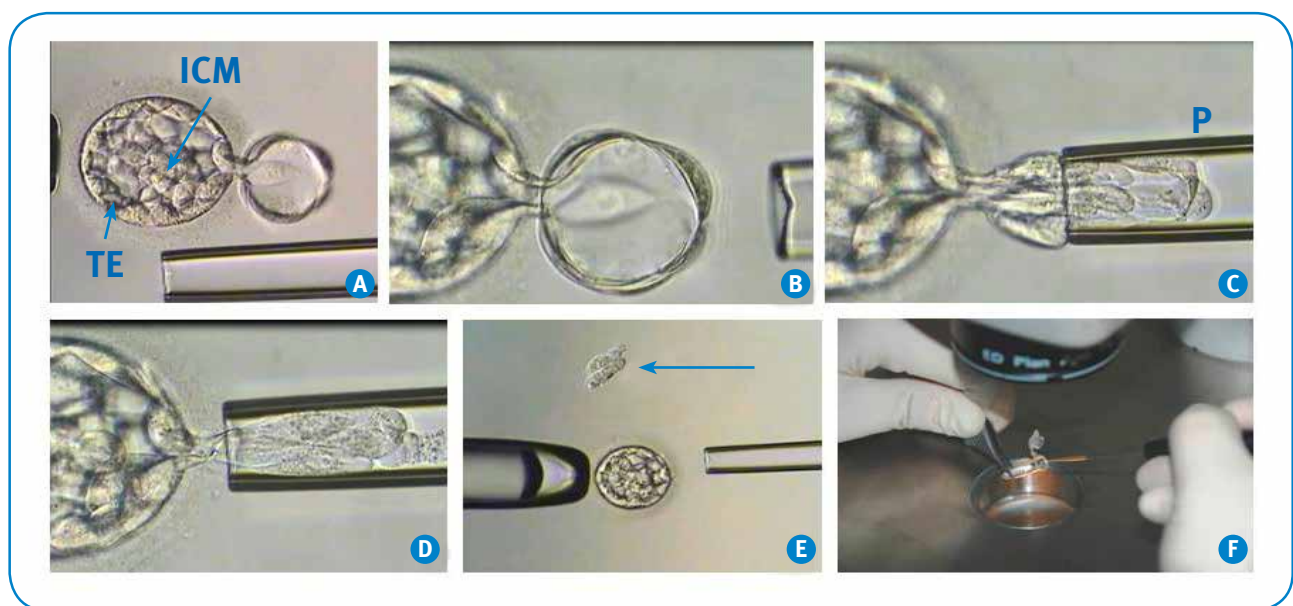
La biopsia del corpo polare consiste nella rimozione del primo corpo polare (CP) da un ovocita prima della ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection), al fine di valutarne lo stato genetico. E' possibile effettuare anche l'analisi del secondo CP dopo l'inseminazione, allo stadio di zigote.

La biopsia di embrioni a 6-10 cellule viene generalmente effettuata nella terza giornata di coltura. In questo caso si procede, dopo l'apertura della ZP, all'aspirazione di uno dei

blastomeri dell'embrione.

I blastomeri sono totipotenti e tale proprietà fa sì che la rimozione di uno di essi non influenzi la capacità delle cellule rimanenti di differenziarsi ed evolversi in tutte le linee cellulari necessarie per un corretto sviluppo.

Una volta che la biopsia è stata effettuata, non è necessario congelare gli embrioni, ma si ha il tempo necessario per effettuare l'analisi genetica, dato che il transfer può essere effettuato dopo due o tre giorni, allo stadio di blastocisti (19).



**Fig. 1:** Nella figura sono illustrate le fasi salienti della biopsia allo stadio di blastocisti: la blastocisti in hatching, in cui siano chiaramente visibili l'inner cell mass (ICM) e il trofocotoderma (TE), viene orientata in modo da poter prelevare qualche cellula del TE senza toccare l'ICM (A,B). Successivamente, con la pipetta da biopsia (P) si aspira delicatamente un pezzetto di trofocotoderma (C,D) che viene staccato con l'aiuto del laser. Il pezzetto staccato (freccia blu in E) viene quindi trasferito in una provetta (tubing) per la successiva analisi genetica (F).

