

Fecondazione medicalmente assistita e difetti di imprinting

Giuseppe Novelli^{1,2}, Lamberto Camurri^{1,3}, Emiliano Giardina¹

¹Dipartimento di Biopatologia e Diagnostica per Immagini; Università di Tor Vergata; Roma, Italia.

²Arkansas Medical School; Little Rock, Arkansas USA.

³Laboratorio Mendel, Servizi in Genetica Umana, Albinea, Italia

L'imprinting genomico è il meccanismo epigenetico secondo il quale il materiale genetico mantiene la memoria o impronta della sua origine gametica e si esprime in modo differenziale a seconda sia ereditato dal padre o dalla madre. L'esistenza dell'imprinting genomico suggerisce che il genoma materno e quello paterno non sono funzionalmente equivalenti, ma hanno un ruolo complementare e non sostituibile nel determinare un corretto sviluppo embrionale. Alterazioni dell'imprinting sono alla base di malattie genetiche, ad oggi 53 geni "imprinted" sono stati identificati e sono note 9 patologie legate a difetti di imprinting.

Ad oggi le nascite con tecnologie di fecondazione assistita rappresentano circa l'1% del totale e l'affinamento di tecnologie come l'ICSI ha determinato un conseguente aumento dei tassi di successo. Nonostante alcuni studi suggeriscano la presenza di un rischio minimamente aumentato di alterazioni al normale sviluppo e salute del bambino per queste tecniche, altri studi hanno riportato una frequenza aumentata di difetti maggiori alla nascita in bambini nati con FMA (fecondazione medicalmente assistita) di almeno il doppio rispetto alla media (1). Confrontando i bambini nati con tecnologie di FMA e concepiti naturalmente, si nota un aumento dell'incidenza di IUGR (*intrauterine growth retardation*) nelle gravidanze ottenute con fecondazione medicalmente assistita (FMA) (2-4).

Già nel 2000 Engel et al. riportavano un aumento significativo della frequenza di perdita di metilazione per KvDMR1 nei pazienti con BWS (Beckwith–Wiedemann Syndrome) concepiti con tecnologie di FMA rispetto ai bambini con BWS concepiti naturalmente (5).

Successivamente Cox et al. (6) hanno riportato due casi di bambini con sindrome di Angelman concepiti con ICSI (intracytoplasmic sperm injection) (7). L'analisi molecolare di questi casi ha dimostrato la presenza di un difetto di imprinting generalmente molto raro (perdita della normale metilazione dell'allele materno al SNRPN senza delezione del centro dell'imprinting). Poiché tale alterazione è stata ritrovata in meno del 5% dei soggetti con sindrome di Angelman avendo un'incidenza attesa di 1 su 300.000 (8), sembra si possa affermare l'esistenza di un aumento della frequenza di questa alterazione nei soggetti nati con tecniche di FMA. Non ci sono attualmente stime del rischio assoluto per la sindrome di Angelman in bambini nati con metodiche di FMA (7);

a tal riguardo occorre comunque considerare che anche se il rischio relativo sembra aumentare di 100 volte, il rischio assoluto è globalmente molto basso (~1 su 3000).

Nel 2003, due studi indipendenti, condotti in Inghilterra e in USA, riportano un aumento di frequenza di patologia BWS nei bambini concepiti con FMA. In uno studio retrospettivo condotto in UK è stato osservato che 6 di 149 bambini con BWS erano stati concepiti con procedure di FMA, contro un atteso di 1,5. (9). Negli USA sono stati riportati 7 bambini con BWS nati con FMA e, in uno studio prospettico, la prevalenza di FMA nei bambini con BWS è stata del 4,6% contro lo 0,8% della popolazione generale. Nel 2003 uno studio condotto in Francia (10) ha confermato questi dati, riportando 6 bambini nati con FMA su 149 con BWS (attesi: 1,94).

Il rischio relativo calcolato negli studi retrospettivi condotti in UK e in Francia è stato rispettivamente di circa 4 e 3,2, mentre gli USA riportano un aumento del rischio di circa 6 volte. Alcuni gruppi (9,10) hanno inoltre suggerito che la frequenza di FMA nei pazienti con BWS è probabilmente sottostimata, poiché nella raccolta dei dati spesso risultava difficile verificare la storia clinica riproduttiva e per molti pazienti questi dati non erano disponibili.

Nel 2004 uno studio caso-controllo retrospettivo condotto in Australia riporta una frequenza del 10,8% di FMA nei bambini con BWS (4/37) paragonato allo 0,7% (1/148) nei controlli (P =0.006, odds ratio =17.8 con 95% CI 1.8–432.9) (11). Si stima inoltre che il rischio di BWS dopo FMA sia di circa 1/4.000 risultando 9 volte superiore al rischio di popolazione (11).

