



# UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

## DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE

**Test genetici preimpianto per aneuploidie in pazienti con ricorrenti aborti e ricorrenti mancati impianti**  
Preimplantation genetic testing for aneuploidy in patients with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure

Tesi di Laurea  
Mazzieri Chiara

Sessione Luglio 2023  
Anno Accademico 2022/2023

Docente referente  
Chiar.mo Prof.  
Giacchini Giorgia

# ANEUPLOIDIA

ANOMALIA CROMOSOMICA NUMERICA MOLTO FREQUENTE, CONSISTE NELLA PERDITA O ACQUISIZIONE DI UNO O PIÙ CROMOSOMI (AUTOSOMI E/O SESSUALI).

È CAUSATA DALLA MANCATA DISGIUNZIONE O DALL'ANOMALA DISTRIBUZIONE DEI CROMOSOMI DURANTE LA MEIOSI (I O II) O LA MITOSI (MOSAICISMO).

IN QUESTO CASO DI STUDIO SI È VOLUTO DIMOSTRARE IL BENEFICIO DELL'USO DI TEST GENETICI PREIMPIANTO PER ANEUPLOIDIE (PGT-A) PER LA BUONA RIUSCITA DI UNA GRAVIDANZA IN PAZIENTI CON RPL (RICORRENTI ABORTI) E RIF (RICORRENTI MANCATI IMPIANTI), CONFRONTANDO I DATI CON UN GRUPPO DI CONTROLLO SOTTOPOSTO ANCH'ESSO A SELEZIONE EMBRIONALE (NO PGT-A) E FECONDAZIONE IN VITRO (IVF-ET).

## TEST GENETICI PREIMPIANTO PER ANEUPLOIDIE

I **PGT-A** SONO ESEGUITI ANALIZZANDO IL DNA DELL'OOCITA (GLOBULO POLARE) O DELL'EMBRIONE PER DETERMINARE E RICERCARE ANEUPLOIDIE. L'OBIETTIVO PRINCIPALE È QUELLO DI AUMENTARE I TASSI DI SUCCESSO DI GRAVIDANZA PER TRASFERIMENTO DI EMBRIONE E DIMINUIRE GLI ABORTI SOPRATTUTTO IN PAZIENTI RPL E RIF. GRAZIE ALL'AVVENTO DI NUOVE TECNOLOGIE GENOMICHE COME L'ARRAY-CGH E SEQUENZIAMENTI DI ULTIMA GENERAZIONE (NGS) BASATE SULL'AMPLIFICAZIONE DEL GENOMA I PGT-A SONO SEMPRE PIÙ USATI IN PRATICHE CLINICHE.

INOLTRE PUÒ ESSERE USATO AL POSTO DELLA BIOPSIA TRAMITE FISH IN CASI DI IVF, VISTO CHE QUESTO TEST PRESENTA MOLTE LIMITAZIONI.

# ARRUOLAMENTO PAZIENTI

PAZIENTI DI 35-42 ANNI ARRUOLATI TRA SETT. 2017 E GIUGNO 2018 (KATO LADIES CLINIC)

CRITERI DI ESCLUSIONE: ANOMALIE STRUTTURALI O NUMERICHE IN UNO O ENTRAMBI I GENITORI, ANOMALIE UTERINE CONGENITE, AZOOSPERMIA, PRESENZA SINDROME ANTIFOSFOLIPIDICA (APS)

14 **RPL**=>NO PRECEDENTI NASCITE VITALI, 2 O + ABORTI DI CUI ALMENO UNO CAUSATO DA EMBRIONI ANEUPLOIDI (GRAVIDANZA TRAMITE IVF-ET)

18 **RIF**=>3 O + FALLITI IMPIANTI DOPO IVF-ET O DOPO TRASFERIMENTO DI BLASTOCISTI

2556 GRUPPO DI CONTROLLO=>NO PGT-A

## STEP SPERIMENTAZIONE

- 1) MINIMA STIMOLAZIONE OVARICA CON CLOMIFENE CITRATO (50 MG/GG) E OVULAZIONE INDOTTA TRAMITE SPRAY NASALE (BURSELINA) -> DOPO 35H RACCOLTA DEGLI OVOCITI
- 2) FECONDAZIONE OVOCITI TRAMITE ICSI
- 3) CULTURA EMBRIONI IN EMBRIOSCOPIO PER 5-7 GG (BLASTOCISTI VALUTATA TRAMITE IL SISTEMA GARDNER)
- 4) BIOPSIA DEL TROFOECTODERMA
- 5) WGA E ARRAY-CGH
- 6) TRASFERIMENTO BLASTOCISTI (EUPLOIDI, MOSAICO, ANEUPLOIDI)