La biopsia della blastocisti (**Figura 1**) può essere effettuata in quinta, sesta o settima giornata, in funzione di quando la blastocisti è completamente formata ed espansa. Essa consiste nella rimozione di alcune cellule del trofoectoderma (TE) senza intaccare l'Inner Cell Mass (ICM).

Il TE è la porzione della blastocisti che non dà origine all'embrione ma agli annessi embrionali, mentre l'ICM è la parte della blastocisti da cui si svilupperà il feto, pertanto, la rimozione del TE non comporta danni per il corretto sviluppo dell'embrione.

Il campione di cellule viene prelevato praticando

un foro nella zona pellucida (ZP) e aspirando le cellule del TE. Il campione prelevato va dalle 2 alle 9 cellule. E' importante notare che allo stadio di blastocisti è possibile rimuovere un numero maggiore di cellule rispetto alla biopsia effettuata in terza giornata, permettendo così il recupero di una maggior quantità di materiale genetico utilizzabile per l'analisi.

A questo stadio, inoltre, l'embrione risulta essere più resistente alla biopsia rispetto ad un embrione in terza giornata: nonostante la totipotenza dei blastomeri di un embrione a 6-10 cellule, infatti, è possibile che il potenziale di impianto di tali embrioni risulti ridotto (19,20).

La biopsia embrionale viene sempre più spesso effettuata allo stadio di blastocisti; in questo modo è anche possibile ridurre i costi della procedura, in quanto non tutti gli embrioni in coltura sono fisiologicamente in grado di diventare blastocisti; la percentuale di sviluppo a blastocisti, infatti, è circa del 50% (21).

Un altro vantaggio di effettuare la biopsia allo stadio di blastocisti è quello di ridurre il rischio di mosaicismo. Esso è definito come la presenza di due o più linee cellulari geneticamente differenti all'interno della stessa blastocisti (22).

La diminuzione del mosaicismo della blastocisti rispetto all'embrione può dipendere da meccanismo di "self correction", che si esplicherebbe attraverso una maggiore apoptosi delle cellule aneuploidi rispetto a quelle sane o da una differente velocità mitotica dei due tipi cellulari o anche, soprattutto nelle pazienti giovani, per eventi reciproci a livello della seconda divisione meiotica ovocitaria (23,24). Inoltre, il prelievo di più di una cellula dal TE al momento della biopsia, e non di una sola come accade nella biopsia degli embrioni al terzo giorno di coltura, permette di avere un campione più rappresentativo dell'assetto cromosomico della blastocisti.

Le strategie che possono essere applicate dopo la biopsia delle blastocisti sono due: una volta effettuata la biopsia in quinta giornata si può effettuare il transfer il giorno successivo - data la velocità dell'analisi effettuata con le moderne tecniche di biologia molecolare - oppure si può effettuare la biopsia in quinta, sesta o settima giornata seguita dalla vitrificazione delle blastocisti e dal successivo transfer su ciclo congelato in quinta giornata, quando l'endometrio è in condizioni ideali per l'impianto.

Attualmente la strategia che prevede la vitrificazione delle blastocisti e il successivo transfer su ciclo stimolato o naturale sembra essere la migliore (25), in quanto permette di avere più tempo per il counseling e l'analisi dei risultati genetici, evitando anche il rischio di iperstimolazione ovarica.

Questa strategia, inoltre, consente di raggiungere una migliore sincronizzazione tra blastocisti ed endometrio.

Il campione ottenuto con la biopsia viene processato per ottenere la diagnosi genetica: il DNA viene amplificato tramite tecniche di biologia molecolare per poi procedere all'analisi del pannello cromosomico completo tramite aCGH, NGS o qPCR. Tutti questi metodi hanno una risoluzione elevata, sono completamente automatizzati e richiedono meno di 24 ore per ottenere il risultato (16,17,18).

La tecnica aCGH si basa sull'amplificazione del DNA tramite WGA. Durante il processo analitico, questi frammenti di DNA sono marcati in maniera differenziale con molecole fluorescenti (generalmente si utilizza un fluorocromo rosso per il DNA test ed un fluorocromo verde per il DNA da analizzare) e, successivamente, vengono mescolati in parti uguali e fatti incubare (ibridazione) su un microarray, costituito da un supporto di vetro la cui superficie è coperta di frammenti di DNA, noti come sonde o cloni.

