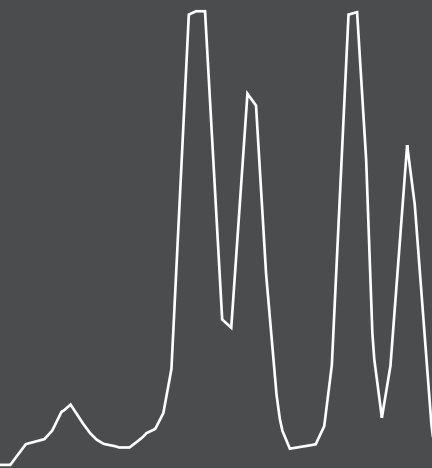
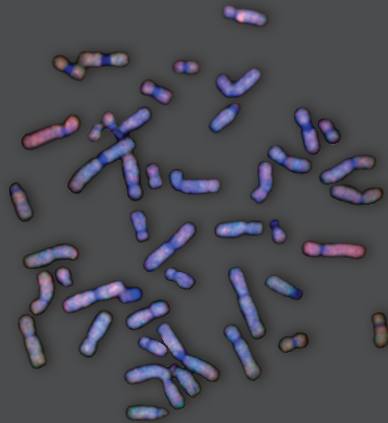


Anàlisi completa d'aneuploidies d'origen femení i de malalties monogèniques en embrions: El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor (DF-PGD)

Albert Obradors i Cherta



Memòria presentada per Albert Obradors i Cherta per aspirar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de doctorat de Biologia Cel·lular

Albert Obradors i Cherta

Bellaterra, 12 de Juny del 2009

La Dra. Joaquina Navarro i Ferreté, professora titular, i el Dr. Jordi Benet i Català, professor titular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que Albert Obradors i Cherta ha realitzat sota la seva direcció, a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball que, per optar al grau de Doctor en Biologia Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona, presenta amb el títol següent:

Anàlisi completa d'aneuploïdies d'origen femení i de malalties monogèniques en embrions: El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor (DF-PGD).

Dra. Navarro i Ferreté

Dr. Benet i Català

Agraïments

El meu agraïment a les institucions i organitzacions que han donat suport econòmic a aquest treball:

- Ministeri de Sanitat (FIS-ISCIH; PI 051395)
- Generalitat de Catalunya (AGAUR) (2005SGR00495)
- Càtedra de Recerca Eugin
- Programa de Doctorat de Biologia Cel·lular: Conveni UAB –Reprogenetics S.A.
- Beca de Formació de Personal Investigador 2005-2009 (FI 2005FI00108)

Vull agrair al personal del centres amb els que hem col·laborat per la realització d'aquest treball:

- Clínica Eugin
- Fundació Puigvert
- IVI Barcelona
- Centro de Reproducción CEFER
- Unitat de Reproducció de Hospital Vall d'Hebron
- Fundación Jiménez-Díaz
- Clínica Quirón Madrid

Agrair també a totes les donants d'òocits i a totes les famílies portadores de malalties monogèniques que s'han inclòs en aquesta tesi, ja que sense la seva aportació no haguès estat possible.

I per acabar, a tots els components de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, especialment a la Quima, a en Jordi, a la Maria, a la Mariona, a la Gemma i a l'Agustín, per possibilitar l'impossible i per fer dels sis darrers anys (el que ha durat aquesta Tesi Doctoral), una experiència immillorable.

A la meva estimada Lúdia,
al meu Pare i a la meva Mare,
als meus germans, Gerard i Pepa,
i a la meva Àvia, per tot el seu suport,
i en memòria del Prof. Dr. Josep Egozcue
que em va ensenyar a estimar la ciència.

SUMARI

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. EL DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL	2
1.1.1. El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de malalties monogèniques	2
1.1.2. El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de detecció d'aneuploïdes	3
1.2. METODOLOGIES APLICADES AL DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL	7
1.2.1. Metodologies de detecció de malalties monogèniques en cèl·lules aïllades	7
1.2.2. Metodologies de detecció d'aneuploïdies en cèl·lules aïllades	21
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS	27
3. MATERIAL I MÈTODES	29
3.1. MATERIAL I MÈTODES DE L'OBJECTIU 1	30
3.1.1. Hibridació Genòmica Comparada	30
3.2. MATERIAL I MÈTODES DE L'OBJECTIU 2	35
3.2.1. Tècnica de <i>Multiple Displacement Amplification</i> (MDA)	35
3.2.2. Mètodes d'anàlisi de mutacions	36
3.2.3. Optimització del Protocol de PCR en cèl·lules úniques	40
3.2.4. Tècnica de <i>Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification</i> (MLPA). 45	
3.3. MATERIAL I MÈTODES DE L'OBJECTIU 3	47
3.3.2. Aplicació clínica del DF-PGD	49
4. RESULTATS	50
4.1. RESULTATS DE L'OBJECTIU 1	51
4.1.1. Article nº1 (en revisió)	51