La sindrome di Beckwith–Wiedemann (BWS) è caratterizzata dalla triade: iperaccrescimento pre- e post-natale, macroglossia e difetto di parete anteriore addominale. Inoltre circa il 7% dei pazienti con BWS sviluppano tumori, con una particolare frequenza del tumore di Wilms (12,13). L'iperaccrescimento prenatale è un reperto caratterizzante della BWS nell'uomo e della LOS (large offspring syndrome) nei mammiferi ruminanti.

In esperimenti murini si è visto che determinate condizioni di coltura possono compromettere la riprogrammazione dell'imprinting durante la fase preimpianto dello sviluppo embrionale. In alcune colture sono stati riportati vari difetti di imprinting, compresa un'alterazione della metilazione del DNA di H19 e di SNRPN (14). Studi condotti sulle pecore hanno mostrato che le colture di embrioni hanno un'incidenza aumentata di alterazioni dell'imprinting al locus IGFR2, con perdita di metilazione dell'allele materno, che risulta in una sindrome di iperaccrescimento (LOS- large offspring syndrome) (15).

Molti studi hanno ipotizzato che la frequenza di cambiamenti epigenetici associati alle colture di embrioni in vitro possa essere correlata ai materiali utilizzati per la coltura stessa (16-18). Finora

nessuna delle singole fasi della FMA si è dimostrata determinante per l'aumentato rischio delle sindromi da imprinting, anche se sono state formulate diverse ipotesi in merito, si pensa che possano essere coinvolti i protocolli di stimolazione, le tecniche biologiche, lo stadio di maturazione dei gameti, i componenti della coltura e il tempo intercorso tra la fecondazione ed il trasferimento dell'embrione. Sono necessari ulteriori studi prospettici per chiarire i motivi che portano a questo aumento dell'incidenza di errori di imprinting nelle gravidanze da FMA.

I centri che praticano la FMA si avvalgono per oltre l'80% della metodica ICSI, che sembra particolarmente coinvolta nelle sindromi da imprinting per vari motivi: la ICSI impedisce l'instaurarsi di quasi tutti i meccanismi di selezione che agiscono nel concepimento naturale, e sono possibili sebbene non ancora dimostrati possibili danni meccanici allo sperma e ad altri componenti dell'ovocita.

È interessante notare che le epimutazioni nella maggior parte dei casi di BWS e di sindrome di Angelman coinvolgono la perdita della metilazione dell'allele materno. Nella maggior parte dei casi le coppie ricorrono alla ICSI per una ridotta funzionalità spermatica, quindi ci si aspetterebbe, a priori, che i difetti di imprinting correlati alla FMA siano correlati a mutazioni all'interno del genoma paterno o di epimutazioni di origine paterna, se assumiamo la ICSI come il maggior determinante dei casi.

In conclusione, i dati a disposizione suggeriscono la necessità di ulteriori studi per determinare e dimostrare i meccanismi alla base dell'aumento di incidenza di patologie da imprinting nei nati con FMA. In questa sede è doveroso sottolineare che il rischio più elevato della FIVET o dell'ICSI è comunque la gravidanza multipla e che, nonostante un aumentato rischio relativo di patologie da difetto di imprinting, il rischio assoluto, benché manchino stime accurate, sembrerebbe essere molto basso o addirittura trascurabile.

Referenze bibliografiche:

1. Hansen, M. et al. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346:725-730.
2. Doyle, P. et al. Preterm delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in liveborn singleton babies resulting from in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1992;7:425-428.

3. Buitendijk, S.E. Children after in vitro fertilization. An overview of the literature. *Int. J. Technol. Assess. Health Care* 1999; 15:52-65.
4. Schieve, L.A. et al. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346:731-737.
5. Engel, J.R. et al. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.* 2000; 37:921-926.
6. Cox, G.F. et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:162-164.
7. Clayton-Smith, J. and Laan, L.A.E.M. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J. Med. Genet.* 2003; 40:87-95.
8. Buiting, K. et al. Epimutations in Prader–Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72:571–577.
9. Maher E.R. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Human Reproduction* 2003; 18:2508-2511.
10. Gicquel, C. et al. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to abnormal imprinting of the KCNQ1OT gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 1338-1341.
11. Halliday, J. et al. Beckwith–Wiedemann syndrome and IVF: a case–control study. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75: 526–528.
12. Elliott, M. and Maher, E.R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.* 1994; 31:560-564.
13. Maher, E.R. and Reik, W. Beckwith-Wiedemann syndrome imprinting in clusters revisited. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 247-252.

14. Mann MR, et al. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 2004;131:3727-3735
15. Young LE, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27:153-154
16. Reik, W. et al. Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo. *Development* 1993; 119: 933-942.
17. Dean, W., et al. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development* 1998; 125:2273-2282
18. Khosla, S., et al. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol. Reprod.* 2001a; 64:918-926.