

Riunione del 9 Marzo 2010 Roma – Istituto Superiore della Sanità

DEFINIZIONE DEGLI EMBRIONI PREIMPIANTO NON EVOLUTIVI

ISS - REGISTRO NAZIONALE PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

Bolli Simone

D'Aloja Paola

De Luca Roberto

Scaravelli Giulia

Vigiliano Vincenzo

EMBRIOLOGI SIERR

Albani Elena

IRCCS Istituto Clinico Humanitas - Rozzano (Milano)

Artini Paolo

Dipartimento di Medicina della Procreazione e dell'Età Evolutiva - Università Pisa

Chamayou Sandrine

HERA - Sant'Agata Li Battiati (Catania)

Cho Yoon

Casa di Cura Santa Maria -Bari

Ciriminna Rosanna

Centro A.M.B.R.A. - Palermo

Coticchio Giovanni

BIOGENESI - Istituti Clinici Zucchi - Monza

Cuomo Simona

DEMETRA - Firenze

De Santis Lucia

Centro Scienze Natalità Ospedale San Raffaele - Milano

Micara Giulietta

Università “La Sapienza”-Roma

Novara Paola V.

IRCCS Istituto Clinico Humanitas - Rozzano -Milano

Restelli Liliana

U.O. Sterilità di Coppia - Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina

Elena - Milano

Ruvolo Giovanni

CBR –Palermo

La raccolta dei dati biologici riguardanti la procreazione medicalmente assistita da parte del Registro Nazionale PMA e la loro divulgazione solleva ovviamente diversi interrogativi su quali informazioni debbano essere raccolte e come. La elaborazione e comunicazione di questi dati dovrebbe avvenire in modo chiaro e semplice, motivo per cui la collaborazione tra gli operatori del Registro e gli operatori della PMA diventa strumento indispensabile per la condivisione e la continua evoluzione delle modalità di raccolta dei dati.

La SIERR è stata consultata dal gruppo che coordina il Registro Nazionale PMA allo scopo di definire i criteri secondo i quali un embrione preimpianto possa essere definito non evolutivo e quindi non utilizzato per il reimpianto in utero; ciò anche allo scopo di ridisegnare le schede dei report del Registro e poter fornire dati numerici anche su questo evento.

La riunione suddetta è stata un'occasione importante di incontro e di discussione su temi che giornalmente, ma singolarmente, sono affrontati nei laboratori di embriologia.

La capacità dell'embrione preimpianto umano di svilupparsi e dare luogo ad una gravidanza a termine è alquanto limitata. Ciò è dovuto fondamentalmente a fattori intrinseci riconducibili alla qualità gametica, in particolare oocitaria. Per esempio, è noto che la qualità dell'oocita sia frequentemente compromessa da una condizione di aneuploidia (Obrados et al., 2010) o dalla mancata produzione di fattori essenziali per le prime fasi dello sviluppo (Wu et al., 2003). In vitro, la competenza allo sviluppo dell'embrione non è sempre evidente o verificabile. Infatti, il destino dell'embrione può essere pregiudicato da perturbazioni del metabolismo non del tutto chiarite o facilmente investigabili nel contesto delle normali attività di un laboratorio di PMA (Brison et al., 2004). Viceversa, in certi casi, anomalie del ciclo cellulare sono indicative della qualità dell'embrione. In particolare, parecchi studi indicano concordemente che alterazioni della scansione temporale dello sviluppo preimpianto siano diagnostiche dell'impossibilità dell'embrione di generare una gravidanza evolutiva. In altri termini, appare che negli embrioni nei quali determinate fasi dello sviluppo (comparsa dei pronuclei e divisioni cellulari immediatamente successive) non sono compiute entro precisi intervalli temporali rispetto al momento dell'inseminazione (IVF o ICSI), lo sviluppo non è destinato ad avere esito positivo. Come

descritto nei punti successivi, tali nozioni sono applicabili nella pratica corrente di PMA per l'individuazione degli embrioni non vitali che, come tali, non sono destinabili al transfer o alla crioconservazione.

E' necessario innanzitutto convenire in maniera univoca sulla definizione di alcuni termini necessari per la raccolta dei dati embriologici:

Ovociti prelevati: ovociti aspirati dai follicoli ovarici

Ovociti crioconservati: ovociti sottoposti ad una tecnica di congelamento

Ovociti inseminati: ovociti utilizzati ai fini di una microiniezione dello spermatozoo o di una fecondazione in vitro

Ovociti non utilizzati: tutti gli ovociti non utilizzati per il ciclo di fecondazione, siano essi scartati perché non idonei oppure in esubero ed eventualmente destinati, previo consenso firmato dalla paziente, a progetti di ricerca.