Ognuno di questi cloni rappresenta una specifica regione del genoma umano, fino a ricomprendere l'intero assetto cromosomico. Tanto più è elevato il numero di cloni, maggiore è l'efficacia dell'array nell'identificazione delle variazioni del numero di copie corrispondenti a piccole porzioni di ciascun cromosoma.

Il potere risolutivo della piattaforma utilizzata può variare in funzione della densità e della tipologia delle sonde utilizzate; attualmente per scopi diagnostici vengono impiegati array tra 1 Mb e 100 Kb. Al termine della suddetta incubazione, sia il DNA in esame che quello di controllo si legheranno ai cloni presenti sull'array.

Il risultato sarà l'emissione di due distinti segnali fluorescenti le cui intensità saranno misurate a seguito di lettura degli array mediante un apposito strumento (scanner). Sull'immagine ottenuta verrà poi effettuata l'analisi comparativa tra le intensità di fluorescenza emesse dai due DNA e la relativa elaborazione dei dati mediante un apposito software, al fine di evidenziare eventuali variazioni del numero di copie del DNA test. In caso di assetto cromosomico normale, il rapporto tra le due emissioni è bilanciato (1:1) (16).

La tecnica di NGS si è affermata nel campo della PMA negli ultimi anni. Tale analisi consiste nei seguenti passaggi principali: inizialmente il



DNA viene frammentato e a seguito amplificato per PCR.

Successivamente, i frammenti di DNA ottenuti vengono usati come stampo per sintetizzare un double strand di DNA attraverso cicli alternati, in cui prima vengono forniti nucleotidi marcati noti e poi vengono lavati via per eliminarne l'eccesso.

La lettura del risultato può avvenire con due tecniche principali: il sistema MiSeq, che si basa sull'emissione di fluorescenza generata dall'incorporazione dei nucleotidi fluorescenti e il sistema PGM (Ion Torrent Personal Genome Machine), che, invece, rileva le variazioni di pH dovute al rilascio di un protone durante la reazione di allungamento.

I dati vanno poi scremati, analizzati e riallineati attraverso approcci bio-informatici. Alcuni dei vantaggi dell'NGS rispetto all'array sono l'elevata capacità di riconoscimento dei mosaici e la maggior velocità di esecuzione (17).

Una ulteriore metodica utilizzata per verificare lo stato genetico dell'embrione è la qPCR o PCR quantitativa; la tecnica consiste nell'utilizzare un fluorocromo associato alla normale reazione di amplificazione così da ottenere un aumento della fluorescenza direttamente proporzionale alla quantità di materiale genetico amplificato. Nel caso particolare della PGS, sono necessarie delle modifiche della metodica poiché l'amplificazione non è specifica per un solo gene ma comprende l'intero genoma; ad ogni cromosoma corrisponde uno specifico valore Ct (Ciclo soglia, ovvero il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base) che va confrontato con il valore Ct totale dell'intero amplificato.

Attraverso un'equazione è quindi possibile risalire alla quantità di amplificato proveniente da ciascuno specifico cromosoma, in modo tale da valutare facilmente l'assetto cromosomico dell'embrione.

La tecnica è talmente accurata da riuscire a valutare non solo le aneuploidie ma anche i mosaicismi (ovvero aneuploidie che colpiscono solo alcune delle cellule che costituiscono la blastocisti) (18).

Questa tecnica, tuttavia, presenta anche degli svantaggi, ha, infatti, una densità di

sonde relativamente bassa e può fallire nell'identificazione delle delezioni e delle duplicazioni cromosomiche (26).

Le indicazioni per effettuare la PGS in coppie che affrontano un ciclo di PMA sono molteplici: età materna avanzata (Advanced Maternal Age, AMA; età materna  $\geq 37$ ) (27), ripetuti fallimenti (Repeated Implantation Failure, RIF; più di 3 cicli di PMA con transfer falliti o dopo il transfer di più di 10 embrioni in transfer multipli) (28), poliabortività (Recurrent Miscarriages, RM; più di 3 aborti spontanei) (29), eziologia multipla (ME; Multiple Etiology; due o più delle precedenti indicazioni combinate).

