

Tesi Doctoral

Anàlisi citogenètica i monogènica
en cèl·lula única:
Diagnòstic Genètic Preimplantacional
de Doble Factor

Gemma Daina Noves

Tesi Doctoral

Anàlisi citogenètica i monogènica en cèl·lula única:
Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor

Memòria presentada per
Gemma Daina Noves

Per optar al grau de
Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi dirigida per
Dra. Joaquina Navarro
Dr. Jordi Benet
Dra. Olga Martinez Pasarell

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona

Directors

Doctoranda

Dra. Joaquina
Navarro

Dr. Jordi
Benet

Dra. Olga
Martinez Pasarell

Gemma Daina Noves

Bellaterra, novembre de 2012

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- PI08/0012 i PI11/00625 Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III
- Suport a Grups de Recerca 2009SGR1107 (AGAUR-CIRIT), Generalitat de Catalunya. Grup de recerca en citogenètica bàsica i clínica UAB. (2009-2013). Responsable: Jordi Benet Català
- Càtedra de recerca Eugin-UAB

Gemma Daina Noves ha gaudit d'una beca predoctoral de la Fundació Crèdit Andorrà

Agraïments

El meu agraïment als centres que han col·laborat en aquest treball:

- Fundació Puigvert - Hospital de Sant Pau
- Clínica Eugin
- Institut Marquès
- Institut Universitari Dexeus
- IVI Barcelona
- Centre de Reproducció Assistida de la Clínica Sagrada Família

Agrair també a les pacients i donants que han cedit els seus oòcits i a totes les famílies portadores de malalties monogèniques que s'han inclòs en aquesta tesi, que sense ells no hagués estat possible.

I per acabar, a tots els membres de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, especialment a la Quima i a en Jordi per haver-me donat la oportunitat d'incorporar-me al vostre grup i també a la Olga per la seva paciència i per les correccions, sobretot les d'última hora.

Als meus pares

A la Carla

Al padrí i a la iaia

Índex

Índex

1. Introducció

1.1 Infertilitat en l'espècie humana	3
1.2. Gametogènesi	4
1.2.1. Meiosi	4
1.2.2 Oogènesi	6
1.3. Aneuploïdia	8
1.3.1 Mecanismes de generació d'aneuploïdia d'origen matern	9
1.3.2 Mecanismes de generació d'aneuploïdia d'origen patern	12
1.3.3. Mecanismes de generació d'aneuploïdia d'origen embrionari	14
1.4. Diagnòstic Genètic Preimplantacional	14
1.4.1. Estadi cel·lular d'aplicació del DGP	15
1.4.2. DGP per malalties monogèniques	17
1.4.2.1. Limitacions del DGP de malalties monogèniques	18
1.4.2.2. Metodologies d'amplificació del genoma cel·lular	19
1.4.2.3- Metodologies de detecció directa i indirecta de mutacions	21
1.4.3 Estudi preimplantacional de cribratge d'aneuploïdies	23
1.4.3.1 Indicacions	23
1.4.3.2 Tècniques aplicades al PGS	24
1.5 Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor	28

2. Hipòtesi i objectius 33

3. Material i Mètodes

3.1. Aïllament Cel·lular	37
3.1.1 Aïllament i processat dels oòcits immadurs	37
3.1.2. Aïllament i processat de fibroblasts i limfòcits control	38
3.2. Estudi d'aneuploïdies d'origen pre-meiótic	39
3.3. Desenvolupament i optimització dels procediments requerits en el DF-DGP	40
3.3.2. Adequació dels procediments desenvolupats a blastòmers d'embrions descartats	40

3.4. Procediments aplicats en cèl·lules úniques	41
3.4.1 Lisi cel·lular i amplificació de tot el genoma	41
3.4.1.1. Multiple Displacement Amplification (MDA) amb <i>Genomiphi V2</i>	41
3.4.1.2 Lisi amb proteïnasa K i <i>Degenerate-oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR)</i>	42
3.4.1.3. Genomeplex [®]	43
3.4.1.4 Multiple Displacement Amplification (MDA) amb <i>Repli-g</i>	45
3.4.1.5. iMDA	45
3.4.1.6. PicoPlex [™] i SurePlex	46
3.4.2-Comprovació de l'amplificació del genoma cel·lular a partir de cèl·lules aïllades	47
3.4.3. Purificació de producte d'amplificació del genoma cel·lular	48
3.5- Estudi Citogenètic	49
3.5.1. Preparació del material amplificat per la hibridació	49
3.5.1.1. Marcatge fluorescent mitjançat <i>Nick-Translation</i>	49
3.5.1.2. Preparació de la sonda d'hibridació de la CGH	49
3.5.2. Hibridació genòmica comparada ràpida 50	
3.5.3. Captura i anàlisi de metafases al microscopi de fluorescència	52
3.6. Estudi monogènic	53
3.6.1. Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)	53
3.6.2. Detecció directa de mutacions	55
3.6.2.1. Detecció de variacions de mida de fragments de DNA	55
3.6.2.2. Minisequenciació (<i>MiniSequencing</i>)	55
3.6.3. Detecció indirecta de mutacions	57
3.6.4. Posada a punt del protocol de detecció molecular en cèl·lula única	57
3.6.5. Aplicació dels procediments desenvolupats i optimitzats a casos clínics concrets	59
3.7. Aplicacions clíniques del DF-DGP	60
3.7.1. Procediment de DF-DGP utilitzant dos blastòmers	61
3.7.2. Procediment de DF-DGP biopsiant un sol blastòmer	62
3.8. Controls estrictes de contaminació	63
3.9 Anàlisi estadística	63

4. Resultats

4.1. Resultats de l'estudi citogenètic d'òcits immadurs (Objectiu 1)	67
4.2. Resultats de les aplicacions clíniques del DF-DGP biopsiant dos blastòmers per embrió (Objectiu 2)	73
4.2.1.-Cas clínic A	73
4.2.2.-Cas clínic B	75
4.2.3.-Cas clínic C	75
4.2.4.-Cas clínic D	76
4.2.5.-Cas clínic E	77
4.2.6.-Cas clínic F	78
4.2.7.-Cas clínic G	80
4.2.8.-Cas clínic H	81
4.2.9.-Cas clínic I	82
4.2.10.- Resultats generals de DF-DGP en dos blastòmers	84
4.3. DF-DGP en embrions a partir d'un sol blastòmer (Objectiu 3)	86
4.4. Resultats de DF-DGP en un blastòmer (Objectiu 4)	91
4.4.1.- Cas clínic H'	91
4.4.2. Cas clínic J	93
4.4.3. Cas clínic K	94
4.4.4. Cas clínic F'	95
4.4.5.- Cas clínic L	97
4.4.6. Resultats generals de DF-DGP en un blastòmer	97

5. Discussió

5.1. Estudi d'aneuploïdies d'origen germinal mitòtic en pacients i donants de cicles de reproducció assistida	105
5.2. Diagnòstic genètic preimplantacional de doble factor	110
5.2.1.- DF-DGP biopsiant dos blastòmers	110
5.2.2.- DF-DGP biopsiant un sol blastòmer	118
5.2.2.1- Posada a punt del DF-DGP en un blastòmer	118
5.2.2.2.- Aplicacions clíniques del DF-DGP en un blastòmer	120
5.3.- Perspectives de futur del DGP	124

6. Conclusions	130
7. Bibliografia	136
Annexes	147

Introducció

1. Introducció

1.1. Infertilitat en l'espècie humana

L'espècie humana es caracteritza per presentar una baixa taxa de fecunditat (Short 1978). Estudis realitzats en embrions de cicles naturals han evidenciat unes taxes de no divisió del 16%, un 15% més moren durant la primera setmana de desenvolupament en diverses etapes preimplantatòries i un 27% addicional no sobreviuen després de la segona setmana, en les etapes primerenques de desenvolupament embrionari post-implantació. Es coneix que una dona en edat fèrtil té, en cada cicle menstrual, tan sols un 25% de probabilitat de concebre i dur a terme un embaràs. Aquest percentatge es redueix dràsticament en les parelles amb problemes reproductius, en les que la taxa es situaria entorn al 10%. És en aquests casos on les tècniques de reproducció assistida prenen importància.

Les causes d'infertilitat poden tenir orígens molt diversos, incloent des de problemes ginecològics relacionats amb els senyals entre l'úter i l'embrió en estadi de blastocist (Macklon *et al.* 2002), factors endometrials com poden ser un baix reg sanguini a l'úter o una inadequada proliferació endometrial, un increment de les concentracions hormonals (Meldrum 1993), o bé anomalies citoplasmàtiques o mitocondrials dels oòcits (Krey i Grifo 2001; Bartmann *et al.* 2004). Tot i així, l'aneuploidia (alteracions en el nombre de cromosomes) s'ha postulat com un dels defectes més importants a l'hora d'originar infertilitat (Los *et al.* 2004).

En l'espècie humana, les cèl·lules somàtiques són diploides, tenen un total de 46 cromosomes, format per 23 parelles d'homòlegs. En els gàmetes en canvi, la dotació cromosòmica és haploide, contenint tan sols 23 cromosomes, un de cada parella i així permetre la creació d'un nou organisme diploid, 46, XX o 46, XY amb la unió de dos gàmetes. Per a la formació dels gàmetes haploides, les cèl·lules germinals primordials masculines (espermatogonis) i les femenines (oogònies) amb dotacions cromosòmiques diploides han de donar lloc a cèl·lules haploides en el procés conegut com a gametogènesi.

1.2. Gametogènesi

La gametogènesi és el procés mitjançant el qual, es formen, desenvolupen i maduren les cèl·lules germinals primordials per convertir-se en oòcits i espermatozoides.

La gametogènesi comença durant el desenvolupament embrionari amb la formació i proliferació de les cèl·lules germinals primordials. Entre la setmana 7 i 10 de gestació, es diferencien les gònades de l'embrió segons el sexe femení o masculí, i a la vegada les cèl·lules germinals primordials migren cap al testicle o l'ovari i es convertiran en oogònies o espermatogonis. A partir d'aquest moment els processos de l'espermatogènesi i oogènesi tenen trets força diferenciats.

1.2.1. Meiosi

La meiosi és el procés que converteix les cèl·lules germinals diploides en gàmetes haploides, permetent així la futura creació d'un nou individu per la unió de dos gàmetes. A més durant la meiosi té lloc la recombinació meiótica que és un esdeveniment crucial, necessari per introduir variabilitat genètica en els gàmetes, els organismes i les espècies. La meiosi consta de dues divisions cel·lulars successives amb una sola replicació del DNA prèvia (Figura 1.1).

La primera divisió meiótica és la més especialitzada i llarga ja que és en la que es concentren els processos que constitueixen els trets que la fan diferent de la mitosi: l'aparellament i sinapsi, la recombinació meiótica i la segregació dels cromosomes homòlegs.

Durant la primera divisió meiótica té lloc la profase I, una profase específica que consta de 5 etapes. La primera és la de leptotè, en la que es condensen els cromosomes homòlegs, ja replicats, i comencen a aparellar-se, en aquest moment s'inicia la recombinació meiótica. A continuació, durant el zigotè, es comença a formar el complex sinaptinomal pel progressiu aparellament dels dos elements laterals, ubicats cada un d'ells entre les cromàtides germanes i constituint progressivament cada bivalent mentre avança i es produeix la recombinació meiótica. Tot seguit, a l'estadi de paquitè, els cromosomes homòlegs ja sinapsats en tota la seva longitud, formant els bivalents, finalitzen el procés de recombinació meiótica. Finalment, a diplotè comença la desinapsi o separació dels cromosomes homòlegs, que quedaran units tan sols pels

punts on han recombinat, denominats quiasmes. És en aquest moment quan, en la oogènesi humana, s'atura la meiosi entrant en un estadi de bloqueig denominat dictiotè. La diacinesi, que té lloc com a mínim una dècada més tard, és una etapa de transició a metafase I en la que es produeix la condensació de bivalents evidenciant els quiasmes, moment en que s'acaba la profase I.

A continuació té lloc la metafase I en la que els bivalents es disposen en la placa metafàsica i cada cromosoma homòleg (format per dues cromàtides germanes) s'orienta cap a pols oposats de la cèl·lula.

Durant l'anafase I es separen els cromosomes homòlegs i es resolen els quiasmes. En el cas de la oogènesi, a l'etapa de la telofase, es produeix una divisió cel·lular desigual, donant d'una banda un l'òocit secundari, amb capacitat reproductiva ja que conté pràcticament tot el citoplasma de l'òocit primari i de l'altra el primer corpuscle polar (1CP) una cèl·lula resultant de la primera divisió meiòtica amb dotació haploide, sense finalitat reproductiva ja que gairebé no té citoplasma que està destinada a degenerar.

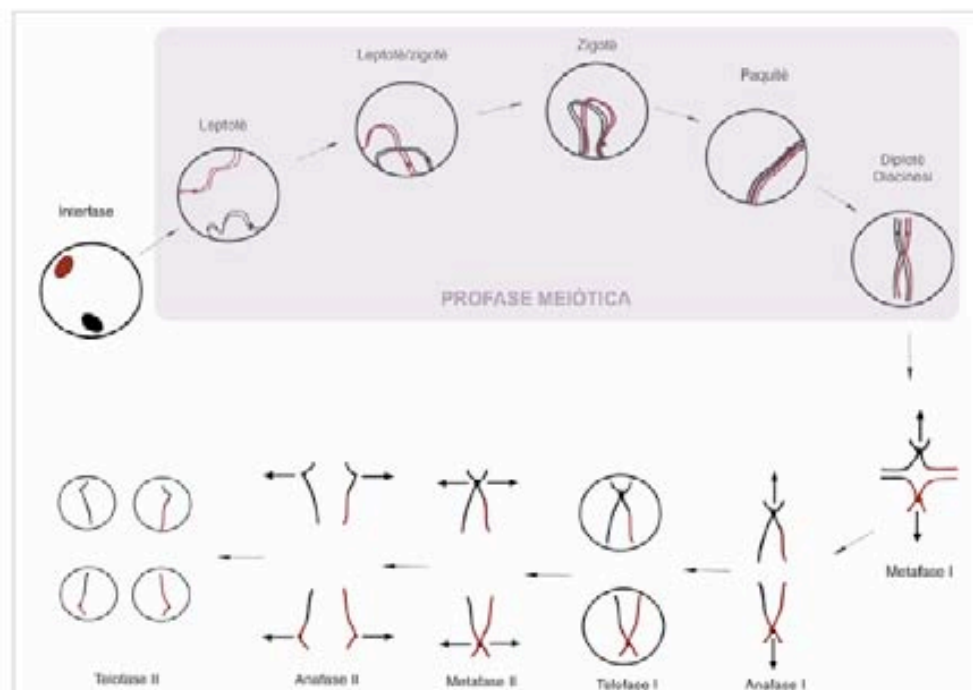


Figura 1.1. Representació de les etapes de la meiosi

La segona divisió meiòtica, és com el procés de mitosi, només amb la peculiaritat de que en lloc de contenir 46 cromosomes (23 parelles) amb dues cromàtides només en conté 23 amb dues cromàtides. Sense que hi hagi cap replicació de la cromatina s'inicia

la segona divisió meiótica, donat que la profase II és pràcticament inexistent en l'ovari ocorre una ràpida transició fins a metafase II, quan té lloc l'alineació dels 23 univalents a la placa metafàsica. Durant l'anafase II, les cromàtides germanes dels univalents migren cap a pols oposats i després de la telofase II s'obtenen dues cèl·lules filles amb 23 cromosomes d'una sola cromàtide.

Mecanismes de control de la meiosi

Els processos cel·lulars descrits són clau per a mantenir la supervivència de la cèl·lula, per això estan sotmesos a mecanismes de control que tenen, com a objectiu principal, detectar si s'han produït errors i o bé induir la seva correcció o bé eliminar les cèl·lules que els hagin patit i puguin estar afectades de manera important.

Durant el procés de la meiosi hi ha dos punts de control importants. El primer punt de control és el de paquitè, que s'encarrega de detectar els errors produïts durant el procés d'aparellament, sinapsi i recombinació dels cromosomes homòlegs (Roeder i Bailis 2000). El segon, és el que s'estableix a metafase, que verifica la correcta segregació cromosòmica en ambdues divisions meiótiques (Malmanche *et al.* 2006). Aquest controla qualsevol error en la formació del fus acromàtic i de l'alineació dels cromosomes en la placa metafàsica (Wang *et al.* 2006; Vogt *et al.* 2008). S'ha descrit que el *checkpoint* de metafase és menys estricte en oòcits que en espermatòcits (Vogt *et al.* 2008), i també que en la gametogènesi femenina el punt de control disminueix la seva eficiència, passant per alt alguns errors que podrien explicar l'increment d'aneuploïdies, a mida que l'edat materna augmenta.

En última instància, l'elevada presència de desequilibris cromosòmics originats abans de la fecundació pot ser deguda a una ineficiència dels punts de control, encarregats d'assegurar el bon funcionament d'aquests processos.

1.2.2 Oogènesi

Durant l'etapa embrionària, les cèl·lules germinals primordials migren cap a la gònada en formació i es converteixen en oogònies, que posteriorment, inicien una etapa activa de proliferació mitjançant successives divisions cel·lulars mitòtiques, de les quals una part es convertiran finalment en oòcits primaris (Figura 1.2).

El procés d'entrada a meiosi per part de les oogònies té lloc de manera asincrònica i té lloc en l'etapa embrionària, fins al sisè mes de gestació, a partir del qual ja no

s'observen més oogònies en l'ovari. En el cas de la oogènesi, la meiosi quedarà aturada a la primera divisió meiòtica, en una l'etapa de dictiotè del final de la profase I i s'hi mantindrà fins a la maduresa sexual de la dona. A l'estadi de dictiotè els oòcits s'envolten d'unes cèl·lules fol·liculars planes formant els fol·licles primordials. A partir d'aquest moment, la major part dels oòcits de la dona es mantenen en l'ovari en aquest estadi que abandonaran cada mes en ser activats mitjançant estímuls hormonals.

La oogènesi es caracteritza també per tenir una elevada taxa d'atrèsia (Baker 1963; Morita i Tilly 1999). El nombre d'oòcits presents en l'ovari en el cinquè mes de gestació assoleix un pic màxim al voltant dels 7 milions, i en el moment del naixement hi ha aproximadament de l'ordre de 2 milions de oòcits a l'ovari, aquesta important disminució és deguda a l'atrèsia fol·licular que pateixen la majoria dels oòcits existents durant el desenvolupament del fetus. L'atrèsia es manté també, després del naixement, provocant una reducció de fins a uns 400.000 oòcits a l'inici de la pubertat, dels quals finalment només uns 400 seran oocitats mentre que els altres degeneraran.

El desenvolupament inicial dels fol·licles s'inicia després del naixement i s'accelera just abans de la pubertat. És un procés independent de les gonadotrofines i es caracteritza per l'increment del volum dels fol·licles i per la important activació a nivell metabòlic, augmentant de manera significativa la síntesi de proteïnes que possibilitarà el desenvolupament i manteniment de l'embrió durant els primers estadis embrionaris. Aquest creixement fol·licular també comporta una proliferació i canvi d'estructura de les cèl·lules de la granulosa que envolten l'oòcit que passen de ser planes, a cúbiques donant lloc als fol·licles primaris i posteriorment formant diverses capes de cèl·lules cúbiques i envoltant a l'oòcit amb una coberta glicoproteica denominada zona pel·lúcida donant lloc als fol·licles secundaris.

Durant la pubertat amb la síntesi de gonadotrofines, es reprèn el desenvolupament dels oòcits. En cada cicle menstrual, aproximadament en uns 15-20 fol·licles comencen a proliferar les cèl·lules de la granulosa i es forma una cavitat o antre, donant lloc als fol·licles antrals. Habitualment d'aquests fol·licles només un acabarà la maduració mentre que els altres degeneraran. El fol·licle dominant reprendrà la meiosi aturada en profase I des d'estadis embrionaris. L'oòcit passa de vesícula germinal (VG) a MI, aquest canvi implica la pèrdua de l'embolcall nuclear, es produeix la condensació dels bivalents que es col·loquen en la placa metafàsica i a l'anafase I tindrà lloc la migració de cada cromosoma homòleg del bivalent cap a un pol oposat de la cèl·lula. Finalment,

en una divisió cel·lular desigual es formaran el primer corpuscle polar, que degenerarà i l'òocit que mantindrà la capacitat reproductiva. Aquest òocit torna a aturar-se per segona vegada en la oogènesi en l'estadi de metafase II (MII) de la meiosi, i tan sola la reprendrà en cas de ser fecundat. En aquest moment del cicle cel·lular és quan es produeix la oocitació i s'allibera l'òocit en estadi de MII a l'oviducte.

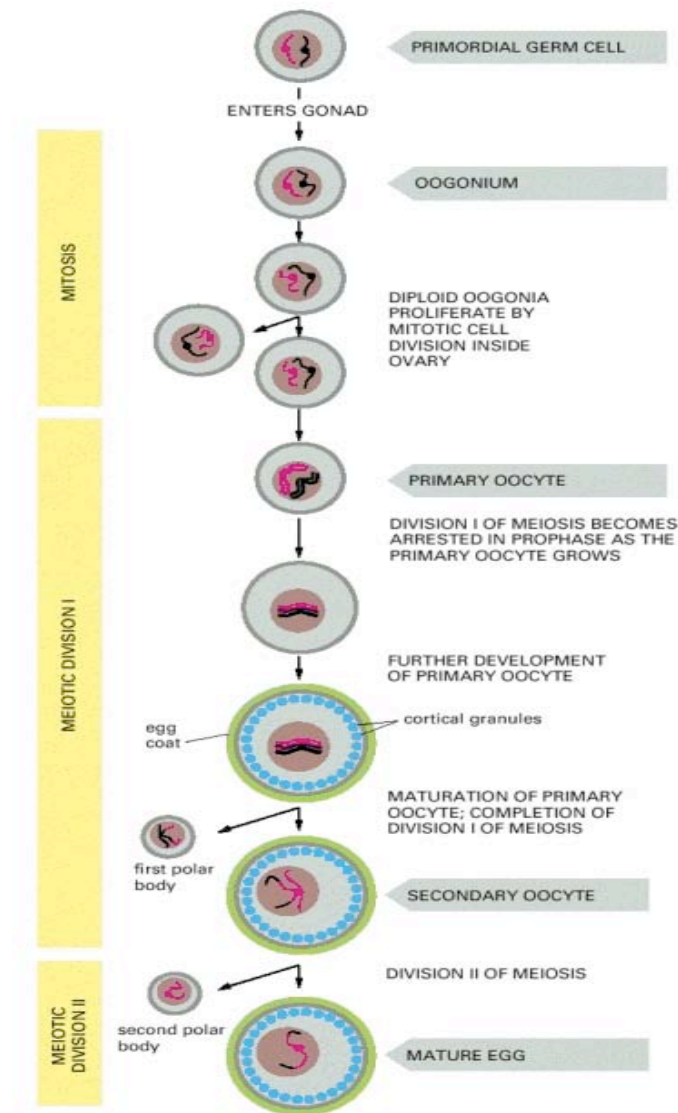


Figura 1.2. Representació del procés de la oogènesi

1.3. Aneuploïdia

Les aneuploïdies són aquelles alteracions cromosòmiques en les que està alterat el nombre de cromosomes. En les cèl·lules somàtiques de l'espècie humana el nombre de cromosomes és 46, i en les cèl·lules germinals 23. Qualsevol canvi en aquest nombre, representarà una alteració amb conseqüències variables. Les poliploïdies, són

alteracions en el nombre de dotacions cromosòmiques completes: per exemple si en lloc de dues còpies de cada cromosoma n'hi hagués 3 donaria lloc a una triploïdia (69, XXX, 69, XXY ó 69 XYY). Aquests tipus d'alteracions en l'espècie humana són inviàbles i per tant letals, per això tot i poder implantar provocarien avortaments en etapes primerenques del desenvolupament embrionari (Jacobs i Hassold 1995).

D'altra banda hi ha aneuploïdies en les que no es veu afectat tot el complement sinó que només està alterat el nombre d'alguns cromosomes concrets. Per aquests, en lloc de dos cromosomes homòlegs se n'observarien més o menys: en cas de tres es denominen trisomies per a aquell cromosoma, i en cas d'un es denomina monosomia. La majoria d'aneuploïdies no són viables i donen lloc a fallades en la implantació o a avortaments durant l'embaràs, com s'ha evidenciat en nombrosos estudis de material biològic procedent d'avortaments espontanis (Hassold *et al.* 1980; Jacobs 1992). Mentre les aneuploïdies nul·lisòmiques, que representen la pèrdua d'ambdós cromosomes homòlegs d'un parell concret, no són viables, hi ha certes aneuploïdies viables que donen lloc al naixement d'individus afectats síndromes que en molts casos comporten malformacions i/o retard mental. La síndrome de Turner, és la única monosomia viable (45, X0). Pel que fa a les trisomies autosòmiques com la síndrome de Down causada per la trisomia del cromosoma 21, la síndrome d'Edwards provocada per la trisomia del cromosoma 18, o bé la síndrome de Patau deguda a la trisomia del cromosoma 13, poden evolucionar fins al naixement. Pel que fa a les aneuploïdies de cromosomes sexuals s'han descrit la síndrome de Klinefelter (47, XXY) amb variants menys freqüents com la 48,XXYY o 48 XXXY, la síndrome triple X (47, XXX) i els individus XYY (47, XYY) aquests últims amb poques manifestacions fenotípiques.

1.3.1 Mecanismes de generació d'aneuploïdia d'origen matern

Errors pre-meiótics: Mosaïcisme gonadal i mosaïcisme germinal

L'any 1999, es va dur a terme un estudi citogenètic del cromosoma 21 en oòcits no fecundats i embrions descartats obtinguts de cicles de FIV d'una dona que havia tingut varies concepcions amb trisomia 21. Els resultats van evidenciar una elevada incidència d'alteracions pel cromosoma 21, tant en els oòcits com en els embrions. Aquest fet va evidenciar l'existència d'una línia cel·lular germinal trisòmica per al cromosoma 21 present en l'ovari matern (Cozzi *et al.* 1999).

Un any més tard en un estudi on s'analitzava la segregació cromosòmica mitjançant la tècnica de FISH, es va trobar que les dotacions cromosòmiques d'uns oòcits MII i el seu corresponent primer corpuscle polar (ICP) no eren complementàries, aquestes diferències es van atribuir a l'existència d'una oogònia precursora aneuploide (Mahmood *et al.* 2000).

Els resultats d'aquests dos estudis van evidenciar per primera vegada mecanismes responsables d'alteracions cromosòmiques en oòcits, d'origen pre-meiotic diferents als descrits anteriorment lligats a les divisions meiotiques. Tot i així probablement l'origen de l'aneuploidia era diferent ja que en un cas tots els oòcits estaven alterats per al cromosoma 21 (Cozzi *et al.* 1999) i en l'altre les aneuploidies involucraven cromosomes diferents (Mahmood *et al.* 2000).

Posteriorment tanta emprant els procediments de FISH com de CGH en l'estudi de parelles oòcit MII i ICP, també s'ha evidenciat la presència d'aquest fenomen observant alteracions no complementàries entre ambdues cèl·lules (Pujol *et al.* 2003; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004b; Fragouli *et al.* 2006b; Obradors *et al.* 2010). Altres estudis han descrit la presència de cèl·lules trisòmiques juntament amb la línia euploide en ovaris de dones amb cariotip normal (Roig *et al.* 2005; Robles *et al.* 2007; Hulten *et al.* 2008).

La presència d'aquestes cèl·lules aneuploides en dones amb cariotip euploide, es deu a errors en la segregació mitòtica que han tingut lloc prèviament a l'inici de la meiosi. Cal tenir en compte, que quan aquestes cèl·lules es sotmetin al procés meiotic, generaran cèl·lules alterades, afectant a l'oòcit, al corpuscle polar o a ambdós.

S'ha descrit també que la proporció relativa d'oòcits trisòmics en els ovaris de dones amb cariotip euploide augmenta amb l'edat, ja que la seva maduració, desenvolupament i oocitació es veuen retardats respecte als oòcits euploides (Zheng *et al.* 2000; Hulten *et al.* 2008).

Errors en la profase I meiotica: Defectes en l'aparellament, sinapsi i recombinació

Durant l'etapa embrionària s'inicia la meiosi i durant les etapes successives de la profase I, poden tenir lloc diverses alteracions. S'ha descrit que un cert percentatge de les cèl·lules presents en l'ovari presenten homòlegs no aparellats durant l'estadi de paquitè (Roig *et al.* 2005; Robles *et al.* 2007). Altres estudis de complexes sinapteinemals han evidenciat la presència de defectes sinàptics i d'aparellaments de cromosomes no homòlegs (Speed 1985; Garcia *et al.* 1987; Speed 1988; Tease *et al.* 2006).

La reducció de quiasmes comportant baixes taxes de recombinació o un inadequat posicionament de la maquinària de recombinació, situant-se massa pròxims als centròmers o telòmers, també s'ha relacionat amb una inestabilitat incrementada amb posteriors conseqüències en la posterior segregació cromosòmica durant la meiosi (Nicolaidis i Petersen 1998; Wolstenholme i Angell 2000; Lamb i Hassold 2004; Lamb *et al.* 2005; Robles *et al.* 2007).

Els quiasmes, les estructures encarregades de mantenir els cromosomes homòlegs connectats fins a l'estadi de metafase I, tenen una funció vital d'unió possibilitant una correcta segregació entre cromosomes homòlegs. Tenint en compte que la recombinació té lloc durant el desenvolupament fetal i la primera divisió meiòtica no es reprèn fins el moment de la ovulació en l'etapa fèrtil de la dona, els quiasmes, que mantenen els cromosomes associats s'han de mantenir intactes en els corresponents llocs de recombinació durant dècades i aquest fet també podria explicar que fossin "hot-spots" a l'hora de generar alteracions que podrien tenir conseqüències generant alteracions cromosòmiques en els oòcits (Buonomo *et al.* 2000; Bickel *et al.* 2002; Warren i Gorringer 2006).

Errors en la represa de la meiosi: No disjunció, alteracions del fus i ineficiència dels punts de control

Dos dels mecanismes relacionats amb la generació d'aneuploïdies tenen lloc durant la primera divisió meiòtica i són la no disjunció de cromosomes homòlegs del bivalent, que pot arribar a generar el 90% de l'aneuploidia originada en aquest estadi (Nicolaidis i Petersen 1998) i la separació prematura de cromàtides germanes descrita per primera vegada en oòcits l'any (Angell 1991).

La no disjunció de cromosomes homòlegs (*whole chromosome non-disjunction*) consisteix en la segregació d'ambdós cromosomes homòlegs cap al mateix pol cel·lular. Aquesta pot tenir dos orígens, en primer lloc pot deure's a que els cromosomes homòlegs no poden resoldre els quiasmes que els mantenen units, i per tant migren conjuntament cap a un mateix pol cel·lular. En segon lloc, la resolució prematura dels quiasmes, que fa que els dos homòlegs no es col·loquin aparellats en la placa metafàsica i conseqüentment es produeix una segregació a l'atzar cap a un o un altre pol cel·lular, podent acabar migrant ambdós cap al mateix pol cel·lular, aquest mecanisme es coneix amb el nom de no disjunció aquiasmàtica.

També s'han descrit alteracions del fus mitòtic i del procés d'alineament dels cromosomes a la placa metafàsica com a possible origen d'aneuploïdies, sobretot en

dones d'edat avançada (Battaglia *et al.* 1996; Volarcik *et al.* 1998). D'acord amb aquests estudis en models animals han associat aquestes alteracions a desequilibris hormonals i a la reducció de proteïnes implicades en aquests processos (Pan *et al.* 2008).

L'any 1991, en un estudi citogenètic realitzat en oòcits humans fixats sobre portaobjectes evidenciant els cromosomes amb tinció uniforme es va descriure un segon mecanisme responsable d'originar aneuploïdies que tenia lloc durant la primera divisió meiótica: la separació prematura de cromàtides germanes (PSSC- *premature separation of sister chromatids*) de manera que es genera una cèl·lula amb un univalent i una cromàtide i una altra amb una sola cromàtide (Angell 1991).

Posteriorment, durant la segona divisió meiótica, també es pot produir una separació anòmala, o no segregació de cromàtides germanes, fet que comporta que migrin totes dues cap al mateix pol cel·lular, en lloc de fer-ho cap a pols cel·lulars oposats. Tot i que sembla que la freqüència d'errors en aquest estadi és menor comparat amb els ocorreguts en MI, en els últims anys s'ha determinat que és més elevat del que es pensava inicialment. És també durant aquesta etapa quan es poden corregir alguns dels errors generats durant la primera divisió meiótica (Hunt i Hassold 2008; Hassold i Hunt 2009; Fragouli *et al.* 2011).

En última instància, l'elevada presència de desequilibris cromosòmics originats abans de la fecundació pot ser deguda a una ineficiència dels punts de control, encarregats d'assegurar el bon funcionament d'aquests processos.

1.3.2 Mecanismes de generació d'aneuploïdia d'origen patern

L'espermatogènesi s'atura durant el període fetal en el moment de diferenciació a espermatogonis. El seu desenvolupament es reprèn a la maduresa sexual de l'individu, en la que els espermatogonis comencen a proliferar mitòticament de manera molt activa. Alguns espermatogonis es mantindran com a cèl·lules mare, que seran capaces d'originar nous espermatogonis al llarg de tota la vida de l'individu mentre que d'altres iniciaran la meiosi, transformant-se en espermatòcits primaris. De cada espermatòcit primari, un cop acabada la primera divisió meiótica, que inclou la sinapsi i recombinació dels homòlegs constituint els 23 bivalents, s'originaran dos espermatòcits secundaris (23 cromosomes amb dues cromàtides), que un cop finalitzada la segona

divisió meiótica generaran 4 espermatides. Per tant, de cada espermatogoni diploide que entra a la meiosi, se'n generaran 4 espermatides haploides. Les espermatides però, encara s'hauran de sotmetre a un procés de diferenciació, denominat espermiogènesi, en el qual tenen lloc un conjunt de transformacions que canvien tant la morfologia citoplasmàtica com nuclear, conferint als espermatozoides les seves característiques cel·lulars característiques.

En la taula adjunta (Taula 1.1) es descriuen les diferències principals entre l'espermatogènesi i la oogènesi.

Tot i les diferències observades entre ambdós processos els errors que donarien lloc a la generació d'aneuploidies són els mateixos que s'han descrit en el cas matern.

Taula 1.1. Diferències entre l'espermatogènesi i l'oogènesi

Aspectes diferencials	Espermatogènesi	Oogènesi
Gametogènesi	Continua	Discontinua
Nº de gàmetes	Nº il·limitat d'espermatozoides	Nº aprox. 400 oòcits
Cèl·lules amb capacitat Reproductiva/ produïdes en cada meiosi	4/4	1/4
Inici de la meiosi	Pubertat	Etapa embrionària
Meiosi	Continua Sempre finalitza	Presenta dos punts de bloqueig, dictiotè i MII Només finalitza si hi ha fecundació
Punt de Control*	Més estrictes	Menys estrictes

*(LeMaire-Adkins *et al.* 1997).

1.3.3. Mecanismes de generació d'aneuploïdia d'origen embrionari

Amb el desenvolupament de les tècniques de reproducció assistida, s'ha pogut aprofundir en el coneixement dels embrions en estadis inicials de desenvolupament. Durant aquestes etapes primerenques s'ha observat que la presència d'aneuploïdies en aquests embrions no sempre prové dels gàmetes que l'han format sinó que també són originades durant les primeres divisions mitòtiques que tenen lloc en l'embrió. D'aquesta manera, s'ha descrit el fenomen del mosaïcisme embrionari. En alguns casos s'ha observat que les dotacions cromosòmiques alterades de les cèl·lules estudiades, eren complementàries entre els diferents blastòmers de l'embrió, posant en evidència el seu origen en les successives divisions mitòtiques (Vanneste *et al.* 2009; Rius *et al.* 2010).

1.4. Diagnòstic Genètic Preimplantacional

Actualment, les metodologies disponibles per evitar que les parelles amb risc de tenir descendència afectada de determinades malalties monogèniques les transmetin a la seva descendència són el diagnòstic prenatal, el diagnòstic preimplantacional, utilitzar gàmetes o embrions de donants o bé decantar-se per l'adopció. En cas de voler tenir fills biològics lliures de la malaltia monogènica familiar poden optar o bé pel diagnòstic genètic prenatal o bé pel diagnòstic genètic preimplantacional.

El diagnòstic prenatal, segons la legislació espanyola, es pot dur a terme en dos moments de l'embaràs. Si s'opta per realitzar l'estudi de les vellositats coriòniques el test es fa entre les setmanes 11 i 13 d'embaràs, en canvi, si s'opta per realitzar l'estudi del líquid amniòtic, aquets es fa entre la setmana 15 i 20 d'embaràs. Generalment, les parelles que es sotmeten a aquest tipus de procediments diagnòstics tenen un historial familiar amb individus afectats de la malaltia en qüestió.

El resultat positiu d'un diagnòstic prenatal, en el qual es determina que l'individu estarà afectat de la malaltia, comporta que les parelles hagin de decidir entre continuar l'embaràs o interrompre'l. Com més avançat estigui l'embaràs més difícil serà per la parella el fet de prendre la decisió, sobretot considerant la qualitat de vida i les possibles dificultats de tractament del seu futur fill versus el fet traumàtic que suposa interrompre un embaràs. En aquest sentit, el diagnòstic genètic preimplantacional, té l'avantatge de

seleccionar per transferir a l'úter matern només els embrions sans per la malaltia d'estudi.

A diferència del diagnòstic prenatal, el diagnòstic genètic preimplantacional requereix que la parella es sotmeti a tractaments de reproducció assistida. Per al diagnòstic dels embrions, és necessari que la inseminació *in vitro* dels oòcits madurs es realitzi mitjançant la injecció de l'espermatozoide (ICSI, *intra-cytoplasmic sperm injection*). Posteriorment, s'analitzen els embrions evolutius resultants. El DGP s'ha aplicat per més de 150 malalties monogèniques diferents d'herència dominant o recessiva segons les dades recollides en l'última compilació de la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) (Goossens *et al.* 2012).

A més de la detecció de malalties monogèniques familiars, d'alteracions cromosòmiques estructurals i de cribratge d'aneuploidies, en els últims anys, les comissions d'ètica de diferents països també han permès la realització de diagnòstic preimplantacional en famílies amb risc de malalties d'aparició més tardana, com són la predisposició familiar a certs tipus de càncer o la malaltia de Huntington.

El primer embaràs després de l'aplicació clínica del DGP es va produir fa 22 anys (Handyside *et al.* 1990) i des de llavors s'han desenvolupat diferents procediments d'anàlisi genètica adaptada a l'estudi d'una o un baix nombre de cèl·lules que és el material d'anàlisi utilitzat en els casos de DGP els quals es detallen a continuació.

1.4.1. Estadi cel·lular d'aplicació del DGP

Per a l'anàlisi del DGP, s'han utilitzat tres tipus de material biològic diferents: els blastòmers, els corpuscles polars i el trofoectoderm.

En la primera publicació reportant la primera aplicació clínica de DGP, mitjançant la biòpsia de blastòmers en l'estadi embrionari de 6-8 cèl·lules es va aconseguir diagnosticar els embrions i transferir només aquells que fossin sans per les malalties monogèniques estudiades. Amb aquest protocol es va aconseguir l'embaràs de bessones en dues famílies (Handyside *et al.* 1990). A partir d'aquell moment es va establir que la biòpsia i el diagnòstic de blastòmer era una bona estratègia per evitar la transferència d'embrions sans a l'úter matern. Fins a l'actualitat el blastòmer ha estat la cèl·lula més freqüentment biopsiada per dur a terme qualsevol tipus de diagnòstic preimplantacional (Goossens *et al.* 2012), la utilització del blastòmer però, presenta dues desavantatges que es deriven de la utilització d'una sola cèl·lula embrionària; les possibles errades

diagnòstiques poden ser degudes a fallades d'amplificació d'algun dels dos al·lels presents en la cèl·lula, conegut com a ADO (*allele drop-out*) i al mosaïcisme embrionari, ambdós mecanismes es discutiran més endavant. Nombrosos grups han optat per biopsiar dos blastòmers en lloc d'un per minimitzar la influència d'aquests fenòmens.

La utilització del primer corpuscle polar per al DGP s'ha emprat, en alguns casos conjuntament amb el segon corpuscle polar, sobretot per a l'estudi d'aneuploïdies per a l'anomenat PGS (*Preimplantational Genetic Screening*) en que s'estudia indirectament la dotació cromosòmica dels oòcits (Verlinsky *et al.* 1996). El corpuscle polar també s'ha utilitzat per al DGP de malalties monogèniques en casos de mutacions maternes o també en països on la legislació no permetia la biòpsia de l'embrió per motius ètics (Verlinsky *et al.* 1997; Montag *et al.* 2009). Els avantatges d'utilitzar aquestes cèl·lules per al diagnòstic hi ha el fet de que es tracta de cèl·lules que no tenen cap utilitat en el desenvolupament embrionari, ja que són cèl·lules extrusionades que contenen les dotacions cromosòmiques complementàries de l'oòcit i que estan destinades a degenerar. La seva utilització permet obtenir informació complementària de l'oòcit i en definitiva del futur l'embrió de la manera menys invasiva possible. Tot i així, també presenta alguns desavantatges: en primer lloc són cèl·lules que tan sols informen de l'aportació materna tant pel que fa a la dotació cromosòmica com per a l'anàlisi de malalties monogèniques, motiu pel qual tan sols té sentit empara-lo en DGP en el cas de risc de malalties d'origen exclusivament matern o d'herència recessiva.

L'estudi de material provinent de la biòpsia de cèl·lules del trofoectoderm en DGP és la oopció desenvolupada i aplicada més recentment, d'acord amb les conclusions d'alguns autors que defensen que cal retardar al màxim el moment de la biòpsia (McArthur *et al.* 2008). El procediment de biòpsia de trofoectoderm i la demostració de que no comprometia la viabilitat embrionària es va descriure durant els anys 90 (Dokras *et al.* 1990) i es va demostrar que es podia aplicar al DGP amb FISH (Veiga *et al.* 1997), però fins al 2002 no es va aconseguir un naixement després d'aplicar-lo clínicament a malalties monogèniques (De Boer 2002).

La biòpsia de trofoectoderm es realitza en dia +5, quan l'embrió arriba a l'estadi de blastocist, i ja es diferencien la massa cel·lular interna del trofoectoderm.

El principal avantatge de biopsiar en aquest moment és que permet disposar de varies cèl·lules per a l'anàlisi, que fan el diagnòstic més robust, reduint o inclús eliminant la

incidència de fallades d'amplificació i d'ADO que s'observen en la utilització de cèl·lules aïllades (Kokkali *et al.* 2005), tot i això caldria augmentar la sèrie que exposen per poder arribar a conclusions més definitives. En aquest estudi de Kokkali, per evitar l'absència de diagnòstic en cas de fallada de la reacció d'amplificació es va proposar dividir les cèl·lules biopsiades de trofoectoderm en dues meitats, per dur a terme dos diagnòstics paral·lels per a cada embrió, però el contacte entre les cèl·lules del trofoectoderm és tan estret que sembla tècnicament força difícil disposar de dos grups de cèl·lules.

Un altre avantatge de la utilització de trofoectoderm és que es seleccionen els embrions més competents evolutivament, descartant per a l'estudi, tots aquells que no arriben a l'estadi de blastocist. Tot i així, altres autors defensen que l'habilitat del zigot de desenvolupar-se fins a estadi de blastocist no reflexa necessàriament la viabilitat de l'embrió ni la seva capacitat d'implantar i donar lloc a embaràs (Bolton *et al.* 1991).