4.2. RESULTATS DE L'OBJECTIU 2.	73
4.2.1. Resultats de l'optimització de la MLPA en cèl·lules aïllades.....	73
4.2.2. Resultats de l'optimització del CF assay.....	76
4.3. RESULTATS DE L'OBJECTIU 3	79
4.3.1. Article nº2.....	79
4.3.2. Article nº3.....	88
4.3.3. ARTICLE Nº 4 (EN REVISIÓ).....	96
5. DISCUSSIÓ	122
5.1. ESTUDI D'ANEUPLOÏDIES D'OÒCITS DE DONES DONANTS DE CICLES DE REPRODUCCIÓ ASSISTIDA.	123
5.2. MÈTODES MOLECULARS ALTERNATIUS D'APLICACIÓ AL DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL.	130
5.2.1. Detecció d'aneuploïdies mitjançant la MLPA.....	130
5.2.2. Optimització de la detecció de múltiples mutacions en cèl·lula aïllada mitjançant <i>CF Assay</i>	131
5.3. DESCRIPCIÓ I APLICACIÓ CLÍNICA DEL PROTOCOL DE DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL DE DOBLE FACTOR (DF-DGP).	132
6. CONCLUSIONS	142
7. BIBLIOGRAFIAA	145
8. ANNEXES	154

1. Introducció

1.1. El Diagnòstic Genètic Preimplantacional

1.1.1. El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de malalties

monogèniques

El Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP) permet a parelles portadores d'un determinat síndrome o malaltia, i per tant, amb un 25-50 % de possibilitats de transmetre el síndrome o malaltia a la seva descendència, seleccionar dels embrions generats amb tècniques de Fecundació *in vitro* (FIV) a partir dels seus oòcits i espermatozoides, els que són sans pel síndrome o malaltia en qüestió. A més, té l'avantatge vers el Diagnòstic Prenatal de que no implica una terminació de l'embaràs en el cas que es diagnostiqui un embrió afecte de la malaltia genètica familiar, un fet molt dramàtic, especialment en malalties que tenen una aparició tardana.

El DGP es va descriure per primera vegada casi fa ja vint anys per Handyside i col. En la seva primera aplicació, el DGP va permetre seleccionar embrions sans en parelles afectades per malalties genètiques lligades al sexe, concretament per l'adrenoleucodistrofia i el retràs mental lligat al cromosoma X (Handyside et al., 1990). Des deleshores, s'han publicat més de 500 treballs de DGP per la detecció de malalties monogèniques, i la ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) recull que des del 2005, hi ha hagut més de 2.500 aplicacions clíniques per aquest tipus de DGP (Goossens et al., 2008).

Tot i que aquestes dades denoten la gran expansió global del DGP, encara és una metodologia en creixement, és a dir, que no ha arribat a la total maduresa tècnica possible. Mostra d'això és la gran varietat de sistemes de diagnòstic que s'apliquen en els diferents laboratoris especialitzats en DGP.

Tradicionalment, el diagnòstic de malalties monogèniques es realitza mitjançant la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), per tal de poder amplificar el gen implicat en la malaltia en concret. Això, es manté en la majoria de grups que treballen en el DGP, però hi ha varies modificacions. Mentre hi ha grups que utilitzen el blastòmer directament per a la PCR, n'hi ha que primerament amplifiquen tot el genoma del blastòmer amb diferents tècniques de WGA (*Whole Genome Amplification*), per després emprar una alíquota del producte de l'amplificació per a la PCR. A part, hi ha multitud de sistemes de diagnosi: des de la digestió amb enzims de restricció, gels d'acrilamida per detectar la diferència de seqüència o mida de les mutacions, la seqüenciació, el *MiniSequencing*, la utilització de microsatèl·lits informatius lligats al gen mutat, entre d'altres...