La legge, inoltre, consente di accedere alla PGS anche a quelle coppie che, pur non avendo un'indicazione clinica particolare, vogliono conoscere lo stato di salute dell'embrione (ex art. 14 comma 5 legge 40/2004).

Ultimamente una richiesta sempre maggiore si ha da coppie giovani che vogliono trasferire un unico embrione, senza ridurre le percentuali di successo della tecnica FIVET-ICSI.

Da uno studio recente effettuato su più di 14.000 blastocisti analizzate (30), si è avuta la conferma che la percentuale di blastocisti aneuploidi aumenta con l'avanzare dell'età materna, con conseguente diminuzione dell'impianto embrionario; lo stesso studio ha dimostrato anche che le possibilità di trovare una blastocisti euploide, e pertanto di effettuare il transfer, diminuiscono con l'avanzare dell'età materna.

Con l'età materna, aumenta anche il numero dei cromosomi colpiti dalla aneuploidia. Generalmente il rapporto tra monosomie e trisomie è pari, anche se in alcuni casi nell'età giovanile possono prevalere le monosomie e nell'età materna avanzata le trisomie (6).

Per quanto riguarda la genesi delle aneuploidie, è stato dimostrato che circa il 70% di esse dipende da errori della meiosi (prima e seconda divisione) materna (31). In particolare, nelle pazienti giovani le anomalie sono presenti a livello della meiosi I, mentre nelle pazienti anziane a livello della meiosi II o di entrambe (31).

L'errore più frequente a livello meiotico è la separazione precoce dei cromatidi fratelli, responsabile di circa il 95% delle anomalie;

mentre la non-disgiunzione cromosomica lo sarebbe solo per il per il restante 10% (31).

Nel nostro centro, da Gennaio 2011 a Maggio 2015, sono stati effettuati 1116 cicli di PGS in cui sono state analizzate 3538 blastocisti. Di questi, solo 293 cicli sono stati effettuati in donne giovani (età  $\leq 36$  anni) senza una specifica indicazione clinica.

Nei restanti 823 cicli, 78 hanno eseguito PGS per RIF, 21 per RM, 161 per ME e 563 per AMA (**Tabella 1 e 2**).

Analizzando i risultati ottenuti nel nostro centro, si evince che nelle pazienti senza indicazione clinica specifica, la percentuale di evoluzione a blastocisti diminuisce in maniera statisticamente significativa con l'avanzare dell'età materna ( $p < 0.001$ ), anche se le percentuali di fertilizzazione ovocitaria e di clivaggio embrionario sono uguali in tutti i gruppi esaminati (74.5%, 74.9% e 74.1% di fertilizzazione e 98.9%, 98.4% e 98.1% di clivaggio nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente, NS) (**Tabella 1**).

Il nostro dato è in accordo con uno studio pubblicato recentemente (32) che evidenzia che la blastulazione, l'espansione e la fuoriuscita dalla zona pellucida (hatching) è di gran lunga superiore negli embrioni euploidi rispetto a quelli aneuploidi e che la probabilità della evoluzione a blastocisti diminuisce in maniera lineare e statisticamente significativa ( $p < 0.0002$ ) con il numero di cromosomi colpiti.

Dai nostri dati, inoltre, anche la velocità di formazione delle blastocisti sembra essere influenzata dall'età materna: è stato infatti ottenuto un più alto numero di blastocisti ( $p < 0.001$ ) al quinto giorno di coltura in pazienti più giovani rispetto alle più anziane (64.7%, 64.1% e 55.9% nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente), mentre in queste ultime si ottiene una percentuale statisticamente più alta ( $p < 0.003$ ) di blastocisti al sesto giorno di coltura rispetto alle pazienti più giovani (30.9%, 31.6% e 38.5% nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente) (**Tabella 1**).