L'estudi de cèl·lules del trofoectoderm, però, també presenta certs inconvenients. En primer lloc, la biòpsia en aquest estadi és molt més fàcil i efectiva quan es disposa d'un làser acoblat al sistema de micromanipulació, això fa que la zona de tall sigui molt més precisa que quan s'utilitza àcid Tyrode. Per tant, requereix un equipament costós, que encara no està disponible en tots els laboratoris de reproducció assistida.

També cal posar en dubte si les cèl·lules del trofoectoderm que es biopsien són totalment representatives de l'embrió pròpiament dit ja que encara no s'ha evidenciat la correlació entre el material que forma la massa cel·lular interna que donarà lloc a l'embrió i el trofoectoderm que originarà la placenta i altres teixits extraembrionaris (Thornhill i Snow 2002).

Finalment, l'estudi de trofoectoderm a partir de blastocists requereix la criopreservació dels embrions degut al temps requerit per al diagnòstic amb tots els inconvenients que això pot suposar. Els embrions poden veure reduïda la seva viabilitat després de passar pel procés de congelació i descongelació, i a més les pacients han d'afegir un nou cicle al procés reproductiu per tal de preparar l'endometri per a la criotransferència dels embrions criopreservats, fet que també suposa afegir dos processos addicionals per al laboratori de FIV, augmentant-ne el seu cost.

1.4.2. DGP per malalties monogèniques

Una de les limitacions principals del DGP és la poca quantitat de DNA del que es disposa per dur a terme l'estudi genètic. És per això que els protocols per al diagnòstic

han de ser molt sensibles i acostumen a ser específics per a cada família (Kuliev i Verlinsky 2008) ja que cadascuna és portadora d'unes mutacions específiques i els individus són informatius per a diferents marcadors polimòrfics. En la majoria de diagnòstics mol·leculars es realitza un estudi indirecte de les mutacions utilitzant STRs (*Short Tandem Repeats*). Els STRs són seqüències de DNA d'entre 2 i 6 nucleòtids que es troben repetides consecutivament en les que la variació en el nombre de repeticions genera al·lels diferents. El fet que el nombre de repeticions sigui altament variable entre els individus d'una població possibilita trobar marcadors informatius en una mateixa família que es trobin en lligament amb la mutació d'interès.

Alguns grups utilitzen la PCR *multiplex* directament sobre les cèl·lules biopsiades, ja siguin un o dos blastòmers o bé diverses cèl·lules de trofoectoderm. Tenint en compte que per al DGP es disposa d'una quantitat molt limitada de DNA, alguns autors han descrit la utilització de diverses metodologies d'amplificació de tot el genoma cel·lular WGA (*whole genome amplification*) per generar més còpies del DNA de les cèl·lules biopsiades i augmentar substancialment la quantitat de DNA de partida per ser emprat en futures aplicacions (Snabes *et al.* 1994; Wells *et al.* 1999; Obradors *et al.* 2008; Obradors *et al.* 2009).

Generalment, en els cicles de DGP, el diagnòstic directe i indirecte de les mutacions familiars es realitza de forma combinada ja que dona una gran robustesa al diagnòstic tal i com han descrit diversos autors aplicant aquesta estratègia per la detecció de diverses malalties (Abou-Sleiman *et al.* 2002; De Rycke *et al.* 2005; Kuliev *et al.* 2006).

1.4.2.1. Limitacions del DGP de malalties monogèniques

La principal limitació pel que fa a la detecció de mutacions és l'*allele drop-out* o ADO. És un fenomen que consisteix en la manca d'amplificació d'un dels dos al·lels presents en la cèl·lula (Navidi i Arnheim 1991; Findlay *et al.* 1995).

Les causes que poden originar l'ADO es desconeixen amb exactitud però s'han descrit diferents factors que hi poden influir com és el cas de la mida dels fragments amplificats, la degradació del DNA cel·lular, els processos de congelació i descongelació de les mostres o bé les condicions i programa de PCR fets servir (Piyamongkol *et al.* 2003). La fallada d'amplificació d'un dels al·lels pot tenir lloc tant en l'al·lel mutant com en el normal, això fa que elevades taxes d'ADO puguin donar lloc a errors diagnòstics. Per exemple, en el cas d'una cèl·lula heterozigota portadora d'una malaltia recessiva si l'ADO afecta a l'al·lel mutant es podria diagnosticar com a

sa un embrió que en realitat és portador. Si en canvi, es produís un ADO afectant l'al·lel sa, l'embrió es diagnosticaria falsament com a afectat i es descartaria. Aquest fenomen pren més rellevància en el cas de malalties dominants, en aquets cas si hi hagués un ADO afectant l'al·lel mutant podria portar a diagnosticar erròniament embrions afectats com a sans. Malauradament, aquests errors diagnòstics deguts a la presència d'ADO s'han descrit en la bibliografia en algunes ocasions (Grifo *et al.* 1994; Verlinsky *et al.* 1994; Verlinsky *et al.* 1996; Harper i Delhanty 2000; Wilton *et al.* 2009).

En base a l'exposat i amb l'objectiu d'augmentar la robustesa del diagnòstic de cèl·lules aïllades s'utilitza l'estratègia d'amplificar també STRs en lligament amb la mutació, per confirmar el diagnòstic de manera indirecta (Wells i Sherlock 1998; Thornhill i Snow 2002).

1.4.2.2. Metodologies d'amplificació del genoma cel·lular

Com s'ha detallat, la quantitat de DNA present en una sola cèl·lula, limita el nombre d'anàlisis que se li poden aplicar. Alternativament, per evitar molts dels problemes relacionats amb aquesta baixa quantitat de DNA de partida es poden utilitzar sistemes d'amplificació de tot el genoma cel·lular (WGA, *whole genome amplification*).

Multiple Displacement Amplification (MDA)

La MDA és una metodologia descrita inicialment l'any 2002 (Dean *et al.* 2002), que s'ha aplicat en nombroses ocasions en el DGP (Handyside *et al.* 2004; Hellani *et al.* 2004; Lledo *et al.* 2006; Renwick *et al.* 2006).

La metodologia MDA es caracteritza pels encebadors i l'enzim que utilitza. En primer lloc els encebadors, són hexàmers degenerats, sintetitzats a l'atzar que hibriden en molts llocs diferents del genoma, aconseguint una amplificació massiva. D'altra banda l'enzim que fa servir per la polimerització és la DNA polimerasa obtinguda del bacteriòfag Phi29. Aquesta es caracteritza per dur a terme una amplificació isotèrmica. Una peculiaritat d'aquest enzim és que si mentre la polimerització, l'enzim es troba amb l'encebador següent, la cadena es desplaça i continua la síntesi. En aquesta cadena desplaçada també podran hibridar nous encebadors i sintetitzar noves còpies (veure Figura 1.3).

L'únic inconvenient que s'ha descrit de la MDA és que sol donar unes elevades taxes d'ADO que poden arribar fins al 25% (Renwick *et al.* 2006), mentre que si les cèl·lules

no s'amplifiquen mitjançant MDA les taxes d'ADO descrites son d'aproximadament el 10%.

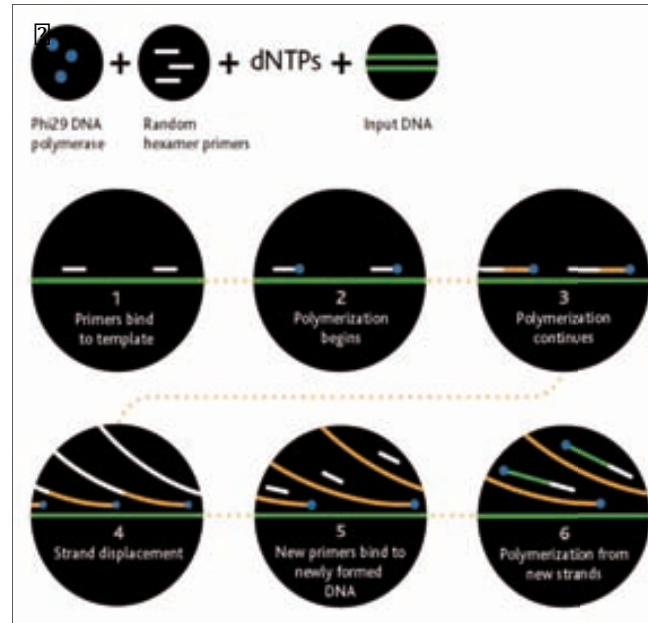


Figura 1.3. Representació de la metodologia d'amplificació de tot el genoma cel·lular *Multiple Displacement Amplification*

GenomePlex®

La metodologia de Genomeplex® consisteix en tres passos successius. En primer lloc es lisa la cèl·lula i es fragmenta el DNA genòmic de manera aleatòria. A continuació es procedeix a la creació d'una llibreria, en aquest pas a partir d'uns encebadors s'amplificarà cadascun dels fragments generats generant còpies d'aquests fragments flanquejats per uns encebadors específics. Finalment, un cop generada la llibreria s'amplificaran aquests fragments flanquejats utilitzant encebadors específics mitjançant successius cicles de PCR (Figura 1.4).

Picoplex/Surpeplex

La metodologia de WGA Picoplex i Sureplex és similar al GenomePlex descrit anteriorment, i consisteix en una fragmentació i una pre-amplificació que aniran seguides d'una posterior amplificació. Tot i així els fabricants no detallen ni els components ni els trets diferencials de la metodologia o del seu funcionament.

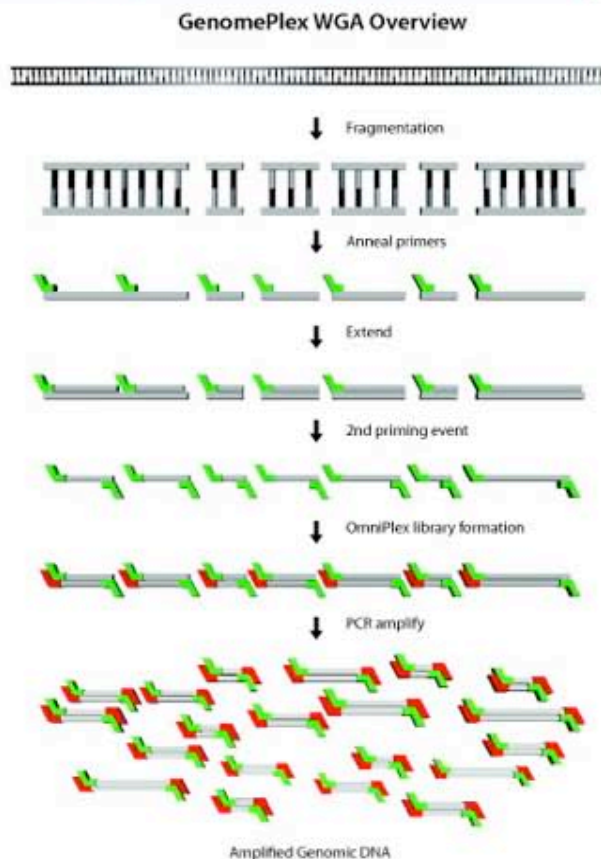


Figura 1.4. Representació de la metodologia d'amplificació de tot el genoma cel·lular GenomePlex[®]

1.4.2.3- Metodologies de detecció directa i indirecta de mutacions

La PCR és la base de les diferents metodologies que s'apliquen en el diagnòstic de mutacions tant en procediments de detecció directa com indirecta.

Un cop amplificats els fragments en qüestió existeixen diferents sistemes de detecció directa que permeten distingir l'al·lel normal del mutant. Entre ells la SSCP (*single strand conformation polymorphism*) la DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) la PCR fluorescent o la miniseqüenciació.

La PCR fluorescent, consisteix en marcar fluorescentment un encebador de cada parella, d'aquesta manera, un cop acabada la PCR s'hauran generat productes fluorescents que es poden analitzar en un seqüenciador de DNA automatitzat per electroforesi capil·lar, permetent una detecció molt sensible dels fragments amplificats, amb una elevada resolució, ja que permet detectar fragments amb tan sols un parell de bases de diferència (Findlay *et al.* 1995).

En la major part dels casos, es fan reaccions PCR *multiplex*, és a dir, s'amplifiquen diferents loci en una mateixa reacció. Això, a més de reduir la utilització de reactius permet una optimització del temps, fet molt rellevant durant l'aplicació clínica del DGP (Rechitsky *et al.* 2001; Goossens *et al.* 2003).

Minisequencing

La miniseqüenciació és una metodologia molt senzilla i sensible que permet la detecció de mutacions puntuals que no es podrien distingir mitjançant la electroforesi capil·lar d'una PCR fluorescent per diferència de mida dels fragments generats. Aquesta metodologia va ser descrita per Fiorentino l'any 2003, es tracta d'un sistema de seqüenciació convencional amb certes peculiaritats ja que en lloc de sintetitzar un fragment de DNA s'incorpora tan sols un nucleòtid (Fiorentino *et al.* 2003).

En primer lloc s'ha d'amplificar per PCR convencional el fragment de DNA que conté la zona de la mutació. Un cop amplificat el fragment es purifica el producte de PCR per eliminar els encebadors i nucleòtids sobrants de la reacció i es procedeix a la miniseqüenciació pròpiament dita. Per la miniseqüenciació s'ha d'haver dissenyat un encebador que hibridi exactament en la base anterior al nucleòtid on s'ha produït la mutació. A partir d'aquí, en un termociclador té lloc la reacció de miniseqüenciació que consisteix en la incorporació del nucleòtid corresponent marcat fluorescentment. Cadascun dels quatre nucleòtids estarà marcat amb un fluorocrom diferent: l'adenina en verd, la timina en vermell, la citosina en negre i la guanina en blau. D'aquesta manera es pot visualitzar quin nucleòtid s'haurà incorporat, segons el color dels pics obtinguts després de l'electroforesi capil·lar duta a terme en un seqüenciador automatitzat, podent deduir si l'individu té l'al·lel normal o mutat i determinar el seu genotip (Figura 1.5).

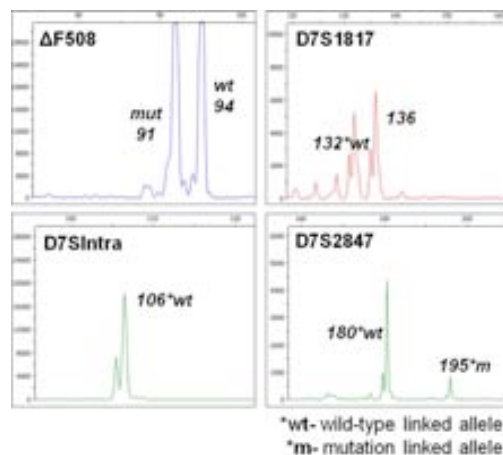


Figura 1.5. Detecció directa i indirecta de mutacions per PCR fluorescent

1.4.3 Estudi preimplantacional de cribratge d'aneuploïdies

1.4.3.1 Indicacions

L'aneuploïdia pot afectar a la implantació embrionària, ja que la majoria d'embrions amb determinades alteracions no aconsegueixen implantar. S'ha descrit que el 60% dels avortaments espontanis es deuen a la presència d'alteracions cromosòmiques numèriques (Hassold 1980; Jacobs 1992). D'aquests la meitat estan causats per trisomies dels cromosomes 16, 21 o 22, i el 10% per la monosomia del cromosoma X (Hassold *et al.* 1980). Altres treballs en què s'han estudiat blastòmers aïllats provinents d'embrions descartats de cicles de FIV, han detectat, en un 75% dels embrions, aneuploïdies en alguna de les cèl·lules analitzades (Voullaire *et al.* 2000; Wells i Delhanty 2000).

És ben conegut l'efecte de l'edat materna en relació a la davallada de la fecunditat. Alguns autors ho han atribuït a una disminució en la receptivitat de l'úter o a l'envelliment dels oòcits (Meldrum 1993). Altres estudis detecten una correlació entre l'augment de l'aneuploïdia en els oòcits i l'edat materna avançada (AMA) evidenciant un increment en les seves taxes d'embaràs si s'utilitzen oòcits de donants més joves (Abdalla *et al.* 1993; Sauer *et al.* 1996). D'acord amb això s'ha recomanat l'ús del cribratge d'aneuploïdies o PGS (*preimplantation genetic screening*) sobretot a dones d'edat materna avançada (Gianaroli *et al.* 1999; Munne *et al.* 1999; Munne *et al.* 2003). El PGS també està indicat en parelles que han experimentat avortaments recurrents (RM), ja que s'ha descrit que en els embrions d'aquestes parelles l'aneuploïdia és força recurrent arribant a taxes del 50 o 60% (Pellicer *et al.* 1999; Rubio *et al.* 2003; Munne *et al.* 2005). La presència d'aneuploïdies en els avortaments espontanis ha estat àmpliament descrita (Hassold *et al.* 1980). En parelles amb repetides fallades d'implantació (RIF), també s'ha indicat i aplicat el PGS. Tot i així cal tenir en compte que no tots els casos d'avortaments recurrents i de fallades d'implantació són atribuïbles a l'aneuploïdia sinó que hi poden haver altres factors implicats.

Alguns estudis han descrit millores en les taxes d'implantació i d'embaràs quan es fa el cribratge d'aneuploïdies (Gianaroli *et al.* 1999; Munne *et al.* 2003; Platteau *et al.* 2006). També s'ha considerat indicat aplicar el cribratge d'aneuploïdies en dones que es sotmeten a tractaments de FIV per factor masculí o bé com a complement per al diagnòstic genètic preimplantacional per millorar les taxes d'implantació.

El mosaïcisme, fenomen molt freqüent en embrions és un dels majors entrebancs que té el PGS. Recentment, amb mètodes d'anàlisi de tot el complement cromosòmic s'ha evidenciat l'elevada taxa de mosaïcisme present en embrions a l'estadi de 6-8 cèl·lules descrivint la presència de mosaïcisme en una 60-70% dels embrions (Vanneste *et al.* 2009; Rius *et al.* 2011). Alguns autors, recomanen la biòpsia de dos blastòmers per tal de detectar la seva existència (Van de Velde *et al.* 2000; Baart *et al.* 2006) però aquesta aproximació pot malmetre l'embrió sense tenir la certesa de detectar ni l'existència ni l'abast del fenomen en l'embrió.

1.4.3.2 Tècniques aplicades al PGS

FISH

L'aplicació del PGS s'ha generalitzat de manera molt important en els últims anys, i està essent aplicat en molts centres de reproducció. Habitualment, fins a l'actualitat, el PGS es realitza aplicant la tècnica de FISH i analitzant un màxim de nou cromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 X i Y) . Segons recull la última recopilació de dades de l'ESHRE, un 15,4% dels embrions transferits després d'un PGS van aconseguir implantar i arribar a batec cardíac (Goossens *et al.* 2012). D'acord amb aquestes baixes taxes d'èxit hi ha diversos estudis que discuteixen l'efectivitat del cribratge d'aneuploidies utilitzant la FISH, ja que no sembla que comporti cap millora evident en les taxes d'implantació en aquestes parelles (Staessen *et al.* 2004; Mastenbroek *et al.* 2007; Hardarson *et al.* 2008; Staessen *et al.* 2008; Schoolcraft *et al.* 2010). És possible que la manca de millora en les taxes d'implantació i embaràs sigui deguda al reduït nombre de cromosomes que s'analitzen, ja que altres estudis que han analitzat tot el complement cromosòmic dels embrions han evidenciat aneuploidies en pràcticament tots els cromosomes (Rius *et al.* 2011).

Hibridació genòmica comparada (CGH)

La hibridació genòmica comparada és un procediment d'estudi citogenètic alternatiu a la FISH, que permet estudiar en una sola anàlisi tot el complement cromosòmic. Per ser aplicada al diagnòstic genètic preimplantacional requereix que s'amplifiqui prèviament el DNA cel·lular (Voullaire *et al.* 1999; Wells *et al.* 1999). La CGH és una tècnica que requereix més temps que la FISH, però té l'avantatge de no requerir la fixació del material cel·lular que podria donar lloc a pèrdues cromosòmiques artefactuals i per tant permet diagnosticar guanys i pèrdues de tots els cromosomes del complement en una

sola anàlisi. Fins fa un parell d'anys l'aplicació de la CGH convencional (que requereix 40h d'hibridació) només s'havia aplicat per al PGS en primer corpuscle polar, que permetia la transferència dels embrions en fresc, sense necessitat de criopreservar-los (Wells *et al.* 2002; Obradors *et al.* 2008; Fragouli *et al.* 2009; Obradors *et al.* 2009). També s'ha aplicat el PGS en blastòmer, havent de criopreservar els embrions degut a la llarga durada del procediment i fer la transferència embrionària dels embrions euploides en cicles posteriors (Wells *et al.* 2002; Wilton 2005; Sher *et al.* 2007; Fragouli *et al.* 2009; Sher *et al.* 2009). El desenvolupament de la metodologia de la CGH ràpida en el nostre grup (Rius *et al.* 2010) s'ha aconseguit diagnosticar citogenèticament els embrions en poc més de 30h i per tant possibilitant la transferència dels embrions euploides en el mateix cicle de FIV sense haver-los de criopreservar.

La hibridació genòmica comparada és una metodologia que consisteix en hibridar de forma competitiva, en proporció 1:1 dos DNAs marcats fluorescentment amb diferents colors, un DNA referència i un DNA problema, provinent de la cèl·lula a testar (Figura 1.6). La hibridació té lloc sobre de metafases d'individus euploides 46, XY. Posteriorment utilitzant un programa informàtic per valorar la proporció de les dues sondes, es pot determinar si la proporció d'hibridació d'ambdues sondes de DNA és igual o diferent.

Com ja s'ha comentat, per aplicar la CGH per a l'estudi citogenètic de cèl·lules aïllades, és necessari amplificar els 6pg de DNA cel·lular, ja que se'n requereixen aproximadament 200ng per obtenir hibridacions de qualitat. Tant les cèl·lules problema (blastòmer, corpuscles polars o 3-6 cèl·lules biopsiades de trofoectoderm) com les cèl·lules control o referència (limfòcits o fibroblasts amb cariotip conegut) s'amplifiquen per separat però aplicant la mateixa metodologia d'amplificació WGA. La més utilitzada en estudis de CGH és la DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primed PCR*) descrita per Telenius l'any 1992 (Figura 1.7).

La DOP-PCR utilitza uns encebadors degenerats, que hibriden per tot el genoma cel·lular, i que contenen una seqüència coneguda en ambdós extrems i una part central amb nucleòtids disposats a l'atzar, per donar una major variabilitat pel que fa a les zones on hibridarà.

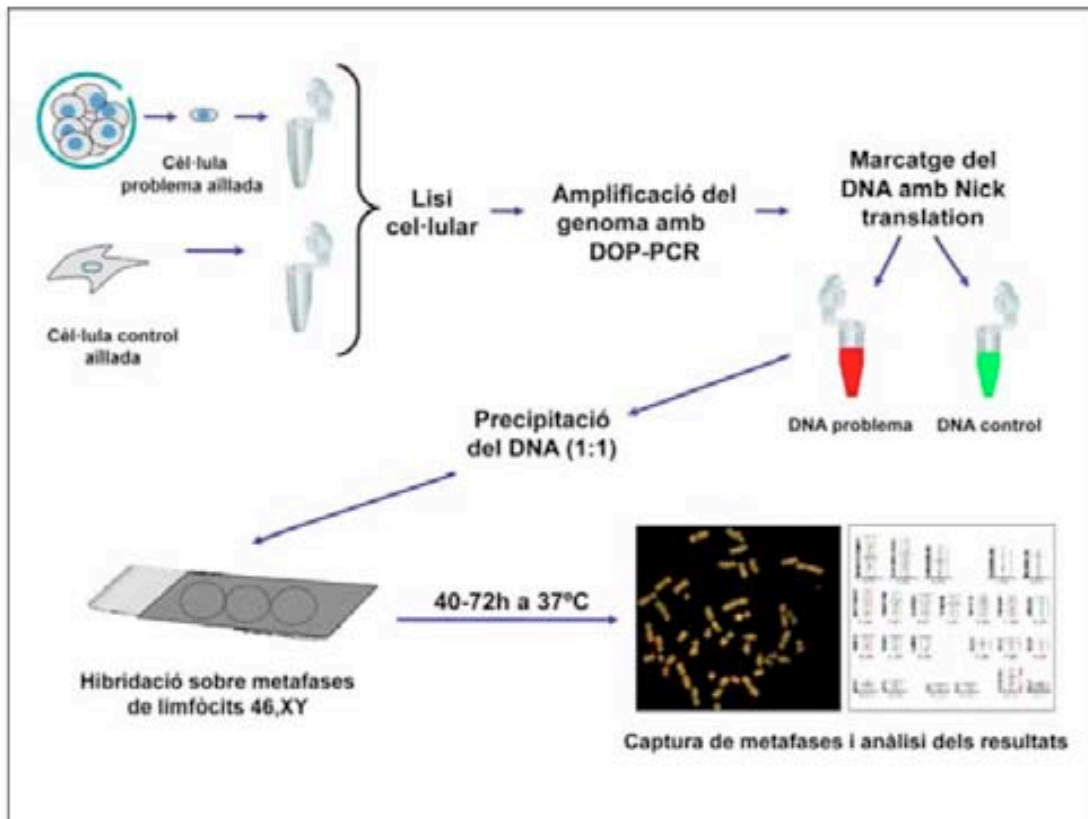


Figura 1.6. Representació de la Hibridació Genòmica Comparada

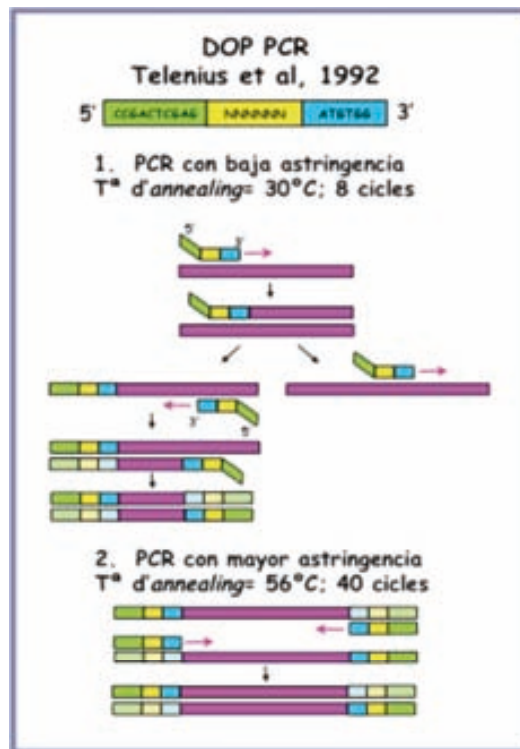


Figura 1.7. Representació de la metodologia d'amplificació de tot el genoma cel·lular DOP-PCR

Després d'amplificar els DNAs de la cèl·lula control i problema, s'han de marcar amb un fluorocroms diferents; per exemple el DNA control en verd, i el de la cèl·lula problema en vermell. Un cop marcats els DNAs se'n prepara una mescla 1:1 i es co-precipiten conjuntament, a partir d'aquesta barreja s'obté la sonda que s'utilitza per hibridar sobre metafases de limfòcits d'individus euploides.

Després del temps d'hibridació, es procedeix a la captura de les metafases (mínim 12) emprant un microscopi de fluorescència equipat amb un programa informàtic específic per la CGH i es cariotipen per tal de que el *software* pugui determinar la ràtio d'hibridació entre els dos fluorocroms per a cadascun dels cromosomes. Quan el *software* detecta l'equilibri entre la hibridació de les dues sondes (ràtio=1) dibuixa un perfil centrat que equival a l'euploïdia. En canvi, quan detecta més hibridació d'un fluorocrom que de l'altre determina que en aquella regió hi ha un desequilibri cromosòmic entre la cèl·lula control i la cèl·lula problema. Seguint amb l'exemple d'abans, si s'ha marcat de color vermell el DNA obtingut a partir de la cèl·lula problema i en verd el DNA obtingut a partir de la cèl·lula control, una major hibridació en color vermell sobre el cromosoma metafàsic indicaria un guany cromosòmic en la cèl·lula que s'està testant. Aquesta diferència en les intensitats d'hibridació és deguda a l'efecte de la competència entre ambdues sondes: per qüestió de probabilitats, si d'una n'hi ha més, hibridarà més. D'altra banda, si en un cromosoma concret s'observa més intensitat d'hibridació en color verd, significa que la sonda verda, amb la que s'ha marcat el DNA control, és més abundant que no pas la sonda vermella (del DNA problema) i per tant evidenciaria la corresponent pèrdua cromosòmica en la cèl·lula problema.

La CGH, permet analitzar tots els cromosomes en tota la seva longitud, amb un límit de resolució d'entre 10 i 20 Mb. Aquest fet permet detectar no només desequilibris cromosòmics numèrics que afectin a tot el cromosoma sencer sinó també desequilibris de fragments cromosòmics. La CGH però no permet la detecció de poliploïdies, que afecten a tot el complement cromosòmic ni tampoc alteracions estructurals equilibrades. A més, la CGH té una limitació en l'estudi de desequilibris de fragments cromosòmics que afecten a centròmers i telòmers. Donat que es tracta de regions amb seqüències de DNA repetitiu, solen presentar amplificacions preferencials i poden donar lloc a desequilibris artefactuals.

Microarrays de CGH

Els arrays de CGH es basen també en la hibridació competitiva de dos DNAs, però en lloc d'hibridar sobre cromosomes metafàsics fixats sobre un portaobjectes, hibriden sobre seqüències concretes posicionades ordenadament que han estat adherides sobre un portaobjectes i que cobreixen tot el genoma. El principal avantatge dels microarrays de CGH en relació a la CGH sobre cromosomes és la major resolució que ofereixen, tot i així, fins al moment els criteris d'anàlisi només permeten detectar alteracions d'un mínim de 10Mb (Hellani *et al.* 2008; Vanneste *et al.* 2009).

Existeixen diversos tipus de microarrays de CGH segons el tipus i mida de seqüències que contenen. Els més utilitzats per al DGP són els microarrays de BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) i els d'oligonucleòtids. Mentre que els de BACs utilitzen seqüències de 150-200 kb corresponents a fragments de qualsevol regió de tots els cromosomes humans. Els microarrays d'oligonucleòtids, en canvi, es basen en la síntesi de seqüències curtes d'entre 25-85 nucleòtids (Wells *et al.* 2008).

L'aplicació dels microarrays de CGH al DGP ofereix una bona via, amb moltes possibilitats pel que fa a la resolució i a la rapidesa del diagnòstic. Tot i així, són tècniques econòmicament molt costoses, tant pel que fa a equipament com a reactius i a més encara s'han d'estandaritzar els criteris d'anàlisi i diagnòstic.

1.5 Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor

Fins a l'actualitat les taxes d'èxit aconseguides en els cicles de DGP per malalties monogèniques són força baixes considerant les dades incloses en la última recopilació de dades de l'ESHRE (Goossens *et al.* 2012). L'índex de naixements respecte els embrions transferits, és de 15,3%, força baix, sobretot si es té en compte que generalment es tracta de parelles sense problemes reproductius.

L'any 2011 es van publicar els resultats d'un treball on es va aplicar una variant del DGP que analitzava en el mateix cicle de FIV la dotació cromosòmica de tot el complement de l'oòcit de manera indirecta utilitzant el primer corpuscle polar, a més de la mutació monogènica familiar, analitzant un blastòmer dels corresponents embrions evolutius. Aquesta aproximació es va anomenar diagnòstic genètic preimplantacional de doble factor (DF-DGP). Tot i tractar-se d'una sèrie reduïda, es va evidenciar que

aplicant el DF-DGP, la taxa de naixements per embrió transferit aconseguida era del 33,3%, posant en evidència l'elevada potencialitat d'aquesta variant del DGP (Obradors 2011).

Hipòtesi i objectius

2. Hipòtesi i objectius

2.1. Hipòtesi

L'aneuploïdia és una de les causes principals de la baixa fecunditat en l'espècie humana. El seu millor coneixement i el seu cribratge poden donar lloc a la obtenció de millors resultats en cicles de FIV i de DGP.

2.2. Objectius

1.- Dur a terme un estudi bàsic que permeti aprofundir en el coneixement de la generació d'aneuploïdies d'origen pre-meiotic en oòcits.

2.- Aplicar el DF-DGP en blastòmer per analitzar les malalties monogèniques familiars i alhora dur a terme un cribratge d'aneuploïdies dels embrions obtinguts mitjançant la CGH ràpida biopsiant dos blastòmers per embrió.

3.- Desenvolupar i optimitzar la metodologia d'amplificació del genoma cel·lular que permeti realitzar el diagnòstic genètic preimplantacional de doble factor a partir d'una sola cèl·lula.

4.- Aplicar clínicament la nova aproximació al DF-DGP a partir d'un sol blastòmer d'embrions evolutius en famílies amb risc de transmetre malalties monogèniques a la descendència.

5.- Comparar els resultats obtinguts amb la utilització de les dues aproximacions per al DF-DGP i també amb el DGP convencional que realitza l'estudi de l'aneuploïdia embrionària simultàniament.

Material i Mètodes

3.- Material i Mètodes

3.1.- Aïllament Cel·lular

3.1.1 Aïllament i processat dels oòcits immadurs

Els oòcits en estadi de VG o MI separats i convenientment identificats segons les pacients i centres de reproducció es van transportar a temperatura ambient fins al laboratori de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Universitat Autònoma de Barcelona on es van processar. En una cabina amb flux laminar horitzontal (Telstar), per evitar qualsevol possible contaminació externa es va seguir el següent protocol.

Es van preparar plaques de petri d'un sol ús per als rentats amb gotes estèrils de 25µl de solució salina PBS estèril (phosphate buffered saline; Invitrogen) complementada amb 0,1% de PVA (polivinil alcohol; Invitrogen) per evitar l'adhesió de les cèl·lules a qualsevol dels materials utilitzats. També s'afegeixen a la placa, gotes d'àcid Tyrode (Sigma a pH=2,5) clarament identificables que s'utilitzaran per retirar la zona pel·lúcida dels oòcits sota una lupa binocular (Figura 3.1).

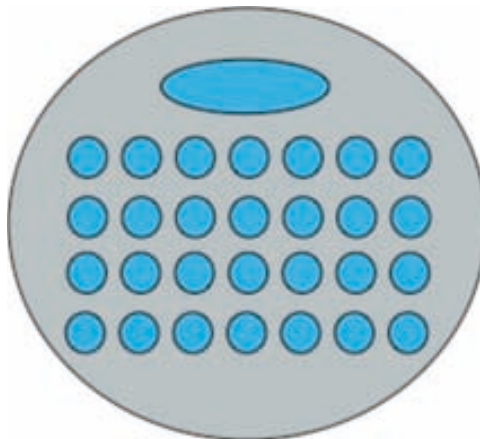


Figura 3.1. Representació de la distribució de gotes per als rentats de cèl·lula única

Amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur d'un sol ús s'agafa el contingut de cadascun dels tubs i es buida dins una placa de petri. A partir d'aquest moment es realitza tot el procés sota el control d'una lupa binocular a 20-50 augments (Wild Heerbrugg M8). En primer lloc s'agafa cada un dels oòcits amb un capil·lar de plàstic de 100µm de diàmetre (Cook) i

es dipositen en una de les gotes de PBS de la placa, en les que es fa el primer rentat. Després es buida el PBS del capil·lar i s'omple d'àcid Tyrode, s'agafa l'oòcit i es posa en una de les gotes de Tyrode. En qüestió de segons es pot observar que la zona pel·lúcida, s'infla i es comença a degradar però abans que s'acabi de dissoldre del tot, s'agafa l'oòcit i es posa en una gota de PBS, a continuació es buida el capil·lar per reomplir-lo amb PBS estèril. Seguidament, es fan tres rentats més en tres gotes de PBS intactes i finalment s'entuba l'oòcit en un tub de PCR de 200µl (Eppendorf) i un cop marcat convenientment es conserva congelat a -80°C fins al posterior processament. Cal remarcar que per evitar contaminacions entre els diferents oòcits, és necessari emprar gotes noves i estèrils, tant de PBS com d'àcid Tyrode.

3.1.2. Aïllament i processat de fibroblasts i limfòcits control

S'han utilitzat cèl·lules aïllades provinents de cultius cel·lulars en diferents ocasions; com a cèl·lules referència o control de la CGH, per a la validació de noves tècniques i també per utilitzar en la posada a punt protocols de detecció de mutacions.

Les cèl·lules referència per a la CGH que s'han utilitzat en els estudis de CGH tant de corpuscles com d'oòcits han estat fibroblastes 46, XX de cultius provinents de teixit ovàric fetal humà (donació del Dr. MA Brieño de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la UAB i la Dra. MR Martorell de Girofiv). També s'han utilitzat amniòcits 47, XXY i limfòcits 46, XY de les línies Coriel GM07381 i GM1185 per utilitzar com a DNA control per la CGH en blastòmer.

Per a la posada a punt de noves tècniques s'han utilitzat fibroblasts de línies cel·lulars Coriel amb alteracions conegudes per tal de poder validar la detecció d'alteracions mitjançant la CGH (Taula 3.1).

Per a l'estudi monogènic, ha calgut posar a punt els mètodes de detecció directes i indirectes. En la majoria dels casos s'han fet servir limfòcits 46, XY de les línies Coriel GM07381 i GM011285 portadores de la mutació $\Delta F508$.

Línies Cel·lulars Coriel	
Referència	Cariotip
GM03676	48, XY, +2, +21
GM03330	47, XY, +13
GM04435	48, XY, +16, +21
GM03623	48, XXX, +18
GM011115	47, XY, +9
GM03184	47, XY, +15

Taula 3.1. Línies Coriel utilitzades en aquest treball

En qualsevol d'aquests casos, el protocol d'aïllament tant de fibroblasts com de limfòcits era molt similar al descrit anteriorment. Tant en el cas de fibroblasts, (cultivats en placa) com de limfòcits (cultivats en tub) s'ha partit de cultius confluents. Un cop arribats a aquest estadi, s'han diluït en PBS estèril i s'ha procedit al seu aïllament sota el control d'una lupa binocular (Wild Heerbrugg M8).

Pel protocol d'aïllament s'utilitzen plaques de petri d'un sol ús amb gotes de PBS amb 0,1% de PVA estèril tal i com s'ha descrit pels oòcits. S'agafa una quantitat de la suspensió cel·lular i es diposita en una de les gotes preparades. Posteriorment, amb un capil·lar de 100µm, i sota una lupa binocular a 50 augments es fan els rentats alhora que es dilueixen les cèl·lules en les gotes noves, fins que es poden identificar entre 20 i 30 cèl·lules per gota. A continuació s'agafen individualment i es dipositen en tubs de PCR de 200µl que es mantindran a 4°C durant el procés i s'emmagatzemaran a -80°C fins al seu processat.

3.2. Estudi d'aneuploïdies d'origen pre-meïòtic

Per l'estudi d'aneuploïdies d'origen germinal mitòtic (Objectiu 1) s'han analitzat 157 oòcits immadurs, provinents de 56 dones d'entre 18 i 45 anys, amb una mitjana de 32,5 anys incloses en els programes de fecundació in vitro de tres centres col·laboradors: el Centre de Reproducció Assistida d'Institut Marquès, la Clínica Eugin i la Fundació Puigvert de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Han participat en l'estudi tres grups de dones: el primer grup format per 24 donants d'òocits, el segon per 7 pacients de FIV de com a màxim 36 anys i finalment el tercer de 25 pacients d'edat avançada de com a mínim 37 anys.

Tots els òocits immadurs descartats dels cicles per a finalitats reproductives, han estat donats per a la realització d'aquest objectiu, prèvia signatura del corresponent consentiment informat.

Per l'estimulació ovàrica d'aquestes dones, s'han aplicat tractaments hormonals convencionals.

3.3. Desenvolupament i optimització dels procediments requerits en el DF-DGP

A continuació es fa una relació dels procediments requerits en el DF-DGP (Objectiu 3) que inclou l'estudi citogenètic complet, cromosomes 1 a 22, X i Y simultàniament amb l'estudi monogènic.

3.3.2. Adequació dels procediments desenvolupats a blastòmers d'embrions descartats

Per poder aplicar clínicament el DF-DGP, calia comprovar la validesa en blastòmer dels procediments desenvolupats en limfòcits o fibroblasts. Per això s'han processat blastòmers provinents d'embrions descartats de cicles de reproducció assistida de diferents centres (Clínica Eugin, Fundació Puigvert, Institut Universitari Dexeus i Instituto Valenciano de Infertilidad) i donats amb finalitats de recerca. Aquests embrions havien estat descartats per motius morfològics, per tractar-se d'embrions no evolutius, citogenèticament anòmals i/o estar afectats de malalties monogèniques hereditàries.

Els embrions eren recollits a cadascun dels centres de reproducció i posteriorment es retirava la zona pel·lúcida utilitzant àcid Tyrode, seguint el mateix procediment que s'ha detallat anteriorment a l'apartat 3.1.2. En els casos en els que els embrions es trobaven ja iniciant el procés de compactació s'ha hagut d'utilitzar pronasa (Roche), una proteasa que permet descompactar les cèl·lules mitjançant la destrucció de proteïnes d'adhesió cel·lular i d'aquesta manera permet separar els blastòmers individualment.

Aquesta proteasa és activa a 37°C, per això s'han preparat plaques amb gotes de 25µl de pronasa (3mg/ml en PBS sense ions de calci ni magnesi) cobertes d'oli mineral (Sigma) per tal d'evitar contaminacions. Degut a que la pronasa és activa a 37°C les plaques es temperaven a l'incubador i un cop s'hi dipositaven els embrions es deixava actuar durant 5 minuts aproximadament. Un cop separats cadascun dels blastòmers es renten en gotes de PBS amb 0,1% de PVA, s'entuben i es mantenen a -80°C fins al moment de processat.

3.4. Procediments aplicats en cèl·lules úniques

3.4.1 Lisi cel·lular i amplificació de tot el genoma

3.4.1.1. Multiple Displacement Amplification (MDA) amb *Genomiphi V2*

El mètode d'amplificació MDA s'ha aplicat fent servir el kit *Genomiphi V2* (GE Healthcare) que comença amb una lisi cel·lular utilitzant els components següents:

2,5 µl de Solució Alcalina (50 mM de DTT/ 200 mM de KOH)

5 µl de *Sample Buffer* (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

Un cop afegides aquestes quantitats a cadascun dels tubs, s'homogeneïtza el contingut del tub fent un toc de vòrtex i de centrifugació per portar al fons del tub el que pugui haver quedat enganxat a les parets i posteriorment es deixa actuar durant 3 minuts a 95°C al termociclador (TGardient, Biometra) per facilitar a més de la lisi la desnaturalització del DNA. Un cop transcorregut aquest temps es posen els tubs immediatament en gel per tal d'evitar la renaturalització del DNA i s'hi afegeixen la resta de reactius:

0,8 µl de Tricina (20 mM a pH=4,95) que s'utilitza per neutralitzar el pH de la sol·lució de lisi alcalina

8,2 µl de *Reaction Buffer* (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

1 µl d'enzim Taq φ 29 (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

Després d'afegir els 10 µl a cada tub es barreja i es manté al termociclador durant 90 minuts a 30°C amb una etapa final de 10 minuts a 65°C per tal d'inactivar l'enzim. Un cop acabat aquest pas ja tenim el DNA amplificat i el podem guardar a 4°C fins al moment de la seva utilització.

