



DEFINIZIONE DEGLI EMBRIONI PREIMPIANTO NON EVOLUTIVI

Revisione Ottobre 2019, a cura di:

SIGU: Antonio Novelli
Daniela Zuccarello

SIERR: Laura Rienzi
Rosanna Ciriminna
Lucia De Santis
Giovanni Coticchio
Maria Giulia Minasi

La SIERR (Società Italiana di Embriologia Riproduzione e Ricerca) e la SIGU (Società Italiana di Genetica Umana), a 9 anni di distanza dalla stesura del primo documento elaborato nel 2010 sulla definizione di “embrione non evolutivo”, hanno sentito l’esigenza di aggiornarlo ed implementarlo alla luce dello sviluppo delle nuove capacità diagnostiche legate alle nuove tecnologie allo scopo di ridefinire i criteri secondo i quali un embrione preimpianto possa essere definito non evolutivo.

La capacità dell’embrione preimpianto umano di svilupparsi e dare luogo ad una gravidanza a termine è intrinsecamente esigua. Ciò è dovuto essenzialmente a fattori riconducibili alla qualità gametica, in particolare ovocitaria. Per esempio, è noto come la qualità dell’ovocita sia frequentemente compromessa da una condizione di aneuploidia età-dipendente (Taylor et al., 2014; Capalbo et al. 2017) o dalla mancata produzione di fattori essenziali per le prime fasi dello sviluppo (Bebbere et al. 2016).

In vitro, la competenza allo sviluppo dell’embrione non è in tutti i casi verificabile con certezza. Per esempio, il destino dell’embrione può essere pregiudicato da perturbazioni del metabolismo non del



tutto note o investigabili nel contesto delle normali attività di un laboratorio di PMA (Leese et al., 2016). Viceversa, in certi casi, anomalie del ciclo cellulare sono indicative della qualità dell'embrione.

Studi basati su osservazioni morfologiche dello sviluppo eseguite staticamente, ancor prima dell'avvento della Time Lapse Microscopy (TLM), hanno indicato concordemente che specifiche alterazioni della scansione temporale dello sviluppo preimpianto sono 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 determinati intervalli temporali rispetto al momento dell'inseminazione (IVF convenzionale o ICSI), lo sviluppo non ha 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.

L'introduzione nell'ultimo decennio della TLM ha generato un enorme incremento del volume di dati morfocinetici sullo sviluppo preimpianto. Sebbene ciò abbia generato una maggiore consapevolezza di importanti fenomeni dello sviluppo precedentemente ignoti o trascurati, tranne pochissime eccezioni non è stato ancora possibile determinare algoritmi o identificare singole caratteristiche morfocinetiche in grado di stabilire inequivocabilmente lo stato di vitalità dell'embrione. Fa eccezione un fenomeno descritto come "directcleavage" consistente nella divisione diretta e immediata di una cellula in tre cellule figlie (**DUC-1**). Eventi di directcleavage possono verificarsi a qualsiasi stadio di sviluppo e avere conseguentemente differente impatto sulla vitalità dell'embrione (Zhan et al., 2016). Nel caso in cui sia l'uovo fecondato a dividersi in tre blastomeri tramite directcleavage, l'embrione che ne deriva risulta quasi sempre affetto da aneuploidie complesse (McCoy et al, 2018) e pressoché privo di capacità d'impianto (Zhan et al., 2016). Tuttavia, non esistendo evidenze totalmente univoche sulle possibilità di impianto degli embrioni provenienti da DUC-1 anche in presenza di una limitatissima possibilità di impianto non è ad oggi possibile inserire questa tra le condizioni di non evolutività.

Inoltre, è oggi possibile identificare la presenza di malattie genetiche ereditarie e/o alterazioni cromosomiche (numeriche o strutturali) in embrioni in diverse fasi di sviluppo. Il materiale sul quale



può essere eseguito il test genetico è infatti rappresentato da: (i) corpi polari ovocitari, (ii) blastomeri di embrioni allo stadio di clivaggio, (iii) cellule prelevate dal trofoectoderma allo stadio di blastocisti (Zegers-Hochschild et al., 2017). Quest'ultimo rappresenta ad oggi il miglior approccio in quanto garantisce una maggiore robustezza dell'analisi genetica nonché il minor impatto sullo sviluppo embrionale a seguito della biopsia (Scott et al., 2013).