Davant de tantes possibilitats, costa decidir quin és el protocol més adient i òptim per a aplicar de forma genèrica al DGP.

Segons la Organització Mundial de la Salut (OMS), el 8-10 % dels Europeus pateixen alguna de les anomenades malalties rares (és a dir, que afecten a menys de 5 de cada 10.000 persones) de les quals el 80 % tenen un origen genètic. Per tant, només a Espanya, es calcula que hi ha aproximadament 2,5 milions de ciutadans afectes de malalties genètiques, un valor molt més elevat que el total de cassos realitzats en tot Europa des de el 2005 segons l'ESHRE (2.500 aplicacions clíniques). Això, pot indicar una creixent demanda d'aquesta tecnologia en el futur més immediat, i per tant, és imprescindible que la metodologia emprada sigui òptima per tal de poder afrontar aquest potencial augment de la demanda en condicions d'excel·lència.

Aquest treball, pretén fer una aportació en aquest camp de la ciència, analitzant les diferents opcions metodològiques que ja s'apliquen clínicament al DGP, per conjugar-les en busca de la millor combinació, i alhora, buscant noves tecnologies que no s'hagin aplicat fins ara al DGP, per estudiar la seva viabilitat i possible utilitat clínica.

2.1.2. El Diagnòstic Genètic Preimplantacional de detecció d'aneuploides

El DGP no tan sols s'empra per a la detecció de malalties monogèniques, sinó també pel cribatge d'aneuploïdies en embrions, és a dir, per detectar si els embrions analitzats contenen el nombre de cromosomes correcte (46), i per tant, són euploides, o bé, si tenen algun cromosoma extra o en manca algun, en aquest cas, presentaria aneuploïdia.

La presència d'aneuploïdia en els embrions provoca en la majoria dels cassos, una alta inviabilitat dels mateixos en els primers estadis del desenvolupament embrionari (Boue et al., 1985). Però algunes aneuploïdies no provoquen la pèrdua embrionària, i poden mantenir-se durant el desenvolupament fetal i originar descendència afecte de la aneuploïdia, el que comporta seriosos problemes de salut i retard mental, entre d'altres.

Es postula que la incidència d'aneuploïdia embrionària pot estar darrera de la baixa taxa de fecunditat de l'espècie humana (Bahçe et al., 1999, Sandalinas et al., 2001), i que per tant, si es seleccionés per a transferir, embrions euploides, la seva taxa d'embaràs (o d'implantació) seria molt superior (Gianaroli et al., 2002, Munne et al., 2006b, Farfalli et al., 2007). D'aquesta assumpció neix el PGS (*Preimplantation Genetic Screening*), és

a dir, el DGP focalitzat en el cribatge d'aneuploïdies amb l'objectiu d'incrementar la taxa d'implantació dels embrions transferits.

Els primers treballs en PGS van ser del 1996, sis anys després de la primera aplicació del DGP per malalties monogèniques a càrrec de Handyside i col. (Munne i Weier, 1996, Verlinsky et al., 1996a, Verlinsky et al., 1996b). Actualment, hi ha uns 250 treballs publicats en aquest àmbit. Basant-nos altre cop amb les dades de la ESHRE, des del 2005, hi ha hagut més de 9.000 aplicacions clíniques de PGS a Europa (Goossens et al., 2008).

La FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*) és la tècnica emprada en la immensa majoria dels PGS. Segons el nombre de sondes que s'utilitzin, la FISH permet detectar fins a 13 dels 23 cromosomes (Abdelhadi et al., 2003), tot i que rutinàriament, tan sols s'analitzen un màxim de 9 cromosomes (cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) (Pujol et al., 2003), quedant, per tant, catorze cromosomes sense analitzar.

Aquest fet, és a dir, que més de la meitat dels cromosomes de l'embrió no es detectin per FISH, pot explicar, segons s'ha publicat darrerament, que el PGS no només no incrementa la implantació embrionària, sinó que fins hi tot, la redueix (Staessen et al., 2004, Mastenbroek et al., 2007, Hardarson et al., 2008, Staessen et al., 2008).

De fet, analitzant un cop més les dades de la ESHRE, podem extreure que, de mitjana, tan sols el 13,5 % dels embrions seleccionats amb FISH transferits a les pacients implanten i generen embaràs (1.635 embarassos per batec cardíac / 12.131 embrions transferits) (Goossens et al., 2008). És coherent pensar que, si enlloc d'analitzar parcialment la dotació cromosòmica del embrió s'analitzés completament, la taxa d'implantació dels embrions transferits seria superior a la descrita fins ara.