3.4.1.2 Lisi amb proteïnasa K i *Degenerate-oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR)*

La metodologia d'amplificació mitjançant DOP-PCR ha estat emprada des de fa temps pel nostre grup (Gutierrez-Mateo *et al.* 2004a), aquesta tècnica no inclou la lisi dins el seu protocol i per tant requereix d'una lisi prèvia que es detalla a continuació. Tant en el pas de lisi com en la posterior amplificació es realitza un control negatiu de les reaccions utilitzant un tub que tan sols conté reactius.

Lisi cel·lular amb proteïnasa K

La metodologia de lisi cel·lular més adequada per amplificar posteriorment el DNA amb DOP-PCR és la que empra l'enzim proteïnasa K (Roche). Es parteix d'una concentració inicial de proteïnasa K de 20 mg/ml que es dilueix fins a una concentració de treball de 125µg/ml, això s'aconsegueix mesclant 1µl de proteïnasa K amb 160µl d'aigua estèril i lliure de nucleases (Promega). La preparació de la solució de lisi també requereix *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS, Sigma) que es comercialitza en solució al 10%. Per aconseguir la concentració de treball (17µM) s'ha de fer una dilució 1/200 seguida d'una segona dilució 1/100 amb aigua estèril i lliure de nucleases. La solució de lisi final s'obté barrejant les solucions anteriorment preparades de proteïnasa K i de SDS en proporció 2:1. A continuació s'afegeixen 3µl de solució de lisi a cada tub on hi ha les cèl·lules aïllades individualment i una gota d'oli mineral (Sigma) per evitar l'evaporació del poc volum que contenen els tubs durant el procés de lisi i també per evitar contaminacions. Es fa un vòrtex i un toc de centrifuga a la mescla i es manté 1h a 37°C perquè actuï la proteïnasa K, que digereix les proteïnes nuclears i allibera el DNA nuclear i mitocondrial seguit d'un pas de 10minuts a 95°C per inactivar l'enzim i evitar que interfereixi en la posterior amplificació.

DOP-PCR

Per al protocol de DOP-PCR es requereix els següents reactius preparats segons s'indica:

- 32µl d'aigua estèril sense nucleases
- 5µl de *10x Long PCR buffer* sense MgSO₄ (Ambion)
- 4µl de mescla de dNTPs Mix 2,5mM de cada nucleòtid(Ambion)
- 3,5µl de MgSO₄ a 25mM (Ambion)
- 1µl d'encebador per a DOP-PCR a 100µM (Biomers)
- 0,5µl de DNA polimerasa *Super Taq Plus* 5u/µl (Ambion)

Un cop preparada la barreja s'homogeneïtza amb l'ajuda del vòrtex i s'afegeixen el total de 46µl als tubs que contenen 3µl de solució de lisi i aproximadament 1µl on s'hi troba la cèl·lula, aconseguint un volum final de reacció de 50µl. Tot seguit, es posen els tubs al termociclador i s'aplica el següent programa de PCR:

4min 30s a 95°C

8 cicles

1min a 95°C

1min 30s a 30°C

3min a 68°C amb una rampa de 0,2°C/s

40 cicles

30s a 95°C

1min a 58°C

3min a 68°C amb una rampa de 0,2°C/s

8min a 68°C

3.4.1.3. Genomeplex®

El kit d'amplificació Genomeplex® (Sigma-Aldrich) utilitza una tecnologia que es basa en la fragmentació aleatòria del DNA per convertir-lo en fragments petits. Aquests podran ser amplificats en posteriors cicles de PCR un cop s'hi hagin afegit uns encebadors universals que flanquejaran els dos extrems. Aquest protocol consta de tres passos successius.

Lisi i fragmentació

Per a l'etapa de lisi i fragmentació, es requereix que la mostra estigui en un volum de 9µl. Com que les cèl·lules estan entubades en un volum d'entre 1 i 2µl cal afegir 7µl d'aigua sense nucleases i estèril a cada tub. Tot seguit es prepara el buffer de lisi:

32µl de 10x *Single-cell Lysis and Fragmentation Buffer* (Sigma-Aldrich)

2µl de *Proteinase K Solution* (Sigma-Aldrich)

Un cop preparada la solució de lisi i mesclada amb un vòrtex, s'afegeix 1µl d'aquesta a cada tub, seguit d'un vòrtex i un toc de centrifuga. A continuació es posen les mostres al termociclador per seguir el programa següent:

1h a 50°C

4min a 99°C

Immediatament després del tractament d'inactivació a 99°C d'exactament 4 minuts s'han de posar els tubs a 4°C en gel i es sotmeten a un toc de centrifuga per tal de fer baixar al fons del tub el volum que es pugui haver quedat adherit al tap en forma de gotes d'evaporació.

Preparació de la llibreria

Per la preparació de la llibreria es segueixen dos passos successius, en primer lloc s'afegeixen:

2µl de 1x *Single Cell Library Preparation Buffer* (Sigma-Aldrich)

1µl de *Library Stabilization Solution* (Sigma-Aldrich)

Es barreja bé la mescla i es fa un pols de centrifugació i s'incuben durant dos minuts a 95°C al termociclador. Just després d'aquest temps de desnaturalització, es posen els tubs en gel i s'hi afegeix l'últim reactiu necessari:

1µl de *Library Preparation Enzyme* (Sigma-Aldrich)

Després de barrejar bé amb un vòtex i fer el toc de centrífuga corresponent ho posem al termociclador per realitzar el següent programa:

20min a 16°C

20min a 24°C

20min a 37°C

5 min a 75°C

Després de la preparació de la llibreria, les mostres es poden guardar a -20°C un màxim de tres dies, tot i que, en el nostre cas l'amplificació s'ha fet sempre a continuació.

Amplificació

Aquest últim pas del protocol requereix els següents reactius:

7,5µl de 10x *Amplification Master Mix* (Sigma-Aldrich)

48,5µl d'aigua sense nucleases (Promega)

5µl de *WGA DNA Polymerase* (Sigma-Aldrich)

Un cop adicionats, mesclats i centrifugats els últims reactius les mostres segueixen el següent programa del termociclador:

3min a 95°C

25 cicles de:

30s a 94°C

5min a 65°C

Un cop finalitzada l'amplificació del material els tubs es poden guardar a 4°C o bé a -20°C. En les indicacions del fabricant es recomana una purificació de l'amplificat previ

a les posteriors aplicacions. Aquest procediment es detalla més endavant en l'apartat 3.4.3.

3.4.1.4 Multiple Displacement Amplification (MDA) amb *Repli-g*

Un altre sistema emprat que també utilitza una amplificació isotèrmica mitjançant la MDA, que utilitza la polimerasa $\phi 29$. Uns dels kits que ofereixen aquesta metodologia són el *Mini/Midi REPLI-g* de Qiagen. La diferència entre el Mini i el Midi és el rendiment, mentre el Mini pot donar uns 10 μ g de DNA per reacció el Midi en pot donar fins a 40 μ g.

En primer lloc s'ha de reconstituir el DLB buffer (Qiagen) en 500 μ l de aigua sense nucleases (Promega). A partir de 55 μ l d'aquest tampó DLB i de 5 μ l d'una solució de DTT (Ditriotreitol) 1M, s'ha de preparar la solució D2, que es pot emmagatzemar durant un màxim de tres mesos. Per fer la lisi i desnaturalització s'ha de fer el següent tractament a cada tub:

Afegir 3,5 μ l de la solució D2

Incubar-ho 10 min en gel

Afegir 3,5 μ l de *Stop Solution* (Qiagen)

Fer un vòrtex i un pols de centrifuga

Un cop lisada la cèl·lula i desnaturalitzat el seu material genètic es procedeix a la seva amplificació, tant en el kit Mini com Midi el protocol és el mateix.

10 μ l d'aigua lliure de nucleases (Promega)

29 μ l de *Repli-g Reaction Buffer* (Qiagen)

1 μ l de *Repli-g DNA polimerasa* (Qiagen)

Posteriorment dins del termociclador, les mostres segueixen el programa que es detalla a continuació:

16h a 30°C

3min a 65°C per inactivar l'enzim

El material amplificat es pot guardar a 4°C per emmagatzemar-lo durant períodes curts de temps o bé a -20°C si s'ha d'emmagatzemar durant períodes llargs.

3.4.1.5. iMDA

També s'ha aplicat un protocol modificat de MDA utilitzant el kit *Genomiphi V2* (GE Healthcare) on s'han introduït certes variacions que s'ha anomenat iMDA.

La lisi cel·lular es realitza afegint a cada tub les quantitats següents:

2,5 μ l de Solució Alcalina (50 mM de DTT/ 200 mM de KOH)

5 µl de *Sample Buffer* (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

A continuació s'homogeneïtza el contingut i es fa una breu centrifugació i s'incuba al termociclador durant 3 minuts a 95°C. Un cop transcorregut aquest temps es posen els tubs en gel i s'hi afegixen la resta de reactius:

0,8µl de Tricina (20 mM a pH=4,95)

12,3µl de *Reaction Buffer* (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

2,5µl de *Sample Buffer* (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

1,5µl d'enzim Taq φ 29 (inclòs en el kit *Genomiphi V2*)

Després d'afegir els 10µl a cada tub es barreja i es manté al termociclador durant 4 hores a 30°C amb una etapa final de 10 minuts a 65°C per inactivar l'enzim. El DNA amplificat es pot mantenir a 4°C fins al moment de la seva utilització.

3.4.1.6. PicoPlex™ i SurePlex

Aquests dos kits d'amplificació del genoma de cèl·lules aïllades són el mateix però el comercialitzen empreses diferents, el PicoPlex™ el distribueix Rubicon Genomics, USA, que el van desenvolupar mentre que SurePlex el distribueix BlueGnome, UK. En cap dels dos productes es detalla el funcionament metodològic ni la funció o composició específica de cadascun dels reactius. Per tant, s'ha seguit estrictament el protocol recomanat pels fabricants.

En primer lloc, s'ha de tenir la cèl·lula en un volum mínim a la qual s'hi afegix el *Cell Extraction Buffer* fins a tenir un volum de 5µl, als que s'ha d'afegir els reactius següents:

4,8 µl de *Extraction and Dilution Buffer*

0,2 µl de *Cell Extraction Enzyme*

Es fa un vòrtex i una centrifugació curta a cada tub i s'introdueixen al termociclador on es segueix el programa següent:

10min a 75°C

4min a 95°C

A continuació es realitza el pas de pre-amplificació:

4,8µl de *Pre-Amplification Buffer*

0,2µl de *Pre-Amplification Enzyme*

Un cop dins el termociclador, els tubs es sotmeten al programa que es detalla a continuació:

2min a 95°C

12 cicles

15s a 95°C
50s a 15°C
40s a 25°C
30s a 35°C
40s a 65°C
40s a 75°C

Després es centrifuguen els tubs i es mantenen en gel. Finalment s'acaba amb l'amplificació final que requereix incorporar els següents reactius:

34,2µl d'aigua lliure de nucleases
25µl d'*Amplification Buffer*
0,8µl d'*Amplification Enzyme*

Després es barreja bé el contingut dels tubs, es fa una curta centrifugació i s'incuba al termociclador seguint el següent programa:

2 min a 95°C
14 cicles
15s a 95°C
1min a 65°C
1min a 75°C

Un cop acabat aquest temps, es guarden els tubs ràpidament a -20°C fins a la seva utilització.

3.4.2-Comprovació de l'amplificació del genoma cel·lular a partir de cèl·lules aïllades

Amb l'objectiu de comprovar l'amplificació del genoma cel·lular i per observar l'absència de contaminació en els controls negatius i blancs cel·lulars s'ha de dur a terme una electroforesi en un gel d'1,5% d'agarosa (Biotools). El gel d'agarosa es prepara diluint 1,5g en 100ml de TAE 1x (Qiagen), un cop dissolta l'agarosa es deixa solidificar i posteriorment s'omple la cubeta d'electroforesi també amb TAE 1x. Al primer pouet del gel d'agarosa, s'hi carreguen 5µl d'un marcador de pes molecular de 100pb (Invitrogen) que ens permetrà saber la mida aproximada dels fragments de DNA amplificat que s'observaran en forma de pinzellada.

Pel que fa a les mostres amplificades i als blancs, es barregen 5µl de cadascuna d'elles i es barregen amb 1µl de tampó de càrrega (Invitrogen) que fa que la mostra es dipositi al

fons del pouet i no es dilueixi amb el TAE 1x de la cubeta. La electroforesi es realitza durant 30 minuts a 120 volts. Per poder visualitzar les bandes o pinzellades de DNA, es tenyeix el gel amb una solució d'aigua amb bromur d'etidi (Sigma). Aquesta substància s'intercala en el DNA i permet la seva observació, en un transil·luminador de llum ultraviolada (Vilber Lourmat).

3.4.3. Purificació de producte d'amplificació del genoma cel·lular

Com s'ha esmentat anteriorment, en alguns casos els kits d'amplificació de tot el genoma cel·lular recomanen realitzar una purificació del material amplificat. Aquest procediment només s'ha realitzat després d'amplificar el genoma cel·lular mitjançant Genomeplex[®]. El kit recomanat per realitzar la purificació de Genomeplex[®] és el *GenElute™ PCR Clean-up Kit* (Sigma-Aldrich), que es tracta d'un kit d'adhesió en columna que permet separar els productes de PCR de doble cadena de la resta de components de la reacció, com poden ser encebadors en excés, nucleòtids no incorporats, enzims, sals, etc. És un procés molt senzill que es detalla a continuació.

Inserir la columna de purificació en un tub de 2ml

Afegir 0,5ml de *Column Preparation Solution* (Sigma-Aldrich)

Centrifugar entre 30 i 60s a 14.500rpm

Descartar el líquid eluït

Fer una barreja 1:5 de DNA amplificat amb *Binding Solution*

Transferir la barreja a la columna

Centrifugar 1min a 14.500rpm

Descartar el líquid eluït

Afegir 0,5ml de *Wash Solution* (prèvia dilució amb 48 ml d'etanol 100%)

Centrifugar 1min a 14.500rpm

Descartar el líquid eluït

Centrifugar 2min a 14.500rpm per retirar l'excés d'etanol

Posar la columna en un tub de 2ml nou

Afegir 50µl de *Elution Solution* (Sigma-Aldrich) o aigua estèril a la columna

Incubar durant un minut a temperatura ambient

Centrifugar la columna durant un minut a 14.500rpm

Un cop acabat aquest procediment ja es pot utilitzar el producte amplificat per altres aplicacions.

3.5- Estudi Citogenètic

3.5.1. Preparació del material amplificat per la hibridació

3.5.1.1.- Marcatge fluorescent mitjançant *Nick-Translation*

Un cop amplificat el genoma de a partir d'una cèl·lula aïllada i verificada la seva correcta amplificació en un gel d'agarosa, ja es pot procedir al seu marcatge fluorescent utilitzant la metodologia de *nick-translation* marcant el DNA de la cèl·lula problema de color vermell i el control o referència en color verd. Degut al fet d'emprar fluorocroms per marcar els DNAs, a partir d'aquest moment és convenient mantenir una llum tènue per tal de que els fluorocroms no perdin intensitat. El kit que s'ha utilitzat és el *Nick Translation Kit* d'Abbott Molecular i s'ha utilitzat com es detalla a continuació:

5µl de 10x *Nick-Translation Buffer* (Abbott Molecular)

10µl de dNTP Mix 0,1mM (1dATP 0,3mM : 1dCTP 0,3mM : 1dGTP 0,3mM)

5µl de dTTP a 0,1mM

2,5µl de *Spectrum red-dUTP* (0,1mM) o bé *Spectrum green-dUTP* (0,2mM)

5µl de *Nick Translation Enzyme 5U/µl* (Abbott Molecular)

Finalment a aquests 27,5µl s'afegeixen 22,5µl de de cada mostra per obtenir un volum final de 50µl. Després de barrejar-ho bé amb un vòrtex i fer un toc de centrifugació es posa al termociclador durant 90 minuts a 15°C amb un pas final de 10 minuts a 70°C per inactivar l'enzim.

Per la preparació del DNA control, després d'amplificar i marcar individualment diferents cèl·lules de la mateixa línia, es fa una barreja amb l'objectiu d'aconseguir un DNA control homogeni, que es guarda a -20°C per a la seva posterior utilització.

3.5.1.2.- Preparació de la sonda d'hibridació de la CGH

Per a la fabricació de la sonda d'hibridació de la CGH cal barrejar, en proporció 1:1, el DNA de la cèl·lula problema, marcat en vermell, i el DNA de la cèl·lula control marcat en verd. A la barreja final s'hi addicionen 5µl de *Cot-1 Human DNA* 1µg/µl (Abbott) que hibridarà a les zones de DNA repetitiu com centròmers i telòmers bloquejant-los. Es precipita el DNA utilitzant un 10% del volum d'acetat sòdic 3M pH=5,5 i 2,5 volums d'etanol al 100%, prenent com a punt de partida el volum inicial de DNA. Per tant, com que tenim 105µl de DNA (50µl de DNA problema + 50µl de DNA control +

5µl de Cot-1 DNA), s'ha d'afegir 10,5µl d'acetat sòdic i 262,5µl d'etanol pur. Després de barrejar-ho bé per inversió, es deixa actuar durant 1 hora a -80°C i a continuació es centrifuga durant 30 minuts a 14.500rpm per obtenir un botó consistent. A continuació s'elimina el sobrenedant amb una pipeta i s'assequen amb molta cura les gotes que hagin quedat a les parets del tub amb l'ajuda d'un paper absorbent. Finalment es deixa que s'acabi d'assecar durant uns minuts a temperatura ambient.

3.5.2 Hibridació genòmica comparada ràpida

Les sondes preparades amb anterioritat s'hibridaran sobre els portaobjectes que contenen extensions de limfòcits d'individus 46, XY amb una elevada proporció de metafases (Abbott Molecular). A cadascun d'aquests portaobjectes, que es mantenen congelats a -20°C fins al moment de la seva utilització, s'hi poden identificar tres gotes diferenciades de suspensió cel·lular fixada. Quan traiem els portaobjectes que s'han d'utilitzar del congelador, es pot observar cadascuna de les gotes fixades i es marquen les zones corresponents amb un llapis de diamant al revers del portaobjectes. A cadascuna d'aquestes zones s'hi hibridarà una mostra diferent. També caldrà tallar els cobreobjectes a la mida de cadascuna de les zones d'hibridació per tal d'evitar qualsevol barreja de sondes entre gotes contigües. Cal evitar que es formin àrees rugoses en la superfície de tall o que hi quedin enganxats petits fragments de vidre que podrien fer que els cobreobjectes no quedessin totalment plans sobre els portaobjectes en el moment de la hibridació.

Un cop preparats els portaobjectes, es procedeix a la seva deshidratació submergint-los durant 2 minuts en una sèrie d'etanols de concentració creixent: 70%, 85% i 100% i a continuació es deixen assecar en posició vertical a temperatura ambient.

Un cop els portaobjectes estan secs, cal desnaturalitzar el DNA de les metafases posant els portaobjectes durant 5 minuts en una solució de formamida al 70% mantinguda a 73°C. La formamida al 70% en 2xSSC es prepara prèviament dins una cabina d'extracció de gasos (Cruma) barrejant 35ml de Formamida, 5ml de 20xSSC (Standard saline citrate) i 10ml d'aigua desionitzada i ajustant el pH =7 que s'escalfa a 73°C dins un bany. Un cop finalitzats els 5 minuts de desnaturalització, els portaobjectes es deshidraten durant 1 minut en una sèrie d'etanols freds (4°C) de concentració creixent; 70%, 85% i 100%, a continuació es deixen assecar a l'aire.

Per últim es prepara la sonda resuspenent el botó de DNA que hem assecat abans en 8µl de solució d'hibridació que conté 50% de formamida desionitzada (Sigma) i 10% de dextrà sulfat (Sigma) en 2xSSC. Cal assegurar-se de tenir la sonda totalment resuspesa i que no quedi cap partícula sense dissoldre, ja que aquest pas és primordial per obtenir una d'hibridació de bona qualitat. És per això que cal insistir en aquest pas utilitzant el vòrtex durant 3-4 minuts per cada una de les sondes. Un cop estan ben dissoltes es procedeix a la seva desnaturalització posant-les durant 10 minuts en un bany a 73°C. Transcorregut aquest temps es diposita la totalitat de les sondes sobre cadascuna de les zones del portaobjectes prèviament marcades, es cobreixen amb els cobreobjectes tallats a mida i es segella el contorn amb cola (Imedio Removable). A partir d'aquest moment els portaobjectes segueixen el procediment descrit anteriorment (Rius *et al.* 2010) en el que es van introduir algunes modificacions al procediment per tal de poder escurçar el temps d'hibridació, passant de 44h a 12h sense afectar a la seva qualitat. La primera d'aquestes variacions consisteix en tractar els portaobjectes durant 30 minuts en un microones a 75W de potència (Optiquick Compact, Moulinex) sobre una cubeta amb aigua destil·lada per mantenir les condicions d'humitat ambiental. A continuació, s'introdueixen els portaobjectes en una cambra humida protegida de la llum i es manté a 37°C dins d'un incubador. Una altra de les variacions introduïdes va ser la incorporació de l'agitació rotatòria durant el temps d'hibridació. Per això cal col·locar la cambra humida sobre un agitador 1309-I CE (Lab-line Instruments) que girarà a 60rpm dins de l'incubador a 37°C durant les 12 hores d'hibridació.

Un cop acabada la hibridació es retira la cola i els cobreobjectes amb molta cura i es fan dos rentats successius dels portaobjectes durant 2 minuts, el primer en una solució de 0,4xSSC/0,3% de NP-40 a 73°C amb una agitació vigorosa i el segon en una solució de 2xSSC/0,1% de NP-40 també en agitació. A continuació es deshidraten els portaobjectes durant 2 minuts en una sèrie d'etanols de concentració ascendent (70%, 85% i 100%) i es deixen assecar a l'aire. Un cop secs, s'afegeixen 15µl de DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (Sigma) a una concentració de 125ng/ml en Vectashield (Vector Labs) per evitar que la fluorescència s'escoti ràpidament. Tot seguit, es protegeixen els portaobjectes amb un cobreobjectes de 60x20mm i després de deixar-ho reposar uns minuts a 4°C, ja es pot procedir a la seva observació al microscopi de fluorescència.

3.5.3-Captura i anàlisi de metafases al microscopi de fluorescència

Per la captura i anàlisi de metafases s'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència Nikon eclipse 90i equipat amb un programa d'anàlisi de CGH desenvolupat per Metasystems.

Per començar amb la captura de metafases, es rastreja el porta amb l'objectiu de 60x. Quan es troba una metafase apta per a l'anàlisi, amb bon senyal fluorescent tant verd com vermell, sense taques de fluorocrom, ni més de dos entrecreuaments es captura amb l'ajuda del *software* associat denominat Isis. La captura consta de tres etapes, en primer lloc es capta la senyal del DAPI, seguit del fluorocrom verd i posteriorment el vermell. Després el programa informàtic integra les imatges per donar-ne una sola de global. De cada mostra es capturen un mínim de 12 metafases que després seran processades i cariotipades individualment.

El processat de les imatges consta de diverses etapes, en primer lloc es retalla la zona que inclou els cromosomes i s'activen diferents filtres per augmentar el contrast entre el possible soroll de fons, i els cromosomes. A continuació, es delimiten els cromosomes, es retallen i es cariotipen utilitzant les bandes DAPI invertides, que són similars a les bandes G. Un cop cariotipades un mínim de 12 metafases de qualitat de cada mostra, es pot considerar que els perfils de CGH que genera el *software* són fiables.

El programa informàtic genera perfils de CGH per a cadascun dels cromosomes, tenint en compte els 24 cromosomes que s'han capturat de cada parell autosòmic i els 12 cromosomes corresponent al X i Y. A partir d'aquí es genera una ràtio entre la fluorescència verda i vermella per cada un dels cromosomes. L'anàlisi dels perfils de CGH es realitza tenint en compte la desviació estàndard de la fluorescència de cadascuna de les captures de cada mostra. D'aquesta manera el programa estableix uns límits superior i inferior amb un interval de confiança del 99% resultants de sumar tres cops la desviació estàndard a la fluorescència mitjana de la mostra.

Cada vegada que la mitjana de fluorescència per a un cromosoma, supera els límits de desviació estàndard apareix una barra de color vermell o verd al costat del perfil dels cromosomes, senyalant que es tracta d'un guany o pèrdua cromosòmica, tal i com es pot observar en aquesta imatge.

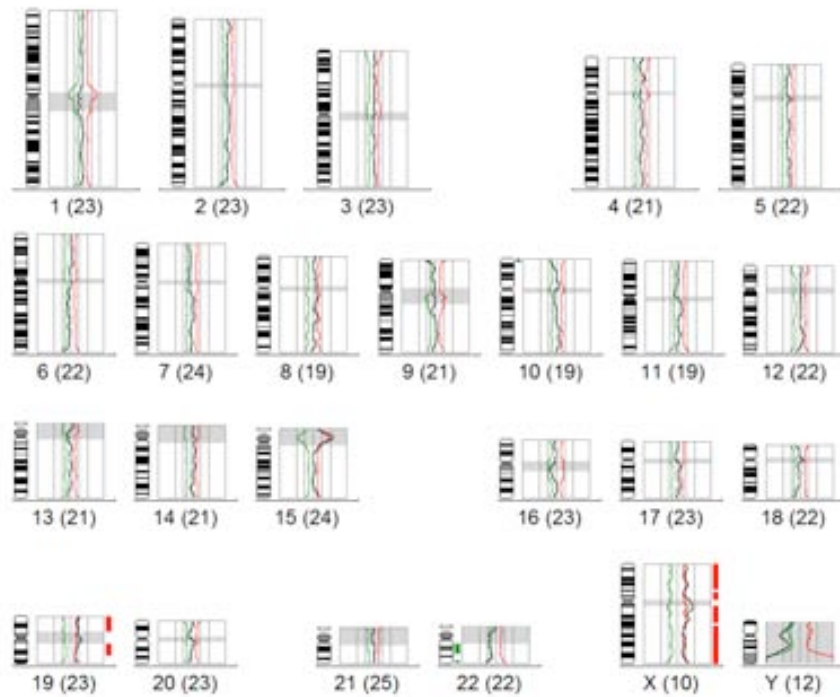


Figura 3.2. Perfils de CGH obtinguts en l'anàlisi d'un blastòmer. El DNA del blastòmer s'ha hibridat competitivament amb un DNA d'una cèl·lula 46, XY. Els perfils evidencien la euploidia per tots els cromosomes excepte el 19, on es pot observar un guany cromosòmic representat amb una barra vermella i el perfil corresponent al cromosoma es veu desplaçat cap a la dreta. També s'observa un guany del cromosoma X i una pèrdua del Y, que evidenciarà el sexe femení del blastòmer.

3.6. Estudi monogènic

3.6.1.- Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El procediment bàsic de PCR utilitzat consta dels reactius següents:

- 2,5µl de *PCR 10x Buffer* (5Prime)
- 2,5µl de dNTPs (2mM) (Invitrogen)
- 0,3-1,2µl de cada encebador a 50mM
- 0,2µl d'enzim *HotMaster Taq Polimerase* (5Prime)
- 0,5-4µl de DNA a amplificar

Aigua lliure de nucleases fins aconseguir un volum final de 25µl de reacció

Les quantitats d'encebadors són variables i es determinen durant la posada a punt de cada protocol.

Pel que fa al volum de DNA incorporat en cada PCR varia segons el material del que es parteix. Si es tracta de DNA genòmic extret de sang, un volum de 0,5µl d'*input* són suficients, mentre que si es tracta de material amplificat a partir d'una sola cèl·lula s'hi incorporen 4µl per reacció.

Després de barrejar bé el contingut de cada tub i de fer un pols de centrifugació, s'introdueixen els tubs al termociclador per sotmetre'ls al següent programa:

2min a 94°C

37 cicles de:

10s a 94°C

5s a la T_m, segons la temperatura òptima d'hibridació de cadascun dels encebadors

30s a 60°C

5 min a 68°C

A part d'aquesta metodologia per dur a terme les PCR també s'ha utilitzat un kit optimitzat per a realitzar reaccions múltiplex denominat *Qiagen Multiplex PCR Kit*. Aquest kit no requereix tanta optimització pel que fa a concentració d'encebadors i la reacció inclou els reactius següents:

25µl de 2x *Qiagen Multiplex PCR Master Mix* (Quiagen)

5µl de 10x *Primer Mix* (Preparat prèviament on es dilueixen en aigua sense nucleases 10µl de cadascun dels encebadors de la reacció a una concentració de partida de 50mM en un volum total de 250µl)

0,5-4µl de DNA

16-19,5µl d'aigua sense nucleases fins els 50µl de volum final de reacció

Un cop mesclat el contingut del tub i centrifugat breument es posen els tubs al termociclador per dur a terme l'amplificació seguint el següent programa:

15min a 95°C

37 cicles:

30s a 94°C

1min 30s a la temperatura òptima dels encebadors

1min 30s a 72°C

10 min a 72°C

3.6.2.-Detecció directa de mutacions

Durant aquesta tesi doctoral s'han fet servir dues metodologies diferents per a la detecció directa de les mutacions, d'una banda la diferència de mida dels fragments corresponent a l'al·lel mutant i al normal i de l'altra la miniseqüenciació (MiniSequencing).

3.6.2.1. Detecció de variacions de mida de fragments de DNA

Per detectar mutacions a través de la identificació de fragments de diferent mida, cal que la mutació en qüestió sigui una duplicació o una deleció de certs parells de bases. Partint del coneixement de que l'al·lel mutant serà o bé més curt o més llarg que l'al·lel normal es busca la seqüència de DNA que conté la mutació en una base de dades de referència: NCBI (National Center for Biotechnology Information) o *Genome Browser* de la UCSC (University of California, Santa Cruz).

Un cop es disposa de la seqüència, s'ha de buscar la base en què comença la mutació i tenir en compte el nombre de parells de bases implicats. Per exemple, en el cas de la $\Delta F508$, que és mutació més freqüent causant de fibrosi quística, es tracta d'una deleció en el gen CFTR, concretament en la posició de l'aminoàcid 508, que hauria de ser una triplet que codifica per a la fenilalanina però està deletat. Un cop identificada i posicionada la mutació dins la seqüència es dissenyen uns encebadors que flanquegin la zona d'interès, i que permetin amplificar aquesta regió obtenint fragments d'entre 100 i 200 parells de bases. Un d'aquests dos encebadors que s'han dissenyat es marcarà fluorescentment per tal de poder visualitzar els fragments generats posteriorment en una electroforesi capil·lar en un seqüenciador automatitzat d'Applied Biosystems ABI Prism 3730 (Servei de Genètica Molecular de la Facultat de Veterinària de la UAB). Continuant amb l'exemple de la mutació $\Delta F508$, si els encebadors han estat dissenyats per generar un fragment de 94 parells de bases, en un individu homocigot sa, s'observaria un sol pic a 94. En canvi, la presència d'un pic a 94 i un altre a 91, indicaria la presència de la deleció del triplet en qüestió en heterocigosi. D'altra banda, si tan sols s'observés un pic a 91, indicaria que es tracta d'un individu homocigot per la mutació i per tant afectat.

3.6.2.2. Miniseqüenciació (MiniSequencing)

Un altre sistema d'identificació directa de la mutació és la miniseqüenciació. En aquest cas també cal conèixer la seqüència i es sol aplicar en els casos de mutacions puntuals de substitució d'una base nitrogenada per una altra. Un cop identificada la posició

exacta de la mutació es procedeix de manera similar al sistema descrit per a l'estudi de fragments de diferent mida. Es dissenyen uns encebadors que permetin amplificar la zona d'interès, i també un encebador de miniseqüenciació que hibrida en el nucleòtid que flanqueja el nucleòtid mutat. Un cop s'ha amplificat la regió d'interès seguin un protocol de PCR convencional s'afegeixen tres passos més; la purificació inicial, la *MiniSequencing* pròpiament dita i la purificació final.

Per a l'etapa de purificació inicial del fragment amplificat es mesclen els components següents:

5µl de producte de PCR

2µl d'ExoSAP-IT (USB products, Affymetrix)

S'incuba durant 1 hora a 37°C seguit de 15 minuts a 75°C per inactivar l'enzim. A continuació es duu a terme la reacció de *MiniSequencing*, per la que s'ha utilitzat el kit comercial *SNaPshot™ Multiplex System* d'Applied Biosystems. La reacció requereix els components següents:

5µl del producte de PCR prèviament purificat

5µl de *SNaPshot™ Multiplex Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems)

1µl de l'encebador dissenyat a una concentració 2mM

1µl d'aigua lliure de nucleases

Un cop barrejats els components i havent fet un toc de centrifuga es posen al termociclador amb el següent programa:

25 cicles:

10s a 96°C

5s a 50°C

30s a 60°C

Després dels 25 cicles es mantenen els tubs a 4°C.

L'últim pas de purificació, tot i ser un pas recomanat després de l'amplificació, és opcional, ja que s'observen resultats similars utilitzant el producte sense purificar o purificat. S'ha d'afegir 1µl de SAP en el producte obtingut i s'incuba durant 1 hora a 37°C seguida d'un pas final de 15 minuts a 75°C.

Finalment, es llegeixen els resultats obtinguts en un seqüenciador de DNA (ABIPrism 3730). Cal posar 1µl de cada mostra, 10µl de formamida i 0,04µl de marcador de pes molecular, en aquest cas LIZ 120 (Applied Biosystems).

3.6.3.-Detecció indirecta de mutacions

La detecció indirecta de les mutacions a estudiar es basa en la utilització d'un cert nombre de *Short Tandem Repeats* (STRs) lligats a cadascuna de les mutacions a estudiar. Per disposar dels STRs adequats per cada cas es pot utilitzar l'aplicació denominada *MapView* del NCBI disponible al web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). Un cop seleccionat l'organisme d'interès, i trobat el gen implicat en la malaltia que es vol estudiar s'obté un mapa del cromosoma en el que es situa el gen i es poden filtrar les opcions d'interès que es poden activar dins el menú *Maps and Options*. Es selecciona la base de dades STS, que recull informació de microsatèl·lits i altres seqüències repetitives. Això mostra, dins el mapa cromosòmic, la situació del gen i les seqüències repetitives descrites en les zones que el flanquegen. Dins el llistat de microsatèl·lits que mostra el programa, cal cercar els que estiguin situats o bé dins del gen o el més propers possibles, i si pot ser que estiguin situats a menys de dues megabases bé *upstream* o *downstream* del gen. D'entre els STRs descrits cal triar els marcadors més adequats: preferiblement tetranucleòtids repetits en tàndem i que tinguin una elevada variabilitat en la població o heterozigositat.

3.6.4.- Posada a punt del protocol de detecció molecular en cèl·lula única

Un cop s'han triat els marcadors STRs lligats a cadascuna de les mutacions, dissenyat els encebadors tant per a la detecció directa com indirecta i s'han adquirit comercialment mitjançant la síntesi de les seqüències demanades (Biomers.net) cal que es testii la seva fiabilitat, de manera preliminar, utilitzant DNA genòmic de la família candidata al DGP.

Com s'ha comentat amb anterioritat, el DNA genòmic el podem obtenir a partir de o bé sang perifèrica o bé d'epiteli bucal extret amb uns raspallets específics per a aquesta funció (*Catch-All Sample Collection Swabs* d'Epicentre), aquesta segona opció s'utilitza en cas de dificultat de dur a terme una extracció de sang o bé quan es veu dificultat el transport refrigerat de les mostres sanguínies. En qualsevol dels dos casos s'utilitzen uns kits d'extracció de DNA específics FlexiGene[®] DNA kit (Qiagen) i QuickExtract[™] DNA Extraction Solution (Epicentre Biotechnologies) seguint les indicacions del fabricant.

Un cop comprovat que els encebadors dissenyats i disponibles funcionen correctament i permeten detectar les mutacions familiars evidenciant pics de la mida esperada d'acord

al disseny, es procedeix a realitzar l'estudi d'informativitat de la mutació concreta i al genotipat dels marcadors STRs de la família, utilitzant DNA de cadascun dels membres dels que en disposem: generalment d'ambdós membres de la parella i idealment, de cadascun dels seus progenitors a més d'algun familiar directe afectat de la patologia. Aquest sistema permet verificar la correcta detecció directa de les mutacions en DNA de la família, i establir el lligament familiar i determinar el grau d'informativitat de cadascun dels marcadors STRs per triar els d'informativitat més elevada i per tant més adequats.

Per optimitzar el protocol per a cada família s'ha de conèixer la temperatura òptima de cada parella d'encebadors dels STRs informatius. Per això es duu a terme una PCR aplicant un gradient de temperatures entre 53-63°C en un termociclador per a cadascun dels marcadors utilitzant DNA genòmic de la família com a motlle. A partir de la observació dels pics resultants de l'electroforesi capil·lar per a cada temperatura es determinen la/les temperatures òptimes per a cada parella d'encebadors. Aquest sistema de gradient de temperatures també s'aplica per a la detecció directa de les mutacions.

A partir d'aquest moment s'agrupen STRs segons la temperatura òptima d'hibridació dels seus encebadors i es posen a punt les PCRs múltiplex corresponents, utilitzant com a material de partida DNA amplificat a partir de cèl·lules aïllades.

En alguns casos s'ha pogut disposar de limfòcits aïllats, obtinguts de cultius de sang dels diferents membres de les famílies candidates al DGP i s'ha pogut posar a punt el protocol en aquestes cèl·lules aïllades. Alternativament, s'han utilitzat limfòcits de les línies cel·lulars Coriel GM07381 i GM11285 ambdues amb un cariotip 46, XY i portadores de la mutació $\Delta F508$ causant de fibrosi quística.

Un cop aconseguits els resultats desitjats, cal valorar l'eficiència del protocol, tenint en compte la taxa d'amplificació, i la taxa d'ADO (percentatge dels locus en el que un dels al·lels no s'ha amplificat). Per això a partir del DNA amplificat de 30 cèl·lules, de les que coneixem el genotip, es valora tant la taxa d'amplificació com d'ADO per determinar la fiabilitat del protocol posat a punt. Un cop validat el protocol i finalitzat l'estudi d'informativitat, s'envia el corresponent informe al centre de reproducció col·laborador i la família candidata al DF-DGP. A partir d'aquell moment ja es poden iniciar els procediments prèvis al cicle de FIV amb DF-DGP.

3.6.5. Aplicació dels procediments desenvolupats i optimitzats a casos clínics concrets

Per a la aplicació dels procediments desenvolupats en el DF-DGP s'ha treballat amb blastòmers biopsiats dins del Programa de Fecundació *In Vitro* de Diagnòstic Genètic Preimplantacional (FIV-DGP) dels centres col·laboradors: Fundació Puigvert i Clínica Eugin. En aquests casos, la biòpsia ha estat realitzada per embriòlegs de cada un dels centres, i d'acord amb la disponibilitat metodològica disponible: biòpsia amb àcid de Tyrode o biòpsia amb làser.

La biòpsia química, utilitzant àcid Tyrode, consisteix en dissoldre químicament una petita regió de la zona pel·lúcida. Un cop realitzada l'obertura, es pot treure el blastòmer amb l'ajuda d'una pipeta de biòpsia.

Per a la biòpsia física, en canvi, s'utilitza un làser (Saturn Laser R1) acoblat a un microscopi amb l'equipament de micromanipulació (Nikon Eclipse TE200). Un cop ben col·locat l'embrió es centra la zona on volem que incideixi el làser i s'hi fan un o dos polsos per tal de perforar la zona pel·lúcida, a continuació es biopsien els embrions utilitzant una pipeta de biòpsia.

En qualsevol dels dos casos, l'eficiència i la rapidesa de la biòpsia són factors molt importants per intentar mantenir la millor qualitat embrionària i dels blastòmers biopsiats. En cas de que algun blastòmer es lisi, s'ha de procedir a canviar la pipeta de biòpsia per evitar contaminacions de DNA entre embrions diferents.

Després de la biòpsia, es fan 4 rentats del blastòmer, en gotes de PBS/0,1% PVA dins d'una cabina de flux i sota el control de la lupa binocular (Wild Heerbrugg M8 a 50x). Un cop rentats, es diposita cada blastòmer a l'interior d'un tub de PCR que es marca adequadament. També s'agafa una mostra de l'última gota de rentat com a control negatiu de cadascun dels blastòmers. En els casos clínics és imprescindible utilitzar gotes noves per a cadascun dels blastòmers biopsiats per evitar contaminacions. A continuació els tubs amb les cèl·lules i els controls negatius corresponents són mantinguts a 4°C en gel fins a l'arribada al laboratori, en què es deixaran durant un mínim de 15 minuts a -80°C per augmentar l'efectivitat de la posterior lisi.

3.7.- Aplicacions clíniques del DF-DGP

La metodologia de diagnòstic genètic preimplantacional s'ha aplicat en 12 famílies diferents. El primer pas per a poder-lo realitzar és informar a les famílies candidates interessades del procediment i dels centres de reproducció col·laboradors disponibles per explicar-los detalladament el procediment de DF-DGP i donar-los un informe detallat del procés que es durà a terme, explicant-ne les limitacions i oferint-los l'aclariment de qualsevol dubte que se'ls presenti. Un cop els pacients sol·liciten ser inclosos en el programa de FIV DF-DGP, havent triat el centre col·laborador de la seva preferència signen el consentiment informat i se'ls inclou en el marc del projecte de recerca del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (FIS-ISCIII: PI 080012) en el marc del qual s'ha realitzat aquesta tesi.

Un cop recollides les mostres biològiques dels pacients i dels familiars de primer grau corresponents, es duu a terme la posada a punt i es realitza l'estudi d'informativitat corresponent amb el que s'estableix el mètode de detecció directa i indirecta amb la utilització de un mínim de 3 STRs. Un cop arribats a aquest punt es pot començar a fixar una data per a l'aplicació clínica del DF-DGP i començar l'estimulació ovàrica de les pacients.

El dia de la punció fol·licular (dia 0), s'inseminen els oòcits madurs (MII) mitjançant ICSI (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*). Arribat el dia +3, els embrions que han arribat a l'estadi de 6-8 cèl·lules són biopsiats seguint les metodologies detallades anteriorment.

El dia +4 a la tarda, es disposa dels resultats del DF-DGP tant de la caracterització monogènica com citogenètica de cadascun dels embrions evolutius biopsiats dels que s'envia l'informe corresponent al centre de reproducció per tal de poder triar els embrions més adequats per a transferir en base als resultats obtinguts en el DF-DGP i també a característiques morfològiques dels embrions. Generalment, la transferència embrionària s'efectua el dia +5.

Un cop passades dues setmanes a partir del dia de la transferència embrionària es fa un test bioquímic per determinar si hi ha hagut o no embaràs, i si és el cas es confirmarà ecogràficament dues setmanes més tard. Sempre s'informa a les famílies que en cas d'embaràs, tal i com ocorre amb la resta de DGPs, està molt indicat l'ús del diagnòstic prenatal corresponent.

3.7.1. Procediment de DF-DGP utilitzant dos blastòmers

El protocol de DF-DGP biopsiant dues cèl·lules (un per a la caracterització monogènica i l'altre per a la caracterització citogenètica) s'ha aplicat en 9 famílies candidates al DGP per a malalties monogèniques de pronòstic greu. Set de les famílies estaven afectades de fibrosi quística, una malaltia recessiva, i dues famílies eren portadores de malalties monogèniques dominants: l'aniridia i la síndrome de Lynch (Taula 3.2).