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 convenzionale
- **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.
- **Ovociti Fecondati 2 PN**: ovociti dopo l'espulsione del secondo globulo polare in cui siano stati osservati 2 pronuclei dopo 16- 20 ore dall'inseminazione.
- **Ovociti Fecondati in modo anomalo**: ovociti in cui siano stati osservati un numero di pronuclei diverso da 2
- **Direct Cleavage (DUC-1)**: divisione diretta dell'uovo fecondato in tre blastomeri: se all'osservazione con gli attuali dispositivi di time-lapse che raccolgono immagini ad intervalli di 10-15 min, non sia distinguibile un passaggio da 2 a 3 cellule; ossia nel caso di $t_3 - t_2 = 0$
- **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
- **Aneuploidia**: anomalia del numero dei cromosomi diversa dall'assetto diploide (46, 2n).
- **Aploidia**: corredo cromosomico con un singolo assetto cromosomico (23, 1n)



- **Monosomia**: assenza di un cromosoma
- **Trisomia**: presenza di un cromosoma soprannumerario
- **Autosomi**: cromosomi dall'1 al 22
- **Mosaicismo cromosomico**: presenza di linee cellulari con diverso contenuto cromosomico
- **Poliploidia**: presenza di cromosomi in numero multiplo rispetto al normale numero diploide
- **Triploidia**: corredo cromosomico con un triplo assetto cromosomico (69, 3n)
- **Tetraploidia**: corredo cromosomico con un quadruplo assetto cromosomico (92, 4n)

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 quasi sempre dopo la 20a ora p.i. (Capmany et al., 1996; Nagy et al., 1994; Payne et al., 1997; Coticchio et al., 2018). 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'ovocita fecondato in due blastomeri si verifica a partire in genere dalla 20a ora p.i., tipicamente tra la 23a e la 35a ora p.i. (Capmany et al., 1996; Meseguer et al., 2011; Coticchio et al., 2018). La mancata formazione dei due blastomeri a 44-46 ore p.i., richiede una ulteriore valutazione (almeno ulteriori 24h di coltura).

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 è considerato non evolutivo.



Osservazione in 5/7 giornata

Il mancato sviluppo embrionale nelle fasi successive di crescita (morulazione/blastulazione) indica l'incapacità dell'embrione allo sviluppo.



DEFINIZIONE DI EMBRIONE NON EVOLUTIVO

L'embrione è considerato non evolutivo se non compatibile con la vita postnatale, ovvero:

1. Quando lo stato nucleare è diverso dalla diploidia. Questa valutazione viene effettuata al momento della fecondazione osservando la presenza microscopica di un numero di pronuclei diverso da 2.

NB. Per accertare lo stato di ploidia degli ovociti/embrioni sono oggi disponibili anche ulteriori approcci diversi dalla sola valutazione morfologica.

2. Quando, 24 ore dopo la precedente osservazione, non è andato incontro ad ulteriore divisione cellulare
3. Se, allo stadio di blastocisti, è affetto da aneuploidia complessa (trisomia e/o monosomia di 2 o più autosomi).
4. Se, allo stadio di blastocisti, è affetto da monosomia completa o parziale in forma omogenea di un autosoma.
5. Se, allo stadio di blastocisti, è affetto da trisomia completa o parziale in forma omogenea di uno dei seguenti cromosomi: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 14, 19. Tale anomalia viene infatti ritenuta non compatibile con una gravidanza evolutiva oltre il primo trimestre.
6. Se, allo stadio di blastocisti, è affetto da poliploidia (triploidia/tetraploidia) o aploidia.
7. Se, allo stadio di blastocisti, è affetto da una malattia monogenica letale in utero.

Nei casi 4-5-6-7 è necessario tenere conto della percentuale di errore diagnostico intrinseca alle tecniche utilizzate in diagnosi preimpianto e della eventuale rilevazione di mosaicismo cromosomico, che varia in base alla tecnica di analisi utilizzata.