	Before propensity score matching				After propensity score matching								
	Control	PGT-A		<i>P</i>	Total			RIF			RPL		
		RIF	RPL		Control	PGT-A	<i>P</i>	Control	PGT-A	<i>P</i>	Control	PGT-A	<i>P</i>
No. of patients, <i>n</i>	2556	18	14		25	25		14	14		11	11	
Age of women (years)	37.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	39.0 ± 0.5 <sup>a,b</sup>	39.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.0535	38.5 ± 0.9	38.6 ± 0.4	0.8899	38.2 ± 0.9	38.9 ± 0.5	0.5671	38.4 ± 1.8	38.5 ± 0.6	0.9625
Age of men (years)	39.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	41.7 ± 1.1 <sup>b</sup>	40.7 ± 0.8 <sup>a,b</sup>	0.0827	40.7 ± 1.0	41.4 ± 0.9	0.5972	42.4 ± 1.4	42.6 ± 1.5	0.9166	39.9 ± 1.5	40.5 ± 0.9	0.5423
Body mass index	21.3 ± 0.5	21.1 ± 0.5	21.5 ± 0.5	0.3548	20.7 ± 0.4	20.5 ± 0.5	0.4833	21.2 ± 0.8	19.8 ± 0.7	0.2315	20.2 ± 0.4	21.9 ± 0.8	0.2001
AMH	2.0 ± 1.8	1.9 ± 1.7	3.1 ± 2.1	0.2538	3.1 ± 2.8	2.4 ± 1.8	0.9571	2.6 ± 1.1	2.2 ± 1.8	0.6874	3.9 ± 4.0	2.6 ± 1.8	0.5677
Previous OR cycles, <i>n</i>	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.4	5.7 ± 0.8	0.5235	5.5 ± 0.8	5.2 ± 0.5	0.6962	4.4 ± 1.0	4.6 ± 0.5	0.8040	6.2 ± 1.7	5.9 ± 1.1	0.8941
Previous ET cycles, <i>n</i>	2.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.0001	5.5 ± 0.8	4.9 ± 0.5	0.8985	4.8 ± 1.1	4.7 ± 0.4	0.9506	6.5 ± 1.5	4.9 ± 0.8	0.3812
Previous pregnancy loss, <i>n</i>	0.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>c</sup>	<0.0001	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.8157	0	0	–	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.3	0.4521
Infertility cause, <i>n</i> (%)				0.7135			0.8674			0.8491			0.7358
Ovulation	286 (11.2)	1 (5.6)	1 (7.1)		1 (4.0)	2 (8.0)		2 (14.3)	1 (7.1)		0 (0)	1 (9.1)	
Oviduct factor	128 (5.0)	1 (5.6)	1 (7.1)		1 (4.0)	1 (4.0)		0 (0)	1 (7.1)		1 (9.1)	0 (0)	
Endometrial factor	154 (6.0)	3 (16.7)	1 (7.1)		1 (4.0)	3 (12.0)		1 (7.1)	2 (14.3)		1 (9.1)	1 (9.1)	
Male factor	404 (15.8)	3 (16.7)	1 (7.1)		5 (20.0)	3 (12.0)		3 (21.4)	3 (21.4)		1 (9.1)	1 (9.1)	
Combination	217 (8.5)	1 (5.6)	0 (0)		1 (4.0)	1 (4.0)		2 (14.3)	1 (7.1)		0 (0)	0 (0)	
Unexplained	1,367 (53.5)	9 (50.0)	10 (71.4)		16 (64.0)	15 (60.0)		6 (42.9)	6 (42.9)		8 (72.7)	8 (72.7)	
Gonadotropins administered, (IU)	250 ± 6 <sup>a</sup>	375 ± 25 <sup>b</sup>	396 ± 33 <sup>b</sup>	0.0418	351 ± 54	446 ± 46	0.3436	380 ± 77	396 ± 51	0.8636	313 ± 79	381 ± 37	0.4462
Oocytes retrieved, <i>n</i>	3.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	8.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	<0.0001	6.6 ± 1.4	7.1 ± 0.6	0.7593	7.6 ± 2.3	7.7 ± 0.7	0.9304	5.5 ± 1.3	6.3 ± 1.1	0.6471
Blastocysts, <i>n</i>	1.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	<0.0001	4.0 ± 0.8	4.4 ± 0.5	0.7416	5.4 ± 1.3	5.6 ± 0.6	0.8450	2.8 ± 0.9	3.2 ± 0.5	0.7327
Frozen blastocysts, <i>n</i>	1.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	4.1 ± 0.8 <sup>b</sup>	<0.0001	3.6 ± 0.8	3.7 ± 0.3	0.9653	4.9 ± 1.3	5.0 ± 0.5	0.8428	2.2 ± 0.8	2.8 ± 0.4	0.6132
Day 5 blastocysts, <i>n</i>	0.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	<0.0001	2.4 ± 0.8	2.4 ± 0.3	0.9610	2.8 ± 1.3	3.0 ± 0.4	0.8718	1.4 ± 0.6	1.8 ± 0.4	0.4373
Good quality blastocysts, <i>n</i>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	<0.0001	1.4 ± 0.6	1.5 ± 0.7	0.8946	2.5 ± 0.9	1.9 ± 0.5	0.7745	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.8441