Família	Malaltia	Gen implicat	Mutacions	Detecció directa	Microsatèl·lits informatius
A	Fibrosi Quística	CFTR	P: ΔF508 M: ΔF508	Diferència de mida	D7S1817 / D7S2847
B	Fibrosi Quística	CFTR	P: 1811+1,6Kb A>G M: 2711delT	Miniseqüenciació	D7S2847 / D7S1817 D7S1799
C	Fibrosi Quística	CFTR	P: W1282X M: W1282X	Miniseqüenciació	D7S2847 / D7S1817 D7S1799
D	Aniridia	PAX6	M: c.311+1G>A	Miniseqüenciació	D11S2001 / D11S2370
E	Fibrosi Quística	CFTR	P: ΔF508 M: ΔF508	Diferència de mida	D7S2847 / D7S3052 D7S1799
F	Fibrosi Quística	CFTR	P: S737F M: ΔF508	Diferència de mida Miniseqüenciació	D7S2847 / D7S3052 D7S1799 / D7S1817
G	Fibrosi Quística	CFTR	P: ΔF508 M: ΔF508	Diferència de mida	D7S2847 / D7S3052 D7S1799 / D7S1817
H	Fibrosi Quística	CFTR	P: 3850-1G>A M: N1303K	Miniseqüenciació	D7S1817 / D7S3052 D7S2847
I	Síndrome de Lynch	MLH1	P: Lys616del	Diferència de mida	D3S3623 / D3S2417 D3S3042 / D3S2447 D3S2411 / D3S1298

Taula 3.2. Aplicacions clíniques de DF-DGP biopsiant dos blastòmers

3.7.2.- Procediment de DF-DGP biopsiant un sol blastòmer

S'ha aplicat el protocol de DF-DGP biopsiant un sol blastòmer (caracteritzant-los monogènica i citogenèticament) en 5 famílies: 4 portadores de fibrosi quística i una de poliquistosi renal.

També s'ha posat a punt el protocol per a l'aplicació d'aquest procediment en una família amb risc de dispàsia arritmogènica de ventricle dret (DAVD) de la qual no s'ha fet mai fins ara un diagnòstic preimplantacional. El corresponent DF-DGP s'ha programat per al mes d'octubre (Taula 3.3).

Família	Malaltia	Gen implicat	Mutacions	Detecció directa	Microsatèl·lits informatius
H'	Fibrosi Quística	CFTR	P: 3850-1G>A M: N1303K	Miniseqüenciació	D7S1817 / D7S3052 D7S2847
J	Poliquistosi renal	PKD1	Paterna; no descrita	-	D16S3042 / D16S3395 D16S3070 / D16S3082 D16S663 / D16S758
K	Fibrosi Quística	CFTR	P: N1303K M: ΔF508	Miniseqüenciació Diferència de mida	D7S1817 / D7S3052 D7S2847 / D7S1799
F''	Fibrosi Quística	CFTR	P: S737F M: ΔF508	Diferència de mida Miniseqüenciació	D7S2847 / D7S486 IVS17bCA / IVS10CA
L	Fibrosi Quística	CFTR	P: ΔF508 M: ΔF508	Diferència de mida	D7S486 / D7S2847 D7S677 / IVS8CA IVS10CA
M	Displàsia arritmogènica de ventricle dret	PKP2	M:2013delC (P671fsX13)	Miniseqüenciació	D12S1648 / D16S1692 D16S1698 / D16S2080 D16S333 /D16S59

Taula 3.3. Aplicacions clíniques de DF-DGP biopsiant dos blastòmers

3.8. Controls estrictes de contaminació

Per als diferents tipus cel·lulars aïllats, tant per a l'estudi més basic d'aquesta tesi com en els procediments previs i durant els DF-DGP aplicats, cal tenir en compte que sempre cal una amplificació de tot el DNA cel·lular, per al seu posterior estudi genètic . Per aquest motius s'ha de insistir en el manteniment de les més estrictes mesures de control i protecció, per evitar qualsevol tipus de contaminació de les mostres, ja que qualsevol contaminació podrà ser magnificada enterbolint els resultats finals. Per aquesta raó l'aïllament cel·lular i els procediments per dur a terme l'amplificació de tot el genoma s'ha de realitzar sempre dins d'una sala en la que únicament es treballi amb cèl·lula única i dins d'una cabina de flux laminar horitzontal, adequadament esterilitzada abans de cada ús. Cal usar sempre una bata i guants desinfectats amb alcohol i emprar sempre que sigui possible, material d'un sol ús estèril i amb fungibles i equipaments (pipetes, centrifugues...) destinats exclusivament al processat de cèl·lules aïllades.

3.9 Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi estadística realitzada per analitzar els resultats dels objectius més bàsics d'aquesta tesi s'ha utilitzat el programa SPSS. Al tractar-se en tots els casos, de dades paramètriques en què calia comparar diferències entre els grups d'estudi s'ha fet servir el test de Khi quadrat (χ^2).

Resultats

4.- Resultats

4.1. Resultats de l'estudi citogenètic d'oòcits immadurs (Objectiu 1)

S'ha aconseguit estudiar citogenèticament un total de 157 oòcits immadurs. De tots ells es va obtenir un DNA amplificat de bona qualitat, evidenciat en gels d'agarosa al 1,5% com a una taca/pinzellada d'entre 200 i 4000 parells de bases.

Un terç de les dones incloses en l'estudi, 33,9% (19/56) van produir almenys un oòcit amb anomalies cromosòmiques, incloent tant aneuploïdies com desequilibris cromosòmics segmentals. Un 15,9% dels oòcits estudiats, eren portadors d'anomalies cromosòmiques, implicant pràcticament tots els cromosomes (veure taula 4.1). Els oòcits estudiats provenien de 56 dones, d'entre 18 i 45 anys, essent la mitja d'edat 32.5 anys.

Taula 4.1. Alteracions trobades en l'estudi d'oòcits immadurs

Mostra	Edat	Pacient (P) Donant d'oòcits (D)	Aneuploïdies	Desequilibris segmentals
IME 7.1	18	D	-4, -5	
IME 7.4	18	D	-5	+19q
IME 7.6	18	D	+18	-2q21.3q33, +3p14.2pter, +7q, +16p
IMM 3.3	24	D	+13+15, +16, +19,	+3pcenp22, +10p, +14q24.1qter,+20q
IMM 15.1	25	D	-21	
IME 6.2	27	D	+17, +19	
IME 8.1	27	D	+16, +22	
IME 8.2	27	D	-3, +16, -18	

IMM 25.2	28	D	+22	
IMM 25.3	28	D	+19, -20, +22	+16p
IMM 5.1	32	D	+16, -21	+19p
IME 1.1	33	P	+3, +7, +11, +X	
IMM 16.2	35	P	-1, +8, +11, +12, -13, -15, +17, +20	
IMM 16.3	35	P	+2, -9, +15, -21, +X	+6q
IMP 1.4	36	P	-20	
IMP 1.7	36	P	-13	
IMP 5.2	37	P	+1, -2, +7, +9, +10	+3p, -8p, -15q22.1qter
IMM 30.1	37	P	-3, +4, +6, +10, +13	
IME 18.2	37	P		+8p12q21.3
IME 11.3	38	P	+19	
IME 22.1	38	P	-21	
IME 9.5	39	P	+22	-20p
IME 14.2	42	P	+21	
IME 20.2	44	P	-21	
IME 21.1	45	P	+X	

La taxa d'aneuploidia d'aquests oòcits ha estat del 15,3% (24/157) amb la presència d'un fins a vuit cromosomes alterats per cèl·lula, amb un total de 56 esdeveniments aneuploides en tota la sèrie (Taula 4.2).

Pel que fa a la implicació cromosòmica en aquestes aneuploidies trobades, es va poder observar una gran variabilitat dels cromosomes implicats, tots els cromosomes hi van

estar implicats en algun cas excepte el cromosoma 14, tot i que els implicats més freqüentment van ser el cromosoma 21, seguit del 13, 16, 19 i 22 (Figura 4.1).

A més de les anomalies cromosòmiques numèriques, també s'han evidenciat desequilibris de segments cromosòmics (Figura 4.2). Un 5,7% (9/157) dels oòcits van presentar aquest tipus d'alteracions, en la majoria dels casos (8/9) anaven acompanyades també d'aneuploïdies. Tan sols en un cas la única alteració era un desequilibri segmental del cromosoma 8 (Figura 4.3).

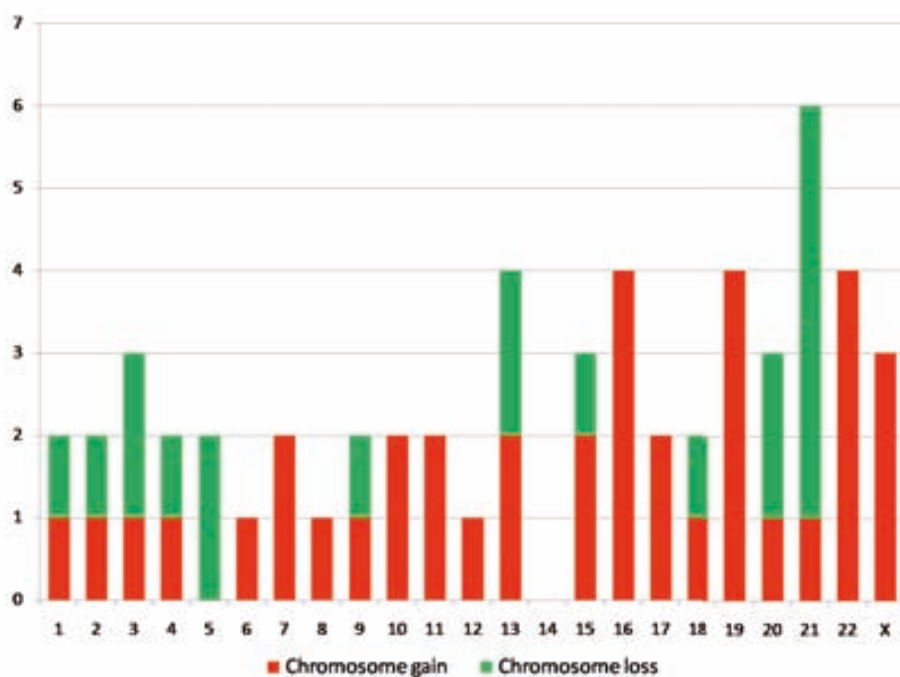


Figura 4.1. Distribució de les aneuploïdies per cromosoma trobades en l'estudi d'oòcits immadurs.

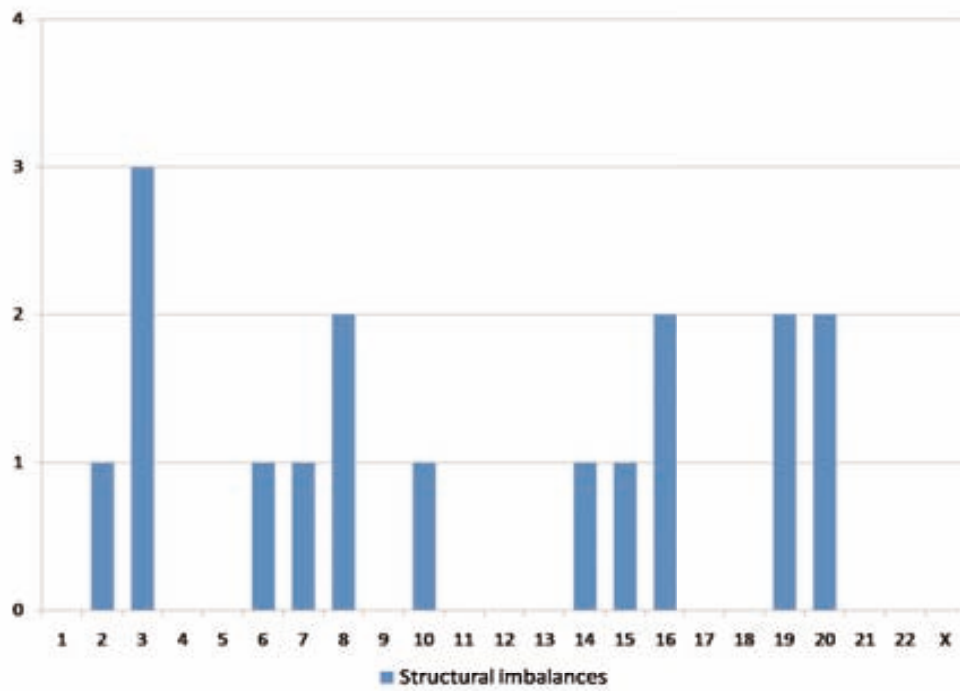


Figura 4.2. Distribució dels desequilibris segmentals per cromosoma trobats en l'estudi d'òcits immadurs

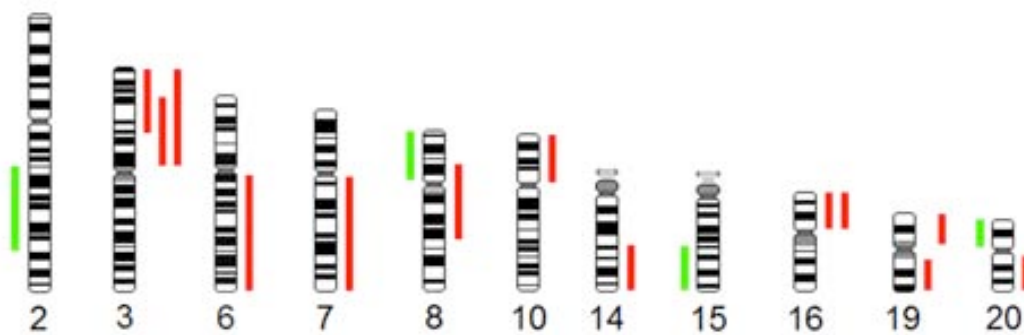


Figura 4.3. Representació dels desequilibris segmentals trobats en l'estudi d'òcits immadurs.

Taula 4.2. Resultats generals de l'estudi d'oòcits immadurs.

	Pacients de FIV ≤36anys (18-36 anys; X=32.4) N dones=7 N oòcits= 28 (%)	Pacients de FIV ≥ 37anys (37-45 anys; X=39.6) N dones=25 N oòcits= 55 (%)	Total parcial Pacients FIV (25-45 anys X=38) N dones=32 N oòcits= 83 (%)
Dones amb algun oòcit aneuploide	3 (42.9)	9 (36)	12 (37.5)
Oòcits amb anomalies	5 (17.9)	9 (16.4)	14 (16.9)
Oòcits aneuploides	5 (17.9)	8 (14.5)	13 (15,7)
Oòcits amb desequilibris segmentals	1(3.6)	3 (5.4)	4 (4.8)
Esdeveniments de cromosoma sencer	19(33.3)	16 (28)	35 (61.4)
Esdeveniments segmentals	1(5.8)	5 (29.4)	6 (35.3)
	Donants d'oòcits (18-33 anys X=25.2) N dones=24 N oòcits= 74		Total parcial Donants d'oòcits (18-33 anys X=25.2) N dones=24 N oòcits= 74
Dones amb algun oòcit aneuploide	7 (29.2)		7 (29.2)
Oòcits amb anomalies	11 (14.9)		11 (14.9)
Oòcits aneuploides	11 (14.9)		11 (14.9)
Oòcits amb desequilibris segmentals	5 (6.7)		5 (6.7)
Esdeveniments de cromosoma sencer	22 (38.6)		22 (38.6)
Esdeveniments segmentals	11 (64.7)		11 (64.7)
	Total parcial Dones joves ≤36 anys (18-36 anys; X=26.84) N dones=31 N oòcits= 102	Total parcial Dones AMA ≥ 37anys (37-45 anys; X=39.6) N dones= 25 N oòcits= 55	TOTAL (18-33 anys; X=25.2) N dones=56 N oòcits= 157
Dones amb algun oòcit aneuploide	10 (32.3)	9 (36)	19 (33.9)
Oòcits amb anomalies	16 (15.7)	9 (16.4)	25 (15.9)
Oòcits aneuploides	16 (15.7)	8 (14.5)	24 (15.3)
Oòcits amb desequilibris segmentals	6 (5.9)	3 (5.4)	9 (5.7)
Esdeveniments de cromosoma sencer	41 (73.2)	16 (28)	57 (100)
Esdeveniments segmentals	12 (70.6)	5 (29.4)	17 (100)

Anàlisi comparativa de l'aneuploïdia d'origen femení segons l'edat materna

Els oòcits inclosos en l'estudi pertanyien o bé al grup de dones joves, de 36 anys o menys, o bé en el grup d'edat materna avançada (AMA, *Advanced Maternal Age*), majors de 37 anys.

El present treball ha demostrat que el 32,3% (10/31) de les dones joves, i el 36% (9/25) de les AMA van produir almenys un oòcit cromosòmicament anòmal.

En el grup de dones joves, es van estudiar 102 oòcits de 31 dones. D'altra banda, en el grup de dones majors de 37 anys, es van analitzar 55 oòcits provinents de 25 dones.

La taxa d'aneuploïdia en el grup de dones joves ha estat del 15,7% (16/102) amb un total de 41 esdeveniments aneuploides, mentre que en el grup de dones d'edat avançada ha estat del 14,5% (8/55) amb la presència de 16 esdeveniments aneuploides. El cromosoma més freqüentment involucrat en l'aneuploïdia en dones joves va ser el cromosoma 16 i en es dones AMA el cromosoma 21.

Pel que fa als desequilibris cromosòmics segmentals, aquest treball n'ha evidenciat en el 5,9% (6/102) dels oòcits provinents de dones joves (5,9%) i en el 5,4% (3/55) dels oòcits de dones d'edat avançada.

Cap de les incidències observades en aquests dos grups ha mostrat diferències estadísticament significatives quan es comparen mitjançant el test de χ^2 .

Anàlisi comparativa de l'aneuploïdia d'origen femení segons la seva indicació

Els oòcits inclosos en l'estudi en alguns casos provenien de dones amb problemes reproductius que requerien tractaments de FIV (Pacients de FIV) i en altres ocasions eren de donants d'oòcits.

En el present treball, el 37,5% (/32) de les pacients de FIV i el 29,9% (/24) de les donants d'oòcits han produït almenys un oòcit cromosòmicament anòmal.

S'han analitzat 83 oòcits de 32 pacients de FIV i 74 provinents de 24 donants d'oòcits.

La taxa d'aneuploïdia en el grup de pacients de FIV ha estat del 18,1% (13/83) amb 35 esdeveniments aneuploides, en el grup de donants un 14,9% (11/74) dels oòcits presentaven aneuploïdies amb un total de 22 esdeveniments. El cromosoma implicat amb més freqüència en les pacients de FIV ha estat el cromosoma 21, mentre que en les donants d'oòcits ha estat el cromosoma 16.

Pel que fa als desequilibris cromosòmics segmentals es van evidenciar en un 4,8% (4/83) dels oòcits de pacients de FIV i en un 5,4% (4/74) dels oòcits del grup de donants.

Comparant les diferències entre ambdós grups mitjançant el test de χ^2 , cap de les incidències observades entre els dos grups han mostrat diferències significatives.

Els resultats d'aquest estudi han estat agrupats en l'article "Mitotic Instability in Human Immature Oocytes" (veure Annex 1).

4.2.- Resultats de les aplicacions clíniques del DF-DGP biopsiant dos blastòmers per embrió (Objectiu 2)

Els resultats obtinguts en els 11 cicles de DF-DGP aplicats a 9 famílies biopsiant dos blastòmers per embrió, diagnòstic genètic preimplantacional de doble factor, s'ha aplicat en 9 famílies emprant dues cèl·lules, un per al diagnòstic de la malaltia monogènica familiar i l'altre per a l'anàlisi citogenètic complet es detallen a continuació.

4.2.1.-Cas clínic A

La parella A amb risc de fibrosi quística a la descendència donat que ambdós progenitors eren portadors de de mutació $\Delta F508$. Es van realitzar dos cicles de FIV amb DF-DGP. L'edat materna era de 37 i 38 anys respectivament.

En el primer cicle es van obtenir un total de 15 complexos cúmulus-oòcit (COC, *Cumulus-Oocyte Complex*), 9 dels quals eren madurs i van ser inseminats per ICSI, 7 van fecundar i 5 van arribar a dia +3 i tots ells van ser biopsiats. Els resultats del DF-DGP es detallen a la taula 4.3. La transferència de l'embrió 4, no va produir embaràs.

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploidies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
AE4	2	No afectat, portador	46, XY Euploide		Si	Si	No
AE5	2	Afectat	51, XXY, +1, +9, +18, +20		No		
AE7	2	No afectat, portador	50, XY, +7, +8, +13, +14		No		
AE8	2	Afectat	49, XXYY, -1, +2, +3, +4, +5, -6, -11, -15, -18, +20, +21		No		
AE9	2	No afectat, portador	39, Y0, -3, -5, -7, -11, -14, -19, -X		No		

Taula 4.3. Resultats del primer DF-DGP de la família A

El segon cicle, es va fer amb embrions obtinguts de dos cicles d'estimulació ovàrica. En el primer, es van obtenir 9 COCs, 5 dels quals madurs que es van inseminar amb ICSI i 2 van fecundar. Degut al baix nombre de zigots disponibles per realitzar el DF-DGP, es van criopreservar en estadi de 2pn per poder agrupar-los amb els embrions d'un cicle d'estimulació ovàrica posterior. En el segon cicle es van obtenir 4 oòcits madurs, que es van inseminar amb ICSI i 3 van fecundar. Finalment, 3 embrions van evolucionar fins a dia +3 i van ser biopsiats (2 del segon cicle i un dels descongelats del primer cicle). Es van transferir dos embrions; l'E3 i l'E104 i un d'ells va donar lloc a embaràs i naixement. El diagnòstic prenatal va confirmar el resultat del DGP. El reanàlisi de l'embrió A'3 també va confirmar el diagnòstic obtingut durant el DF-DGP.

Embrions A	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploidies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
A'E104	2	No Afectat	46, XY Euploide		Si	Si	Si (1)
A'E3	2	No Afectat	46, XX, +19, -22		No		
A'E4	2	No Afectat	46, XY Euploide		Si	Si	

Taula 4.4. Resultats del segon DF-DGP de la família A

4.2.2.-Cas clínic B

La parella B, eren també portadors de fibrosi quística, la mutació paterna era la 2711delT i la materna la 1811+ 1.6kbA>G, ambdues en el gen CFTR. Aquesta parella ja havia fet un cicle anterior amb l'aproximació del DF-DGP utilitzant corpuscle polar en el qual no van aconseguir l'embaràs. L'edat materna era de 38 anys.

En la punció fol·licular es van obtenir 19 COCs. Tots els oòcits eren madurs i es van microinjectar mitjançant la tècnica d'ICSI, 15 van fecundar i 10 van ser evolutius i es van biopsiar el dia +3. Els resultats del DF-DGP es detallen a la taula 4.5. Dos embrions van ser transferibles però no van implantar.

Embrions B	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
BE1	2	Afectat	47, XY, +13	-11q	No		No
BE2	2	No Afectat, Portador Materna	47XY, +2		No		
BE3	2	No Afectat, Portador Paterna	47XXYY, -17	-20q	No		
BE4	2	No Afectat, Sa	46XXY, -22		No		
BE6	2	No Afectat, Portador Paterna	46 XY, Euploide		Si	Si	
BE8	2	Afectat	47, XY -21	+5p	No		
BE12	2	No Afectat, Sa	No Amplificat		Si*		
BE15	2	No Afectat, Portador Paterna	48XY, +13, -21		No		
BE16	2	No Afectat, Portador Paterna	45XX, -22		No		
BE19	2	No Afectat, Sa	46XY, Euploide		Si	Si	

Taula 4.5. Resultats del DF-DGP de la família B. * L'embrió era transferible per no estar afectat de fibrosi quística però no es disposava d'informació citogenètica

4.2.3.-Cas clínic C

En el cas clínic de la parella C, ambdós progenitors eren portadors de la mutació W1282X en el gen CFTR, causant de fibrosi quística. L'edat materna era de 34 anys.

Es van obtenir un total de 10 COCs, tots ells madurs i després d'inseminar-los amb ICSI, 9 van fecundar i 6 van ser evolutius a dia +3 i es van poder biopsiar. Només un embrió era sa per a la malaltia i tot i no tenir diagnòstic citogenètic, es va transferir, va implantar i donar lloc al naixement d'un nen sa (Taula 4.6).

Embrions C	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
CE2	2	NO AFECTAT, SA	ND		Si*	Si*	Si
CE3	2	AFECTAT	46 XY, Euploide		NO		
CE4	2	AFECTAT	46 XY, Euploide		NO		
CE6	2	AFECTAT	ND		NO		
CE8	2	AFECTAT	46 XY, Euploide		NO		
CE9	2	AFECTAT	44, XX, -17, -22		NO		

Taula 4.6. Resultats del DF-DGP de la família C. * Sense tenir informació citogenètica

4.2.4.-Cas clínic D

En la parella D, amb risc d'aniridia (malaltia autosòmica dominant), la pacient estava afectada de la malaltia degut a la mutació c.311+1 G>A situada al gen PAX6. L'edat materna era de 33 anys.

En un primer cicle d'estimució ovàrica es van obtenir 5 COCs, tots ells madurs, 4 dels quals van fecundar. Donat el nombre reduït de soigots i sobretot pel fet de tractar-se d'una malaltia dominant, els embrions fecundats es van criopreservar a l'estadi de 2pn. En la segona estimulació ovàrica es van aconseguir 4 COCs, tots madurs, 2 dels quals van fecundar. Finalment, degut a la qualitat embrionària, es va optar per fer la biòpsia d'un sol blastòmer dels 6 embrions evolutius disponibles a dia +3 per realitzar exclusivament l'anàlisi monogènica. Un dels 6 embrions va resultar ser sa i es va transferir però no va donar lloc a embaràs (Taula 4.7).

Embrions D	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
DE101	1	AFECTAT	No biòpsia	No biopsiat	No		No
DE102	1	AFECTAT	No biòpsia	No biopsiat	No		
DE103	1	AFECTAT	No biòpsia	No biopsiat	No		
DE104	1	NO AFECTAT, SA	No biòpsia	No biopsiat	Si*	Si*	
DE2	1	AFECTAT	No biòpsia	No biopsiat	No		
DE3	1	AFECTAT	No biòpsia	No biopsiat	No		

Taula 4.7. Resultats del DF-DGP de la família D. * Sense tenir informació citogenètica

4.2.5.-Cas clínic E

La parella E, amb risc de transmetre fibrosi quística a la descendència degut a que ambdós progenitors eren portadors de la mutació $\Delta F508$ en el gen CFTR. L'edat materna era de 39 anys.

Aquest cas també va requerir dos cicles d'estimulació ovàrica, en un dels quals es van congelar els 4 zigots obtinguts en l'estadi de 2pn i posteriorment es van analitzar conjuntament amb els obtinguts en el segon cicle d'estimulació ovàrica, en el qual es van obtenir 12 COCs, 8 d'ells madurs, i després de ser microinjectats per ICSI van fecundar i es van poder biopsiar tots 8 a més dels 4 criopreservats. En la taula XXXXX es mostren els resultats del total de 12 embrions. Un embrió va ser transferible segons el DF-DGP, i un altre transferible només tenint en compte l'estudi monogènic ja que el blastòmer biopsiat per dur a terme l'anàlisi citogenètica no va amplificar. Tots dos van ser transferits però cap va implantar (Taula 4.8)

Embrions E	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploidies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
EE1	3 N DUBTÓS	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	46 XX, Euploid		Si	Si	No
EE2	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	54 XXYY, +2, +5, +8, +11, +16, +17, +18, -21		No		
EE5	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	NO AMPLIFICAT		Si*	Si	
EE8	2	AFECTAT	47, XXY		No		
EE9	2	NO AFECTAT, SA	49 XXY, -1, +3, +7, +9, +10, -13, -15, +16, +18, -21		No		
EE10	2	AFECTAT	48XXY, +19	-9qcenq21.3, -9q34.1qter	No		
EE11	3 (1 no tenia nucli)	AFECTAT	47XY, +21		No		
EE12	2	AFECTAT	52XXYY, +4, +6, +8, -9, -10, +16, +19, +20		No		
EE201	2	AFECTAT	47XX, +19		No		
EE202	3 (1 no tenia nucli)	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	53 XXY, +1, +3, +4, +10, -13, +16, +19, +22		No		
EE204	2	ND	45XX, -22		No		
EE205	2	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	44 XX, -3 -18		No		

Taula 4.8. Resultats del DF-DGP de la família E. * Sense tenir informació citogenètica

4.2.6.-Cas clínic F

Ambdós membres de la parella F eren portadors de mutacions en el gen CFTR, el pare tenia la mutació S737F i la mare era portadora de la $\Delta F508$. Es van sotmetre a dos cicles de DF-DGP, amb cinc mesos de diferència. L'edat materna era de 33 i 34 anys respectivament en els dos cicles.

En la primera aplicació clínica es van obtenir 12 COCs, tots ells eren madurs, i van ser inseminats mitjançant ICSI, 11 van fecundar i 10 van poder ser biopsiats el dia +3. Tan sols es van biopsiar dos blastòmers en els embrions de bona qualitat. D'acord amb el DF-DGP es va obtenir un embrió transferible, que es va transferir però no va implantar

(Taula 4.9). Quatre embrions no afectats, que no es van biopsiar per a l'anàlisi citogenètica, no es van transferir per motius morfològics o per no ser evolutius.

Embrions F	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploidies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
FE2	2	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	47XX, +8		No		No
FE3	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46, EUPLOIDE		Si	Si	
FE4	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	NO BIÒPSIA		Si*	No	
FE5	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	NO BIÒPSIA		Si*	No	
FE6	2	AFECTAT	46, XY		No		
FE8	1	AFECTAT	NO BIÒPSIA		No		
FE9	1	ND	NO BIÒPSIA		No		
FE10	2	AFECTAT	46XX, +5, +14, -16, -22		No		
FE11	1	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	NO BIÒPSIA		Si*	No	
FE12	1	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	NO BIÒPSIA		Si*	No	

Taula 4.9. Resultats del primer DF-DGP de la família F. * Sense tenir informació citogenètica

En la segona aplicació, de 12 oòcits madurs inseminats per ICSI, 10 van fecundar i 8 van ser biopsiats el dia +3 i analitzats. Un d'ells, l'E9, no afectat de fibrosi quística i era euploide, es va transferir però no va produir embaràs (Taula 4.10).

Embrions F'	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
F'E1	2	AFECTAT	46XY, Euploide		No		No
F'E3	2	AFECTAT	44 XY,-1, -16		No		
F'E5	2	AFECTAT	46XY, Euploide		No		
F'E6	2	AFECTAT	47XY, +16		No		
F'E8	2	ND	48XXY, +1, +6, -7, +8, +13, -20, -22		No		
F'E9	2	NO AFECTAT, PORADOR MATERNA	46XX, Euploide		Si	Si	
F'E11	2	AFECTAT	46XY, +19	+8q21.2q21.3	No		
F2E12	2	AFECTAT	46XX, Euploide		No		

Taula 4.10. Resultats del segon DF-DGP de la família F.

4.2.7.-Cas clínic G

La parella G també són portadors de fibrosi quística, tots dos de la mutació $\Delta F508$. L'edat materna era de 38 anys.

En aquest cas també es van fer dos cicles d'estimulació per aconseguir un major nombre d'embrions per al DF-DGP. En un primer cicle es van obtenir 4 zigots que es van criopreservar a l'estadi de 2pn. En un segon cicle, es van obtenir 8 COCs, tots ells madurs que van ser microinjectats. Quatre d'aquests van fecundar i van ser biopsiats juntament amb 3 dels criopreservats. L'embrió 202, era transferible donat que era sa per la fibrosi quística i euploide i va ser transferit però no va donar lloc a embaràs (Taula 4.11).

Embrions G	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
GE5	2	ND	43XX, -15, -16, -22		No		No
GE6	2(1LISAT)	ND	NO BIÒPSIA		No		
GE7	2	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	44 XX, -1, -16		No		
GE8	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46 XY	+6q12-q22.3	No		
GE202	2	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	46, XY, Euploide		Si	No	
GE203	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46 XX	+18q12.1-21.1	No		
GE204	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46 XX	-20p	No		

Taula 4.11. Resultats del DF-DGP de la família G

4.2.8.-Cas clínic H

Aquesta parella també té risc de transmetre fibrosi quística a la descendència. La mutació paterna es la 3850-1G>A i la materna la N1303K. L'edat materna era de 27 anys.

En la punció fol·licular es van obtenir 22 COCs, tots ells estaven en estadi MII i per tant van ser microinjectats per ICSI. Es van aconseguir un total de 17 zigots, 11 dels quals eren evolutius a dia +3 i van poder ser biopsiats. D'aquests embrions tan sols un va ser no afectat i euploide, va ser transferit però no va donar lloc a embaràs (Taula 4.12).

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
HE1	2	AFECTAT	46 XY	+16p13pter, +17q21.3-q23	No		No
HE2	2	AFECTAT	46 XY	+7p22-p31	No		
HE4	3(1LISAT)	AFECTAT	46 XX, Euploide		No		
HE5	2	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46XX, Euploide		Si	Si	
HE8	2	ND	46 XX, Euploide		No		
HE12	2	AFECTAT	46 XY	+8pcenp12	No		
HE13	2	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	45 XY, -22		No		
HE15	2	ND	47 XXY	+8p22-q22, -8q24-qter	No		
HE16	2	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	46 XX	+18p	No		
HE17	2	ND	46 XX, Euploide		No		
HE20	2	AFECTAT	46 XX, Euploide		No		

Taula 4.12. Resultats del DF-DGP de la família H

4.2.9.-Cas clínic I

La família I, tenia risc de transmetre a la seva descendència la síndrome de Lynch, o HNPCC (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*). La mutació paterna era la Lys616del en el gen MLH1. L'edat materna va ser 36 anys. Aquesta ha estat la primera aplicació de DGP per a aquesta síndrome de predisposició a càncer a l'estat espanyol.

En el moment de la punció fol·licular es van obtenir 23 oòcits madurs que es van inseminar mitjançant ICSI, 16 d'aquests van fecundar i 14 van evolucionar fins a dia +3 i es van poder biopsiar. Després del DF-PGD l'embrió 13 i 17, van ser transferits donant lloc a embaràs i naixement de dos nadons sans. El diagnòstic postnatal, ja que la família va declinar la opció prenatal, ha confirmat els resultats obtinguts durant el DF-DGP.

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
IE2	3(1LISAT)	AFECTAT	46, XY Euploide		No		Si (2)
IE3	2	AFECTAT	47, XO, -5, +9, +11, +16	-4pterq27, +4q27qter	No		
IE4	2	NO AFECTAT	46, XX, +11, -18	-9pterq21.3, +9q21.3qter	No		
IE6	3(1 sense nucli)	AFECTAT	47, XY +17		No		
IE7	2	AFECTAT	46, XX Euploide		No		
IE8	3(1LISAT)	ND	46, XX Euploide		No		
IE9	2	AFECTAT	46, XY, -16	-9q21.3qter	No		
IE10	2	AFECTAT	46, XY Euploide		No		
IE12	1	NO AFECTAT	NO BIÒPSIA		Si*	No**	
IE13	2	NO AFECTAT	46, XY Euploide		Si	Si	
IE14	2	NO AFECTAT	47, XX, +16		No		
IE15	3(1LISAT)	AFECTAT	46, XY Euploide		No		
IE16	3(1LISAT)	ND	45, XX, -8		No		
IE17	2	NO AFECTAT	46, XX Euploide		Si	Si	

Taula 4.13. Resultats del DF-DGP de la família I. * Sense tenir informació citogenètica. ** Material criopreservat

En aquest cas es van poder reanalitzar els embrions descartats que es detallen a continuació (Taula 4.14).

Codi embrió	Resultats de CGH en blastòmer	Codi reanàlisi	Reanàlisi
I2	46, XY Euploide	I2 ¹	46, XY Euploide
I4	46, XX, -9pterq21.3, +9q21.3qter, +11, -18	I4 ¹	46, XX, -4, +11
I8	46, XX Euploide	I8 ¹	46, XX Euploide
I10	46, XY Euploide	I10.1 ³	46, XY Euploide
		I10.2 ³	46, XY Euploide
		I10.3 ³	46, XY +19
I14	47, XX, +16	I14 ¹	45, X0 +16
I15	46, XY Euploide	I15.1 ²	46, XY Euploide
		I15.2 ²	46, XY, -1q
		I15.3 ²	45, X0
		I15.4 ³	46, XY, +1p32.1q31, +6p, -9q
I16	45, XX, -8	I16 ¹	45, X0

Taula 4.14. Resultats del reanàlisi de la família I. Els superíndexs corresponen a: ¹⁾ Embrions sencers ²⁾ Blastòmers aïllats ³⁾ Grups de 3 a 5 blastòmers.

Els resultats d'aquest cas clínic s'han descrit en l'article "First successful double-factor PGD for Lynch Syndrome: monogenic analysis and comprehensive aneuploidy screening" (Annex 2).

4.2.10.- Resultats generals de DF-DGP en dos blastòmers

Els resultats obtinguts per a les 9 famílies portadores de malalties monogèniques tenint en compte els 11 casos clínics de DF-DGP en els quals s'han biopsiat dues cèl·lules per embrió són els que es detallen a continuació.

D'un total de 163 COCs puncionats, 147 eren oòcits MII i tots ells es van inseminar mitjançant la tècnica d'ICSI amb una taxa de fecundació del 78,9% (116/147). Dels fecundats, un 79,3% (92/116) van ser evolutius a dia +3 i per tant van poder ser biopsiats. En 78 dels embrions de bona qualitat es van biopsiar dos blastòmers de cada embrió, per la doble detecció: un per l'estudi de mutació/ns familiars i l'altre per a l'anàlisi citogenètica. En 14 embrions que no havien arribat a l'estadi de 8 cèl·lules, només es va biopsiar un blastòmer per realitzar l'anàlisi monogènica i es va realitzar un DGP convencional.

Pel que fa a l'anàlisi de mutacions, dels 92 blastòmers analitzats l'èxit de diagnòstic va ser del 89.1%. El 48,8% dels embrions estaven afectats de les malalties d'estudi i el 51,2% eren sans.

En referència a l'anàlisi citogenètica completa, es van estudiar 78 blastòmers, amb un èxit diagnòstic del 94.9%. D'aquests, el 37,8% (28/74) eren euploides i el 62,2% (46/74) presentaven anomalies: Aneuploïdies, desequilibris segmentals o bé tots dos alhora. Pel que fa a les aneuploïdies, estaven presents en el 52,7% dels blastòmers, amb un total de 127 esdeveniments, involucrant tots els cromosomes excepte el cromosoma 12. Els cromosomes més implicats en l'aneuploïdia són els sexuals, seguits del cromosoma 16 i 22 (Figura 4.4).

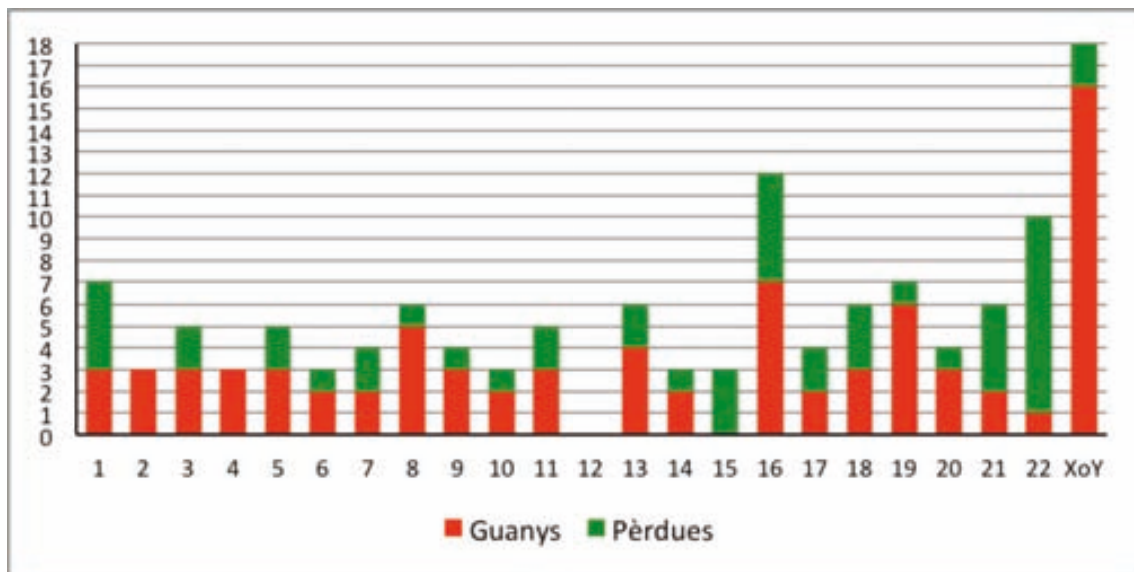


Figura 4.4. Aneuploïdies trobades en les aplicacions clíniques de DF-DGP utilitzant dos blastòmers.

Pel que fa als desequilibris segmentals, s'han evidenciat en el 21,6% (16/74) dels blastòmers analitzats. La meitat d'ells presentaven aneuploïdies juntament amb els desequilibris segmentals, mentre que l'altra meitat només presentaven aquest tipus d'alteració. S'han observat un total de 21 esdeveniments d'aquest tipus, implicant diferents cromosomes (Figura 4.5).

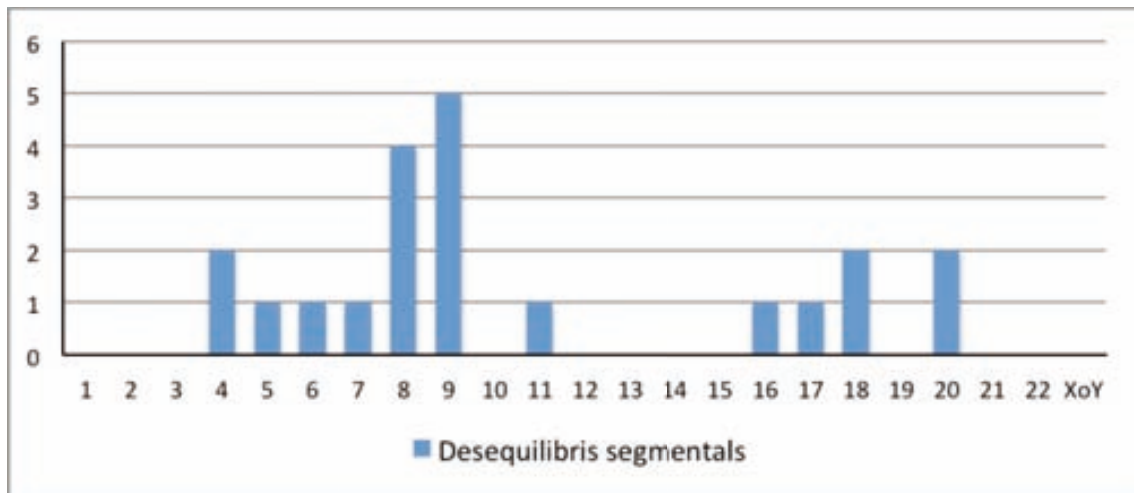


Figura 4.5. Desequilibris segmentals trobats en les aplicacions clíniques de DF-DGP utilitzant dos blastòmers.

La taxa global d'implantació del DGP, amb tan sols resultat monogènic, i DF-DGP, amb resultat monogènic i citogenètic analitzant dos blastòmers és del 28,6% (4/14). Considerant exclusivament els embrions transferits amb el DF-DGP informatiu per ambdós factors genètics la taxa d'embaràs i posterior naixement ha estat del 27,3% (3/11).