È importante sottolineare il fatto che anche se complessivamente la maggior parte delle blastocisti si ottiene al quinto giorno di coltura, è possibile ottenere blastocisti anche fino al

settimo (4.4% 4.3% 5.6% nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente) (**Tabella 1**) che possono risultare euploidi. Pertanto, tali blastocisti andrebbero comunque prese in considerazione e non andrebbero scartate a priori (25).

Analizzando, invece, le percentuali di evoluzione a blastocisti nei diversi giorni di coltura in base alla indicazione medica, si rileva una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.005$ ) solo nella velocità di formazione delle blastocisti al sesto giorno per le pazienti ME (32.4%) e per le pazienti AMA (34.0%), rispetto alle RIF e RM (42.0% e 37.0%, rispettivamente) (**Tabella 2**).

Per quanto riguarda il rapporto di blastocisti euploidi versus quelle aneuploidi in base alle differenti fasce di età, si rileva una diminuzione statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) di embrioni euploidi tra i tre gruppi esaminati (47.5%, 34.9% e 16.1% nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente) e un aumento degli embrioni aneuploidi ( $p < 0.001$ ) con l'avanzare dell'età materna (42.4%, 58.2% e 79.1% nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente); inoltre, si rileva un aumento degli embrioni a mosaico ( $p < 0.001$ ) soprattutto nei pazienti giovani (7.5%, 4.6% e 3.0% nelle pazienti di anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente). (**Tabella 1**).

La percentuale di aneuploidie aumenta significativamente ( $p < 0.001$ ) nelle pazienti ME (68.2%) e nelle pazienti AMA (65.1%), rispetto a quelle con una singola indicazione genetica (48.1% e 47.3% nelle pazienti RM e RIF, rispettivamente).

La maggior parte degli embrioni euploidi ( $p < 0.001$ ) è stata invece ottenuta nelle pazienti RIF e RM, rispetto a quelle ME e AMA (42.7%, 40.7%, 23.7% e 28.3% in RIF, RM, ME e AMA, rispettivamente).

Non esiste nessuna differenza significativa nella percentuale di embrioni a mosaico ottenuti nelle pazienti in base alle diverse indicazioni cliniche analizzate (**Tabella 2**).

Per quanto riguarda il tipo di anomalie cromosomiche, ed in particolare il rapporto tra aneuploidie complesse (due o più cromosomi colpiti) e le monosomie e trisomie, si nota come nelle pazienti con età  $\geq 41$  anni prevalgano le aneuploidie complesse ( $p < 0.001$ ), mentre nelle pazienti con età minore di 40 anni, il rapporto

tra i due tipi di aneuploidie è bilanciato (*Tabella 1*).

Se consideriamo invece l'indicazione clinica, la maggior parte delle aneuploidie complesse ( $p < 0.001$ ) si trova nelle pazienti RM, ME e AMA (65.4%, 66.6%, e 63.6%, rispettivamente) (*Tabella 2*).

Le pazienti con una età  $\geq 41$  anni hanno meno possibilità di effettuare il transfer ( $p < 0.001$ ), sia per un aumento della degenerazione embrionaria che per aumento del numero di blastocisti aneuploidi.

Tuttavia, una volta effettuato il transfer, le pazienti nei tre differenti gruppi di età presentano la stessa probabilità di rimanere in gravidanza, con il 35.3%, 42.1% e 37.8% di gravidanze cliniche in pazienti con anni  $\leq 36$ , 37-40 e  $\geq 41$ , rispettivamente.

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative nella percentuale di aborti per le tre classi di età esaminate (*Tabella 1*).

I risultati ottenuti in base alla indicazione clinica, evidenziano una differenza statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) per il numero di transfer effettuati, che risulta essere maggiore nelle pazienti RIF (87.2%) e minore nelle pazienti ME (50.3%).

Anche in questo caso, una volta effettuato il transfer non sono evidenziate differenze significative nelle gravidanze cliniche (55.9%, 46.7%, 40.7% e 40.9% in pazienti RIF, RM, ME e AMA, rispettivamente).

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative nella percentuale di aborti per le varie indicazioni cliniche esaminate (*Tabella 2*).

I dati in nostro possesso sembrerebbero indicare una maggiore percentuale di successo del trasferimento dopo vitrificazione rispetto a quello fresco, probabilmente grazie a una migliore sincronizzazione con l'endometrio uterino (dati non pubblicati).