PGT-A, preimplantation genetic testing for aneuploidy; RIF, repeated implantation failure; RPL, recurrent pregnancy loss; OR, oocyte retrieval; ET, embryo transfer

<sup>a-c</sup>Different superscript letters indicate a significant difference at *P* < 0.05

	Total			RIF			RPL		
	Control	PGT-A	<i>P</i>	Control	PGT-A	<i>P</i>	Control	PGT-A	<i>P</i>
Oocytes inseminated, <i>n</i>	163	178		109	111		54	67	
Fertilized oocytes, <i>n</i> (%)	148 (90.8)	155 (87.1)	0.2757	101 (92.7)	99 (89.2)	0.3705	47 (87.0)	56 (83.6)	0.5955
Blastocysts, <i>n</i> (%)	108 (66.3)	115 (64.6)	0.7489	76 (69.7)	80 (72.1)	0.7015	32 (59.3)	35 (52.2)	0.4400
Frozen blastocysts, <i>n</i> (%)	94 (57.7)	101 (56.7)	0.8628	68 (62.4)	70 (63.1)	0.9172	26 (48.2)	31 (46.3)	0.8369
Day 5 blastocysts, <i>n</i> (%)	54 (57.5)	67 (66.3)	0.2012	39 (57.4)	47 (67.1)	0.2354	15 (57.7)	20 (64.5)	0.5981
Morphological grade, <i>n</i> (%)									
ICM									
A	32 (34.0)	23 (22.8)	0.2023	26 (38.2)	20 (28.6)	0.2865	6 (23.1)	3 (9.7)	0.2948
B	33 (35.1)	39 (38.6)		23 (33.8)	22 (31.4)		10 (38.5)	17 (54.8)	
C	29 (30.9)	39 (38.6) <sup>a</sup>							
TE									
A	29 (30.9)	10 (9.9)							
B	19 (20.2)	31 (30.7)							
C	46 (48.9)	60 (59.4)							

Good quality blastocysts, *n*

Good quality blastocysts, <i>n</i>	45 (47.9)	38 (37.6)
Euploids, <i>n</i> (%)	-	27 (26.7)
Euploids with suspected mosaicism (mosaic), <i>n</i> (%)	-	4 (4.0)
Aneuploids, <i>n</i> (%)	-	70 (69.3)

PGT-A, preimplantation genetic testing for aneuploidy; RIF, repeated implantation failure; TE, trophoctoderm