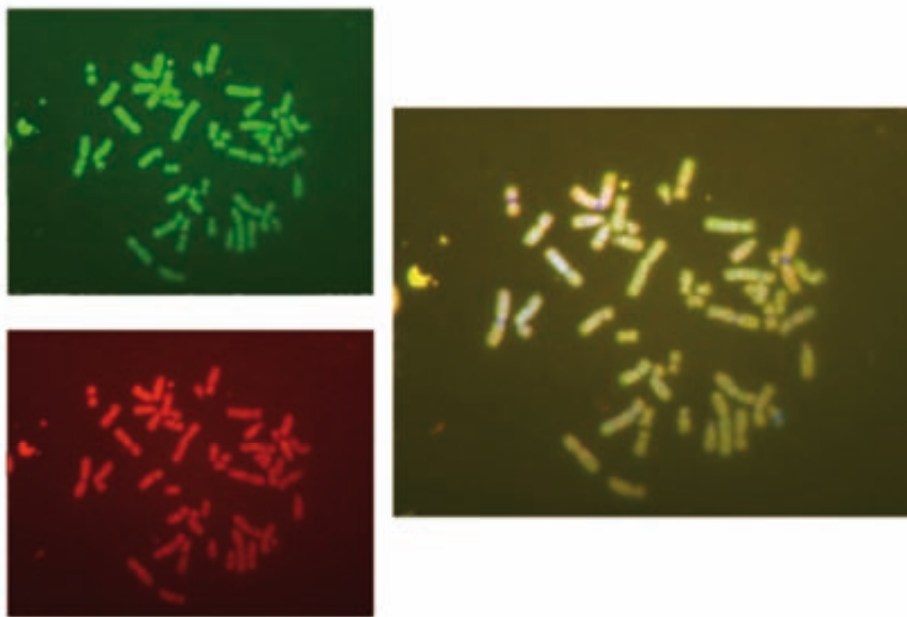
4.3 DF-DGP en embrions a partir d'un sol blastòmer (Objectiu 3)

Per la posada a punt, s'han assajat diferents sistemes d'amplificació de tot el genoma cel·lular: DOP-PCR, Genomeplex[®], MDA (*Multiple Displacement Amplification*) amb el kit *Genomiphi V2* i amb el kit Repli-g.

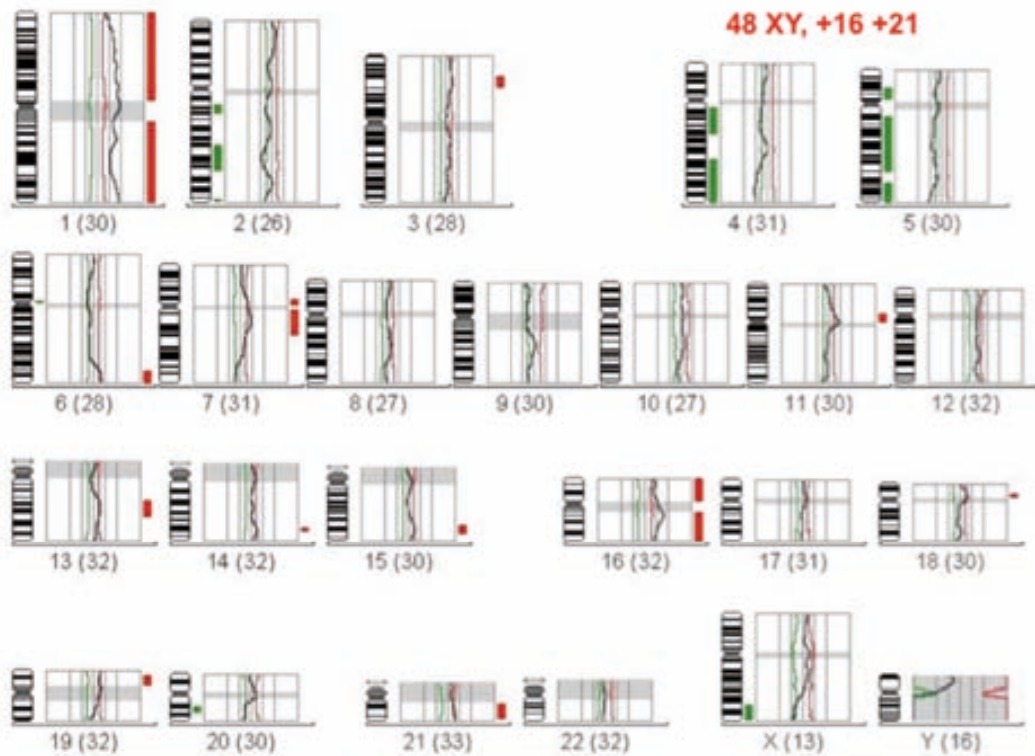
DOP-PCR: Donada la disponibilitat de la CGH ràpida desenvolupada en el nostre grup (Rius *et al.* 2010) es va avaluar el grau d'adequació del sistema d'amplificació de genoma cel·lular emprat, la DOP-PCR per a la detecció de malalties monogèniques però no es van obtenir bons resultats, ja que els errors d'amplificació eren del 40,5% i taxes d'ADO del 24%.

Genomeplex[®]: L'amplificació del genoma d'una cèl·lula aïllada amb el kit Genomeplex[®], va generar bons resultats d'hibridació en la CGH però en analitzar línies cel·lulars Coriel aneuploides amb alteracions conegudes, es va observar que apareixien guanys i pèrdues cromosòmiques artefactuals (veure Figures 4.6 i 4.7).

Pel que fa a l'estudi molecular a partir de producte pre-amplificat amb Genomeplex[®] la taxa d'amplificació total dels loci era del 64%, i les taxes d'ADO de 30,5%. Tot i introduir diverses modificacions al protocol establert; afegint passos addicionals que afavorissin la lisi cel·lular i la desnaturalització del DNA per a una millor amplificació, augmentar el temps de fragmentació i d'amplificació respecte el recomanat pel fabricant i introduir passos de purificació post-amplificació per obtenir un DNA de major qualitat, no es van aconseguir resultats més fiables



Imatge 4.6. Resultat de CGH després d'amplificar el DNA cel·lular utilitzant el kit Genomeplex[®].



Imatge 4.7. Perfils de CGH obtinguts després d'amplificar el DNA cel·lular utilitzant el kit Genomeplex[®].

Genomiphi V2: L'amplificació del genoma de la cèl·lula amb la metodologia MDA emprant el kit *Genomiphi V2* (GE Healthcare) amb la introducció d'algunes modificacions; afegint passos addicionals de lisi, canviant les quantitats de reactius per evitar la possible saturació de la reacció, i augmentant els temps d'amplificació passant d'1 h 30 min a 4 h va aconseguir millores lleus en el rendiment de les PCRs passant d'un 88,3% d'amplificació a un 89,6%, i sobretot incrementant la quantitat de producte amplificat, obtenint pics de fluorescència més clars en la electroforesi capil·lar. passant d'un no es va aconseguir obtenir resultats de CGH fiables, ja que tot i que la hibridació era de bona qualitat, es detectaven guanys i pèrdues cromosòmiques artefactuals tal i com s'observa a la figura 4.8.

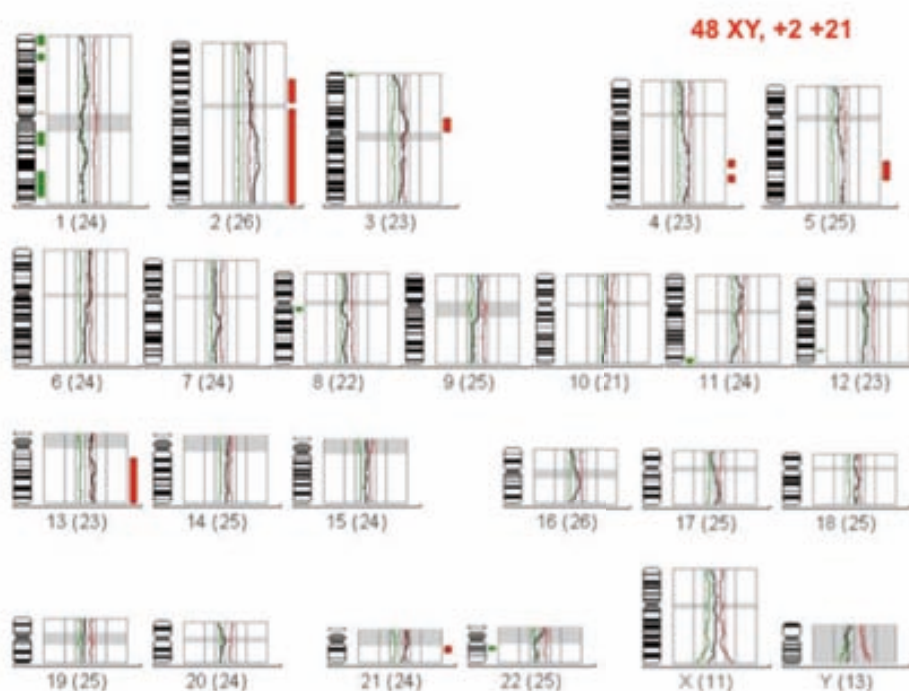
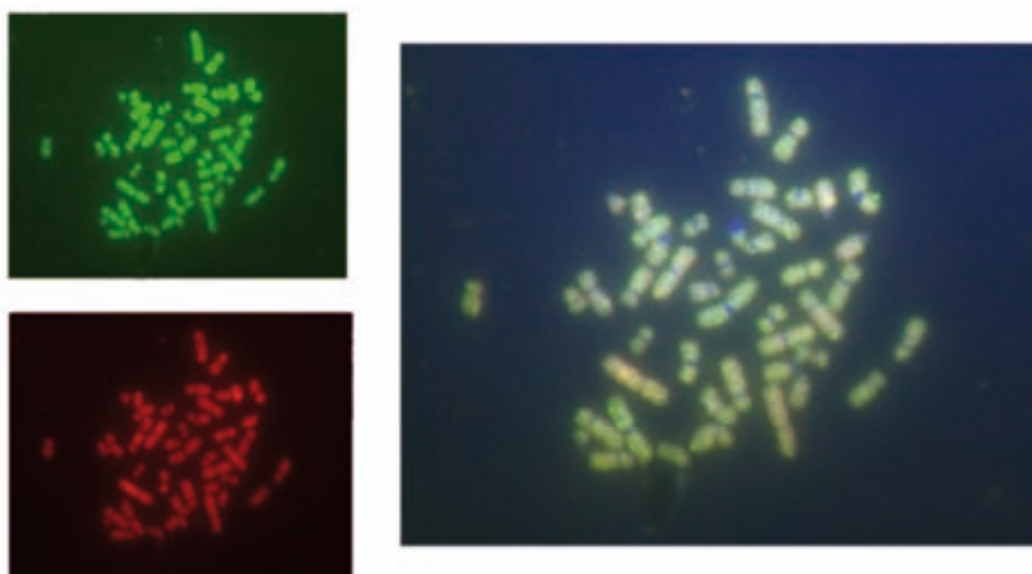


Figura 4.8. Resultat de CGH després d'amplificar el DNA cel·lular utilitzant el kit *Genomphi V2* i els corresponents perfils obtinguts.

Repli-g: L'amplificació del genoma a partir de cèl·lula única amb MDA emprant tant la versió Mini com Midi del kit Repli-g (Qiagen) no va donar resultats vàlids per la CGH ja que el DNA presentava fallades d'hibridació (Figura 4.9). Cap de les modificacions introduïdes que incloïen augmentar el temps de marcatge va de les sondes mitjançant *Nick-translation* fins a 2h 30min, i diluir el DNA obtingut després de l'amplificació per evitar la sobresaturació de la reacció de marcatge, van aconseguir millorar els resultats de CGH.

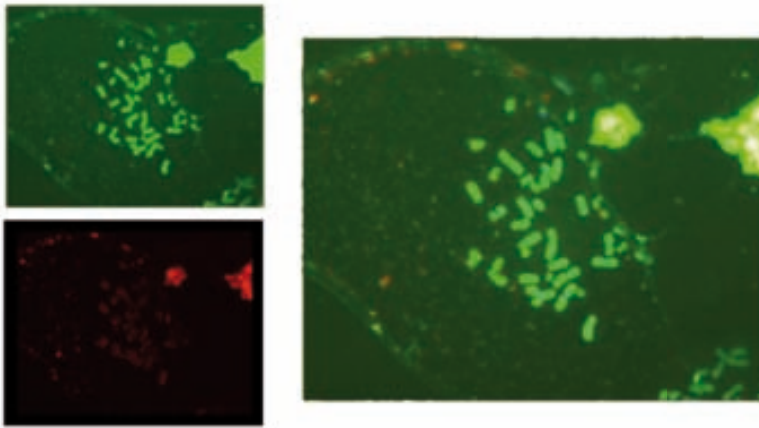


Figura 4.9. Exemple de fallada d'hibridació després d'amplificar el DNA cel·lular amb el kit *Repli-g*.

PicoPlex™ i Sureplex: L'amplificació de tot el genoma cel·lular amb aquestes dues metodologies en l'anàlisi monogènica, s'han obtingut resultats similars utilitzant dos kits diferents de PCR en una sèrie comparativa. Utilitzant la PCR convencional amb la *HotMaster Taq Polimerase (5Prime)* s'han obtingut unes taxes d'amplificació del 92,9% i unes taxes d'ADO de 5,1%. D'altra banda, fent servir el *Qiagen Multiplex PCR Kit* l'amplificació tenia lloc en un 96,3% de les cèl·lules i l'ADO en un 3,8% dels casos. Quan s'ha aplicat aquesta metodologia a l'estudi citogenètic amb CGH, els resultats són òptims, mostrant perfils sense artefacte (Figura 4.10). Aquest procediment va permetre aplicar el Df-DGP fent tan sols la biòpsia d'un sol blastòmer de cada embrió i ser analitzat per dos factors genètics: monogènica i citogenètica. Els resultats es detallaran en els apartats següents.

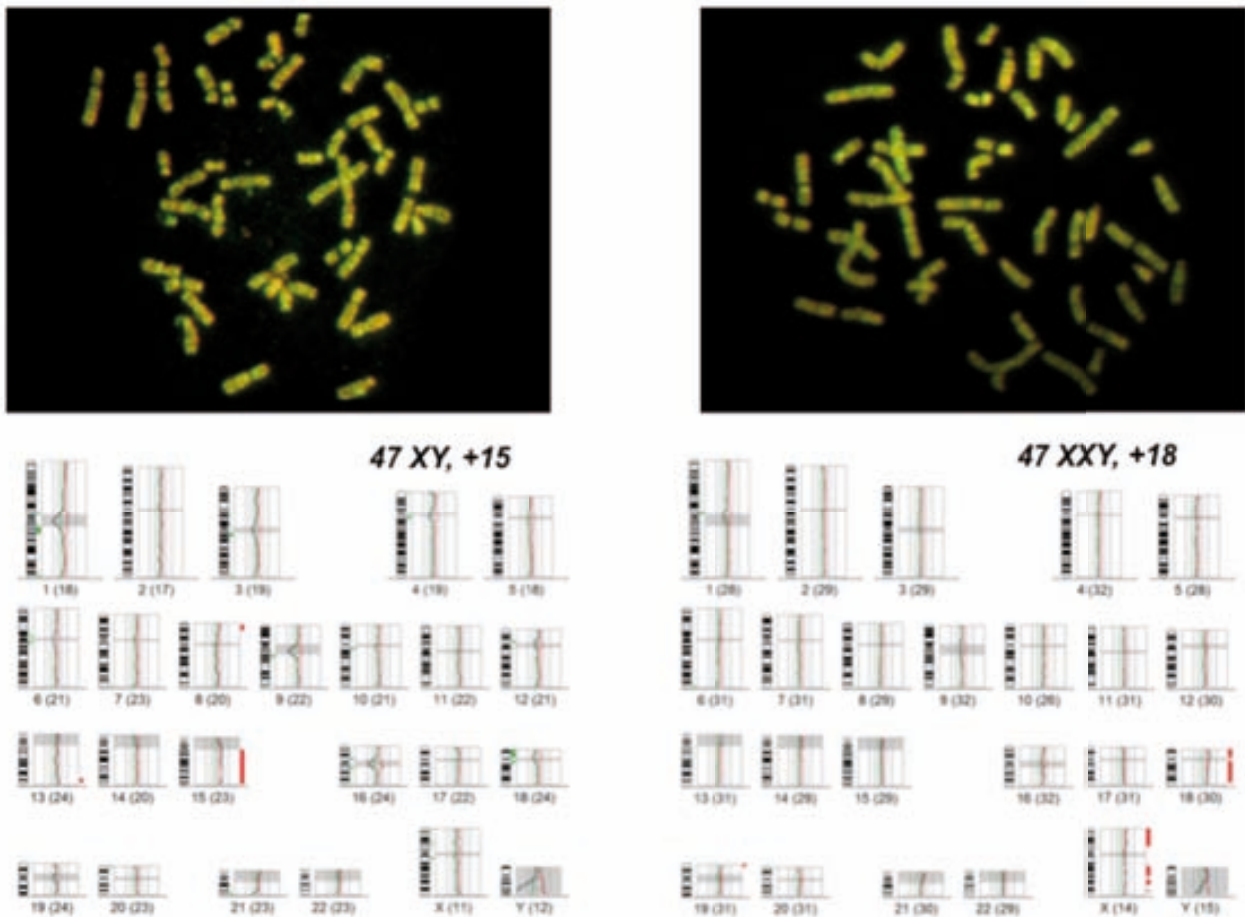


Figura 4.10. Resultats citogenètics en dues línies cel·lulars amb alteracions conegudes resultat de l'amplificació del genoma utilitzant PicoPlex™.

4.4.- Resultats de DF-DGP en un blastòmer (Objectiu 4)

Els resultats concrets obtinguts per a cadascuna de les 5 famílies en què s'ha aplicat el DF-DGP biopsiant un sol blastòmer per embrió per dur a terme el diagnòstic monogènic i l'anàlisi citogenètica de tot el complement cromosòmic es detallen a continuació.

4.4.1.- Cas clínic H'

La parella H amb risc de transmetre la malaltia de fibrosi quística a la seva descendència per ser portadors de les mutacions 3850-1G>A el pare i N1303K la mare. La parella ja s'havia sotmès prèviament a un cicle de Df-DGP amb biòpsia de dos blastòmers però sense èxit. Aquesta família ja s'havia sotmès prèviament a un cicle de DF-DGP, en dos blastòmers sense èxit. L'edat materna era de 28 anys.

Es van obtenir 18 COCs, tots ells amb oòcits madurs que van ser inseminats per ICSI, 15 d'aquests van fecundar. Tots ells eren evolutius el dia +3, i es van biopsiar. Un d'ells va ser transferible segons el DF-DGP i es va transferir però no va donar lloc a embaràs (Taula 4.15).

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploidies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
H'E1	1	NO AMPLIFICAT	NO AMPLIFICAT	NO AMPLIFICAT	No*		No
H'E2	1	ND	46XY	+16p, -13q21.1q32	No		
H'E3	1	ND	46XY, Euploide		No*		
H'E4	1	ND	47XY, +22		No		
H'E6	1	ND	47XX, +16	+17p	No		
H'E7	1	AFECTAT	46, XX, Euploide		No		
H'E8	1	AFECTAT	58, XXYY, -1, +2, +3, -4, +5, -6, +7, -8, +9, +11, +13, +15, +16, +17, +19, +20, +22		No		
H'E9	1	AFECTAT	46, XY, Euploide		No		
H'E10	1	NO AFECTAT	47, XX, +16		No		
H'E11	1	AFECTAT	45, XX, -16, +18		No		
H'E12	1	NO AFECTAT, SA	45, XO		No		
H'E13	1	NO AFECTAT	46, XY	+9q	No		
H'E14	1	AFECTAT	47, XX, +16		No		
H'E15	1	ND	46, XY, Euploide		No*		
H'E16	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERN	46, XY, Euploide		Si	Si	

Taula 4.15. Resultats del DF-DGP de la família H'. *Es suggereix fer biòpsia de trofoectoderm

Degut a que tres dels embrions (E1, E3 i E15) no van ser diagnosticats i podrien haver estat transferibles, es va recomanar fer la biòpsia de trofoectoderm el dia +5 per poder criopreservar els sans i euploides i transferir-los en un cicle posterior. La biòpsia de trofoectoderm va ser possible en els embrions H'E1 i H'E3. El diagnòstic de l'embrió H'E1 va evidenciar que era sa per la malaltia però era aneuploid: 47, XY +14, -9p21pter. D'altra banda, pel que fa al H'E3 estava afectat de la malaltia i tenia un cariotip normal 46, XY. Amb els resultats obtinguts cap dels dos són transferibles.

4.4.2. Cas clínic J

La parella J, tenia risc de transmetre poliquistosi renal-hepàtica, malaltia autosòmica d'herència dominant, a la seva descendència ja que la dona, era portadora d'una mutació sense concretar en el gen PKD1. En aquest cas només es va realitzar l'anàlisi indirecte de les mutacions degut a que no es disposava de la mutació de la pacient afectada. Per això es van utilitzar 6 STRs informatius diferents. L'edat materna era de 37 anys.

En la punció fol·licular es van obtenir 27 COCs, 20 dels quals eren madurs i es van microinjectar amb ICSI, 17 van fecundar i 13 d'aquests van ser evolutius a dia +3 i van ser biopsiats. Es van identificar dos embrions transferibles, que després de la transferència embrionària no van donar lloc a embaràs.

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
JE1	1	AFECTAT	46, XX, -1, +19	+3q, +9q, +16q, +20q	No		No
JE3	2	AFECTAT	46, XX	-9q	No		
JE7	2	AFECTAT	45, XX, -16		No		
JE8	1	NO AFECTAT, SA	46, XX, Euploide		Si	Si	
JE10	1	ND	39, XO, +4, -8, -9, -11, +14, -16, -20, -21, -22		No		
JE11	1	ND	49, YO, -1, +3, +6, -10, +11, +12, +13, +14, +18, -21	+4q, +5q	No		
JE12	1	AFECTAT	46, XY Euploide		No		
JE15	1	ND	46, XY, Euploide		No*		
JE16	1	NO AFECTAT, SA	46, XY, Euploide		Si	Si	
JE17	1	AFECTAT	48, XX, +20		No		
JE18	1	AFECTAT	44, XX, +5, -10, -12, -18		No		
JE19	1	ND	46, XY	+8q	No		
JE20	1	NO AFECTAT, SA	47, XX, +21	+9q33qter	No		

Taula 4.16. Resultats del DF-DGP de la família J. *Es suggereix fer biòpsia de trofoectoderm

Degut a que un dels embrions diagnosticats com euploide no tenia diagnòstic de mutacions per la malaltia monogènica es va recomanar al centre fer una biòpsia de trofoectoderm i criopreservar l'embrió fins a disposar del resultat. Aquest embrió, l'E15 va ser diagnosticat com a sa, va ser transferit en un cicle de criotransferència i va donar lloc a un embaràs bioquímic.

4.4.3. Cas clínic K

La parella K és portadora de fibrosi quística, la mutació paterna es la N1303K i la materna la Δ F508. L'edat materna era 30 anys.

En la punció fol·licular es van obtenir 30 COCs, 25 dels quals eren madurs i van ser inseminats mitjançant ICSI, d'aquests 14 van fecundar i 10 van ser evolutius a dia +3 i es van biopsiar. D'acord amb el DF-DGP es van identificar 3 embrions transferibles, però un d'ells no era apte morfològicament, per tant se'n van transferir 2 i cap d'ells va donar lloc a embaràs. També es va recomanar fer biòpsia de trofoectoderm de l'embrió KE14 però no va arribar a l'estadi de blastocist i per tant va ser descartat.

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
KE6	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46, XX, Euploide		Si	Si	No
KE7	1	AFECTAT	45, XX, -16		No		
KE13	1	ND	46, XX +20, -21, +22	+6p21.2q15, +7p, +18pterq21.1, +19p	No		
KE14	1	ND	46, XX, Euploide		No*		
KE15	1	NO AFECTAT	39, XX, -2, -5, -7, -11, -12, -16, -18		No		
KE16	1	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	45, XX, -6		No		
KE18	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	47, XX, +14		No		
KE19	1	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	46, XX, Euploide		Si	No apte	
KE20	1	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	46, XY, Euploide		Si	Si	
KE22	1	NO AFECTAT	41, XX, -3, -4, -8, -11, -18,	+20p	No		

Taula 4.17. Resultats del DF-DGP de la família K. *Es suggereix fer biòpsia de trofoectoderm

4.4.4. Cas clínic F'

La parella F, tenia risc de transmetre la malaltia de fibrosi quística a la seva descendència. El pare era portador de la mutació S737F i la mare de la $\Delta F508$. Aquesta parella ja s'havia sotmès a dos cicles de DF-DGP biopsiant dos blastòmers, però no van aconseguir embaràs. L'edat materna era de 36 anys.

En la punció fol·licular es van obtenir 12 COCs, 7 dels quals eren MII que van ser microinjectats mitjançant ICSI donant lloc a 5 zigots que van evolucionar fins a dia +3 i es van biopsiar. L'embrió F'E6 va resultar transferible donat que no estava afectat de

fibrosi quística i era euploid i es va transferir donant lloc a un embaràs. L'embrió F''E2 del que no es disposava de resultat citogenètic va ser criopreservat per ser transferit en un cicle posterior. L'embrió F''E7 del qual no es va amplificar el blastòmer no es va poder efectuar la biòpsia de trofoectoderm donat que no va evolucionar fins a l'estadi de blastocist, i va ser descartat.

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
F''E2	1	NO AFECTAT	ND		Si* ⁺	No	Si
F''E4	1	NO AFECTAT	45, XX, -16		No		
F''E5	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	45, XO, +1, -3	-2p, -5q, -7p, -9q, +10q, +16p, -16q, -20p	No		
F''E6	1	NO AFECTAT, SA	46, XY, Euploide		Si	Si	
F''E7	1 (LISAT)	NO AMPLIFICAT	NO AMPLIFICAT		No ⁺		

Taula 4.18. Resultats del DF-DGP de la família F'. * Sense tenir informació citogenètica ⁺Es suggereix fer biòpsia de trofoectoderm

Posteriorment, es van poder reanalitzar els embrions 4, 5 i 7 obtenint els següents resultats. L'embrió F''E7 del que no s'havia obtingut DNA en l'aplicació clínica va resultar afectat de fibrosi quística en el reanàlisi.

Embrió	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals
F''E4	45, XX, -16	-
F''E5	46 XY, Euploide	-
F''E7	46, XY, Euploide	-

Taula 4.19. Resultats del reanàlisi de la família F'.

4.4.5.- Cas clínic L

La parella J, tenia risc de transmetre fibrosi quística a la descendència degut a la mutació $\Delta F508$ present en ambdós progenitors. L'edat materna era de 34 anys.

Es van obtenir 20 COCs, 18 dels quals eren oòcits MII, es van inseminar amb ICSI i van donar 13 zigots, d'aquests 9 van ser evolutius a dia +3 i es van biopsiar i analitzar. Els embrions LE2 i LE8, van ser transferits i van donar lloc a un embaràs bioquímic que no es va confirmar ecogràficament.

Embrions	Blastòmers biopsiats	Resultat monogènic	Citogenètica aneuploïdies	Citogenètica estructurals	Transferibles	Transferits	Embaràs
LE1	1	NO AFECTAT, SA	49, XX, +9, +20, +22	-18p	No		No
LE2	1	NO AFECTAT	46, XX, Euploide		Si	Si	
LE3	1	NO AFECTAT, PORTADOR PATERNA	46, XX, Euploide		Si	No	
LE6	1	NO AFECTAT, PORTADOR	46, XY	-8q23qter	No		
LE8	1	NO AFECTAT, PORTADOR MATERNA	46, XX Euploide		Si	Si	
LE10	1	NO AFECTAT, SA	45, XY, -22		No		
LE13	1(MULTIN)	ND	45, XX, -2, -5, +20		No		
LE17	2	ND	46, XY, Euploide		No*		
LE18	1	NO AFECTAT, PORTADOR	47, XX, +8, -16, +18	+5q32q34, -6p, +9q, +12q14q21.3, +15cen15q21.1	No		

Taula 4.20. Resultats del DF-DGP de la família L. *Es suggereix fer biòpsia de trofoectoderm

4.4.6. Resultats generals de DF-DGP en un blastòmer

Considerant conjuntament els 5 casos clínics en els quals s'ha aplicat el DF-DGP en un sol blastòmer els resultats assolits són els que es detallen a continuació. Dels 107 COCs

puncionats, 88 eren madurs amb els oòcits en estadi MII, i van poder ser inseminats mitjançant la tècnica d'ICSI aconseguint un total de 64 zigots, essent per tant, la taxa de fecundació del 72,7%. Dels embrions fecundats, el 81,2% (52/64) eren evolutius a dia +3, i van ser biopsiats. El blastòmer biopsiat de cada embrió es va processar per ambdós factors genètics: la malaltia monogènica i el cribratge d'aneuploïdies.

Pel que fa a l'anàlisi monogènica, l'èxit diagnòstic ha estat del 71,1% (37/52), un 32,4% (12/37) dels embrions diagnosticats estaven afectats de les malalties d'estudi mentre que el 67,5% restant eren sans.

Pel que fa a l'anàlisi citogenètica, l'èxit diagnòstic ha estat del 98% (49/50) dels embrions biopsiats essent un 36,7% euploides, el 63,3% restant presentaven alteracions citogenètiques tant aneuploïdies com desequilibris cromosòmics segmentals. En el 18,4% de les cèl·lules estudiades es va observar la presència conjunta d'aquests dos tipus d'alteracions (Figura 4.13).

L'aneuploïdia estava present en un 53,1% dels blastòmers analitzats, amb un total de 87 esdeveniments aneuploides. El cromosoma més freqüentment implicat en l'aneuploïdia va ser el 16, seguit del 18, 20 i 22, tal i com es pot observar a la figura 4.11.

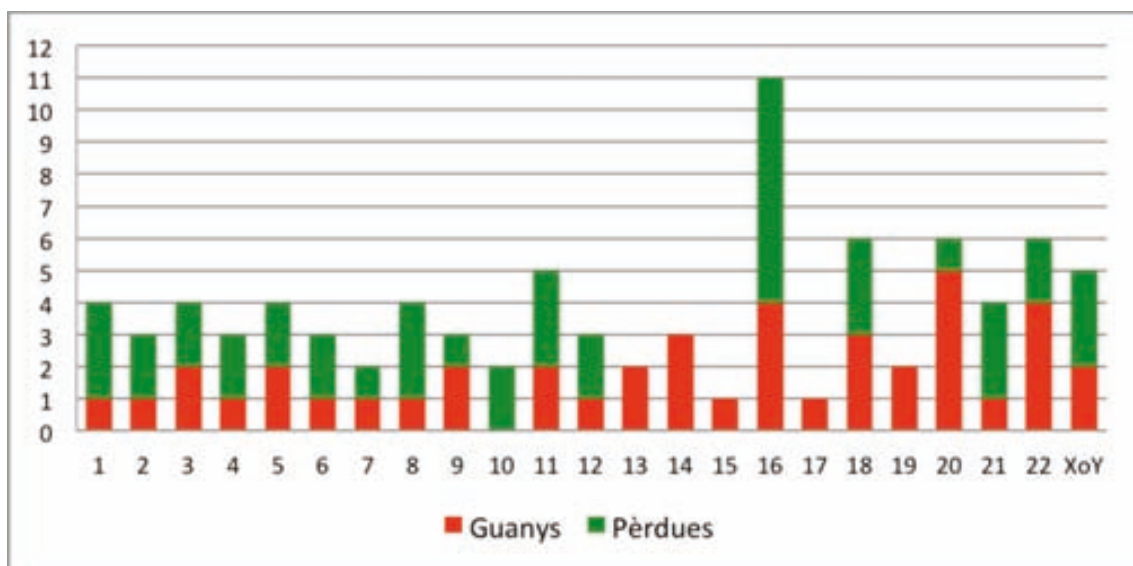


Figura 4.11. Aneuploïdies per cromosoma trobades en les aplicacions clíniques de DF-DGP utilitzant un blastòmer.

Un 28,6% (14/49) dels embrions van mostrar desequilibris cromosòmics segmentals en els blastòmers analitzats, en 9 ocasions les cèl·lules també presentaven aneuploïdies i en 5 casos només mostraven desequilibris segmentals de fragments cromosòmics. S'han detectat 33 esdeveniments d'aquest tipus en les aplicacions clíniques dutes a terme, involucrant gairebé tots els cromosomes del complement (Figura 4.12)

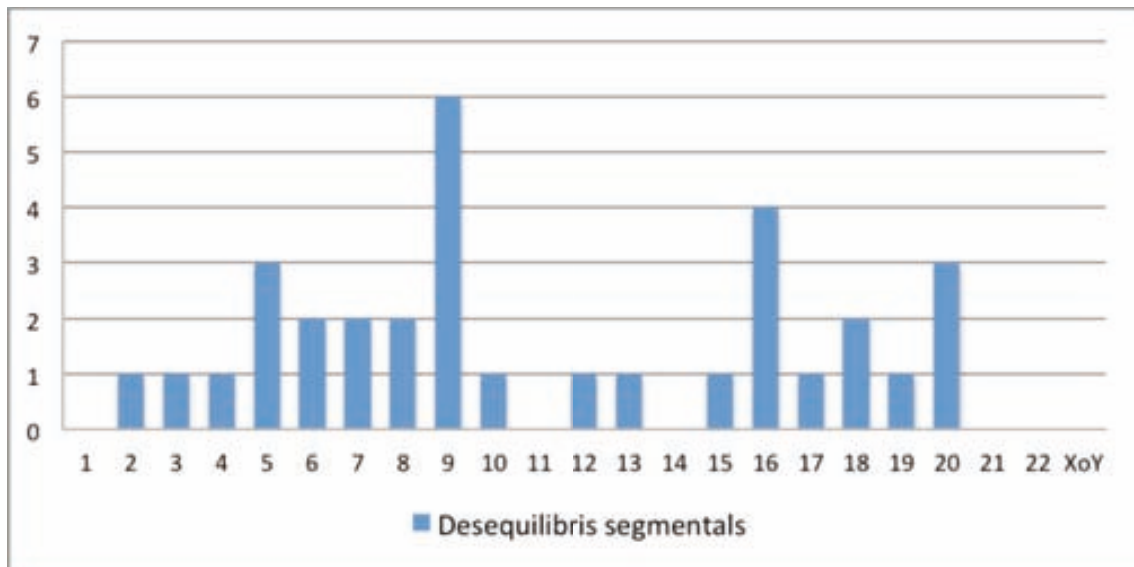


Figura 4.12. Desequilibris segmentals trobats en les aplicacions clíniques de DF-DGP utilitzant un blastòmer.

La taxa global d'implantació dels cicles de DF-DGP biopsiant un blastòmer és del 37,5% (3/8) i la taxa d'embaràs ha estat del 12,5%.

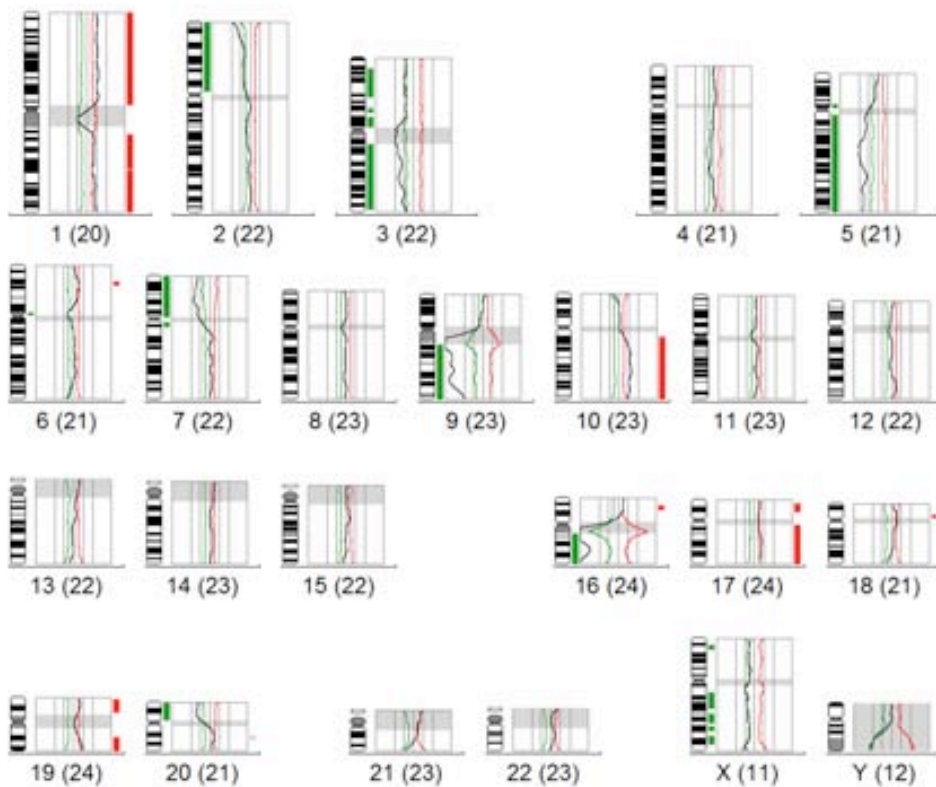
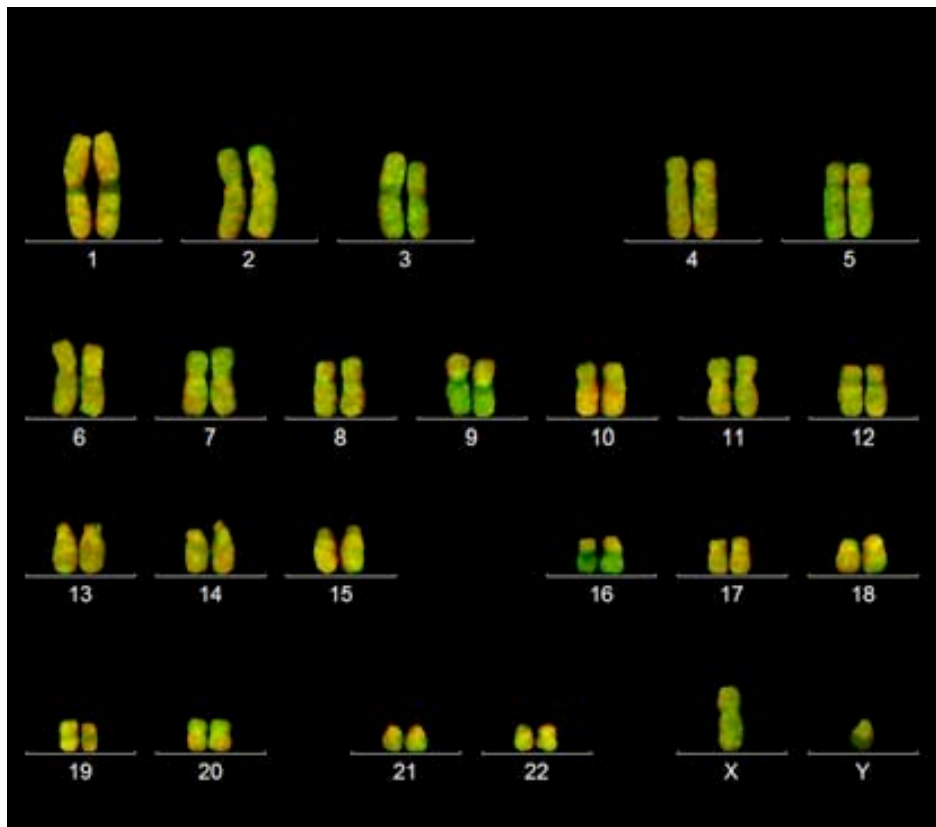


Figura 4.13 Exemple de resultats citogenètics, on s'observen aneuploidies i desequilibris segmentals, obtinguts en l'anàlisi de CGH de l'embrió F''E5.

Discussió

5. Discussió

5.1. Estudi d'aneuploïdies d'origen germinal mitòtic en pacients i donants de cicles de reproducció assistida

La caracterització d'alteracions citogenètiques mitjançant la CGH ràpida en oòcits immadurs ha posat de manifest la seva validesa per dur a terme estudis citogenètics bàsics que han permès estudiar les aneuploïdies d'origen mitòtic. Els resultats obtinguts en l'estudi de 157 oòcits immadurs descartats de cicles de FIV han estat de molt bona qualitat i s'han pogut observar tant aneuploïdies com desequilibris cromosòmics estructurals.

Els oòcits immadurs descartats de cicles de FIV han estat un tipus de mostra molt recurrent en els estudis citogenètics de gàmetes femenins. Tot i així cal destacar que en la majoria dels casos els oòcits immadurs s'han sotmès a processos de maduració in vitro per tal de poder estudiar el primer corpuscle polar i la corresponent MII i així detectar les aneuploïdies originades durant la primera divisió meiòtica. Tots ells han permès tenir un coneixement detallat dels processos que donen lloc a aneuploïdia durant la meiosi.

Aquesta ha estat la primera vegada que s'ha dut a terme un estudi citogenètic complet en oòcits immadurs que ha permès identificar la existència d'alteracions d'origen pre-meioïtic. Les aneuploïdies observades no poden ser atribuïdes a errors meiòtics deguts a mecanismes descrits en estudis anteriors, ja que en aquest treball la meiosi encara no ha tingut lloc i els errors trobats s'han hagut d'originar en etapes precedents.

En estudis previs, en els quals s'ha estudiat citogenèticament la segregació cromosòmica de parelles 1cp-oòcit de pacients, utilitzant tant la FISH per a diversos cromosomes com la CGH, també evidencien, amb una incidència variable, dotacions no complementàries entre ambdues cèl·lules, pel que es dedueix que les oogònies precursoras presents en l'ovari eren aneuploides. Quan s'aplica la CGH, que informa de tot el complement cromosòmic, s'han descrit taxes d'aneuploïdia d'origen pre-meioïtic d'entre l'1 i el 12,5% (Fragouli *et al.* 2006a; Fragouli *et al.* 2006b) passant pel 8% i 9,5% (Gutierrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004b).

Aquests valors descrits anteriorment varien, depenent del grup, respecte a la incidència detectada en el present treball en què s'ha trobat un valor d'aneuploïdia d'origen mitòtic en pacients del 15,7%. La variabilitat de percentatges pot ser atribuïble a diferències en

la mida de les mostres d'estudi i també a la variabilitat interindividual de les dones incloses en cadascun dels grups.

Pel que fa a les aneuploïdies d'origen pre-meiotic en donants d'oòcits, en un estudi previ del nostre grup la taxa detectada va ser del 15,5% en les parelles 1cp-oòcits MII estudiades (Obradors *et al.* 2010). Aquests resultats són molt similars als descrits en el present treball on un 14,9% de les cèl·lules presentaven aneuploïdies d'origen mitòtic. Contràriament, en un altre estudi d'oòcits de donant no es va observar aquest d'absència de complementarietat entre ambdues dotacions en cap de les parelles de primer corpuscle polar i oòcit MII estudiades (Fragouli *et al.* 2009).

Tenint en compte els resultats generals de la sèrie, incloent pacients i donants, el 15,3% dels oòcits immadurs estudiats mostren aquest tipus d'aneuploïdies.

S'han detectat un total de 57 esdeveniments aneuploides, en els que tots els cromosomes s'hi veuen implicats excepte el cromosoma 14. Els cromosomes trobats més freqüentment han estat el 21, seguit del cromosoma 13, 16, 19 i 22.