Hi ha varies tècniques que permeten la detecció de tot el complement cromosòmic, de entre elles destaquem, les que s'han desenvolupant més recentment, la CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) i l'array-CGH. L'array-CGH permet detectar variacions en el nombre de cromosomes d'una forma ràpida, i sense necessitar un gran nombre d'operadors experimentats per dur-la a terme. D'aquesta manera, es pot aplicar directament en blastòmers, sense necessitat de congelar l'embrió a l'espera dels resultats, ja que aquests s'obtenen dins d'un període de temps suficient per a poder realitzar la transferència embrionària en el mateix cicle de FIV. En canvi, té l'inconvenient de l'elevat cost dels reactius i de la infraestructura necessària per analitzar els resultats. De moment, hi ha varis treballs d'optimització de l'array-CGH a cèl·lules aïllades amb resultats molt interessants (Hu et al., 2004, Wells et al., 2004, Le

Caignec et al., 2006, Fiegler et al., 2007), i recentment, s'ha aplicat per primera vegada clínicament, obtenint cinc embarassos en pacients amb múltiples intents fallits de FIV (Hellani et al., 2008). Tot i aquest resultat tant encoratjador, calen més treballs per confirmar la possibilitat d'aplicar amb seguretat els array-CGH al PGS. De moment, i fins que arribi aquest moment, la CGH continua sent la tècnica d'elecció per a la detecció de tots els cromosomes de l'embrió.

La CGH es va aplicar al PGS per primera vegada tot just fa set anys, i des de aleshores s'ha aplicat repetides vegades (Voullaire et al., 2002, Wells et al., 2002, Wilton, 2005, Keskinetepe et al., 2007, Sher et al., 2007), tot i que més tímidament que la FISH, degut en part, a la complicació tècnica i a la quantitat de personal qualificat que requereix per a la seva aplicació clínica. La CGH, a més, té una limitació important, comparat amb l'array-CGH, es requereixen un mínim de 4-5 dies per obtenir els resultats. Això implica que si s'analitza un blastòmer biopsiat de l'embrió el dia +3, caldrà congelar l'embrió per possibilitar l'obtenció dels resultats de CGH i en el cas que sigui euploide, caldrà descongelar-lo per transferir-lo en un altre cicle de FIV. Se sap que el procés de congelació-descongelació és relativament dramàtic per l'embrió, ja que el 33-50 % d'ells no sobreviu al procés (Hill, 2003, Jericho et al., 2003, Munne i Wells, 2003, Wilton et al., 2003).

L'altre opció que ofereix la CGH és la utilització del primer corpuscle polar (1CP), que s'obté per biòpsia just després de la fecundació per ICSI dels oòcits de la pacient. Al obtenir el 1CP en el dia 0 (o dia de la punció fol·licular i de la fecundació), es disposen de fins a 5 dies abans de la transferència embrionària, i per tant, és possible obtenir els resultats de la CGH dins del mateix cicle de FIV sense necessitat de congelar els embrions. L'anàlisi del 1CP, però, òbviament aporta informació parcial del embrió ja que tan sols informa de les aneuploïdies presents en l'oòcit corresponent. Donat que el 1CP, conté una dotació complementària a la del oòcit, si aquest presenta una trisomia per un cromosoma en concret, l'oòcit corresponents presentarà una monosomia per aquest mateix cromosoma. D'aquesta manera, amb la 1CP-CGH, s'obté un diagnòstic indirecte de les aneuploïdies de l'oòcit, és a dir, de les d'origen femení i originades durant la primera divisió meiótica, però quedarien sense detectar les aneuploïdies degudes a la segona divisió meiótica, i les d'origen masculí així com les aneuploïdies causades mitòticament en les divisions mitòtiques de l'embrió. Està descrit, però, que la majoria d'aneuploïdies que s'observen en els embrions, s'han originat, de fet, en l'oòcit, concretament en la seva primera divisió meiótica (Nicolaidis i Petersen, 1998, Hassold i

Hunt, 2001). Precisament així es justifica l'anàlisi de 1CP mitjançant la CGH per a la realització de un PGS complet d'aneuploïdies d'origen femení.