Riferimenti bibliografici

1. Bebbere D, Masala L, Albertini DF, Ledda S. The subcortical maternal complex: multiple functions for one biological structure? *J Assist Reprod Genet* 2016;1–8. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
2. 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. *LeeseHJ.HumReprod.* 2004 Oct;19(10):2319-24.
3. Capalbo A, Hoffmann ER, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update.* 2017 Nov 1; 23(6):706-722.
4. Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *MolHumReprod.* 1996 May;2(5):299-306.
5. Ch De Geyter C Calhaz-Jorge M S Kupka C Wyns E Mocanu T Motrenko G Scaravelli JSmeenck S Vidakovic V Goossens, The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE, *Human Reproduction*, Volume 33, Issue 9, 1 September 2018, Pages 1586–1601. doi.org/10.1093/humrep/dey242
6. Coticchio G, Mignini Renzini M, Novara PV, Lain M, De ponti E, Turchi D, Fadini R, Dal Canto M. Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Human Reproduction*2018; 33:23–31.
7. D.M.7/10/2005 G.U.282 3/12/2005
8. Germond M, Wirthner D, Senn A; Calhaz-Jorge C, Castilla JA, Cohen J, Consten D, de Mouzon J, Diaz NP, Ferraretti AP, Gianaroli L, Gissler M, Grygoruk C, Gudleviciene Z, Hazekamp JT, Isikoglu M, Lidegaard Ø, Karlström PO, Korsak V, Kupka MS, Limoni C, Mariller M, Mayorga J, McNab A, Merlet F, Mocanu E, Nyboe Andersen A, Nygren KG, Scaravelli G, Tomazevic T, Urbancsek J, Urdl W, Yunakova M, Core data for assisted reproductive technology registers: results of a consensus meeting *Reprod Biomed Online* Dec;17(6):834-40 (2008)
9. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmänn J, Roulier R.. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers*HumReprod.* 1995 Sep;10(9):2427-31.
10. Kupka MS, de Geyter C, de Mouzon J, Erb K, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Wyns C, Calhaz-Jorge C. Core dataset The European IVF-Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), July 2016



11. Lagalla C, Tarozzi N, Sciajno R, Wells D, Di Santo M, Nadalini M, Distratis V, Borini A. Embryos with morphokinetic abnormalities may develop into euploid blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2017;34:137–146.
12. Legge 40/2004 G.U.45 24 febbraio 2004
13. Linee Guida legge 40/2004 G.U. 161 del 17/7/2015
14. McCoy RC, Newnham LJ, Ottolini CS, Hoffmann ER, Chatzimeletiou K, Cornejo OE, Zhan Q, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Petrov DA, et al. Tripolar chromosome segregation drives the association between maternal genotype at variants spanning PLK4 and aneuploidy in human preimplantation embryos. *Human Molecular Genetics* 2018; 27:2573–2585.
15. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction* 2011; 26:2658–2671.
16. 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.
17. 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.
18. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)
19. Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá M-J, Bellver J, Meseguer M. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and Sterility* 2012; 98:1458–1463.
20. Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril.* 2013 Sep;100(3):624-30.
21. Tarun Jain, M.D., David A. Grainger, M.D., M: P:H:, G. David Ball, Ph.D. et al. 30 years of data: impact of the United States in vitro fertilization data registry on advancing fertility care. *Fertility and Sterility* 2018
22. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017
23. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting HR, Vol.26, No.6 pp. 1270–1283, 2011
24. XII° Report Registro Nazionale Procreazione Medicalmente Assistita www.iss.it/rpma



25. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, Simpson JL, van der Poel S. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *HumReprod.* 2017 Sep 1;32(9):1786-1801
26. Zegers-Hochschild F1, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S; The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. Hum Reprod.* 2009 Nov;24(11):2683-7
27. Zhan Q, Ye Z, Clarke R, Rosenwaks Z, Zaninovic N. Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. In Schlatt S, editor. *PLoS ONE* 2016; 11:e0166398. Public Library of Science.