D'acord amb aquestes dades, es pot deduir que els cromosomes de mida més petita, a diferència dels de mida més gran, semblen estar més afectats pels errors de segregació cromosòmica produïts durant les divisions mitòtiques de l'embrió o de les cèl·lules germinals primordials. Aquest fet, també s'ha detectat en estudis previs que evidenciaven aneuploïdies produïdes durant la meiosi, trobant una major incidència d'aneuploïdia involucrant els cromosomes petits, del cromosoma 13 en endavant (Sandalinas *et al.* 2002; Cupisti *et al.* 2003; Pellestor *et al.* 2003; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004b; Fragouli *et al.* 2006a; Fragouli *et al.* 2011).

Considerant el nombre d'esdeveniments aneuploides per cèl·lula, en gairebé la meitat dels oòcits aneuploides, hi havia dos o més cromosomes implicats. Aquest fet no concorda amb el descrit en un treball anterior del nostre grup dut a terme en oòcits de donant, on s'evidenciava que totes les aneuploïdies d'origen mitòtic trobades implicaven més d'un cromosoma mentre que els que presentaven aneuploïdies originades durant la meiosi generalment implicaven un sol cromosoma (Obradors *et al.* 2010).

Pel que fa a la freqüència de dones que presenten oòcits amb anomalies cromosòmiques, s'ha evidenciat que el 33,9% de les dones incloses en aquest estudi han produït almenys un oòcit immadur bé amb aneuploïdies o bé amb desequilibris

segmentals originats durant les divisions mitòtiques prèvies a l'inici de la meiosi. En un estudi previ, utilitzant FISH per a 9 cromosomes (1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X) en parelles de 1cp-oòcit madurats in vitro, el 25,7% de les dones presentaven alteracions originades en etapes pre-meiotiques (Pujol *et al.* 2003). També en altres treballs, en els quals s'ha analitzat tot el complement cromosòmic de parelles 1cp-oòcit MII mitjançant la CGH s'ha detectat que el 13,2% de les pacients de FIV de 21 a 42 anys estudiades generaven almenys un oòcit anòmal amb aquest mateix origen (Gutierrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004b; Gutierrez-Mateo *et al.* 2005). També, en donants d'oòcits menors de 29 anys, s'ha detectat aquest tipus d'alteracions en un 22,6% de les dones (Obradors *et al.* 2010).

Aquest treball evidencia unes incidències superiors respecte al descrit en els estudis previs esmentats. Això es podria explicar pel fet que en aquest estudi s'han avaluat tots els oòcits immadurs, incloent ens que no haguessin acabat madurant i per tant no s'haurien inclòs en els estudis anteriors per no haver arribat a l'estadi de metafase II amb la consegüent extrusió del corpuscle polar. Una possible raó per la que els oòcits no arriben a madurar es la inestabilitat cromosòmica, que en alguns casos no permetria superar els punts de control de la meiosi (Roeder i Bailis 2000). Cal dir però que aquest fet ha estat força discutit degut a que alguns oòcits amb una elevada presència d'errors cromosòmics originats per defectes en la recombinació meiòtica acaben sobrevivint i arriben a madurar (Woods *et al.* 1999; Tease *et al.* 2006).

Pel que fa als mecanismes responsables que justifiquen l'aparició d'aquestes alteracions en primer lloc, es pot pensar que els errors s'han produït durant la fase proliferativa de la oogènesi, on tenen lloc un nombre molt elevat de divisions cel·lulars successives susceptibles d'errors. Aquests errors podrien estar causats per defectes en els punts de control del cicle cel·lular. D'aquesta manera hi hauria un efecte generalitzat que podria actuar sobre tots els cromosomes donant lloc a una mala segregació de qualsevol cromosoma del complement.

D'altra banda, s'ha de considerar l'efecte del mosaïcisme embrionari, que podria ser una altra causa que explicaria la presència de cèl·lules aneuploides en la línia germinal. L'any 1997 es va demostrar mitjançant estudis d'embrions preimplantacionals i biòpsies de vellositats de còrion que el mosaïcisme és molt comú en les etapes primerenques del desenvolupament embrionari (Delhanty *et al.* 1997) per tant, tot i que el cariotip del fetus fos euploide podrien presentar situacions de mosaic de baix percentatge. A partir de llavors s'han descrit taxes força elevades de mosaïcisme en embrions arribant fins al

60 o 77% (Voullaire *et al.* 2000; Wells i Delhanty 2000; Rius *et al.* 2011). Es coneix que en ocasions les cèl·lules aneuploides presents en embrions mosaics, poden ser eliminades, donant lloc a embrions totalment euploides o bé poden ser aïllades i mantingudes en certs teixits, generant individus mosaics. En cas de que aquestes cèl·lules aneuploides de l'embrió es mantinguin en les gònades, es parlaria de mosaïcisme gonadal. Aquest tipus de mosaïcisme es caracteritza per tenir, a part de cèl·lules normals euploides, un conjunt de cèl·lules aneuploides amb la mateixa alteració cromosòmica. Aquest fet ha estat descrit en estudis de teixits ovàrics fetals (Hulten *et al.* 2008) i és un fet força comú en parelles amb tres o més concepcions portadores de la mateixa aneuploïdia (Sachs *et al.* 1990; Cozzi *et al.* 1999; Somprasit *et al.* 2004).

A diferència del mosaïcisme gonadal, el mosaïcisme germinal és aquell en què es desconeix l'origen concret de l'aneuploïdia però que es sap que ha estat originat prèviament a la meiosi (Delhanty 2011).

Cap de les comparacions realitzades a partir dels resultats obtinguts d'oòcits provinents de dones joves versus els de provinents de dones d'edat materna avançada (de 37 anys o més grans) com els d'oòcits que provenien de pacients de FIV versus els de donants d'oòcits evidencien diferències significatives ni pel que fa a aneuploïdes ni a desequilibris segmentals. D'acord amb això, es pot pensar que el mecanisme responsable de la generació de l'aneuploïdia observada en aquest estudi, i que ha tingut lloc durant el desenvolupament embrionari, està present en qualsevol grup de dones estudiades mostrant una prevalença individu-dependent més que estar lligada a alguna característica específica, com ara l'edat o el grau d'infertilitat. Per tant, aquest nivell basal d'oòcits amb errors pre-meiotics presents en els ovaris podria ser extrapolable a la població femenina en general.

Aquesta idea també ha estat suggerida prèviament en treballs anteriors, en els quals s'ha descrit la presència d'oogònies aneuploides pel cromosoma 21 en ovaris fetals i s'ha suggerit que la presència d'oogònies aneuploides en els ovaris pot ser considerada una situació habitual en fetus femenins normals (Hulten *et al.* 2008).

A finals dels anys 80 es va postular que la estimulació ovàrica podia induir a la maduració de gàmetes cromosòmicament anòmals que sense la estimulació hormonal es convertirien en atrèsics (Wramsby *et al.* 1987). En estudis posteriors en què s'han

analitzat oòcits de pacients de FIV i també de donants suggereixen que el tractament hormonal al que es sotmeten les dones podria tenir un efecte diferenciat entre els dos grups esmentats. En nombroses ocasions, estudis duts a terme en dones joves, generalment donants d'oòcits, s'ha descrit un reclutament preferencial dels oòcits amb més aneuploïdies degut a la intensa estimulació hormonal a la que es sotmeten (Weghofer *et al.* 2008; Weghofer *et al.* 2009; Obradors *et al.* 2011).

També s'ha descrit que en els cicles naturals, la maduració dels oòcits aneuploides trisòmics, és retardada respecte a la maduració dels oòcits disòmics donant lloc al conegut efecte de l'edat materna (Hulten *et al.* 2008; Hulten *et al.* 2010). És per aquesta raó que hi hauria una acumulació d'oòcits aneuploides en la reserva ovàrica de dones d'edat avançada. El nostre estudi però, no detecta aquest tipus de correlació amb l'edat materna. Això es podria explicar pel fet que en estudiar tots els oòcits immadurs, s'inclouen els que no acabaran madurant, fet que podria explicar que es vegi esbiaixat l'efecte del retard en el procés de maduració en relació a l'aneuploïdia.

S'ha descrit també que els punts de control que regulen el fus mitòtic es poden veure afectats en relació amb l'edat materna (Vogt *et al.* 2008). Per tant, en dones d'edat materna avançada, es podria permetre la maduració d'oòcits amb un elevat nombre d'aneuploïdies en lloc de convertir-los en atrèsics tal i com va descriure Wramsby (Wramsby *et al.* 1987).

Tot i així encara caldran més estudis que permetin aclarir la possible relació entre els protocols d'estimulació hormonal i el reclutament preferencial d'oòcits no euploides en lloc dels euploides, com ja s'ha suggerit anteriorment (Handyside *et al.* 2012).

D'altra banda, en el present estudi, s'ha detectat la presència de desequilibris segmentals d'entre 26,5 i 110 megabases en un 5,7% dels oòcits. Aquesta es la primera vegada que s'han trobat aquest tipus d'alteracions utilitzant la CGH en oòcits immadurs. Tot i així, altres estudis utilitzant diferents metodologies en oòcits madurs han permès identificar anomalies estructurals utilitzant bandes R (Pellestor *et al.* 2002) i també fent servir la CGH, detectant desequilibris segmentals en un 1% (Fragouli *et al.* 2006a) i en un 3,6% dels oòcits madurs estudiats (Fragouli *et al.* 2011).

També s'han volgut tenir en compte els punts de trencament que han originat aquests desequilibris segmentals que s'han descrit. Tots els punts de trencament trobats, excepte el -8p12, han estat descrits prèviament com a llocs fràgils del genoma (Mrasek *et al.* 2010). Concretament, un dels punts més fràgils descrits, el FRA3G, localitzat en la banda 3p14.2 també s'ha trobat en els punts de trencament dels oòcits immadurs. S'ha

descriu anteriorment que en situacions d'estrès replicatiu del DNA, els llocs fràgils poden ser conflictius, ja que mostren una predisposició al trencament (Franchitto i Pichierri 2011).

Aquests desequilibris segmentals, observats com guanys i pèrdues de fragments cromosòmics poden ser conseqüència de trencaments cromosòmics seguits de pèrdues o bé de duplicacions de certs fragments, que no han estat reparats (Voet *et al.* 2011). D'acord amb això cal tenir en compte que durant la etapa proliferativa de les cèl·lules germinals, tenen lloc un seguit de divisions mitòtiques successives molt actives, i que per tant pot existir una inestabilitat genètica característica, i generar alteracions estructurals que podrien recordar als processos tumorals (Voet *et al.* 2011).

Els resultats obtinguts en el present estudi han permès aprofundir en el coneixement de les anomalies cromosòmiques originades en estadis previs a la meiosi, tot i així cal tenir en compte que les dades obtingudes pel que fa a alteracions no són informatives de les situacions reals dels cicles de FIV ja que aquests oòcits immadurs estudiats en molts casos no maduraran i per tant no s'acabaran utilitzant amb finalitats reproductives.

Tenint en compte tots els mecanismes de generació d'aneuploïdia que tenen lloc prèviament i durant la meiosi femenina, és fàcil explicar el baix èxit reproductiu de l'espècie humana. És per això que l'anàlisi d'aneuploïdies ha anat agafant importància en l'àmbit del diagnòstic preimplantacional, amb l'objectiu de millorar específicament les taxes d'embaràs associades a tractaments de reproducció assistida.

5.2. Diagnòstic genètic preimplantacional de doble factor

5.2.1.- DF-DGP biopsiant dos blastòmers

L'aplicació clínica del DF-DGP utilitzant dos blastòmers s'ha dut a terme en 11 ocasions, en 9 famílies amb risc de tenir descendència afectada de malalties monogèniques: Set de les parelles eren portadores de fibrosi quística (herència recessiva) una amb risc d'anirídia (herència dominant) i una altra amb risc de patir síndrome de Lynch (herència dominant).

Considerant totes les famílies s'han biopsiat un total de 92 embrions. El 89,1% dels embrions biopsiats van ser diagnosticats per la malaltia monogènica. De tots ells es va amplificar el DNA del blastòmer mitjançant la tècnica de MDA. Aquest procediment d'amplificació de tot el genoma a partir de cèl·lula única ha resultat ser molt efectiu. De fet s'ha aplicat també amb èxit en nombroses ocasions per al diagnòstic genètic preimplantacional (Lledo *et al.* 2007; Hellani *et al.* 2008; Obradors *et al.* 2008; Obradors *et al.* 2009; Ren *et al.* 2009; Spits i Sermon 2009).

Utilitzant la MDA s'obté una major quantitat de DNA a partir de la cèl·lula aïllada i això permet disposar de suficient DNA per dur a terme diferents reaccions *multiplex*. D'aquesta manera, la següent PCR que es duu a terme per amplificar els fragments d'interès no és tan crítica i no fa imprescindible mesclar tots els encebadors en la mateixa reacció, fet que pot dificultar el seu rendiment. Així la reacció o reaccions *multiplex* poden ser més eficients pel fet d'amplificar 2 o 3 regions cadascuna d'elles. Un altre avantatge de la utilització de metodologies d'amplificació de tot el genoma cel·lular és que es pot repetir l'anàlisi i confirmar el diagnòstic en posteriors reaccions en cas de no obtenir resultats satisfactoris en la lectura de les PCRs fluorescents donat que es disposa de material de partida suficient.

Fent una anàlisi seqüencial del cas clínic es poden deduir els moments en els quals s'han pogut produir els errors que finalment han donat lloc a una manca de diagnòstic de la cèl·lula. Aquest fet també ha estat descrit prèviament per altres autors (Piyamongkol *et al.* 2003; Fiorentino *et al.* 2006; Gutierrez-Mateo *et al.* 2009). Generalment, l'absència de diagnòstic s'ha degut a la manca d'amplificació cel·lular per motius intrínsecs a la cèl·lula. Tal i com hem observat i s'ha apuntat anteriorment, aquest fenomen té lloc de manera més freqüent en blastòmers que en limfòcits o fibroblasts (Glentis 2009).

En primer lloc, la no amplificació es pot deure a l'absència de cèl·lula en el tub per pèrdua accidental durant el procés dels rentats o d'entubació, ja sigui com a causa d'algun error humà, per haver-se quedat enganxat al capil·lar utilitzat per transferir-lo al tub de PCR o per haver-se lisat després dels successius rentats. En aquest sentit es prenen tres precaucions. En primer lloc, un cop realitzada la entubació del blastòmer s'observa el tub sota la lupa binocular, i en algunes ocasions es fàcil veure el blastòmer biopsiat dins la gota de líquid entubada, en altres casos però les brillantors i irregularitats del plàstic de tub no ho fan possible, per això sempre es realitzen dos passos addicionals més. Un cop dipositat el blastòmer dins el tub de PCR, es torna a la

última gota on s'ha rentat i es deixa anar el volum sobrant que queda dins el capil·lar després d'entubar el blastòmer, per estar segurs que el volum dipositat al tub contenia la cèl·lula. Posteriorment s'agafa vigorosament més volum de la última gota i es buida, aquest procés es realitza tres vegades seguides, en cas de que el blastòmer s'hagués quedat enganxat al capil·lar podria desprendre's durant aquests fluxos de líquid que el travessarien. Per acabar, i abans de procedir als rentats d'un altre blastòmer es renta tres vegades el capil·lar amb PBS estèril.

En el cas de que el blastòmer es lisi o bé durant la biòpsia o bé durant els rentats i tot i així s'observi el nucli intacte i es vulgui entubar, s'ha d'actuar amb molta cura en els successius passos per tal d'intentar que el nucli no es vegi afectat pels procediments de rentat. Un cop entubat, sempre s'ha de canviar tant la pipeta de biòpsia com el capil·lar amb el que s'han fet els rentats, per evitar qualsevol tipus de contaminació entre cèl·lules d'embrions diferents, que podrien donar lloc a errors diagnòstics.

El segon motiu pel qual no s'obté producte amplificat a partir de la cèl·lula pot ser degut al fet de que la lisi cel·lular o la descondensació del DNA no hagin estat efectives. D'aquesta manera els encebadors presents en la MDA no poden accedir al DNA i l'amplificació del genoma cel·lular no és eficient.

El tercer motiu que pot donar lloc a la no ampliació de cap dels loci és la presència i/o qualitat del DNA. En tots els casos s'ha biopsiat preferentment blastòmers amb un nucli evident, ja que en cas contrari podria tractar-se de fragments embrionaris sense material genètic que no serien útils per al diagnòstic (Ray *et al.* 1998; Kanavakis *et al.* 1999). Però, tot i tenir nucli, el DNA podria estar degradat, d'aquesta manera si els trencaments afecten a la regió d'interès, el diagnòstic se'n podria veure afectat. En cas de que hi haguessin trencaments de cadena simple, podria donar lloc al fenomen de l'ADO, en canvi, si es tractés de trencaments de cadena doble, la conseqüència seria la manca d'amplificació del locus o loci afectats.

La taxa d'ADO, calculada a partir de les 92 cèl·lules amplificades que s'ha trobat en la posada a punt dels protocols es del 10%, en canvi en les aplicacions clíniques ha arribat fins al 37%, en un cas de síndrome de Lynch. Aquest fet que dona pes a la hipòtesi de que segons el tipus cel·lular utilitzat es poden obtenir resultats molt variables (Gutierrez-Mateo *et al.* 2009). La taxa d'ADO mitjana obtinguda en les aplicacions clíniques ha estat del 16,4% similar al 15,4% obtingut prèviament al nostre grup

(Obradors *et al.* 2008; Obradors *et al.* 2009) i inferior a la descrita en altres estudis on s'ha arribat al 27% (Renwick *et al.* 2006).

En les aplicacions clíniques de fibrosi quística, s'han utilitzat a més del diagnòstic directe mitjançant la mida dels fragments o la minisequenciació, de 2 a 4 STRs per família, situats a ambdós costats del gen (Wilton *et al.* 2009).

En la família afectada d'aniridia es va detectar la mutació de manera directa mitjançant la minisequenciació i utilitzant dos STRs lligats al gen PAX2.

Pel que fa a la família portadora de HNPCC o síndrome de Lynch, es va detectar un increment en les taxes d'ADO durant la optimització del protocol, arribant al 12,9%, per tant, per donar robustesa al diagnòstic es va procedir a incrementar el nombre de STRs per al diagnòstic fins a un total de 6. En el cas clínic les taxes d'ADO van arribar al 37%. La incrementada taxa d'ADO d'aquests marcadors, podria ser resultat d'una mala amplificació durant la MDA. La baixa eficiència d'amplificació de la zona d'interès podria deure's a les característiques de la pròpia seqüència, que la podrien fer més susceptible als trencaments. Això donaria lloc a taxes d'ADO elevades, que altres autors han descrit fins al 31% havent utilitzat la MDA en el DGP (Burllet *et al.* 2006; Renwick *et al.* 2006).

Molts estudis han evidenciat que la MDA dona una major cobertura del genoma, menys biaix d'amplificació, un baix error de la polimerasa, i genera productes de més pes molecular comparat amb altres mètodes d'amplificació de genoma complet basats en la PCR. Tot i així, un desavantatge d'aquesta tècnica es que l'enzim *phi29 polymerase* que fa servir requereix partir d'un DNA de qualitat per obtenir resultats robustos (Hughes *et al.* 2005).

En 78 dels 92 embrions estudiats, addicionalment a la biòpsia d'un blastòmer per al diagnòstic monogènic, se'n va biopsiar un altre per dur a terme un estudi citogenètic complet de tot el complement cromosòmic mitjançant la CGH ràpida. En aquest segon blastòmer es va amplificar el DNA cel·lular mitjançant la DOP-PCR. L'èxit del diagnòstic citogenètic va ser del 94,9%.

Dels embrions diagnosticats citogenèticament, un 37,8% eren euploides i el 62,2% restant presentaven anomalies cromosòmiques ja fossin aneuploïdies, desequilibris segmentals o ambdós.

Aquesta incidència d'embrions citogenèticament anòmals, tot i ser valors força elevats son inferiors al 79,4% d'aneuploïdia trobat en estudis d'embrions de dones amb diferents problemes reproductius (edat materna avançada, avortaments de repetició o repetides fallades d'implaantació) (Rius *et al.* 2011). En el present grup de casos les parelles no tenien problemes reproductius sinó que es sotmetien a tractaments de FIV per dur a terme el diagnòstic genètic preimplantacional, tot i així en 5 dels 11 casos l'edat de les pacients era igual o major a 37 anys.

D'altra banda, la incidència d'alteracions citogenètiques detectada és superior al 45,4% d'aneuploïdia d'origen femení descrita en una sèrie prèvia de DF-DGP en la que s'analitzaven citogenèticament mitjançant la CGH convencional els primers corpuscles polars (Obradors 2011). L'increment d'aneuploïdies en el present treball respecte a l'anterior es degut amb molta probabilitat a que en aquest cas també s'han identificat les aneuploïdies d'origen patern i les originades en les primeres divisions mitòtiques de l'embrió.

En l'última recopilació periòdica dels cicles de DGP realitzats en diferents centres dut a terme per l'ESHRE, es recull una taxa d'aneuploïdia del 65,2% en embrions provinents de parelles a les que s'ha realitzat un estudi d'aneuploïdies degut a l'edat materna o a repetides fallades d'implantació, en tots els casos, la metodologia diagnòstica aplicada va ser la FISH. Els nostres estudis previs i també el present, demostren que tots els cromosomes en major o menor grau, estan implicats en l'aneuploïdia, i per tant, el fet d'estudiar només determinats cromosomes de tot el complement porta a una subestimació de l'aneuploïdia real. Possiblement degut a aquest fet, la taxa d'aneuploïdia és similar a la obtinguda en el present estudi on s'estudien embrions de parelles sense problemes reproductius.

Això també podria explicar el fet de que no millorin significativament les taxes d'embaràs tot i realitzar el PGS que tal i com recull la mateixa recopilació és del 15,4% en els casos de PGS i del 16,6% en els casos de PGD.

Una de les limitacions de la CGH és que en ser una anàlisi comparativa de les ràtios d'hibridació dels DNAs problema i control, no és capaç de detectar les haploïdies i poliploïdies. Així, segons les cèl·lules emprades com a control, no serà possible detectar certes alteracions. Per exemple, en el cas de fer servir un DNA referència provinent d'una cèl·lula XY, podria passar per alt una alteració viable, la trisomia del cromosoma X, ja que en els perfils de CGH mostrarien un guany del cromosoma X, que es podria confondre amb el perfil corresponent a un embrió de sexe femení. Aquest fenomen es

podria evitar amb la utilització d'un doble control, és a dir, fer una CGH amb control XX i l'altra amb control XY, fet que duplicaria el cost i el temps del diagnòstic citogenètic de manera molt considerable i per tant no és una solució massa factible. Una altra solució possible és la utilització de cèl·lules 47,XXY com a cèl·lules control, aquesta opció s'ha aplicat en algunes ocasions utilitzant limfòcits d'individus 47,XXY, afectats de la síndrome de Klinefelter. La disponibilitat de cèl·lules d'una línia cel·lular homogènia no ha estat possible i per tant no ens ha permès aplicar aquesta opció de manera sistemàtica.

L'aplicació del DF-DGP en casos clínics analitzant blastòmers ha permès la detecció de desequilibris cromosòmics estructurals o segmentals en un 21,6% dels embrions. Aquest tipus d'alteracions han estat descrites a la literatura tant utilitzant la CGH convencional com els *microarrays* de CGH (Wells *et al.* 1999; Voullaire *et al.* 2000; Hellani *et al.* 2008). Fins ara però, aquest tipus d'alteracions s'havien descrit amb una incidència de l'ordre del 4% en analitzar tot el complement cromosòmic d'oòcits humans (Pellestor *et al.* 2002; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004b; Fragouli *et al.* 2006a; Obradors *et al.* 2010; Fragouli *et al.* 2011). Els percentatges més elevats de desequilibris segmentals en oòcits són els descrits en el present treball en estudiar oòcits immadurs que arriben al 5,7%, veure apartat 4.1.

Aquest augment d'alteracions segmentals en embrions respecte els oòcits es pot explicar pel fet que a part de les alteracions provinents de l'oòcit també s'avalua l'aportació paterna. El fet de que els punts de control de l'espermatogènesi siguin molt més restrictius que en la oogènesi pel que fa a la inducció de bloqueig en cas d'alteracions cromosòmiques no garantitzen la integritat total del DNA cel·lular tal i com demostren diversos estudis que revelen la existència i el manteniment d'alteracions estructurals en els espermatozoides (Estop *et al.* 1995; Templado *et al.* 2005).

D'altra banda, presència d'aquest elevat nombre de desequilibris segmentals, es pot interpretar que estigui relacionada amb l'estadi replicatiu en que es troba el blastòmer corresponent. Tenint en compte que les primeres divisions cel·lulars del zigot se succeeixen de manera continua, el cicle cel·lular dels blastòmers es compona principalment de fase S o de síntesi seguida d'una fase M de mitosi, amb absència de fases G1 i G2. Considerant aquestes característiques específiques d'aquestes cèl·lules, cal contemplar la possibilitat de que si el blastòmer analitzat es troba en fase S, el perfil de CGH podria mostrar guanys o pèrdues parcials i temporals degudes a l'amplificació diferent en zones de replicació primerenca o tardana lluny de tractar-se realment

d'alteracions cromosòmiques permanents. Aquest fenomen responsable de falsos positius, es difícil d'obviar quan s'analitza el DNA amplificat d'un sol blastòmer d'embrions de 6-8 cèl·lules ja que a partir d'una sola còpia de cada cromosoma s'amplifica tot el seu material genètic, una estratègia per minimitzar el possible efecte de l'estadi replicatiu de la cèl·lula seria analitzar diverses cèl·lules biopsiades de trofoectoderm.

En aquest treball, durant l'aplicació del DF-DGP s'han pogut observar esdeveniments peculiars que han evidenciat l'existència de mosaïcisme en els embrions.

En els embrions A7 i E9 la presència d'un cromosoma 7 extra en un blastòmer i la observació d'un al·lel patern i un de matern en l'estudi molecular, posaria en evidència el mosaïcisme originat en l'embrió, ja que si l'aneuploidia vingués d'una de les cèl·lules germinals s'observaria l'equivalent a tres al·lells, un d'un progenitor i els dos al·lells de l'altre. Una situació similar passa amb l'embrió A9, el fet d'observar l'al·lel patern i matern en el diagnòstic monogènic és perquè la pèrdua del cromosoma 7 detectada en l'altre blastòmer analitzat no és d'origen matern o patern sinó embrionari.

En l'embrió H12, diagnosticat com a afectat pel fet d'haver observat al·lells paterns i materns, es va detectar un guany d'un fragment del cromosoma 7, que incloïa la zona del gen CFTR, això es podria explicar de dues maneres. La primera seria que durant les primeres divisions mitòtiques de l'embrió també puguin ocórrer esdeveniments que generin desequilibris estructurals, com duplicacions o delecions, que es trobarien en només alguns dels blastòmers. D'altra banda també es podria explicar per l'efecte de l'estadi replicatiu de la cèl·lula sobre el posterior resultat de CGH com ja s'ha discutit més amunt.

D'altra banda, l'embrió F'8 no es va poder diagnosticar per a la malaltia monogènica ja que tan sols es va observar l'al·lel patern, però no es tenia cap informació del matern. Posteriorment es va observar en la CGH del blastòmer la pèrdua del cromosoma 7, això seria consistent amb el fet de que la pèrdua d'aquest cromosoma provingués d'un error ocorregut durant la meiosi de l'òocit.

Globalment, 42 dels 82 embrions diagnosticats per a la malaltia monogènica eren sans, i per tant potencialment transferibles, però tan sols 12 eren euploides. De 9 se'n desconeixia la dotació cromosòmica bé perquè no se'n va biopsiar un segon blastòmer (6) o bé perquè no es va aconseguir el seu diagnòstic citogenètic (3). Això vol dir que en un 50% dels embrions sans es van detectar desequilibris cromosòmics.

Probablement, si haguessin estat transferits no haurien implantat, o bé haurien produït avortaments espontanis durant el primer trimestre o en algun cas haurien pogut donar lloc al naixement d'algun individu amb alteracions viables.

D'acord amb el diagnòstic genètic preimplantacional de doble factor favorable, s'han transferit un total de 11 embrions, dels quals han nascut 3 nens lliures de les malalties monogèniques familiars. Aquests resultats representen una taxa d'èxit d'embaràs i naixement del 27,3% (naixements/embrió transferit) que tot i tractar-se d'una sèrie reduïda és un bon resultat si es compara amb la descrita per l'ESHRE PGD Consortium on es detallen taxes del 16,6% (batec cardíac/embrió transferit) que es veuen reduïdes fins al 15,3% considerant naixements/embrió transferit (Goossens *et al.* 2012).

Si es comparen els resultats d'aquest treball amb resultats anteriors aplicant el DF-DGP analitzant citogenèticament el primer corpuscle polar dels oòcits mitjançant la CGH (Obradors 2011), les taxes d'embaràs per embrió transferit són lleugerament més baixes (27,3% vs 33,3%). Aquesta diferència podria ser atribuïble fet que la biòpsia d'un segon blastòmer per realitzar el diagnòstic d'aneuploïdies és molt més invasiu que la biòpsia del corresponent 1CP de l'oòcit just després de la seva inseminació. Aquest és el motiu pel qual el desenvolupament de procediments d'amplificació del genoma cel·lular que permetessin una variant de DF-DGP a partir d'un sol blastòmer va ser un dels objectius d'aquesta tesi doctoral.

En tots els casos de DF-DGP on s'ha aconseguit embaràs s'ha realitzat el reanàlisi dels embrions descartats. En el reanàlisi de l'embrió descartat de la família A ha confirmat el diagnòstic obtingut en el corresponent DF-DGP.

En el reanàlisi de la família I, dels 11 embrions descartats se'n va reanalitzar 7. Els embrions I2 i I8 es van entubar sencers degut al seu avançat estadi de desenvolupament, i es va confirmar que eren euploides. L'embrió I4 i I14, també es van reanalitzar sencers i les aneuploïdies van ser confirmades de manera parcial. Aquest fenomen es podria explicar pel fet que unes aneuploïdes provindrien dels gàmetes que van formar l'embrió i altres, s'haurien originat durant les primeres divisions mitòtiques. Dels embrions I10 i I15 se'n va poder separar diferents cèl·lules i algunes es van estudiar de manera aïllada mentre altres es van entubar en grups de 3 a 5 cèl·lules degut a la dificultat de separar-les individualment. Els resultats obtinguts van evidenciar la presència de mosaïcisme en aquests embrions. L'embrió I15, es podria catalogar com a caòtic degut a l'elevat nombre de línies trobades amb alteracions diferents. Finalment, un resultat discordant

en l'embrió I16 evidenciaria un cop més la presència de mosaïcisme. El reanàlisi efectuat en aquest cas posaria de relleu que el 71,4% dels embrions d'aquesta família presentaven mosaïcisme, incidència força concordant amb valors d'anteriors estudis el què s'ha evidenciat una incidència de mosaïcisme en el 77% dels embrions estudiats (Rius *et al.* 2011).

No es van poder reanalitzar els embrions 3, 6, 7 i 9 que es van lissar en el procés de separació de blastòmers amb pronasa o es van perdre durant el transport des del centre de reproducció al nostre laboratori.

En tots els casos en que es va aconseguir l'embaràs es va recomanar la realització d'un diagnòstic prenatal, per tal de confirmar el diagnòstic.

5.2.2.- DF-DGP biopsiant un sol blastòmer

5.2.2.1- Posada a punt del DF-DGP en un blastòmer

L'any 2010 es va posar demostrar la eficiència i fiabilitat de la CGH ràpida, que permet avaluar citogenèticament cèl·lules úniques (Rius *et al.* 2010). Les primeres aproximacions que es van realitzar per optimitzar el DF-DGP en un sol blastòmer, van consistir en assajar els diferents sistemes de WGA, buscant el més adequat per ser emprat en el DF-DGP en un sol blastòmer, obtenint la mateixa eficiència i fiabilitat diagnòstica que amb dos blastòmers.

Els primers assajos amb la MDA i posteriorment la iMDA utilitzant el *Genomiphi V2* Kit (GE Healthcare) van evidenciar que cap de les dues metodologies permetia analitzar citogenèticament amb CGH ràpida una cèl·lula aïllada de manera eficient. El resultat de la electroforesi en un gel d'agarosa al 1,5% del producte de DNA amplificat no evidenciava la "pinzellada" de DNA, pel que es podia deduir que la quantitat de DNA obtinguda en la WGA era insuficient per poder dur a terme el marcatge fluorescent i aconseguir sondes de qualitat suficient per hibridar competitivament sobre metafases control i obtenir perfils de CGH informatius. Tot i així, les hibridacions obtingudes amb el producte amplificat utilitzant la iMDA, han mostrat una bona qualitat per a tots els cromosomes, però es detectaven alteracions addicionals a les esperades. Aquestes alteracions, es van considerar falsos positius, ja que eren variables i no permetien establir uns criteris d'anàlisi adequats pel qual es va desestimar utilitzar aquesta metodologia d'amplificació.

A continuació, es va intentar obtenir bons resultats en l'anàlisi monogènica utilitzant la DOP-PCR, tal i com s'havia descrit anteriorment (Wells *et al.* 1999). Els resultats obtinguts però, van mostrar un elevat índex d'errors d'amplificació de determinats loci fent el diagnòstic molt poc robust, donant suport a la idea que els encebadors de DOP-PCR tenen zones d'*annealing* preferencial (Telenius *et al.* 1992), ja que semblava que determinades zones del genoma no s'amplificaven eficientment. L'error d'amplificació també podia deure's a que la DOP-PCR genera fragments de pes molecular menor, i es podria donar la circumstància de que les zones d'interès s'amplifiquessin en fragments petits que no permeten la posterior amplificació en la PCR fluorescent (Glentis *et al.* 2009).

La següent aproximació va ser amb la metodologia de GenomePlex (Sigma Aldrich), que alguns autors havien testat en cèl·lules aïllades obtenint bons resultats tant en arrays de CGH com amb la CGH convencional (Fiegler *et al.* 2007; Geigl i Speicher 2007). En l'anàlisi monogènica es van obtenir taxes de no amplificació i d'ADO del 36,4% i 30,5% respectivament. Durant l'anàlisi citogenètica amb la CGH, en línies cel·lulars amb alteracions conegudes també es van detectar alteracions artefactuals variables. Es van assajar diferents variacions en les metodologies de lisi cel·lular utilitzant diferents agents químics i temperatures, també es va augmentar la temperatura de desnaturalització del DNA, i augmentar el temps de fragmentació i d'amplificació, així com purificar els productes de DNA amplificat resultants, però cap d'aquestes actuacions va donar bons resultats, i per tant també es va descartar.

La publicació d'un treball sobre l'ús de la MDA aplicada a la CGH convencional utilitzant un kit denominat *Repli-g Midi* (Qiagen), va fer renovar l'intenció d'utilitzar aquesta metodologia utilitzant un kit diferent (Keskintepe *et al.* 2007). En cap ocasió es va aconseguir que en el nostre laboratori mostra i control hibridessin sobre les metafases de manera homogènia, es van variar els protocols de marcatge per obtenir la sonda però tampoc es van obtenir els resultats desitjats. El fet de que aplicant aquesta metodologia, en l'estudi de Keskintepe, es detectessin taxes d'aneuploidia especialment altes, comparades amb altres estudis, podria haver estat degut al fet que la tècnica generés alteracions artefactuals.

Per últim, amb l'ús dels sistemes d'amplificació PicoPlex™ i Sureplex es van obtenir unes taxes d'amplificació i d'ADO del 94,8% i 4,4% respectivament. A més, pel que fa

a l'estudi citogenètic mitjançant la CGH ràpida els resultats van ser excel·lents en les 30 cèl·lules de línies cel·lulars amb alteracions cromosòmiques conegudes. Totes elles van poder ser cariotipades i en cap cas es van identificar desequilibris cromosòmics o estructurals artefactuals. El producte obtingut per amplificació de tot el genoma a partir d'una sola cèl·lula amb aquesta metodologia, ha permès la seva aplicació al diagnòstic directe i indirecte de mutacions així com a l'estudi citogenètic amb CGH. Aquesta opció va permetre oferir una nova metodologia per realitzar el DF-DGP a partir de la biòpsia d'un sol blastòmer a famílies candidates.

5.2.2.2.- Aplicacions clíniques del DF-DGP en un blastòmer

El DF-DGP a partir de la biòpsia d'un sol blastòmer s'ha aplicat a 5 famílies 4 d'elles portadores de fibrosi quística (herència recessiva), i una amb risc de poliquistosi renal (herència dominant).

Tenint en compte el total de famílies es va amplificar el DNA cel·lular en el 96,2% dels blastòmers biopsiats (50 de 52) utilitzant el kit Picoplex/Sureplex. L'absència d'amplificació en els blastòmers restants probablement sigui atribuïble a que es tractés de fragments i no de blastòmers o a que el seu DNA estès degradat ja que amb aquesta metodologia s'obtenen molt bones taxes d'amplificació.

En aquest treball la taxa de diagnòstic per la malaltia monogènica ha estat del 74% (37 dels 50 blastòmers amplificats) força inferior a la obtinguda utilitzant la iMDA.

L'explicació més possible d'aquest fet és que la qualitat del DNA de partida no fos òptima, produint una taxa d'ADO especialment elevada com a conseqüència de la mala amplificació dels fragments d'interès en el pas d'amplificació del genoma que podria haver afectat a les posteriors PCRs. També cal tenir en compte que la mida mostral és molt reduïda. Tot i així, les diferències entre les taxes d'amplificació i d'ADO entre la posada a punt (94,8% i 4,4%) i les aplicacions clíniques (74,7% i 27,7%) són destacables i siguin probablement degudes a factors intrínsecs de la cèl·lula més que a limitacions de la tècnica.

En les aplicacions clíniques de fibrosi quística es van utilitzar entre 3 i 5 STRs lligats a la mutació per poder diagnosticar la malaltia de manera directa i indirecta. En el cas de PKD, la mutació no s'havia pogut identificar, i per tant es va realitzar el diagnòstic de manera indirecta utilitzant 6 STRs i col·locats a ambdós costats del gen PKD1. Les

taxes d'ADO en la optimització dels protocols van ser del 4,4% de mitja. Pel que fa a les aplicacions clíniques va ser força més elevat arribant fins al 27,7%.

Pel que fa a l'estudi citogenètic amb la CGH ràpida l'èxit diagnòstic ha estat del 98% (49 dels 50 embrions processats), un valor lleugerament superior a l'obtingut amb la DOP-PCR. va donar resultats fiables per a 49 dels 50 embrions, obtenint una eficiència diagnòstica del 98%. L'absència de diagnòstic sigui deguda probablement a una degradació del DNA cel·lular que va produir hibridacions de mala qualitat en la que els perfils no es van poder considerar.

La taxa d'aneuploidia dels blastòmers estudiats va ser del 63,3%. Aquesta freqüència és molt similar al 62,2% trobat en el DF-DGP de dos blastòmers, fet que dona consistència al procediment desenvolupat i als resultats obtinguts tot i el reduït nombre de casos. Les possibles diferències comparant les dades amb altres estudis ja s'han discutit en l'apartat 5.2.1.

L'anàlisi citogenètica completa ha permès identificar en el 28,6% dels embrions, la presència de desequilibris segmentals. Aquesta incidència és una mica més elevada que la detectada en l'aplicació del DF-PGD de dos blastòmers. El possible increment d'aquestes alteracions estructurals en comparació a l'estudi anterior, on es descrivien unes taxes del 21,6% podria deure's a diferències inherents a cadascun dels sistemes d'amplificació del genoma cel·lular emprats, essent una més sensible que l'altra, augmentant de manera important els canvis deguts a l'estadi replicatiu de la cèl·lula.

Com s'ha comentat anteriorment en l'apartat 5.2.1, s'han observat alguns resultats que han permès relacionar els diagnòstics citogenètics amb els resultats monogènics. En aquest cas però, a diferència del que s'ha comentat en l'apartat XXXXX, cal tenir en compte que els resultats s'han obtingut a partir del mateix blastòmer biopsiat.

Pel que fa al diagnòstic de les famílies de fibrosi quística en l'embrió H'8, es va detectar un guany del cromosoma 7, com que en l'anàlisi monogènica no s'havia observat res especial, detectant els pics corresponents a la presència d'un al·lel matern i un de patern, se'n pot deduir que l'aneuploidia detectada s'hauria generat en l'embrió, evidenciant la presència de mosaïcisme embrionari. L'embrió K15, va presentar només els pics corresponents a un l'al·lel sa, concretament el patern, per tant es va poder diagnosticar com a no afectat de la malaltia, ja que al tractar-se d'una malaltia recessiva

i havent detectat un al·lel sa, podia ser portador o homozigot sa, però en cap cas afectat. Aquest fet es va relacionar després amb l'anàlisi de la CGH que mostrava una pèrdua del cromosoma 7, en aquest cas el d'origen matern.

En el cas de la malaltia PKD, es van detectar dues situacions que val la pena comentar. En primer lloc en l'embrió J7, es van observar els pics corresponents a l'al·lel matern però cap corresponent al pare, tot i així al tractar-se d'una malaltia dominant es va catalogar l'embrió com a afectat i es va descartar. Posteriorment, en l'anàlisi citogenètica es va detectar una pèrdua del cromosoma 16, en aquest cas el d'origen patern, però no es va poder discernir si es tractava d'un error preexistent en l'espermatozoide o bé generat en el propi embrió. En segon lloc, l'embrió J10, no es va poder diagnosticar, perquè no es va detectar cap dels 6 STRs estudiats de cap dels dos progenitors. En el posterior anàlisi i interpretació de la CGH, es va detectar una pèrdua del cromosoma 16, aquesta però, mostrava un perfil molt més accentuat que en els altres perfils de cromosomes perduts presents en la mateixa cèl·lula, per tant es va interpretar que l'embrió J10 tenia una nul·lisomia del cromosoma 16. Posteriorment, en la revisió de resultats es van poder relacionar aquests dos fets.

En tots aquells casos en que els embrions no es van poder diagnosticar per la malaltia monogènica, es va recomanar fer una biòpsia de trofoectoderm i criopreservar-los. Aquest procediment va ser possible en 3 embrions, ja que els altres no diagnosticats, no van arribar a estadi de blastocist, un d'ells va ser diagnosticat com a sa i euploide i va ser criopreservat. Aquesta estratègia de biopsiar el trofoectoderm, es podria considerar com una alternativa a seguir en cas de que els embrions que no hagin estat diagnosticats arribin a l'estadi de blastocist.

Considerant el DF-DGP en termes generals, dels 24 embrions no afectats de les malalties monogèniques dels que es va tenir diagnòstic citogenètic, un 41,7% eren aneuploides. Si haguessin estat transferits molt probablement no haurien pogut implantar ni donat lloc al naixement d'individus sans. Dels 8 embrions transferits amb el DF-DGP favorable 3 van implantar (37,5%): un d'ells està en el tercer trimestre de gestació i dos van ser embarassos bioquímics. Ja que cap dels casos ha donat lloc a un naixement, comparant les taxes de batec cardíac s'ha obtingut una taxa del 12,5% (batec cardíac/embrió transferit), que és inferior a la descrita per l'ESHRE de 15,3% (Goossens *et al.* 2012). Cal però ampliar la sèrie per donar valor o no a aquestes diferències. Tanmateix la freqüència de naixements a partir d'embrions transferits és

inferior al 27,3% de naixements/embrió transferit que s'aconseguia amb el DF-DGP fent biòpsia i anàlisi de dos blastòmers per embrió. Aquest fet, tot i que es tracta de sèries molt petites, està apuntant a que si bé la biòpsia d'un blastòmer és la opció més desitjable, la biòpsia de dos blastòmers, si es realitza tan sols en embrions evolutius de bona qualitat, no sembla que tingui conseqüències dràstiques pel que fa a la viabilitat ni en el potencial d'implantació de l'embrió.