Així doncs, l'aplicació de la 1CP-CGH podria permetre la selecció dels embrions potencialment euploides per tots els cromosomes, i per tant, amb més probabilitat d'implantar a l'úter de la pacient. La qüestió rau en si s'hauria d'aplicar en totes les pacients indistintament de la seva edat, o bé, només recomanar-la a pacients amb edat avançada (més de 35 anys).

L'aneuploïdia en oòcits de dones pacients de FIV, i per tant, d'edat avançada i a més amb problemes reproductius, ha estat àmpliament estudiada. Diferents estudis indiquen que aproximadament el 50 % dels oòcits d'aquestes pacients (edat mitjana 40 anys) contenen aneuploïdies (Pellestor et al., 2003, Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b, Pellestor et al., 2005b, Fragouli et al., 2006c, Wells et al., 2008). Per tant, un valor significativament elevat, que sens dubte recomanaria l'aplicació de la 1CP-CGH en aquest tipus de pacients.

En canvi, hi ha molt pocs estudis d'oòcits provinents de pacients joves sense problemes reproductius. En els únics treballs al respecte, s'analitzen oòcits de dones joves que participen en programes de donació d'oòcits en centres de FIV. Aquest oòcits són molt difícils d'obtenir amb finalitat d'estudi bàsic, ja que tenen un alt valor clínic. S'ha demostrat que utilitzar oòcits de donants enlloc d'oòcits de la pròpia pacient incrementa en casi 10 punts el percentatge d'embaràs (39,6 % en comparació al 30 %) (Andersen et al., 2008).

Aquesta limitació en l'obtenció de mostra per a l'anàlisi, fa que en la majoria d'estudis d'oòcits de donants, s'analitzen els oòcits madurats *in vitro* (MIV): oòcits immadurs en el moment de la punció fol·licular que no s'usen per a ICSI i que es deixen al incubador unes 16 hores per tal que es produeixi l'extrusió del 1CP o maduració. Difícilment s'utilitzen en estudis bàsics oòcits "frescos", és a dir, els que en el moment de la punció fol·licular són madurs (constituïts per el 1CP extrosionat i el corresponent oòcit aturat a la MII) i que per tant, són vàlids per a ésser inseminats mitjançant ICSI. És obvi que els oòcits MIV poden no ser massa representatius dels "frescos", ja que el procés de la maduració *in vitro* pot generar alteracions artefactuals, però com s'ha dit, la dificultat en obtenir oòcits de donants, justifica la seva utilització. Així doncs, els treballs emprant oòcits de donants MIV troben una taxa d'aneuploïdia de entre el 5 al 23 %, segons autors (Pellestor et al., 2003, Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Fragouli, 2007).

Hi ha només tres treballs que analitzin oòcits “frescos” de donants amb tècniques que permetin l’anàlisi de tots els cromosomes, obtenint una taxa d’aneuploïdia de entre el 29 i el 65% (Sandalinas et al., 2002, Keskinetepe et al., 2007, Sher et al., 2007).

Aquests valors contrasten amb els observats pels estudis d’oòcits MIV de donants, ja que indiquen una taxa d’aneuploïdia molt superior, fins i tot, superior a la observada en pacients de FIV.

Si ens basem en aquestes dades, és difícil decidir si és recomanable l’aplicació del PGS mitjançant 1CP-CGH en dones joves, ja que com hem vist, la taxa d’aneuploïdia varia de entre el 5 al 6 5%.

Arribats aquest punt, i amb la intenció de aportar més dades en aquest camp, aquest treball es planteja estudiar mitjançant 1CP-CGH, oòcits de donants, diferenciant que siguin “frescos” o MIV, per tal de poder decidir si és útil aplicar PGS a dones joves.

2.2. Metodologies aplicades al Diagnòstic Genètic

Preimplantacional

2.2.1. Metodologies de detecció de malalties monogèniques en cèl·lules aïllades

2.2.1.1. Amplificació del Genoma amb *Multiple Displacement*

Amplification (MDA)

La MDA es va descriure fa ja set anys (Dean et al., 2002) i des deleshores ha esdevingut una revolució en el camp de les tècniques de WGA (*Whole genome amplification*), que són les tècniques que s’usen per augmentar la quantitat de DNA en mostres amb una o poques cèl·lules. S’han publicat més de 150 articles utilitzant la MDA aplicada en càncer, clínica forense, com també en DGP (Hellani et al., 2004).