Group	Case	Embryo ranking															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
I	1	a/AA	a/AA	a/AA	a/AB	b/BC	b/CC	d/CC									
	2	b/BC	b/CC	b/CC	b/BC	b/CC											
	3	a/CB	a/AB	a/AB	b/BC	b/CC											
	4	a/AB	a/BB	a/BB	d/BC												
	5	a/BB	c/AC	c/BC	c/BC												
II	6	a/AA	a/AA	a/AB	a/AB	a/BB	a/BB	c/BC	c/BC	c/BC	c/BC	c/CC	d/CC	d/CC	a/c		
	7	a/AB	a/BB	b/BC	b/BC	c/CC	d/CC	d/CC	d/CC								
	8	a/AA	a/BA	a/BB	a/BB	a/CC											
	9	a/AB	c/BC	d/CC	e/CB	a/CC											
III	10	d/CC	d/CC	e/CC													
IV	11	b/AA	b/AB	c/AC	d/CC												
	12	b/AA	e/CC														
	13	a/CC	b/CC														
	14	b/AB	d/CB														

b

Group	Case	Embryo ranking				
		1	2	3	4	5
I	1	a/AB	b/BC	b/CC	b/CC	a/CC
	2	a/BB	a/BB	a/BB	d/BC	
	3	b/BB	b/BB	c/BC	c/BC	
	4	c/BC	c/BC			
	5	a/BB	d/CC			
II	6	b/AB	b/BB			
IV	7	a/BB	c/CC	d/CC	d/CC	
	8	b/BC	b/BC	c/CC		
	9	a/AA	c/BC	c/CC		
	10	d/CC				
	11	d/CC				

	Total			RIF			RPL		
	Control	PGT-A	<i>P</i>	Control	PGT-A	<i>P</i>	Control	PGT-A	<i>P</i>
No. of patients, <i>n</i>	25	25		14	14		11	11	
Patients who underwent ET, <i>n</i> (%)	22 (88.0)	15 (60.0)	0.0240	13 (92.9)	10 (71.4)	0.1388	9 (81.8)	5 (45.5)	0.0763
ET cycles, <i>n</i>	22	15		13	10		9	5	
Implantation, <i>n</i> (%)	15 (68.2)	14 (93.3)	0.1083	10 (76.9)	9 (90.0)	0.6036	5 (55.6)	5 (100)	0.2208
Clinical pregnancies, <i>n</i> (%)	15 (68.2)	14 (93.3)	0.1083	10 (76.9)	9 (90.0)	0.6036	5 (55.6)	5 (100)	0.2208
Live births, <i>n</i> (%)	9 (40.9)	13 (86.7)	0.0073	9 (69.2)	9 (90.0)	0.3394	0 (0)	4 (80.0)	0.0050
Miscarriages, <i>n</i> (%)	6 (40.0)	1 (7.1)	0.0801	1 (10.0)	0 (0)	0.9999	5 (100)	1 (20.0)	0.0098

PGT-A, preimplantation genetic testing for aneuploidy; RIF, repeated implantation failure; RPL, recurrent pregnancy loss; ET, embryo transfer

	Control	PGT-A	<i>P</i>
At birth			
No. of patients delivered	9	13	
No. of babies delivered	9	13	
Gestational age (d)	274.3 ± 3.5	273.1 ± 3.2	0.7980
Sex			0.6581
Male	7 (77.8)	9 (30.8)	
Female	2 (22.2)	4 (69.2)	
Height/length (cm)	49.1 ± 0.5	48.9 ± 0.9	0.8994
Weight (g)	2952 ± 36	2848 ± 148	0.5737
Head circumference (cm)	34.0 ± 0.2	33.8 ± 0.4	0.7255
Chest circumference (cm)	31.9 ± 0.3	30.7 ± 0.5	0.1336
Malformation (%)	1 (11.1)	0 (0)	0.2186
1 month			
Height/length (cm)	53.4 ± 0.4	52.5 ± 0.8	0.4306
Weight (g)	3952 ± 93	3805 ± 204	0.5772
Head circumference (cm)	37.0 ± 0.4	37.0 ± 0.3	0.9972
Chest circumference (cm)	35.9 ± 0.5	34.6 ± 0.7	0.2286

No., number

Data are presented as *n*, *n* (%) or mean ± standard error of the mean



## FOLLOW-UP CRESCITA EMBRIONI

RIF= 10 NEONATI SANI

RPL=7 NEONATI SANI

NO ANOMALIE CONGENITE

UN EMBRIONE SOSPETTO MOSAICO IMPIANTATO NEL PROTOCOLLO RIF=>NEONATO SANO

UN EMBRIONE SOSPETTO MOSAICO IMPIANTATO NEL PROTOCOLLO RPL=>NEONATO SANO

# CONCLUSIONI

- LO STUDIO DIMOSTRA CHE L'USO DI PGT-A IN PAZIENTI RPL INCREMENTA I SUCCESSI NELLA BUONA RIUSCITA DELLA GRAVIDANZA E RIDUCE IL RISCHIO DI ABORTO. I BENEFICI DI PGT-A NON SONO RITROVATI IN PAZIENTI RIF.