Pel que fa al reanàlisi dels casos en que es va aconseguir embaràs es van amplificar els embrions sencers ja que degut al seu estadi de desenvolupament no es podien individualitzar les seves cèl·lules. El reanàlisi de l'embrió F''4 va confirmar el diagnòstic citogenètic: 45, XX -16. El de l'embrió F''5 va posar de nou en evidència l'efecte del mosaïcisme ja que mentre en el blastòmer s'havia obtingut un elevat nombre d'alteracions numèriques i desequilibris estructurals l'embrió complet reanalitzat va donar un resultat de 46, XY probablement evidenciant que les alteracions es van generar durant les divisions mitòtiques embrionàries generant un embrió mosaic.

De l'embrió F''7 es va biopsiar un blastòmer que es va lissar en el moment de la biòpsia, posteriorment no es va obtenir amplificació del genoma cel·lular i no es va poder diagnosticar. Com que no va arribar a l'estadi de blastocist per poder biopsiar el trofoectoderm i analitzar-lo es va estudiar amb els altres embrions descartats. Finalment, va ser diagnosticat com a euploide i afectat de fibrosi quística.

Considerant totes les dades obtingudes en la totalitat d'aquest estudi aplicant el DF-DGP, tant biopsiant un com dos blastòmers, s'ha obtingut una mitjana de naixements per embrió transferit del 21%. Aquestes dades es poden comparar amb el 15,3% de naixements per embrió transferit en els cicles de PGD recollides per l'ESHRE. Amb les dues metodologies de DF-DGP aplicades s'ha continuat tenint les limitacions de la utilització d'un sol blastòmer per al diagnòstic. També es pot considerar l'opció d'aplicar aquesta metodologia a biòpsia de trofoectoderm, amb l'avantatge de disposar de més d'una cèl·lula i més temps per realitzar el diagnòstic, però amb l'inconvenient d'haver de criopreservar els embrions, minvant així la seva viabilitat.

5.3.- Perspectives de futur del DGP

Els procediments de DF-DGP desenvolupats en aquest treball evidencien la seva validesa per diagnosticar els embrions citogenèticament i per identificar alteracions de cromosomes sencers i de fragments cromosòmics per tal de seleccionar aquells més favorables per la implantació.

Darrerament, s'han posat a punt metodologies més universals com el Karyomapping que permeten realitzar l'anàlisi de malalties monogèniques, i alhora detectar desequilibris cromosòmics mitjançant els *microarrays* de SNPs (Handyside *et al.* 2010). Aquesta metodologia s'aplica després d'amplificar el DNA cel·lular també mitjançant Sureplex, tot i ser una bona alternativa al DF-DGP, el cost de l'equipament i els reactius per mostra és força més elevat. Aquest procediment també requereix el genotipat dels membres de la parella amb el mateix sistema, fet que també comporta un increment dels costos.

Actualment, es disposa de noves metodologies com els *microarrays* de CGH, alternatius a la CGH sobre cromosomes metafàsics que també permeten l'estudi citogenètic complet dels embrions d'una manera molt eficient i segura. Aquestes metodologies podrien suposar un avantatge pel que fa a l'estandardització de la metodologia i al menor requeriment de personal per dur-les a terme (Hu *et al.* 2004; Le Caignec *et al.* 2006; Hellani *et al.* 2008; Vanneste *et al.* 2009).

Ambdós sistemes universals esmentats basats en els *microarrays* tant de CGH com de SNPs presenten una gran potencialitat, però de moment, com ja s'ha explicat, requereixen grans inversions tant per a l'equipament com per als reactius utilitzats. Cal esperar però a analitzar els resultats d'estudis aleatoritzats que s'estan duent a terme per avaluar la seva eficiència i procedir a la seva estandardització, ja que en alguns casos la seva interpretació és problemàtica (Geraedts *et al.* 2010).

Per això els procediments desenvolupats en aquesta tesi representen una eina vàlida que no requereix fer una inversió tan elevada pel que fa a equipament ni tampoc per als reactius i que es podria dur a terme en qualsevol centre de reproducció o laboratori de genètica molecular per ser aplicada al doble anàlisi de malalties monogèniques i aneuploidies en parelles candidates, seleccionant no tan sols els embrions sans per a les malalties familiars sinó també cromosòmicament euploides.

Conclusions

6. Conclusions

1.- Per primera vegada s'ha dut a terme un estudi citogenètic complet d'òcits immadurs mitjançant la CGH que ha permès diagnosticar alteracions cromosòmiques, detectant aneuploïdies i desequilibris segmentals que tenen lloc abans de l'etapa de la meiosi i permetent elucidar la rellevància d'aquest fenomen.

2.- Independentment de l'edat i del grau de fertilitat, les aneuploïdies d'origen femení pre-meiotic afecten aproximadament a un 15.9% dels òcits estudiats, afectant a un terç de les dones de l'estudi.

3.- L'origen de les aneuploïdies o desequilibris segmentals originades en estadis embrionaris estarien relacionades amb les etapes d'activa proliferació cel·lular que justificaria una extrema inestabilitat genètica.

4.- Els òcits anòmals originats en estadis pre-meiotics no comporten un risc reproductiu directe ja que molts d'ells no arribaran a madurar ni seran fecundats.

5.- L'aplicació del diagnòstic directe mitjançant la miniseqüenciació i anàlisi de mida de fragments i indirecte mitjançant STRs lligats a la mutació genera protocols de detecció monogènica robustos per a ser aplicats al DF-DGP.

6.- S'ha aplicat amb èxit una aproximació al DF-DGP en famílies portadores de malalties monogèniques analitzant la malaltia monogènica i tot el complement cromosòmic de l'embrió partint del DNA amplificat de cadascun dels dos blastòmers biopsiats per embrió, obtenint unes taxes de naixement del 27,3%.

7.- S'ha aconseguit desenvolupar una aproximació al DF-DGP per diagnosticar els embrions a partir de la biòpsia d'un sol blastòmer, analitzant la malaltia monogènica i tot el complement cromosòmic partint del DNA amplificat de la mateixa cèl·lula.

8.- S'han aplicat clínicament ambdues metodologies de DF-DGP obtenint resultats diagnòstics del 89.1% i del 71,1% respectivament, per a diferents malalties monogèniques.

9.- Per primera vegada a l'estat espanyol s'ha dut a terme el diagnòstic genètic preimplantacional per a famílies portadores de Síndrome de Lynch i anirídia combinant-lo, a més, amb l'estudi citogenètic complet dels blastòmers.

10.- Les dues aproximacions al DF-DGP biopsiant un o dos blastòmers de cada embrió, permeten el diagnòstic i la transferència dels embrions sans, en el mateix cicle de FIV evitant la seva criopreservació.

11.- Les aproximacions al DF-DGP proposades són aplicables a cicles de FIV amb DGP i requereixen una bona formació i coordinació dels equips implicats.

Bibliografia

7. Bibliografia

- Abdalla, H. I., G. Burton, A. Kirkland, M. R. Johnson, T. Leonard, A. A. Brooks and J. W. Studd (1993). "Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors." *Hum Reprod* 8(9): 1512-1517.
- Abou-Sleiman, P. M., A. Apessos, J. C. Harper, P. Serhal and J. D. Delhanty (2002). "Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis for Crouzon syndrome." *Mol Hum Reprod* 8(3): 304-309.
- Angell, R. R. (1991). "Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man." *Hum Genet* 86(4): 383-387.
- Baart, E. B., E. Martini, I. van den Berg, N. S. Macklon, R. J. Galjaard, B. C. Fauser and D. Van Opstal (2006). "Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF." *Hum Reprod* 21(1): 223-233.
- Baker, T. G. (1963). "A Quantitative and Cytological Study of Germ Cells in Human Ovaries." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158: 417-433.
- Bartmann, A. K., G. S. Romao, S. Ramos Eda and R. A. Ferriani (2004). "Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria." *J Assist Reprod Genet* 21(3): 79-83.
- Battaglia, D. E., N. A. Klein and M. R. Soules (1996). "Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte." *Mol Hum Reprod* 2(11): 845-851.
- Bickel, S. E., T. L. Orr-Weaver and E. M. Balicky (2002). "The sister-chromatid cohesion protein ORD is required for chiasma maintenance in *Drosophila* oocytes." *Curr Biol* 12(11): 925-929.
- Bolton, V. N., M. E. Wren and J. H. Parsons (1991). "Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts." *Fertil Steril* 55(4): 830-832.
- Buonomo, S. B., R. K. Clyne, J. Fuchs, J. Loidl, F. Uhlmann and K. Nasmyth (2000). "Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin." *Cell* 103(3): 387-398.
- Burlet, P., N. Frydman, N. Gigarel, V. Kerbrat, G. Tachdjian, E. Feyereisen, J. P. Bonnefont, R. Frydman, A. Munnich and J. Steffann (2006). "Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome." *Mol Hum Reprod* 12(10): 647-652.
- Cozzi, J., C. M. Conn, J. Harper, R. M. Winston, M. Rindl, P. A. Farndon and J. D. Delhanty (1999). "A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception." *Hum Genet* 104(1): 23-28.
- Cupisti, S., C. M. Conn, E. Fragouli, K. Whalley, J. A. Mills, M. J. Faed and J. D. Delhanty (2003). "Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms." *Prenat Diagn* 23(8): 663-668.
- De Boer, S. M., C. Murray, RPS Jansen (2002). "First live birth following blastocyst biopsy and PGD analysis." *Reprod Biomed Online* 4(Supplement 2): 35.
- De Rycke, M., I. Georgiou, K. Sermon, W. Lissens, P. Henderix, H. Joris, P. Platteau, A. Van Steirteghem and I. Liebaers (2005). "PGD for autosomal dominant polycystic kidney disease type 1." *Mol Hum Reprod* 11(1): 65-71.
- Dean, F. B., S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A. F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm and R. S. Lasken

- (2002). "Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5261-5266.
- Delhanty, J. D., J. C. Harper, A. Ao, A. H. Handyside and R. M. Winston (1997). "Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients." *Hum Genet* 99(6): 755-760.
- Dokras, A., I. L. Sargent, C. Ross, R. L. Gardner and D. H. Barlow (1990). "Trophectoderm biopsy in human blastocysts." *Hum Reprod* 5(7): 821-825.
- Estop, A. M., C. Marquez, S. Munne, J. Navarro, K. Ciepely, V. Van Kirk, M. R. Martorell, J. Benet and C. Templado (1995). "An analysis of human sperm chromosome breakpoints." *Am J Hum Genet* 56(2): 452-460.
- Fiegler, H., J. B. Geigl, S. Langer, D. Rigler, K. Porter, K. Unger, N. P. Carter and M. R. Speicher (2007). "High resolution array-CGH analysis of single cells." *Nucleic Acids Res* 35(3): e15.
- Findlay, I., P. Ray, P. Quirke, A. Rutherford and R. Lilford (1995). "Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis." *Hum Reprod* 10(6): 1609-1618.
- Fiorentino, F., A. Biricik, A. Nuccitelli, R. De Palma, S. Kahraman, M. Iacobelli, V. Trengia, D. Caserta, M. A. Bonu, A. Borini and M. Baldi (2006). "Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders." *Hum Reprod* 21(3): 670-684.
- Fiorentino, F., M. C. Magli, D. Podini, A. P. Ferraretti, A. Nuccitelli, N. Vitale, M. Baldi and L. Gianaroli (2003). "The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders." *Mol Hum Reprod* 9(7): 399-410.
- Fragouli, E., S. Alfarawati, N. N. Goodall, J. F. Sanchez-Garcia, P. Colls and D. Wells (2011). "The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy." *Mol Hum Reprod*.
- Fragouli, E., A. Escalona, C. Gutierrez-Mateo, S. Tormasi, S. Alfarawati, S. Sepulveda, L. Noriega, J. Garcia, D. Wells and S. Munne (2009). "Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors." *Reprod Biomed Online* 19(2): 228-237.
- Fragouli, E., D. Wells, A. Thornhill, P. Serhal, M. J. Faed, J. C. Harper and J. D. Delhanty (2006a). "Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies." *Hum Reprod* 21(9): 2319-2328.
- Fragouli, E., D. Wells, K. M. Whalley, J. A. Mills, M. J. Faed and J. D. Delhanty (2006b). "Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies." *Cytogenet Genome Res* 114(1): 30-38.
- Franchitto, A. and P. Pichierri (2011). "Understanding the molecular basis of common fragile sites instability: role of the proteins involved in the recovery of stalled replication forks." *Cell Cycle* 10(23): 4039-4046.
- Garcia, M., A. J. Dietrich, L. Freixa, A. C. Vink, M. Ponsa and J. Egozcue (1987). "Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy." *Hum Genet* 77(3): 223-232.
- Geigl, J. B. and M. R. Speicher (2007). "Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis." *Nat Protoc* 2(12): 3173-3184.

- Geraedts, J., J. Collins, L. Gianaroli, V. Goossens, A. Handyside, J. Harper, M. Montag, S. Repping and A. Schmutzler (2010). "What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach!" *Hum Reprod* 25(3): 575-577.
- Gianaroli, L., M. C. Magli, A. P. Ferraretti and S. Munne (1999). "Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed." *Fertil Steril* 72(5): 837-844.
- Glentis, S., S. SenGupta, A. Thornhill, R. Wang, I. Craft and J. C. Harper (2009). "Molecular comparison of single cell MDA products derived from different cell types." *Reprod Biomed Online* 19(1): 89-98.
- Goossens, V., K. Sermon, W. Lissens, M. De Rycke, B. Saerens, A. De Vos, P. Henderix, H. Van de Velde, P. Platteau, A. Van Steirteghem, P. Devroey and I. Liebaers (2003). "Improving clinical preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis by duplex PCR using two polymorphic markers or one polymorphic marker in combination with the detection of the DeltaF508 mutation." *Mol Hum Reprod* 9(9): 559-567.
- Goossens, V., J. Traeger-Synodinos, E. Coonen, M. De Rycke, C. Moutou, T. Pehlivan, I. A. Derks-Smeets and G. Harton (2012). "ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009." *Hum Reprod* 27(7): 1887-1911.
- Grifo, J. A., Y. X. Tang, S. Munne, M. Alikani, J. Cohen and Z. Rosenwaks (1994). "Healthy deliveries from biopsied human embryos." *Hum Reprod* 9(5): 912-916.
- Gutierrez-Mateo, C., J. Benet, H. Starke, M. Oliver-Bonet, S. Munne, T. Liehr and J. Navarro (2005). "Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH, a new 24-colour centromere-specific technique." *Hum Reprod* 20(12): 3395-3401.
- Gutierrez-Mateo, C., J. Benet, D. Wells, P. Colls, M. G. Bermudez, J. F. Sanchez-Garcia, J. Egozcue, J. Navarro and S. Munne (2004b). "Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis." *Hum Reprod* 19(12): 2859-2868.
- Gutierrez-Mateo, C., J. F. Sanchez-Garcia, J. Fischer, S. Tormasi, J. Cohen, S. Munne and D. Wells (2009). "Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: experience with more than 200 cycles conducted by a reference laboratory in the United States." *Fertil Steril* 92(5): 1544-1556.
- Gutierrez-Mateo, C., D. Wells, J. Benet, J. F. Sanchez-Garcia, M. G. Bermudez, I. Belil, J. Egozcue, S. Munne and J. Navarro (2004a). "Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes." *Hum Reprod* 19(9): 2118-2125.
- Handyside, A. H., G. L. Harton, B. Mariani, A. R. Thornhill, N. Affara, M. A. Shaw and D. K. Griffin (2010). "Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes." *J Med Genet* 47(10): 651-658.
- Handyside, A. H., E. H. Kontogianni, K. Hardy and R. M. Winston (1990). "Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification." *Nature* 344(6268): 768-770.
- Handyside, A. H., M. Montag, M. C. Magli, S. Repping, J. Harper, A. Schmutzler, K. Vesela, L. Gianaroli and J. Geraedts (2012). "Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation." *Eur J Hum Genet* 20(7): 742-747.

- Handyside, A. H., M. D. Robinson, R. J. Simpson, M. B. Omar, M. A. Shaw, J. G. Grudzinkas and A. Rutherford (2004). "Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease." *Mol Hum Reprod* 10(10): 767-772.
- Hardarson, T., C. Hanson, K. Lundin, T. Hillensjo, L. Nilsson, J. Stevic, E. Reismer, K. Borg, M. Wikland and C. Bergh (2008). "Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial." *Hum Reprod* 23(12): 2806-2812.
- Harper, J. C. and J. D. Delhanty (2000). "Preimplantation genetic diagnosis." *Curr Opin Obstet Gynecol* 12(2): 67-72.
- Hassold, T., N. Chen, J. Funkhouser, T. Jooss, B. Manuel, J. Matsuura, A. Matsuyama, C. Wilson, J. A. Yamane and P. A. Jacobs (1980). "A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions." *Ann Hum Genet* 44(Pt 2): 151-178.
- Hassold, T. and P. Hunt (2009). "Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew." *Curr Opin Pediatr* 21(6): 703-708.
- Hassold, T. J. (1980). "A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions." *Am J Hum Genet* 32(5): 723-730.
- Hellani, A., K. Abu-Amero, J. Azouri and S. El-Akoum (2008). "Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening." *Reprod Biomed Online* 17(6): 841-847.
- Hellani, A., S. Coskun, M. Benkhalifa, A. Tbakhi, N. Sakati, A. Al-Odaib and P. Ozand (2004). "Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications." *Mol Hum Reprod* 10(11): 847-852.
- Hu, D. G., G. Webb and N. Hussey (2004). "Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization." *Mol Hum Reprod* 10(4): 283-289.
- Hughes, S., N. Arneson, S. Done and J. Squire (2005). "The use of whole genome amplification in the study of human disease." *Prog Biophys Mol Biol* 88(1): 173-189.
- Hulten, M. A., S. Patel, J. Jonasson and E. Iwarsson (2010). "On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model." *Reproduction* 139(1): 1-9.
- Hulten, M. A., S. D. Patel, M. Tankimanova, M. Westgren, N. Papadogiannakis, A. M. Jonsson and E. Iwarsson (2008). "On the origin of trisomy 21 Down syndrome." *Mol Cytogenet* 1: 21.
- Hunt, P. A. and T. J. Hassold (2008). "Human female meiosis: what makes a good egg go bad?" *Trends Genet* 24(2): 86-93.
- Jacobs, P. A. (1992). "The chromosome complement of human gametes." *Oxf Rev Reprod Biol* 14: 47-72.
- Jacobs, P. A. and T. J. Hassold (1995). "The origin of numerical chromosome abnormalities." *Adv Genet* 33: 101-133.
- Kanavakis, E., C. Vrettou, G. Palmer, M. Tzetis, M. Mastrominas and J. Traeger-Synodinos (1999). "Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting beta-thalassaemia major: clinical experience including the initiation of six singleton pregnancies." *Prenat Diagn* 19(13): 1217-1222.
- Keskintepe, L., G. Sher and M. Keskintepe (2007). "Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization." *Reprod Biomed Online* 15(3): 303-309.

- Kokkali, G., C. Vrettou, J. Traeger-Synodinos, G. M. Jones, D. S. Cram, D. Stavrou, A. O. Trounson, E. Kanavakis and K. Pantos (2005). "Birth of a healthy infant following trophoctoderm biopsy from blastocysts for PGD of beta-thalassaemia major." *Hum Reprod* 20(7): 1855-1859.
- Krey, L. C. and J. A. Grifo (2001). "Poor embryo quality: The answer lies (mostly) in the egg." *Fertil Steril* 75(3): 466-468.
- Kuliev, A., S. Rechitsky, K. Laziuk, O. Verlinsky, I. Tur-Kaspa and Y. Verlinsky (2006). "Pre-embryonic diagnosis for Sandhoff disease." *Reprod Biomed Online* 12(3): 328-333.
- Kuliev, A. and Y. Verlinsky (2008). "Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications." *Reprod Biomed Online* 16(4): 532-538.
- Lamb, N. E. and T. J. Hassold (2004). "Nondisjunction--a view from ringside." *N Engl J Med* 351(19): 1931-1934.
- Lamb, N. E., S. L. Sherman and T. J. Hassold (2005). "Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans." *Cytogenet Genome Res* 111(3-4): 250-255.
- Le Caignec, C., C. Spits, K. Sermon, M. De Rycke, B. Thienpont, S. Debrock, C. Staessen, Y. Moreau, J. P. Fryns, A. Van Steirteghem, I. Liebaers and J. R. Vermeesch (2006). "Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH." *Nucleic Acids Res* 34(9): e68.
- LeMaire-Adkins, R., K. Radke and P. A. Hunt (1997). "Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females." *J Cell Biol* 139(7): 1611-1619.
- Lledo, B., R. Bernabeu, J. Ten, F. M. Galan and L. Cioffi (2007). "Preimplantation genetic diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy with gender determination using multiple displacement amplification." *Fertil Steril* 88(5): 1327-1333.
- Lledo, B., J. Ten, F. M. Galan and R. Bernabeu (2006). "Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using multiple displacement amplification." *Fertil Steril* 86(4): 949-955.
- Los, F. J., D. Van Opstal and C. van den Berg (2004). "The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model." *Hum Reprod Update* 10(1): 79-94.
- Macklon, N. S., J. P. Geraedts and B. C. Fauser (2002). "Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss." *Hum Reprod Update* 8(4): 333-343.
- Mahmood, R., C. H. Brierley, M. J. Faed, J. A. Mills and J. D. Delhanty (2000). "Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception." *Hum Genet* 106(6): 620-626.
- Malmanche, N., A. Maia and C. E. Sunkel (2006). "The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis." *FEBS Lett* 580(12): 2888-2895.
- Mastenbroek, S., M. Twisk, J. van Echten-Arends, B. Sikkema-Raddatz, J. C. Korevaar, H. R. Verhoeve, N. E. Vogel, E. G. Arts, J. W. de Vries, P. M. Bossuyt, C. H. Buys, M. J. Heineman, S. Repping and F. van der Veen (2007). "In vitro fertilization with preimplantation genetic screening." *N Engl J Med* 357(1): 9-17.
- McArthur, S. J., D. Leigh, J. T. Marshall, A. J. Gee, K. A. De Boer and R. P. Jansen (2008). "Blastocyst trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic

- diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations." *Prenat Diagn* 28(5): 434-442.
- Meldrum, D. R. (1993). "Female reproductive aging--ovarian and uterine factors." *Fertil Steril* 59(1): 1-5.
- Montag, M., K. van der Ven, B. Rosing and H. van der Ven (2009). "Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening." *Reprod Biomed Online* 18 Suppl 1: 6-11.
- Morita, Y. and J. L. Tilly (1999). "Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass." *Dev Biol* 213(1): 1-17.
- Mrasek, K., C. Schoder, A. C. Teichmann, K. Behr, B. Franze, K. Wilhelm, N. Blaurock, U. Claussen, T. Liehr and A. Weise (2010). "Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones." *Int J Oncol* 36(4): 929-940.
- Munne, S., S. Chen, J. Fischer, P. Colls, X. Zheng, J. Stevens, T. Escudero, M. Oter, B. Schoolcraft, J. L. Simpson and J. Cohen (2005). "Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages." *Fertil Steril* 84(2): 331-335.
- Munne, S., C. Magli, J. Cohen, P. Morton, S. Sadowy, L. Gianaroli, M. Tucker, C. Marquez, D. Sable, A. P. Ferraretti, J. B. Massey and R. Scott (1999). "Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos." *Hum Reprod* 14(9): 2191-2199.
- Munne, S., M. Sandalinas, T. Escudero, E. Velilla, R. Walmsley, S. Sadowy, J. Cohen and D. Sable (2003). "Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy." *Reprod Biomed Online* 7(1): 91-97.
- Navidi, W. and N. Arnheim (1991). "Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis." *Hum Reprod* 6(6): 836-849.
- Nicolaidis, P. and M. B. Petersen (1998). "Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies." *Hum Reprod* 13(2): 313-319.
- Obradors, A., E. Fernandez, M. Oliver-Bonet, M. Rius, A. de la Fuente, D. Wells, J. Benet and J. Navarro (2008). "Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report." *Hum Reprod* 23(8): 1949-1956.
- Obradors, A., E. Fernandez, M. Rius, M. Oliver-Bonet, M. Martinez-Fresno, J. Benet and J. Navarro (2009). "Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening." *Fertil Steril* 91(3): 933 e931-937.
- Obradors, A., M. Rius, J. Cuzzi, G. Daina, C. Gutierrez-Mateo, A. Pujol, F. Marina, C. Marquez, J. Benet and J. Navarro (2010). "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* 93(2): 675-679.
- Obradors, A., M. Rius, G. Daina, L. Ramos, J. Benet and J. Navarro (2011). "Whole-chromosome aneuploidy analysis in human oocytes: focus on comparative genomic hybridization." *Cytogenet Genome Res* 133(2-4): 119-126.
- Obradors, A. R., M. Daina G, et al. (2011). "Double-Factor Preimplantation Genetic Diagnosis: preliminary results." *Human Genetic Diseases InTech*
- Pan, H., P. Ma, W. Zhu and R. M. Schultz (2008). "Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs." *Dev Biol* 316(2): 397-407.

- Pellestor, F., B. Andreo, F. Arnal, C. Humeau and J. Demaille (2002). "Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes." *Hum Reprod* 17(8): 2134-2145.
- Pellestor, F., B. Andreo, F. Arnal, C. Humeau and J. Demaille (2003). "Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes." *Hum Genet* 112(2): 195-203.
- Pellicer, A., C. Rubio, F. Vidal, Y. Minguez, C. Gimenez, J. Egozcue, J. Remohi and C. Simon (1999). "In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos." *Fertil Steril* 71(6): 1033-1039.
- Piyamongkol, W., M. G. Bermudez, J. C. Harper and D. Wells (2003). "Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis." *Mol Hum Reprod* 9(7): 411-420.
- Platteau, P., C. Staessen, A. Michiels, A. Van Steirteghem, I. Liebaers and P. Devroey (2006). "Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening?" *Reprod Biomed Online* 12(3): 334-339.
- Pujol, A., I. Boiso, J. Benet, A. Veiga, M. Durban, M. Campillo, J. Egozcue and J. Navarro (2003). "Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies." *Eur J Hum Genet* 11(4): 325-336.
- Ray, P. F., A. Ao, D. M. Taylor, R. M. Winston and A. H. Handyside (1998). "Assessment of the reliability of single blastomere analysis for preimplantation diagnosis of the delta F508 deletion causing cystic fibrosis in clinical practice." *Prenat Diagn* 18(13): 1402-1412.
- Rechitsky, S., O. Verlinsky, T. Amet, M. Rechitsky, T. Kouliev, C. Strom and Y. Verlinsky (2001). "Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders." *Mol Cell Endocrinol* 183 Suppl 1: S65-68.
- Ren, Z., H. T. Zeng, Y. W. Xu, G. L. Zhuang, J. Deng, C. Zhang and C. Q. Zhou (2009). "Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification." *Fertil Steril* 91(2): 359-364.
- Renwick, P. J., J. Trussler, E. Ostad-Saffari, H. Fassihi, C. Black, P. Braude, C. M. Ogilvie and S. Abbs (2006). "Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping--a paradigm shift for embryo diagnosis." *Reprod Biomed Online* 13(1): 110-119.
- Rius, M., G. Daina, A. Obradors, L. Ramos, E. Velilla, S. Fernandez, O. Martinez-Passarell, J. Benet and J. Navarro (2011). "Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization." *Fertil Steril* 95(1): 413-416.
- Rius, M., A. Obradors, G. Daina, J. Cuzzi, L. Marques, G. Calderon, E. Velilla, O. Martinez-Passarell, M. Oliver-Bonet, J. Benet and J. Navarro (2010). "Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application." *Hum Reprod* 25(7): 1824-1835.
- Robles, P., I. Roig, R. Garcia, A. Ortega, J. Egozcue, L. L. Cabero and M. Garcia (2007). "Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements." *Reproduction* 133(5): 899-907.

- Roeder, G. S. and J. M. Bailis (2000). "The pachytene checkpoint." *Trends Genet* 16(9): 395-403.
- Roig, I., P. Robles, R. Garcia, M. Martin, J. Egozcue, L. Cabero, S. Barambio and M. Garcia (2005). "Evolution of the meiotic prophase and of the chromosome pairing process during human fetal ovarian development." *Hum Reprod* 20(9): 2463-2469.
- Rubio, C., C. Simon, F. Vidal, L. Rodrigo, T. Pehlivan, J. Remohi and A. Pellicer (2003). "Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples." *Hum Reprod* 18(1): 182-188.
- Sachs, E. S., M. G. Jahoda, F. J. Los, L. Pijpers and J. W. Wladimiroff (1990). "Trisomy 21 mosaicism in gonads with unexpectedly high recurrence risks." *Am J Med Genet Suppl* 7: 186-188.
- Sandalinas, M., C. Marquez and S. Munne (2002). "Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes." *Mol Hum Reprod* 8(6): 580-585.
- Sauer, M. V., R. J. Paulson and R. A. Lobo (1996). "Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older." *Hum Reprod* 11(11): 2540-2543.
- Schoolcraft, W. B., E. Fragouli, J. Stevens, S. Munne, M. G. Katz-Jaffe and D. Wells (2010). "Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage." *Fertil Steril* 94(5): 1700-1706.
- Sher, G., L. Keskinetepe, M. Keskinetepe, M. Ginsburg, G. Maassarani, T. Yakut, V. Baltaci, D. Kotze and E. Unsal (2007). "Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study." *Fertil Steril* 87(5): 1033-1040.
- Sher, G., L. Keskinetepe, M. Keskinetepe, G. Maassarani, D. Tortoriello and S. Brody (2009). "Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages." *Fertil Steril* 92(6): 1886-1894.
- Short (1978). "When a conception fails to become a pregnancy." *Ciba Fund Symp* 64: 377-394.
- Snabes, M. C., S. S. Chong, S. B. Subramanian, K. Kristjansson, D. DiSepio and M. R. Hughes (1994). "Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13): 6181-6185.
- Somprasit, C., M. Aguinaga, P. L. Cisneros, S. Torsky, S. A. Carson, J. E. Buster, P. Amato, S. L. McAdoo, J. L. Simpson and F. Z. Bischoff (2004). "Paternal gonadal mosaicism detected in a couple with recurrent abortions undergoing PGD: FISH analysis of sperm nuclei proves valuable." *Reprod Biomed Online* 9(2): 225-230.
- Speed, R. M. (1985). "The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy." *Hum Genet* 69(1): 69-75.
- Speed, R. M. (1988). "The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes." *Hum Genet* 78(3): 260-266.
- Spits, C. and K. Sermon (2009). "PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology." *Prenat Diagn* 29(1): 50-56.
- Staessen, C., P. Platteau, E. Van Assche, A. Michiels, H. Tournaye, M. Camus, P. Devroey, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2004). "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 Reprod* 19(12): 2849-2858.
- Staessen, C., W. Verpoest, P. Donoso, P. Haentjens, J. Van der Elst, I. Liebaers and P. Devroey (2008). "Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer." *Hum Reprod* 23(12): 2818-2825.
- Tease, C., G. Hartshorne and M. Hulten (2006). "Altered patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes with asynapsis and/or synaptonemal complex fragmentation at pachytene." *Reprod Biomed Online* 13(1): 88-95.
- Telenius, H., N. P. Carter, C. E. Bebb, M. Nordenskjold, B. A. Ponder and A. Tunnacliffe (1992). "Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer." *Genomics* 13(3): 718-725.
- Templado, C., M. Bosch and J. Benet (2005). "Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa." *Cytogenet Genome Res* 111(3-4): 199-205.
- Thornhill, A. R. and K. Snow (2002). "Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis." *J Mol Diagn* 4(1): 11-29.
- Van de Velde, H., A. De Vos, K. Sermon, C. Staessen, M. De Rycke, E. Van Assche, W. Lissens, M. Vandervorst, H. Van Ranst, I. Liebaers and A. Van Steirteghem (2000). "Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis." *Prenat Diagn* 20(13): 1030-1037.
- Vanneste, E., T. Voet, C. Le Caignec, M. Ampe, P. Konings, C. Melotte, S. Debrock, M. Amyere, M. Vikkula, F. Schuit, J. P. Fryns, G. Verbeke, T. D'Hooghe, Y. Moreau and J. R. Vermeesch (2009). "Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos." *Nat Med* 15(5): 577-583.
- Vanneste, E., T. Voet, C. Melotte, S. Debrock, K. Sermon, C. Staessen, I. Liebaers, J. P. Fryns, T. D'Hooghe and J. R. Vermeesch (2009). "What next for preimplantation genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis for the low success rate." *Hum Reprod* 24(11): 2679-2682.
- Veiga, A., M. Sandalinas, M. Benkhalifa, M. Boada, M. Carrera, J. Santalo, P. N. Barri and Y. Menezo (1997). "Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human." *Zygote* 5(4): 351-354.
- Verlinsky, Y., J. Cieslak, V. Ivakhnenko, A. Lifchez, C. Strom and A. Kuliev (1996). "Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group." *Fertil Steril* 66(1): 126-129.
- Verlinsky, Y., A. Handyside, J. Grifo, S. Munne, J. Cohen, I. Liebers, G. Levinson, N. Arnheim, M. Hughes, J. Delhanty and et al. (1994). "Preimplantation diagnosis of genetic and chromosomal disorders." *J Assist Reprod Genet* 11(5): 236-243.
- Verlinsky, Y., S. Rechitsky, J. Cieslak, V. Ivakhnenko, G. Wolf, A. Lifchez, B. Kaplan, J. Moise, J. Walle, M. White, N. Ginsberg, C. Strom and A. Kuliev (1997). "Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body." *Biochem Mol Med* 62(2): 182-187.
- Voet, T., E. Vanneste, N. Van der Aa, C. Melotte, S. Jackmaert, T. Vandendael, M. Declercq, S. Debrock, J. P. Fryns, Y. Moreau, T. D'Hooghe and J. R. Vermeesch

- (2011). "Breakage-fusion-bridge cycles leading to inv dup del occur in human cleavage stage embryos." *Hum Mutat* 32(7): 783-793.
- Vogt, E., M. Kirsch-Volders, J. Parry and U. Eichenlaub-Ritter (2008). "Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error." *Mutat Res* 651(1-2): 14-29.
- Volarcik, K., L. Sheean, J. Goldfarb, L. Woods, F. W. Abdul-Karim and P. Hunt (1998). "The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary." *Hum Reprod* 13(1): 154-160.
- Voullaire, L., H. Slater, R. Williamson and L. Wilton (2000). "Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization." *Hum Genet* 106(2): 210-217.
- Voullaire, L., L. Wilton, H. Slater and R. Williamson (1999). "Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization." *Prenat Diagn* 19(9): 846-851.
- Wang, Q., X. Du, Z. Cai and M. I. Greene (2006). "Characterization of the structures involved in localization of the SUN proteins to the nuclear envelope and the centrosome." *DNA Cell Biol* 25(10): 554-562.
- Warren, W. D. and K. L. Goringe (2006). "A molecular model for sporadic human aneuploidy." *Trends Genet* 22(4): 218-224.
- Weghofer, A., S. Munne, W. Brannath, S. Chen, D. Barad, J. Cohen and N. Gleicher (2009). "The impact of LH-containing gonadotropin stimulation on euploidy rates in preimplantation embryos: antagonist cycles." *Fertil Steril* 92(3): 937-942.
- Weghofer, A., S. Munne, W. Brannath, S. Chen, G. Tomkin, N. Cekleniak, M. Garrisi, D. Barad, J. Cohen and N. Gleicher (2008). "The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation." *Hum Reprod* 23(3): 499-503.
- Wells, D., S. Alfarawati and E. Fragouli (2008). "Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH." *Mol Hum Reprod* 14(12): 703-710.
- Wells, D. and J. D. Delhanty (2000). "Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization." *Mol Hum Reprod* 6(11): 1055-1062.
- Wells, D., T. Escudero, B. Levy, K. Hirschhorn, J. D. Delhanty and S. Munne (2002). "First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy." *Fertil Steril* 78(3): 543-549.
- Wells, D. and J. K. Sherlock (1998). "Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification." *Prenat Diagn* 18(13): 1389-1401.
- Wells, D., J. K. Sherlock, A. H. Handyside and J. D. Delhanty (1999). "Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation." *Nucleic Acids Res* 27(4): 1214-1218.
- Wilton, L. (2005). "Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization." *Hum Reprod Update* 11(1): 33-41.

- Wilton, L., A. Thornhill, J. Traeger-Synodinos, K. D. Sermon and J. C. Harper (2009). "The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD." *Hum Reprod* 24(5): 1221-1228.
- Wolstenholme, J. and R. R. Angell (2000). "Maternal age and trisomy--a unifying mechanism of formation." *Chromosoma* 109(7): 435-438.
- Woods, L. M., C. A. Hodges, E. Baart, S. M. Baker, M. Liskay and P. A. Hunt (1999). "Chromosomal influence on meiotic spindle assembly: abnormal meiosis I in female Mlh1 mutant mice." *J Cell Biol* 145(7): 1395-1406.
- Wramsby, H., K. Fredga and P. Liedholm (1987). "Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles." *N Engl J Med* 316(3): 121-124.
- Zheng, C. J., S. W. Guo and B. Byers (2000). "Modeling the maternal-age dependency of reproductive failure and genetic fitness." *Evol Dev* 2(4): 203-207.

Annex

Annex 1

Article 1: “Mitotic Instability in Human Immature Oocytes”

TITLE: MITOTIC INSTABILITY IN HUMAN IMMATURE OOCYTES

Running Title: Mitotic Instability in Oocytes

G Daina^{1,2}, L Ramos², M Rius², A Obradors^{1,3}, J del Rey^{1,2}, M Campillo⁴, E Velilla⁵, A Pujol³, O Martinez-Pasarell⁶, J Benet^{1,2}, J Navarro^{1,2}.

1. Càtedra de Recerca Eugin-UAB.
2. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
3. Clínica Eugin, Barcelona.
4. Àrea de Medicina Preventiva i de Salut Pública. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona.
5. Institut Marquès. Servei de Reproducció. Barcelona.
6. Fundació Puigvert. Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, Barcelona.

Corresponding author: Dr. Joaquina Navarro.

Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica.

Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia.

Facultat de Medicina.

Universitat Autònoma de Barcelona 08193, Bellaterra, Spain

Phone 0034 93 581 1724

Fax 0034 93 581 1025

Mail Joaquina.Navarro@uab.cat

ABSTRACT

Title: Mitotic Germline Instability in Human Immature Oocytes

Study question: To assess the presence of abnormal immature oocytes from euploid females as a consequence of mitotic germline instability.

Summary answer: A total of 15.9% of the oocytes analysed, coming from 33.9% of the females included in the study, display this type of abnormalities, independently of the maternal age.

What is known already: Previous studies have described germline abnormalities using FISH, however, this is the first time that the whole chromosome complement is assessed in immature oocytes coming from different groups of females.

Study design, size, duration: Along two years, discarded oocytes from IVF patients and IVF oocyte donors have been collected from three centres. According to maternal age, two groups of study were established (≤ 36 years old, and ≥ 37 years old).

Materials, setting, methods: Fifty six women, between 18 and 45 years old, (mean 32.5 years) including 32 IVF patients (25-45 y.o.) and 24 IVF oocyte donors (18-33 y.o.). A total of 157 oocytes at germinal vesicle or metaphase I stage and discarded from IVF cycles, were analysed by short-CGH.

Main results and the role of chance: Independently of the maternal age, the incidence of abnormal oocytes originated early in embryogenesis is 15.9%, and have been found in 33.9% of the studied females.

Limitations, reasons for caution: The type of abnormalities found in this study cannot be used to infer infertility risk for females, because some of the immature oocytes would not reach MII stage and would not be fertilised.

Wider implications of the findings: This work sheds light on the relevance of germline mitotic instability responsible for the generation of the abnormalities observed.

Study funding/competing interest(s): This study was funded by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (PI 08/0012, PI 11/00625), Grup de Suport a la Recerca from Generalitat de Catalunya (2009SGR1107) and Càtedra de Recerca Eugeni-UAB.

Key words: Germline instability, immature oocytes, aneuploidy, segmental imbalances, germline mitotic abnormalities

INTRODUCTION

Aneuploidy has been a major issue in human gametes, and highly related to fertility problems. It is known to be present in cleavage stage embryos and gestational losses (Hassold and Hunt 2009, Delhanty 2011). Several studies have focused their interest on oocyte aneuploidy, mainly in the aneuploidies originated during the first and second meiotic divisions (Hassold and Hunt 2009). For this purpose, many studies have analysed the first and second polar bodies (1PB and 2PB) and the corresponding metaphase II (MII) oocytes, describing aneuploidies of meiotic origin, mainly caused by chromosome non-disjunction and/or sister chromatid pre-division (Angell 1991). There are many aneuploidy studies in oocytes that elucidate whether or not the aneuploidies originate in meiosis I or II. These meiotic studies performed in oocytes have obtained cytogenetic results with great variety of methodologies. Using R-banding karyotyping on 1397 oocytes, 10.8% of them presented aneuploidies (Pellestor et al. 2002). In another study, where 9-chr FISH was used, the aneuploidy rate was 47.5% when analysing 1PB-MII oocyte doublets. In studies where the whole chromosome complement was analysed, aneuploidy rates from 16.7% (10/60) (Marquez et al. 1998) to 42.5% (20/47) (Sandalinas et al. 2002) were obtained by Spectral Karyotyping studies. Recently, using Comparative Genomic Hybridisation (CGH), a great variability of aneuploidy rates has been found, probably due to the fact that different whole genome amplification methodologies were used and the aneuploidy rates found in 1PB-MII oocyte doublets vary from 3% in IVF patients (Fragouli et al. 2009) to 65% (Sher et al. 2007) in oocyte donors. Lately, some studies

have applied array-CGH and have reported aneuploidy rates of 72% (Geraedts et al. 2011).

About a decade ago another aneuploidy mechanisms apart from meiosis was identified to be responsible for the presence of trisomic cells together with the euploid ones in euploid women (Cozzi et al. 1999, Mahmood et al. 2000). These alterations, observed as non-complementary results between 1PB-MII oocyte doublets have been found in other studies where the whole chromosome complement was evaluated. No-complementary rates between 1 and 15.5% have been described (Gutierrez-Mateo et al. 2004a, Gutierrez-Mateo et al. 2004b, Gutierrez-Mateo et al. 2005, Fragouli et al. 2006a, Fragouli et al. 2006b, Fragouli et al. 2009, Obradors et al. 2010). It has been postulated that these aneuploid cells could have been originated during the mitotic proliferation of the oogonia early in embryogenesis.

Previous oocyte studies not only detected aneuploidy, but also structural imbalances have been observed using different cytogenetic approaches. Pellestor described a 2.1% of structural aberrations including chromatid and chromosome breaks, acentric fragments and deletions using R-banding (Pellestor et al. 2002). Afterwards, using CGH, a 1.9% of segmental gains and losses were also identified (Fragouli et al. 2011).

To shed some light on the origin of oocyte abnormalities meiotically unexplained, the aim of this work was to perform a comprehensive aneuploidy screening of immature oocytes either at germinal vesicle (GV) or metaphase I (MI) stage, in order to be able to determine the chromosome abnormalities, either aneuploidies or segmental imbalances, present in the oocytes before entering meiosis.

MATERIAL & METHODS

Cell retrieval

A total of 157 immature oocytes discarded from IVF cycles were analysed by short-CGH (Rius et al. 2010). The oocytes were donated by 56 women, between 18 and 45 years old. The mean maternal age was 32.5 years and included 32 patients (25-45 y.o.) and 24 oocyte donors (18-33 y.o.). The oocytes were retrieved and donated by three IVF centres in Barcelona, Spain; Clínica Eugin, Institut Marquès and Fundació Puigvert. Female fibroblasts (46, XX) were cultured to the confluent stage and single cells were used as reference for CGH.