Uova Fecondate 2 PN: uova (ovocita dopo l'espulsione del secondo globulo polare) nelle quali siano stati osservati 2 pronuclei dopo 16- 20 ore dall'inseminazione.

Uova Fecondate \neq 2PN: uova nelle quali siano stati osservati un numero di pronuclei diverso da due; dalla somma di queste uova più le uova fecondate 2 PN si ottengono per sottrazione dagli ovociti inseminati gli ovociti non fecondati.

Embrioni non evolutivi: l'embrione è considerato non evolutivo quando, 24 ore dopo la precedente osservazione, non è andato incontro ad ulteriore divisione cellulare.

Embrioni trasferiti: embrioni trasferiti in utero materno in seconda, terza, quarta, quinta o sesta giornata dal prelievo ovocitario.

Embrioni crioconservati: embrioni sottoposti a tecniche di congelamento a differenti stadi di sviluppo.

Osservazione in prima giornata

I pronuclei maschile e femminile compaiono quasi contemporaneamente tra la 5a e la 12a ora post-inseminazione (p.i.) e scompaiono in perfetta sincronia solitamente dopo la 20a ora p.i (Capmany et al., 1996; Nagy et al., 1994; Payne et al., 1997).

L'eventuale comparsa dei pronuclei in tempi successivi alla 20a ora coincide con la formazione di embrioni incapaci di generare una gravidanza evolutiva (Giorgetti et al., 1995).

Osservazione in seconda giornata

La divisione dell'uovo fecondato in due blastomeri si verifica tipicamente tra la 23a e la 35a ora p.i. (Capmany et al., 1996). La mancata formazione dei due blastomeri a 44-46 ore p.i., tempo in cui è effettuato l'embryo transfer in seconda giornata, dovrebbe essere considerato un arresto irreversibile dello sviluppo. Ciò è indicato dal fatto che il transfer in seconda giornata di uova fecondate non divise non produce gravidanze evolutive (Giorgetti et al., 1995).

Osservazione in terza giornata

Nel corso dello sviluppo preimpianto, il ciclo cellulare avviene in tempi progressivamente più brevi. Pertanto, per inferenza dalle evidenze relative all'osservazione in seconda giornata, qualora a 70-72 ore p.i. non fosse riscontrata alcuna divisione mitotica rispetto allo stato osservato a 44-46 ore p.i., l'embrione dovrebbe essere considerato non evolutivo

Ai fini della raccolta dei dati del Registro, uno dei punti più discussi è stato quello riguardante gli ovociti non fecondati, in quanto l'intervallo di tempo tra inseminazione e prima osservazione non è uniforme in tutti i laboratori. Tale difficoltà ha portato alla mancata definizione di ovociti non fecondati ed ottenere gli stessi per esclusione, deducendone il numero per differenza tra gli ovociti inseminati cui vanno sottratte le uova fecondate e le uova fecondate con un numero di pronuclei diverso da 2.

Altri gruppi di ovociti/embrioni non sono stati definiti in quanto deducibili per sottrazione dai gruppi definiti.

Tra questi:

embrioni evolutivi: ottenuti dalla somma degli embrioni trasferiti più gli embrioni crioconservati.

uova fecondate 2 PN non divise: si deducono per differenza dalle uova fecondate 2PN meno gli embrioni non evolutivi e gli embrioni evolutivi.

A partire dalle definizioni sopra riportate è stato organizzato un diagramma di flusso che riassume in modo chiaro ed inequivocabile il destino degli ovociti/embrioni dei cicli di procreazione medicalmente assistiti sia nei dati di ogni singolo centro, sia nei calcoli cumulativi dei dati di tutti i Centri.

Il fine ultimo dell'incontro è quello di stilare un documento condiviso prima con tutti i membri SIERR e gli embriologi italiani, e in un secondo

tempo con la Federazione delle Società Scientifiche in occasione del convegno di Riccione a maggio 2010.

Riferimenti bibliografici

Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA, Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Leese HJ.Hum Reprod.* 2004 Oct;19(10):2319-24.

Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol Hum Reprod.* 1996 May;2(5):299-306.

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R.. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers *Hum Reprod.* 1995 Sep;10(9):2427-31.

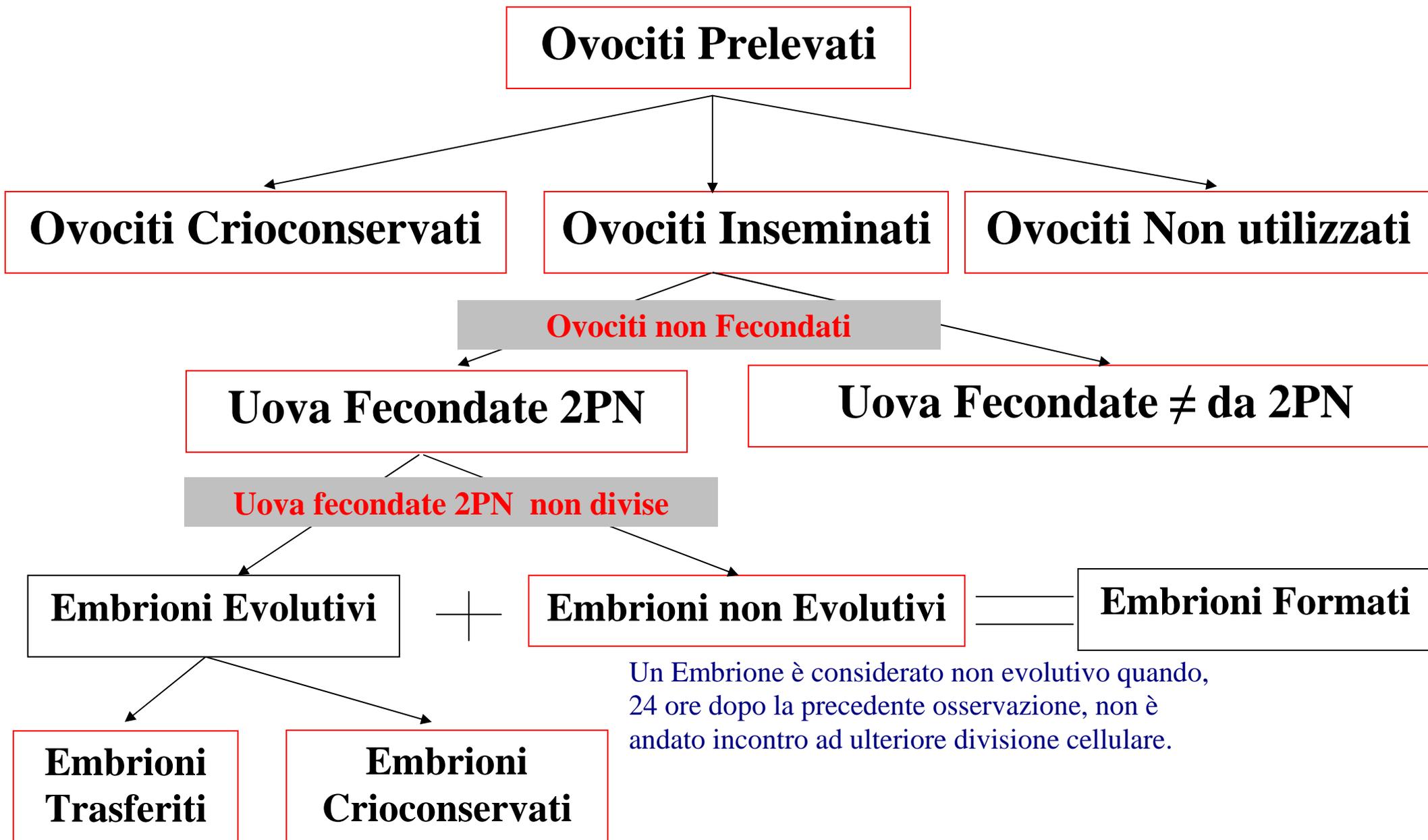
Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994 Sep;9(9):1743-8.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997 Mar;12(3):532-41.

Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutiérrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Márquez C, Benet J, Navarro J. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(2):675-9.

Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM.

Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nat Genet.* 2003 Feb;33(2):187-91.



Un Embrione è considerato non evolutivo quando, 24 ore dopo la precedente osservazione, non è andato incontro ad ulteriore divisione cellulare.