QUESTO AFFERMA IL FATTO CHE ANOMALIE CROMOSOMICHE NUMERICHE SONO UNA DELLE CAUSE PRINCIPALI DI ABORTI.

LA COMBINAZIONE DI PGT-A E DEI METODI CONVENZIONALI DI VALUTAZIONE E SELEZIONE DELLE BLASTOCISTI INCREMENTA I SUCCESSI NELLE GRAVIDANZE E RICHIEDE UN MINOR NUMERO DI CICLI DI ET.

IL MOSAICISMO PUÒ ESSERE UNA DELLE LIMITIAZIONI DEI PGT-A (ERRORI MITOTICI NELLE PRIME FASI DELLA CRESCITA EMBRIONICA).

LO STUDIO, INOLTRE, DIMOSTRA CHE NON CI SIANO RISCHI NELLA CRESCITA FISICA E COGNITIVA NEI BAMBINI NATI DA BLASTOCISTI SOTTOPOSTE A PGT-A.

# RIASSUNTO ESTESO

QUESTO STUDIO SI PROPONE DI RICERCARE I BENEFICI DEI TEST GENETICI PREIMPIANTO PER LE ANEUPLOIDIE (PGT-A) PER GARANTIRE UNA GRAVIDANZA DI SUCCESSO IN PAZIENTI CON RICORRENTI ABORTI (RPL) CAUSATI DA UN'ANEUPLOIDIA O CON RICORRENTI MANCATI IMPIANTI (RIF). NELLO STUDIO SONO STATI ARRUOLATE 32 PAZIENTI SOTTOPOSTI A PGT-A (18 NEL RIF E 14 NEL RPL) E 2556 PAZIENTI COME GRUPPO DI CONTROLLO NON SOTTOPOSTI A PGT-A DURANTE LO STESSO PERIODO DI TRATTAMENTO DI FIV. TUTTE LE PAZIENTI SONO STATE SOTTOPOSTE A UN CICLO DI MINIMA STIMOLAZIONE OVARICA. NEL PROTOCOLLO RPL, IL TASSO DI NATI VIVI PER TRASFERIMENTO DI EMBRIONI (ET) E QUELLO PER PAZIENTE È PIÙ ALTO CON LA PGT-A (80,0% CIASCUNO) RISPETTO A QUELLI SENZA (0% CIASCUNO;  $P = 0,0050$ ), E IL TASSO DI ABORTI SPONTANEI È PIÙ BASSO CON LA PGT-A RISPETTO A QUELLO SENZA (20,0% VS. 100,0%,  $P = 0,0098$ ). NEL PROTOCOLLO RIF, NON CI SONO STATE DIFFERENZE SIGNIFICATIVE NEL TASSO DI NATI VIVI PER ET E NEL TASSO DI ABORTI SPONTANEI TRA I GRUPPI CON E SENZA PGT-A-90,0% VS. 69,2% ( $P = 0,2313$ ) E 0% VS. 10,0% ( $P = 0,3297$ ). NESSUNO DEI BAMBINI NATI HA PRESENTATO ANOMALIE A UNO STUDIO DI FOLLOW-UP A 1,5 ANNI. IN CONCLUSIONE, LA PGT-A NELLA RPL È VANTAGGIOSA PER MIGLIORARE IL TASSO DI NATI VIVI PER ET E QUELLO PER PAZIENTE NELLA FIV A CICLO MINIMO DI STIMOLAZIONE; RIDUCE IL TASSO DI ABORTI SPONTANEI. INOLTRE, LA PGT-A POTREBBE ESSERE PIÙ VANTAGGIOSA PER LA SELEZIONE DEGLI EMBRIONI RISPETTO AGLI ATTUALI GRADI MORFOLOGICI DELLE BLASTOCISTI, CON CONSEGUENTE ANTICIPO DEL CONCEPIMENTO.

Bibliografia: Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy for Recurrent Pregnancy Loss and Recurrent Implantation Failure in Minimal Ovarian Stimulation Cycle for Women Aged 35–42 Years: Live Birth Rate, Developmental Follow-up of Children, and Embryo Ranking.

<https://doi.org/10.1007/s43032-022-01073-z>