Ethical approval

According to the legislation all the IVF patients and donors signed the corresponding informed consent.

Isolation and Lysis

The zona pellucida was removed from each oocyte using Tyrode's acid. Afterwards, the oocytes were washed in three phosphate buffered-saline (PBS) droplets with 0.1% polyvinyl alcohol (PVA). The reference fibroblasts were washed in PBS/0.1%PVA droplets, isolated individually and placed in PCR tubes for their storage.

The lysis of the cells was performed adding 1µl of sodium dodecyl sulphate (SDS, 17µM) and 2µl of proteinase K (125µg/ml). One droplet of mineral oil was placed in each tube to avoid evaporation. Lysis was performed at 37°C for 1hour followed by a 10min step at 95°C to inactivate proteinase K.

Whole genome amplification

The DNA from the single cells was amplified using degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) as previously described (Gutierrez-Mateo et al. 2004a). The PCR program was carried out in a TGradient thermocycler (Biometra; Goettingen, Germany). After the DOP-PCR, the amplification was evaluated by electrophoresis using 1.5% agarose gel. Successful amplifications gave smears between 200bp and 4000bp.

Labelling by Nick-translation and preparation of probes

Each amplified DNA from single cells was labelled fluorescently using Nick-translation kit (Abbott Molecular; USA) according to the manufacturer's instructions. The test DNA, from the immature oocytes, was labelled using Spectrum-Red dUTPs (Abbott Molecular; USA), whereas amplified DNA from single fibroblasts was labelled using Spectrum-Green dUTPs and used as reference DNA. In order to obtain a homogenous reference DNA, green-labelled DNAs from various single fibroblasts were mixed after labelling.

To obtain the probes for CGH, both DNAs, test and control, were mixed 1:1 with 10µl of blocking Cot-1-DNA (Abbott Molecular; USA) and precipitated using ethanol and sodium acetate. The precipitation was performed at -80°C for 1 hour followed by centrifugation at 14,500rpm for 30 min. Afterwards, the pellet obtained was dried and resuspended in 8µl of hybridisation solution (50% formamide, 2xSSC, 10% dextran sulphate, pH=7).

Comparative Genomic Hybridisation and CGH analysis

Hybridisation was performed on euploid male (46, XY) metaphase slides (Abbott Molecular; USA) following the short-CGH methodology (Rius et al. 2010).

The capture of the metaphases was performed by a Nikon eclipse 90i epifluorescence microscope. A minimum of 12 metaphases were captured per cell and analysed using Isis CGH software developed by MetaSystems. Considering that similar chromosome dosage means euploidy, chromosome losses and gains were considered when the ratio between both labelled DNAs was under 0.8 or above 1.2, respectively. The software also included standard deviation variations. The telomeres and centromeres were excluded from the analysis because they can give false profiles. In the cases where chromosomes 17, 19 and 22 together were gained or lost in the same cell, they were excluded from the analysis as they might be artifactual (Voullaire et al. 2000, Gutierrez-Mateo et al. 2004a, Rius et al. 2010).

Statistical analysis

Chi squared tests were used to analyse if the differences were or not significant between each established group.

RESULTS

In this study 157 cells were analysed, all of them corresponding to immature oocytes.

DNA smears between 200bp and 4000bp were observed after whole genome amplification and electrophoresis for all the 157 cells, and therefore were analysed.

The 157 oocytes analysed by CGH, came from 56 different females with an age range between 18-45 y.o. the mean being 32.5 years old. From the 56 females included in this work, 19 produced at least one oocyte with chromosomal abnormalities (33.9%) including aneuploidies and/or segmental imbalances, as detailed in Table I. Twenty-five oocytes out of 157 (15.9%) showed abnormalities.

A total of 24 oocytes presented aneuploidies (aneuploidy rate 15.3%) for one to eight chromosomes. A total of 56 aneuploid events occurred in the analysed oocytes. All chromosomes were involved in aneuploidy except chromosome 14. The highest aneuploidy rate was found for chromosome 21, followed by 13, 16, 19 and 22, as shown in Figure 1.

Performing a comprehensive aneuploidy screening using CGH permitted the detection of structural abnormalities, as shown in Table I and Figure 2. Nine out of 157 oocytes had structural imbalances (5.7%), in eight of them they were accompanied by aneuploidies, and in one oocyte, only a structural imbalance for chromosome 8 was observed.

Age related aneuploidy

Considering the oocytes from women aged 36y.o. or less, 102 oocytes from 31 women were analysed. Ten out of the 31 (32.3%) produced at least one cytogenetically abnormal oocyte. Meanwhile, in advanced maternal age (AMA) females (≥ 37 y.o.) 55

oocytes from 25 women were evaluated and 9 (16.4%) of the patients gave at least one abnormal oocyte.

The aneuploidy rate in the younger group was 15.7% (16/102) involving 41 whole chromosome events, and the most frequent aneuploidy was for chromosome 16. In the AMA group the aneuploidy rate was 14.5% (8/55) comprising 16 events, with chromosome 21 being the most frequent.

The younger group presented 5.9% (6/102) of the oocytes with segmental chromosome imbalances, whilst 5.4% (3/55) were found in the AMA group.

All the data were statistically evaluated by χ^2 tests and gave no significant differences between the established groups.

Patient versus donor aneuploidy

From 32 IVF patients in the study a total of 83 oocytes could be analysed; in 37.5% of these patients (12/32) at least one abnormal oocyte could be identified. In the oocyte donor group, 74 oocytes from 24 women were assessed, and in 29.2% of the donors (7/24) at least one oocyte was diagnosed as abnormal.

In the IVF patients group, 18.1% (13/83) of the oocytes were aneuploid, whereas the donor group had an aneuploidy rate of 14.9% (11/74). The aneuploid events were 35 in the patient group and 22 in the oocyte donors. Chromosome 21 was the one presenting more frequent aneuploidy in patients, whilst in oocyte donors it was chromosome 16.

Segmental chromosome imbalances were detected in 4.8% (4/83) of the oocytes in the IVF patient group and in 5.4% (4/74) in the oocyte donor group.

The χ^2 test was performed to compare the data obtained and no significant differences were found between these two groups of women.

DISCUSSION

In the present study, conclusive CGH profiles were obtained for all the 157 immature oocytes, an adequate and complete cytogenetic analysis has been performed and both aneuploidies and segmental chromosome imbalances between 26.5MB and 110 Mb have been detected.

A total of 15.9% of the analysed oocytes were chromosomally abnormal, due to either aneuploidies and/or segmental imbalances. The incidences observed in the established groups (Table II) showed no significant differences.

Regarding the aneuploidy, 15.3% of the oocytes included in this work displayed whole chromosome imbalances. The mechanisms responsible for the aneuploidy detected cannot be attributed to those previously described of meiotic origin such as sister chromatid pre-division or bivalent non-disjunction since all of the oocytes were immature, and meiosis had not still taken place. Therefore, other hypotheses must be considered as being responsible for these alterations. In fact, the presence of another mechanism responsible from aneuploidy was firstly described, after analyzing 1PB and its corresponding MII oocyte and finding non complementary results between both cells (Mahmood et al. 2000). Afterwards, subsequent studies analysing 1PB and MII oocyte doublets by CGH also showed non-complementary results, with heterogeneous incidence, attributable to the existence of precursor aneuploid oogonia not only in IVF patients but also in oocyte donors, as shown in Table III (Gutierrez-Mateo et al. 2004a, Gutierrez-Mateo et al. 2004b, Gutierrez-Mateo et al. 2005, Fragouli et al. 2006a, Fragouli et al. 2006b, Fragouli et al. 2009, Obradors et al. 2010).

The overall aneuploidy rate found here, 15.3%, is similar to the 15.5% (Obradors et al. 2010) found in oocyte donors <29 y.o. and a bit higher than 8.0%, 9.5% (Gutierrez-Mateo et al. 2004a, Gutierrez-Mateo et al. 2004b) and 12.5% (Fragouli et al. 2006b) previously identified in IVF patients (21-42y.o.). The differences observed could be attributed to the size of the samples and the variability among the patients included in each study.

All the chromosomes, except chromosome 14 were present in the 57 aneuploid events observed. The most frequently involved chromosomes were chromosome 21, followed by 13, 16, 19 and 22. According to this data it can be inferred that the smallest chromosomes seem to be more commonly affected by chromosome segregation errors. They could be produced early in embryogenesis, during the formation of the oogonia by mitotic cell divisions of the germline precursor cells. Similar prevalence of the implication of smaller chromosomes in aneuploidy have been widely described as consequence of errors at the meiotic level (Sandalinas et al. 2002, Cupisti et al. 2003, Pellestor et al. 2003, Gutierrez-Mateo et al. 2004b, Fragouli et al. 2006a, Fragouli et al. 2011).

Furthermore, it can be noted that in almost half of the aneuploid oocytes, two or more chromosomes were involved (Table I). This is in agreement with previously published data, which found that aneuploid oocytes of meiotic origin mainly involve aneuploidies for only one chromosome whilst aneuploid oocytes originated by mitotic errors involved more than one chromosome (Obradors et al. 2010). These results suggest that the chromosome segregation errors could have two different explanations. Firstly, if they are produced during the proliferative phase of oogenesis, they could be caused

by errors in cell cycle checkpoint mechanisms, affecting the segregation of the whole chromosome set (Tease et al. 2002). On the contrary, those errors originated during meiosis, would involve either synaptic defects between specific homologous chromosomes, or a reduction in the number of chiasmata giving low recombination rates, which would subsequently affect the segregation of certain unstable bivalents (Nicolaidis and Petersen 1998, Wolstenholme and Angell 2000, Robles et al. 2007).

As stated above, no differences have been observed regarding the incidence of aneuploid events in immature oocytes depending on the maternal age. Accordingly to this data, it can be inferred that the mechanism responsible for these type of events produced early during the embryonic development would be present in a basal level in all women, having an individual-dependent prevalence rather than being related to maternal age. In fact a previous work described the presence of aneuploid 21 oogonia by analysing oocytes from eight euploid fetuses and the authors suggested that this fact could be considered a normal situation in normal female fetuses (Hulten et al. 2008).

Moreover, in previous studies analyzing mature oocytes from IVF patients and IVF donors, it was suggested that hormonal treatment could have a differentiated effect in both groups of women. A preferential recovery of the aneuploid oocytes with more aneuploid events, originated from aneuploid oogonia, was found in young females as a possible effect of intensive hormonal stimulation (Weghofer et al. 2008, Weghofer et al. 2009, Obradors et al. 2011). It has also been postulated that in natural situations, the maturation of the trisomic oocytes is postponed in relation to the disomic ones, this is the reason why there is an accumulation of these oocytes in the ovarian reserve

of older women (Hulten et al. 2008, Hulten et al. 2010). To shed light on the effect of hormonal stimulation in relation to natural cycles more research should be performed, and later, conclude whether or not the protocols applied favour aneuploid oocyte recruitment and maturation instead of euploid ones as has been suggested before (Handyside et al. 2012).

Moreover, in this work, 5.7% of the oocytes showed 17 structural or segmental imbalances involving a great variety of chromosomes. To our knowledge, this is the first time in which these structural chromosome imbalances have been identified using comprehensive chromosome complement analysis in immature oocytes. However, using other cytogenetic methods on mature oocytes, structural chromosome abnormalities were identified using R-banding (Pellestor et al. 2002) and also using CGH in 1% (Fragouli et al. 2006a) and in 3.6% of the mature oocytes analysed (Fragouli et al. 2011). It can be supposed that these imbalances, losses and gains of chromosome fragments, can be consequence of chromosome breakage and loss, or duplication of certain chromosome fragments (Voet et al. 2011) later being kept unrepaired. Accordingly, is the fact that during the proliferative stage of germ cells, early in the embryogenesis (from week 9 to the 5th month), a very active cell proliferation stage takes place and, therefore, extreme genetic instability is present, reminding the observed in some tumours (Voet et al. 2011).

The breakpoints of the chromosome fragments found in this study, have been previously described as fragile sites, except -8p12 (Mrasek et al. 2010). Specifically, one of the most active fragile sites, FRA3G located at 3p14.2, has also been found in this work. As stated before, in situations of DNA replication stress, the fragile sites can

be problematic to replicate displaying predisposition to break (Franchitto and Pichierri 2011) and could explain chromosome instability.

Overall, 33.9% of the women included in this study produced at least one immature oocyte with chromosomal errors that originated along germline mitosis. The mechanism responsible for aneuploidies reported here was observed in 25,7% of females when 9-chr FISH was used analysing MII and its corresponding 1PB in IVM oocytes (Pujol et al. 2003). The incidence observed is higher than the previously published when the whole chromosome complement of mature oocytes (1PB and its MII oocyte doublet) was evaluated: 13.2% in IVF patients of 21-42 y.o. (Gutierrez-Mateo et al. 2004a, Gutierrez-Mateo et al. 2004b, Gutierrez-Mateo et al. 2005) and in 22.6% of IVF oocytes from donors <29 y.o. (Obradors et al. 2010). The higher incidence detected in this work, could be explained by the fact that all the immature oocytes were evaluated, and it has to be considered that some of the oocytes studied would have been discarded from previous studies due to their lack of maturation. It is known that some of the aneuploid oocytes would have never gone through the checkpoint at meiosis. Despite the fact that the mitotic origin abnormal oocytes cannot be used to infer the reproductive risk of the women, because not all of them will reach the MII stage, they allow us to know how relevant this mechanism is for generating this type of abnormal oocytes.

This work has analysed the whole chromosome complement of immature oocytes by CGH and provided a deeper basic knowledge of the aneuploidy present in these cells, identifying abnormal oocytes originated early in embryogenesis due to germline

mitotic errors. These abnormal oocytes with aneuploidies and/or structural imbalances can be close related to very active cell proliferation stages and could determine extreme genetic instability. It has been demonstrated that a third of the females included in the study produced at least one of these abnormal oocytes and showed no relation to maternal age, or infertility problems, therefore considering this phenomenon more frequent than expected. This study achieved a deeper knowledge regarding the relevance of mitotic germline errors originating abnormalities.

AUTHOR'S ROLES

Gemma Daina contributed to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript and revision of the manuscript.

Laia Ramos contributed to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, and revision of the manuscript.

Mariona Rius contributed to acquisition of data, analysis and interpretation of data, and revision of the manuscript.

Albert Obradors contributed to conception and design and acquisition of data.

Javier del Rey contributed to acquisition of data, analysis and interpretation of data, and revision of the manuscript.

Mercedes Campillo contributed in the data analysis.

Esther Velilla contributed to acquisition of data

Aïda Pujol contributed to acquisition of data

Olga Martinez-Pasarell contributed to acquisition of data.

Jordi Benet contributed to conception and design, analysis and interpretation of data, and revision of the manuscript.

Joaquima Navarro contributed to conception and design, analysis and interpretation of data, and revision of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr. Magda Giralte for the support for the CGH analysis. This study was funded by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (PI 08/0012, PI 11/00625), Grup de Suport a la Recerca from Generalitat de Catalunya (2009SGR1107) and Càtedra de Recerca Eugeni-UAB. The first author had a predoctoral grant from Fundació Crèdit Andorrà (2008-2011).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Angell RR. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 1991;86:383-387.
- Cozzi J, Conn CM, Harper J, Winston RM, Rindl M, Farndon PA and Delhanty JD. A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet* 1999;104:23-28.
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJ and Delhanty JD. Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 2003;23:663-668.
- Delhanty JD. Inherited aneuploidy: germline mosaicism. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:136-140.
- Fragouli E, Alfarawati S, Goodall NN, Sanchez-Garcia JF, Colls P and Wells D. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Mol Hum Reprod* 2011.
- Fragouli E, Escalona A, Gutierrez-Mateo C, Tormasi S, Alfarawati S, Sepulveda S, Noriega L, Garcia J, Wells D and Munne S. Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors. *Reprod Biomed Online* 2009;19:228-237.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC and Delhanty JD. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006a;21:2319-2328.
- Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ and Delhanty JD. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res* 2006b;114:30-38.

- Franchitto A and Pichierri P. Understanding the molecular basis of common fragile sites instability: role of the proteins involved in the recovery of stalled replication forks. *Cell Cycle* 2011;10:4039-4046.
- Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, Harper J, Schmutzler A, Collins J, Goossens V *et al.* Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod* 2011;26:3173-3180.
- Gutierrez-Mateo C, Benet J, Starke H, Oliver-Bonet M, Munne S, Liehr T and Navarro J. Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH, a new 24-colour centromere-specific technique. *Hum Reprod* 2005;20:3395-3401.
- Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J and Munne S. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 2004b;19:2859-2868.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, Egozcue J, Munne S and Navarro J. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004a;19:2118-2125.
- Handyside AH, Montag M, Magli MC, Repping S, Harper J, Schmutzler A, Vesela K, Gianaroli L and Geraedts J. Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *Eur J Hum Genet* 2012;20:742-747.
- Hassold T and Hunt P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr* 2009;21:703-708.
- Hulten MA, Patel S, Jonasson J and Iwarsson E. On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. *Reproduction* 2010;139:1-9.

- Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM and Iwarsson E. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 2008;1:21.
- Mahmood R, Brierley CH, Faed MJ, Mills JA and Delhanty JD. Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet* 2000;106:620-626.
- Marquez C, Cohen J and Munne S. Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81:254-258.
- Mrasek K, Schoder C, Teichmann AC, Behr K, Franze B, Wilhelm K, Blaurock N, Claussen U, Liehr T and Weise A. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int J Oncol* 2010;36:929-940.
- Nicolaidis P and Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998;13:313-319.
- Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutierrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Marquez C, Benet J and 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;93:675-679.
- Obradors A, Rius M, Daina G, Ramos L, Benet J and Navarro J. Whole-chromosome aneuploidy analysis in human oocytes: focus on comparative genomic hybridization. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:119-126.
- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C and Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 2003;112:195-203.
- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C and Demaille J. Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 2002;17:2134-2145.

Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J and Navarro J. Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 2003;11:325-336.

Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marques L, Calderon G, Velilla E, Martinez-Passarell O, Oliver-Bonet M, Benet J *et al.* Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010;25:1824-1835.

Robles P, Roig I, Garcia R, Ortega A, Egozcue J, Cabero LL and Garcia M. Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. *Reproduction* 2007;133:899-907.

Sandalinas M, Marquez C and Munne S. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002;8:580-585.

Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, Baltaci V, Kotze D and Unsal E. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. *Fertil Steril* 2007;87:1033-1040.

Tease C, Hartshorne GM and Hulten MA. Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 2002;70:1469-1479.

Voet T, Vanneste E, Van der Aa N, Melotte C, Jackmaert S, Vandendael T, Declercq M, Debrock S, Fryns JP, Moreau Y *et al.* Breakage-fusion-bridge cycles leading to inv dup del occur in human cleavage stage embryos. *Hum Mutat* 2011;32:783-793.

Voet T, Vanneste E and Vermeesch JR. The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:160-168.

Voullaire L, Slater H, Williamson R and Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106:210-217.

Weghofer A, Munne S, Brannath W, Chen S, Barad D, Cohen J and Gleicher N. The impact of LH-containing gonadotropin stimulation on euploidy rates in preimplantation embryos: antagonist cycles. *Fertil Steril* 2009;92:937-942.

Weghofer A, Munne S, Brannath W, Chen S, Tomkin G, Cekleniak N, Garrisi M, Barad D, Cohen J and Gleicher N. The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. *Hum Reprod* 2008;23:499-503.

Wolstenholme J and Angell RR. Maternal age and trisomy--a unifying mechanism of formation. *Chromosoma* 2000;109:435-438.

Table 1.- Detailed chromosome abnormalities observed in the oocytes analysed.

Sample	Age	Patient (P) Oocyte donor (D)	Aneuploidies	Segmental imbalances
IME 7.1	18	D	-4, -5	
IME 7.4	18	D	-5	+19q
IME 7.6	18	D	+18	-2q21.3q33, +3p14.2pter, +7q, +16p
IMM 3.3	24	D	+13+15, +16, +19,	+3pcenp22, +10p, +14q24.1qter,+20q
IMM 15.1	25	D	-21	
IME 6.2	27	D	+17, +19	
IME 8.1	27	D	+16, +22	
IME 8.2	27	D	-3, +16, -18	
IMM 25.2	28	D	+22	
IMM 25.3	28	D	+19, -20, +22	+16p
IMM 5.1	32	D	+16, -21	+19p
IME 1.1	33	P	+3, +7, +11, +X	
IMM 16.2	35	P	-1, +8, +11, +12, -13, -15, +17, +20	
IMM 16.3	35	P	+2, -9, +15, -21, +X	+6q
IMP 1.4	36	P	-20	
IMP 1.7	36	P	-13	
IMP 5.2	37	P	+1, -2, +7, +9, +10	+3p, -8p, -15q22.1qter
IMM 30.1	37	P	-3, +4, +6, +10, +13	
IME 18.2	37	P		+8p12q21.3
IME 11.3	38	P	+19	

IME 22.1	38	P	-21	
IME 9.5	39	P	+22	-20p
IME 14.2	42	P	+21	
IME 20.2	44	P	-21	
IME 21.1	45	P	+X	

?

Figure 1.- Abnormalities found in the study.

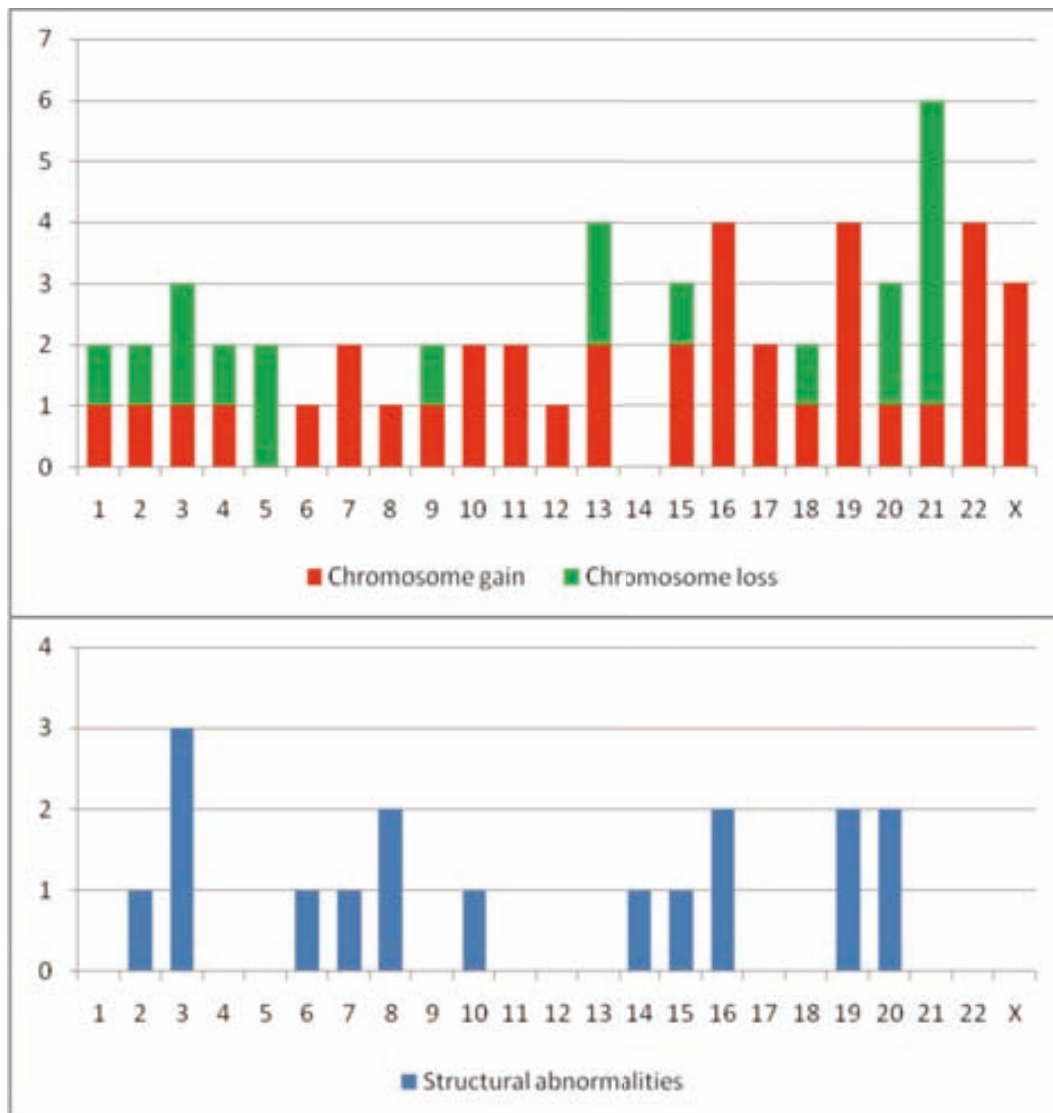


Table 2.- Data compilation of whole chromosome analysis by CGH in human oocytes

Author	Analysed cells	Total 1pb-oocytes doublets	Aneuploid Oocytes (%)	Germ-line origin aneuploidy oocytes/total (%)	
Patients (18-45 Women age range)	Gutiérrez-Mateo et al. 2004 a	1pb-oocyte doublets	25	12 (48)	2(8)
	Gutiérrez-Mateo et al. 2004 b	1pb-oocyte doublets	42	24 (57.1)	4 (9.5)
	Gutiérrez-Mateo et al. 2005	1pb-oocyte doublets	14	5(35.7)	1(7.1) *

	Fragouli et al. 2006 b	1pb-oocyte doublets	8	4 (50)	1 (12.5)
	Fragouli et al. 2006 a	1pb-oocyte doublets	100	22 (22)	1(1)
	Daina et al. (present work)	Immatureoocytes	83	13(15.7)	13 (15.7)
<u>Donors (<33)</u>	Fragouli et al. 2009	1pb-oocyte doublets	49	2 (4.1)	0
	Obradors et al. 2010	1pb-oocyte doublets	84	27 (32.1)	13 (15.5)
	Daina et al. (present work)	Immatureoocytes	74	11 (14.9)	11 (14.9)
* Also compatible with artifactual loss due to fixation					

Table 3.- Detailed incidences of abnormal immature oocytes from the groups of the study.

	Young IVF patients ≤36 y.o. (18-36; X=32.4) N females=7 N oocytes= 28 (%)	AMA IVF patients ≥ 37y.o. (37-45; X=39.6y.o) N females=25 N oocytes= 55 (%)	Subtotal IVF patients (25-45 X=38y.o.) N females=32 N oocytes= 83 (%)
Patients producing abnormal oocytes	3 (42.9)	9 (36)	12 (37.5)
Abnormal oocytes	5 (17.9)	9 (16.4)	14 (16.9)
Aneuploid oocytes	5 (17.9)	8 (14.5)	13 (18.1)
Oocytes with segmentals	1(3.6)	3 (5.4)	4 (4.8)
Whole chromosome events	19(33.3)	16 (28)	35 (61.4)
Segmental chromosome events	1(5.8)	5 (29.4)	6 (35.3)
	IVF Oocyte Donors (18-33 X=25.2y.o.) N females=24 N oocytes= 74		Subtotal IVF Oocyte Donors (18-33 X=25.2y.o.) N females=24 N oocytes= 74
Patients producing abnormal oocytes	7 (29.2)		7 (29.2)
Abnormal oocytes	11 (14.9)		11 (14.9)
Aneuploid oocytes	11 (14.9)		11 (14.9)
Oocytes with segmentals	5 (6.7)		5 (6.7)
Whole chromosome events	22 (38.6)		22 (38.6)
Segmental chromosome events	11 (64.7)		11 (64.7)
	Subtotal Young females ≤36 y.o. (18-36; X=26.84) N females=31 N oocytes= 102	Subtotal AMA females ≥ 37y.o. (37-45; X=39.6y.o) N females= 25 N oocytes= 55	TOTAL (18-33 X=25.2y.o.) N females=56 N oocytes= 157
Patients producing abnormal oocytes	10 (32.3)	9 (36)	19 (33.9)
Abnormal oocytes	16 (15.7)	9 (16.4)	25 (15.9)
Aneuploid oocytes	16 (15.7)	8 (14.5)	24 (15.3)
Oocytes with segmentals	6 (5.9)	3 (5.4)	9 (5.7)
Whole chromosome events	41 (73.2)	16 (28)	57 (100)
Segmental chromosome events	12 (70.6)	5 (29.4)	17 (100)

Annex 2

Article 2: “First Successful Double-Factor PGD for Lynch Syndrome: Monogenic Analysis and Comprehensive Aneuploidy Screening”

Acceptat per publicació a la revista *Clinical Genetics*

Title: First Successful Double-Factor PGD for Lynch Syndrome: Monogenic Analysis and Comprehensive Aneuploidy Screening

Gemma Daina^{1,2a}, Laia Ramos^{2a}, Albert Obradors^{1,3}, Mariona Rius², Olga Martinez-Pasarell⁴, Ana Polo⁴, Javier del Rey^{1,2}, Josep Obradors⁵, Jordi Benet^{1,2}, Joaquina Navarro^{1,2*}

1. Càtedra de Recerca Eugin-UAB.
2. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
3. Clínica Eugin, Barcelona.
4. Fundació Puigvert Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, Barcelona.
5. Consultori Obstètric Ginecològic Josep Obradors, Figueres, Girona.

^a Both authors contributed equally to this work

Corresponding author: Dr. Joaquina Navarro.

Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica.

Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia.

Facultat de Medicina.

Universitat Autònoma de Barcelona 08193, Bellaterra, Spain

Phone 0034 93 581 1724

Fax 0034 93 581 1025

Mail Joaquina.Navarro@uab.cat

All authors have read and approved the submission of this manuscript in this journal, and have no conflict of interest to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank Ph.D.Magda Giralt for the support received for CGH analysis., M.D.Joan Brunet, Cap del Servei d'Oncologia Mèdica from ICO Girona for the detection of the causative mutation in the Lynch Syndrome family. This work has been funded by FIS (PI 080012, PI11/00625), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 1107) and Càtedra de Recerca Eugin-UAB. The first author has a pre-doctoral grant from the Fundació Crèdit Andorrà.

ABSTRACT

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has been applied worldwide for a great variety of single-gene disorders over the last 20 years. The aim of this work was to perform a double-factor PGD (DF-PGD) protocol in a family at risk for Lynch Syndrome.

The family underwent a DF-PGD approach in which two blastomeres from each cleavage-stage embryo were biopsied and used for monogenic and comprehensive cytogenetic analysis respectively. Fourteen embryos were biopsied for the monogenic disease and after Multiple Displacement Amplification (MDA), 12 embryos were diagnosed; five being non-affected and seven affected by the disease. Thirteen were biopsied to perform the aneuploidy screening by short-Comparative Genomic Hybridization (CGH).

The improved DF-PGD approach permitted the selection of not only healthy, but also euploid embryos for transfer. This has been the first time a double analysis of embryos has been performed in a family affected by Lynch Syndrome, resulting in the birth of two healthy children. The protocol described in this work offers a reliable alternative for single-gene disorders assessment together with a comprehensive aneuploidy screening of the embryos that may increase chances of pregnancy and birth of transferred embryos.

Key words: Aneuploidy, Comparative Genomic Hybridization, Lynch Syndrome, Monogenic Disease, Preimplantation Genetic Diagnosis.

INTRODUCTION

Since the first Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) application for single-gene disorders, PGD has been applied in more than 4,500 cases from 1997 to 2008 (1, 2).

Lynch Syndrome is an autosomal dominant genetic condition that significantly increases the risk of developing colorectal cancer as well as other cancers. The increased risk for these cancers is due to inherited mutations that impair DNA mismatch repair. Despite being one of the most studied cancer syndromes, there is still not a clear correlation between the mutation and the type of disease nor the onset age of its appearance due to the influence of environmental factors(3). The male of the couple was affected by Lynch Syndrome, and the causative mutation was found in *MLH1* gene. After genetic counselling the couple decided to perform PGD due to the increased risk for the offspring to develop Lynch Syndrome.

As is known, cytogenetic abnormalities could contribute to the low implantation rates found in PGD cycles, and are present in many first trimester abortions thus reducing the chances of embryo implantation or even causing early-stage abortions(4, 5).

In this way, in 2008, a double analysis approach was proposed to analyze a monogenic disease from blastomeres and perform the cytogenetic screening of the 1st Polar Body (1PB) by CGH, to indirectly assess the female complement, permitting the transfer of the embryos within the same cycle. This variation of PGD, called double-factor PGD (DF-PGD) selected not only those embryos without the single-gene disorder but also those coming from potentially euploid oocytes(6, 7). Using that approach, aneuploidies which originated in the second meiotic division could not be analyzed, neither those coming from sperm or produced early in the embryo.

The validation of a shortened CGH protocol, with a hybridization step of 12 hours, has given researchers the opportunity to analyze the whole chromosome complement of the embryos, using blastomeres biopsied on Day +3, and transfer the selected embryos in the same IVF PGD cycle(8).

The aim of this work is to assess the feasibility and applicability of an alternative variant to the DF-PGD previously published in a family at risk of having offspring affected by Lynch Syndrome, analyzing the single-gene disorder and simultaneously performing a whole cytogenetic analysis in two blastomeres biopsied from cleavage-stage embryos.

MATERIALS AND METHODS

A couple at risk of Lynch Syndrome for their offspring underwent an IVF DF-PGD cycle in collaboration with the Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu. The family was carrier of a c.1846_1848delAAG; p.Lys616del paternal dominant mutation at the *MLH1* gene. The maternal age was 36 years old.

Ethics

According to the legislation, the couple signed an informed consent of the DF-PGD procedure that was going to be performed. Permission from the *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA)* in Spain was obtained so this PGD could be performed.

Direct and indirect mutation detection

For the direct detection of the Lys-616 deletion, a pair of primers was designed. To indirectly assess the mutation, six different informative STRs were chosen (D3S3623, D3S2417, D3S3042, D3S2447, D3S2411 and D3S1298).

IVF procedure and blastomere biopsy

After oocyte retrieval, the mature oocytes went through ICSI, and the evolved embryos were biopsied on Day +3. Two blastomeres per embryo were biopsied only from 8-cell stage embryos and were processed as described in previous works(6, 7, 9).

Treatment of the blastomeres for mutation detection

One biopsied blastomere of each embryo underwent a modified Multiple Displacement Amplification protocol lasting 4 hours, using the *Genomiphi v2* DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) to amplify its DNA. For single cell lysis, 2.5 μ L of Alkaline Buffer (AB: 200mM KOH, 50mM dithiothreitol) were

added to the single cell together with 5 μ L of the Sample Buffer contained in the commercial kit. The samples were kept at 95°C for 3min using a thermocycler (TGradient, Biometra) and immediately placed on ice. To neutralize the AB, 0.8 μ L of tricine (20mM, pH=4.95) were added. Afterwards, 12.3 μ L of Reaction Buffer, 2.5 μ L of Sample Buffer and 1.5 μ L of enzyme were placed to each tube. The MDA reaction took place for 4 hours at 30°C followed by an inactivation step at 70°C for 10min. For all multiplex-PCR reactions, 4 μ L of the MDA product were used as a template to perform genetic analysis.

Two multiplex PCR reaction mixes were made containing 5 μ l of 10x primer mix, 25 μ l of 2x Master Mix and 16 μ l of nuclease-free water (Qiagen multiplex PCR Kit; Quiagen, Germany) in a final volume of 50 μ l. The tubes were located in the thermocycler and the following PCR protocol was applied: 2min 95°C, 37 cycles of 30s at 94°C, 90s at 57°C, and 90s at 72°C, followed by a final step of 10 min at 72°C. Finally, 1 μ l of each Multiplex-PCR product was analyzed by capillary electrophoresis using an ABIPrism 3730 sequencer (Applied Biosystems).

Treatment of the blastomere for comprehensive aneuploidy screening

The second blastomere was washed and a shortened CGH protocol was performed as described elsewhere(8).

When possible, the discarded embryos at Day +5 were reanalyzed by CGH for a comprehensive aneuploidy screening, using the same protocol applied to single blastomeres.

RESULTS

Preclinical validation of direct and indirect detection of the mutation

The direct and indirect mutation detection responsible for Lynch Syndrome were first tested in genomic DNA from the patients, and afterwards in amplified DNA from single lymphocytes from the members of the family. The ADO (allele drop-out) rates observed were, on average, 12.9% in the *MLH1* gene. The average values were not higher than those previously described using MDA amplification.

Double-factor PGD outcome at cleavage-stage embryos

After the monogenic analysis, 12/14 (85.7%) of the embryos could be diagnosed. Seven carried the c.1846_1848delAAG; p.Lys616del in the *MLH1* gene, so they were affected and non-transferable, whereas five embryos (35.7%) were free of the causative mutation. Two out of 14 embryos (14.2%) could not be diagnosed for the monogenic disease due to whole genome amplification failure.

Regarding the comprehensive aneuploidy screening all the 13 biopsied embryos were cytogenetically assessed. Seven of them were euploid (53.8%), whereas six (46.2%) were aneuploid, as shown in Table 1.

Embryos C13 and C17 were free of the family mutation and euploid for all chromosomes, thus they were transferred on Day +5, achieving a double pregnancy and birth. Postnatal analysis confirmed the DF-PGD results.

Reanalysis of the embryos by CGH

Seven embryos were available for reanalysis. Concordant results were observed in some of the diagnosed embryos while other aneuploidies and some discordant results were detected in some cases as shown in Table 2.

DISCUSSION

In this work, an improved DF-PGD methodology has been applied in order to analyze monogenic pathologies simultaneously with comprehensive aneuploidy screening of the embryo, achieving the birth of healthy offspring. This procedure could be adapted to other single gene disorders.

In our approach, in order to reduce the negative impact of the biopsy on viability, two blastomeres were biopsied only in good quality embryos with eight cells or more. One was used for monogenic analysis after MDA amplification whilst the other was amplified using DOP-PCR for further comprehensive aneuploidy screening by short CGH. Until now, this option has been necessary until a single WGA methodology from single cells is optimized for both applications.

In the clinical application reported, the direct diagnosis of the mutation was by fragment size analysis. In order to minimize misdiagnosis, six informative STRs were also employed to perform an indirect analysis obtaining a reliable diagnosis in 85.7% of the embryos. The results for single-gene diagnosis showed that five out of 12 diagnosed embryos were healthy and seven were affected (Table 1).

Additionally, the aneuploidy incidence was 46.2%, these results are not far from the 50% detected in a series of 10 patients undergoing DF-PGD, using 1st polar bodies for aneuploidy screening and blastomeres for single-gene disorder investigation(9).

Apart from aneuploidies, some gains and losses of chromosomal fragments have also been detected (Table 1). These structural imbalances have also been described in previous studies of cleavage-stage embryos using different techniques(10-12).

Related to the reanalysis of the discarded embryos, some of the abnormalities seem to have a mitotic germinal or a meiotic origin, as they are observed in all the

analysed cells, but others might have been generated in the early mitotic divisions of the embryo. The effect of mosaicism in cleavage-stage embryos has previously been described(13); remarkable rates of up to 60% mosaic have been reported in aneuploid embryos due to the suggested mitotic disorganization(12).

Four healthy embryos for Lynch Syndrome were analysed by CGH, two of them showed aneuploidies for one or more chromosomes. Therefore, if the diagnosis had been only for the monogenic disease, half of the unaffected embryos that could have been selected for transfer might have presented aneuploidies, and consequently they would have not been appropriate for implantation or could have even lead to early miscarriage.

Trophectoderm (TE) biopsy is becoming a powerful approach, which would minimize ADO, as more than one cell are analyzed. However, it needs specialized equipment to be optimized. Additionally, further IVF treatments for the patients are required for cryotransfer of the selected embryos as well as reliable cryopreservation approaches with good yields.

Recently, Karyomapping and SNP arrays offer an extensive screening of single-gene defects in a single approach, and the whole chromosome complement analysis can be performed simultaneously(14). At the moment, these technologies are still very expensive, need unique equipment and still require consensus by specialists in order to solve any kind of interpretational difficulties prior to becoming applicable and interpretable by any PGD center.

In conclusion, this improved procedure of DF-PGD offers the possibility to analyze both the mutations and the whole chromosome complement of the embryos from families carrying monogenic diseases. This double analysis is an accessible and affordable approach for any PGD laboratory, to be used in PGD applications to candidate families.

REFERENCES

1. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-770.
2. Harper JC, Coonen E, De Rycke M et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 2010; 25: 2685-2707.
3. Reeves SG, Meldrum C, Groombridge C et al. DNA repair gene polymorphisms and risk of early onset colorectal cancer in Lynch syndrome. *Cancer Epidemiol* 2011.
4. Munne S, Sandalinas M, Escudero T et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 91-97.
5. Munne S, Bahce M, Sandalinas M et al. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 81-90.
6. Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M et al. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod* 2008; 23: 1949-1956.
7. Obradors A, Fernandez E, Rius M et al. Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2009; 91: 933 e931-937.
8. Rius M, Obradors A, Daina G et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010; 25: 1824-1835.
9. Obradors A, Rius M, Daina G et al. Double-Factor Preimplantation Genetic Diagnosis: preliminary results. In: Plaseska-Karanfilska D ed. *Human Genetic Diseases*. Rijeka, Croatia: InTech, 2011: 161-178.
10. Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J et al. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 841-847.
11. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009; 15: 577-583.
12. Rius M, Daina G, Obradors A et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011; 95: 413-416.
13. Vanneste E, Voet T, Melotte C et al. 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.
14. Handyside AH, Harton GL, Mariani B et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010; 47: 651-658.

TABLES

Table 1

Results from the clinical application for Lynch Syndrome

Embryo	Monogenic diagnosis Lynch Syndrome	Comprehensive aneuploidy screening by Comparative Genomic Hybridization	Transfer
C2	Affected	46, XY Euploid	No
C3	Affected	47, XO, -4pterq27, +4q27qter -5, +9, +11, +16	No
C4	Healthy	46, XX, -9pterq21.3, +9q21.3qter, +11, -18	No
C6	Affected	47, XY +17	No
C7	Affected	46, XX Euploid	No
C8	No Diagnosis	46, XX Euploid	No
C9	Affected	46, XY, -9q21.3qter, -16	No
C10	Affected	46, XY Euploid	No
C12	Healthy	No biopsy	Cryopreserved
C13	Healthy	46, XY Euploid	Yes
C14	Healthy	47, XX, +16	No
C15	Affected	46, XY Euploid	No
C16	No Diagnosis	45, XX, -8	No
C17	Healthy	46, XX Euploid	Yes

Table 2

Cytogenetic results obtained in single biopsied blastomeres during the DF-PGD and reanalysis.

Embryo code	CGH results in a single blastomere	Reanalysis code	Reanalysis
C2	46, XY Euploid	C2 ¹	46, XY Euploid
C4	46, XX, -9pterq21.3, +9q21.3qter, +11, -18	C4 ¹	46, XX, -4, +11
C8	46, XX Euploid	C8 ¹	46, XX Euploid
C10	46, XY Euploid	C10.1 ³	46, XY Euploid
		C10.2 ³	46, XY Euploid
		C10.3 ³	46, XY +19
C14	47, XX, +16	C14 ¹	45, X0 +16
C15	46, XY Euploid	C15.1 ²	46, XY Euploid
		C15.2 ²	46, XY, -1q
		C15.3 ²	45, X0
		C15.4 ³	46, XY, +1p32.1q31, +6p, -9q
C16	45, XX, -8	C16 ¹	45, X0
1) Correspond to whole embryos 2) Are single blastomeres 3) Correspond to groups from 3 to 5 blastomeres			