La elevata percentuale di sopravvivenza delle blastocisti alle procedure di crioconservazione mediante vitrificazione, fa sì che tale strategia possa essere applicata con rischi molto bassi (33).

Uno degli argomenti più dibattuti riguardanti la PGS, è la sua effettiva applicabilità nei pazienti a buona prognosi (età inferiore ai 36 anni).

Dai nostri dati, si evidenzia che circa il 42% delle blastocisti che si formano in questa

categoria di pazienti, è comunque aneuploide, con evidenti ripercussioni sull'esito clinico e sul numero di tentativi necessari per raggiungere il successo.

Diversi studi prospettici randomizzati in questo gruppo di pazienti, evidenziano come il trasferimento di blastocisti euploidi abbia tassi di gravidanza clinica, ongoing e nascita statisticamente più elevati rispetto al controllo (6).

L'applicazione della PGS risulta quindi uno strumento efficace, al fine di aumentare le percentuali di successo delle tecniche di PMA e di ridurre i tempi di attesa per l'ottenimento del risultato.

Qualsiasi sia l'indicazione alla diagnosi preimpianto, infatti, le coppie infertili trovano nella PGS un valido strumento per ottenere in tempi brevi una gravidanza con bimbo in braccio.

Come ogni tecnica di laboratorio, ci sono dei limiti dovuti ai costi elevati della tecnica e allo stress psicologico delle coppie che si possono trovare a dover accettare un mancato transfer, a causa della mancanza di embrioni euploidi da trasferire.

E' necessario inoltre affidarsi a centri che posseggano le competenze e le attrezzature necessarie per effettuare la PGS affinché questa si dimostri uno strumento effettivamente valido, poiché la tecnica è di difficile esecuzione.

È importante ricordare che comunque, anche con la PGS, circa il 35% degli embrioni euploidi non si impianta. Secondo un recente studio (34), questo potrebbe essere dovuto, alla quantità di DNA mitocondriale presente negli embrioni.

Blastocisti euploidi con un elevato livello di DNA mitocondriale hanno più basse probabilità di impianto (34). In termini numerici, questa alterazione può riguardare circa un terzo degli embrioni euploidi.

La selezione delle blastocisti euploidi anche in base al DNA mitocondriale potrebbe aumentare di un ulteriore 8% il tasso di impianto (34). Per dimostrare questa ipotesi sono necessari ulteriori studi prospettici randomizzati.

## Bibliografia

- Schoolcraft W, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *FertilSteril*. 2010;94(5):1700-6.
- Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M, Munné S. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *FertilSteril*. 2012;98(3):675-80.
- Forman EJ, Upham KM, Cheng M, Zhao T, Hong KH, Treff NR, Scott RT Jr. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer. *FertilSteril*. 2013;100(3):718-24.
- ALPHA Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group in Embryology. The Istanbul Consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270-1283.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1993;8(12):2185-91.
- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoblast biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *FertilSteril*. 2014;101(3):656-663.
- Kaser D J, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Human Rep* 2014; 0(0):1-15.
- Marquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000;1:17-26
- Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *FertilSteril*. 2011;95(3):953-8.
- Alfarawati S, Fragouli E., Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *FertilSteril* 2011;35:520-524.
- Wilton L. Preimplantation Genetic Diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *PrenatDiagn*. 2002;22:512-518.
- Vanneste E, Voet T, Melotte C, Debrock S, Sermon K, Staessen C, Liebaers I, Fryns JP, D'Hooghe T, Vermeesch JR. What next for preimplantation genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis for the low success rate. *Hum Reprod* 2009;24:2679-2682.
- Lee E, Illingworth P, Wilton L, Chambers GM. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Hum Reprod*. 2015;30(2):473-83.
- Coonen E, Dumoulin JCM, Ramaekers FCS, Hopman AHN. Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei by fluorescent in situ hybridisation. *Hum Reprod*. 1994;9:533-7.
- Tarkowski AK. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966;5:394-400.
- Gogol-Döring A, Chen W. An overview of the analysis of next generation sequencing data. *Methods MolBiol*. 2012;802:249-57.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genom*. 2012;13:341.
- Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT Jr. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril*. 2012;97(4):819-24.
- Greco E, Fabozzi G, Ruberti A, Zavaglia D, Minasi MG. Preimplantation genetic diagnosis and the biopsy technique: Important considerations. *Advances in Reproductive Sciences* 2013;1(2):1-8.
- Scott RT Jr, Ferry K, Su J, Tao X, Scott K, Treff NR. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, non selection study. *FertilSteril* 2012;97:870-875.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Rep* 2002;17(9):2415-2418.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. Multi-colour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997;99:755-760.
- Angell RR. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet*. 1991;86(4):383-7.
- Fragouli E, Bianchi V, Patrizio P, Obradors A, Huang Z, Borini A, Delhanty JD, Wells D. Transcriptomic profiling of human oocytes: association of meiotic aneuploidy and altered oocyte gene expression. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(8):570-82.
- Minasi M.G., Greco E. Current aspects of blastocyst culture, biopsy and vitrification. *Current Trends in Clinical Embriology* 2014;1(1):27-33.
- Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):697-703.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. 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 Rep* 2004;19-12:2849-2858.
- Greco E, Bono S, Ruberti A, Lobascio AM, Greco P, Biricik A, Spizichino L, Greco A, Tesarik J, Minasi MG, Fiorentino F. Comparative Genomic Hybridization Selection of Blastocysts for Repeated Implantation Failure Treatment: A Pilot Study. *BioMed Research International*. 2014.
- Rubio C, Simeon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Rep*. 2003;18-1:182-188.
- Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, Griffin DK, Wells D. PGD Practitioners Group. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *FertilSteril*. 2013;100(6):1695-703.
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet*. 2013;132(9):1001-13.
- Vega M, Breborowicz A, Moshier EL, McGovern PG, Keltz MD. Blastulation rates decline in a linear fashion from euploid to aneuploid embryos with single versus multiple chromosomal errors. *Fertil Steril*. 2014;102(2):394-8.
- Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*. 2012;18(5):536-54.
- Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel CE, Kocinski F, Cohen J, Munne S, Wells D. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS Genet*. 2015;3;11(6).



**Tabella 1:** Dati in base alla fascia di età femminile riferiti a cicli PGS senza indicazione clinica specifica effettuati nel periodo da Gennaio 2011 a Maggio 2015 presso il Centro di Medicina della Riproduzione European Hospital.

	<36 anni (A)	37-40 (B)	≥41 (C)	p
N. Cicli	293	321	242	
Eta' Materna	33.2±2.4	38±1.1	42±1.6	
Fertilizzazione (%)	1968/2641 (74.5)	1707/2280 (74.9)	1156/1561 (74.1)	Ns
Embrioni (%)	1948/1968 (98.9)	1680/1707 (98.4)	1134/1156 (98.1)	Ns
Embrioni Scongelati	115	105	15	
Blastocisti (%)	1217/2063 (59.0)	1006/1785 (56.4)	535/1149 (46.6)	A Vs C P<0.0001 B Vs C P<0.01
Giorno 5 (%)	787/1217 (64.7)	645/1006 (64.1)	299/535 (55.9)	A Vs C P<0.0002 B Vs C P<0.0008
Giorno 6 (%)	376/1217 (30.9)	318/1006 (31.6)	206/535 (38.5)	A Vs C P<0.003 B Vs C P<0.003
Giorno 7 (%)	54/1217 (4.4)	43/1006 (4.3)	30/535 (5.6)	Ns
Euploidi (%)	541/1138 (47.5)	350/1006 (34.9)	86/535 (16.1)	A Vs B P<0.0001 A Vs C P<0.0001 B Vs C P<0.0001
Aneuploidi (%)	482/1138 (42.4)	581/1006 (58.2)	423/535 (79.1)	A Vs B P<0.0001 A Vs C P<0.0001 B Vs C P<0.0001
Mosaici (%)	85/1138 (7.5)	47/1006 (4.6)	16/535 (3.0)	A Vs B P<0.001 A Vs C P<0.0001
Nr (%)	30/1138 (2.6)	28/1006 (2.7)	10/535 (1.9)	Ns
Aneuploidie Complesse (%)	247/482 (51.2)	324/581 (55.8)	314/423 (74.2)	A Vs C P<0.0001 B Vs C P<0.0001
Monosomie+Trisomie (%)	237/482 (49.2)	257/581 (44.2)	109/423 (25.8)	A Vs C P<0.0001 B Vs C P<0.0001
Embryo Transfer (%)	286/293 (97.6)	216/321 (67.3)	82/242 (33.9)	A Vs B P<0.0001 A Vs C P<0.0001 B Vs C P<0.0001
Gravidanze Cliniche (%)	101/286 (35.3)	91/216 (42.1)	31/82 (37.8)	Ns
Aborti (%)	2/101 (1.9)	6/91 (6.6)	0 (0.0)	Ns

**Tabella 2:** Dati in base alla indicazione clinica riferiti a cicli PGS effettuati nel periodo da Gennaio 2011 a Maggio 2015 presso il Centro di Medicina della Riproduzione European Hospital.

	RIF (A)	RM (B)	ME (C)	AMA (D)	p
N. Cicli	78	21	161	563	
Eta' Materna ±Ds	34.5±2.9	36±2.0	40.4±1.9	40.3±2.4	A Vs B P<0.03 A Vs C P<0.0001 A Vs D P<0.0001 B Vs C P<0.0001 B Vs D P<0.0001
Fertilizzazione (%)	507/654 (77.5)	96/122 (78.7)	866/1146 (75.6)	2863/3841 (74.5)	Ns
Embrioni (%)	477/507 (94.1)	94/96 (98.0)	850/866 (98.1)	2814/2863 (98.3)	A Vs C P<0.0001 A Vs D P<0.0001
Embrioni Scongelati	48	2	25	120	
Blastocisti (%)	269/490 (54.9)	54/96 (56.3)	457/875 (52.2)	1541/2934 (52.5)	Ns
Giorno 5 (%)	143/269 (53.2)	29/54 (53.7)	280/457 (61.3)	944/1541 (61.2)	A Vs C P<0.01 A Vs D P<0.006
Giorno 6 (%)	143/269 (53.2)	29/54 (53.7)	280/457 (61.3)	944/1541 (61.2)	A Vs C P<0.01 A Vs D P<0.006
Giorno 7 (%)	13/269 (4.8)	5/54 (9.3)	28/457 (6.1)	73/1541 (4.7)	Ns
Euploidi (%)	112/262 (42.7)	22/54 (40.7)	108/456 (23.7)	436/1541 (28.3)	A Vs C P<0.0001 A Vs D P<0.0001 B Vs D P<0.02 B Vs C P<0.004 C Vs D P<0.03
Aneuploidi (%)	124/262 (47.3)	26/54 (48.1)	311/456 (68.2)	1004/1541 (65.1)	A Vs C P<0.0001 A Vs D P<0.0001 B Vs C P<0.002 B Vs D P<0.007
Mosaici (%)	119/262 (7.3)	3/54 (5.6)	16/456 (3.5)	63/1541 (4.0)	Ns
Nr (%)	7/262 (2.7)	3/54 (5.6)	21/456 (4.6)	38/1541 (2.5)	C Vs D P<0.006
Aneuploidie Complesse (%)	63/124 (50.8)	17/26 (65.4)	207/311 (66.6)	638/1004 (63.6)	A Vs C P<0.001 A Vs D P<0.003
Monosomie+Trisomie (%)	61/124 (49.2)	9/26 (34.6)	104/311 (33.4)	366/1004 (36.4)	A Vs C P<0.001 A Vs D P<0.003
Embryo Transfer (%)	68/78 (87.2)	15/21 (71.4)	81/161 (50.3)	298/563 (52.9)	A Vs C P<0.0001 A Vs D P<0.0001 B Vs D P<0.04 B Vs C P<0.03
Gravidanze Cliniche (%)	38/68 (55.9)	7/15 (46.7)	33/81 (40.7)	122/298 (40.9)	Ns
Aborti (%)	3/38 (7.9)	1/7 (14.3)	1/33 (3.0)	6/122 (4.9)	Ns