El WGA té l’avantatge de permetre l’obtenció de una gran concentració de DNA a partir d’una sola cèl·lula. Això ha resultat molt interessant en els casos de DGP per a la detecció de malalties monogèniques, en els que a partir d’una sola cèl·lula (el blastòmer) cal realitzar els protocols de PCR necessaris per a diagnosticar la malaltia en qüestió.

Fins a l’arribada de la MDA, el DNA del blastòmer s’utilitzava per amplificar únicament la regió implicada amb la malaltia, és a dir, la mutació puntual, conjuntament amb microsatèl·lits que permetien una diagnosi indirecta de la malaltia per lligament.

Per tant, calia optimitzar un protocol de PCR que permetés una amplificació simultània de diferents locis per a diferents mutacions i per als microsatèl·lits lligats a les mutacions. Era necessari doncs, optimitzar una PCR múltiplex amb tres parelles de encebadors com a mínim (una mutació en malalties dominants i dos microsatèl·lits, un a cada costat del gen implicat). A més, aquesta PCR múltiplex tenia com a DNA diana, el provinent d'una sola cèl·lula, solament dos còpies de cada al·lel, i per acabar, no es podia repetir la reacció, ja que no es disposava de més cèl·lules. Per molt complicat que sembli, el DGP per malalties monogèniques ha estat funcionant d'aquesta manera des de la seva primera aplicació al 1990, quan es va seleccionar embrions portadors del cromosoma Y per PCR (Handyside et al., 1990).

L'aplicació de la MDA en el DGP, permet amplificar primerament el blastòmer per obtenir una gran quantitat de DNA que s'utilitza per a la detecció de la malaltia monogènica en qüestió. El principal avantatge d'aconseguir amplificar tot el genoma del blastòmer és amplificar separatament els diferents locis sense necessitat d'optimitzar una PCR múltiplex per detectar-los tots conjuntament i cada un entre tots. Això fa que l'eficiència de la reacció de PCR sigui molt superior, assolin-se millors resultats i per tant, una diagnosi més acurada. A part, es poden amplificar un major nombre de locis, i repetir la reacció en el cas que aparegués qualsevol error. Conseqüentment, la diagnosi encara és més acurada, i el temps d'optimització del protocol es redueix considerablement.

L'únic inconvenient de la MDA es la seva elevada taxa de ADO (*Allele Drop Out*). L'ADO succeeix quan en un locus amb dos al·lels diferents només s'observa un dels al·lels. Aquest fenomen només s'ha descrit en procediments de cèl·lula única, ja que tal com s'ha dit, al disposar només de una còpia de cada al·lel, pot succeir que una de les còpies estigui degradada o que per qualsevol altre motiu no s'amplifiqui.

L'ADO és un problema en el DGP, per exemple, en una malaltia dominant, si l'al·lel mutant pateix un ADO, i per tant, aquest no apareix i només es detecta l'al·lel normal, aleshores l'embrió es diagnostica erròniament com a sà per a la malaltia dominant en qüestió quan realment és afecte.

Per tal d'evitar aquest risc d'error en la diagnosi, cal amplificar no només el loci de mutació, sinó que també microsatèl·lits lligats a la mutació que ens informaran indirectament del genotip de l'embrió. Com més loci amplifiquem menys risc de que pateixin ADO a la vegada per l'al·lel mutant, i per tant, menys risc d'error en la diagnosi.

Tal com dèiem, els productes de MDA tenen una mitja del 25 % d'ADO (Spits i Sermon, 2008), comparat amb el 10 % observat en cèl·lules no amplificades amb MDA. No es coneixen amb exactitud les causes d'aquest augment, possiblement són degudes a causes intrínseques de l'enzim utilitzat o de la metodologia d'amplificació de la MDA, aspectes que veurem a continuació.

Per tant, el fet que amb la MDA es multipliqui per dos cops i mig la taxa ADO, significa, en teoria, que el risc de error en la diagnosi també augmenta. Per contrarestar aquest efecte negatiu, la MDA permet, tal com ja hem dit, amplificar més locis que si es tractés d'un protocol a partir de cèl·lules sense amplificar, i per tant, com més loci s'amplifiquen menor és la probabilitat que estiguin afectats per ADO alhora, i d'aquesta manera, la major taxa d'ADO no es tradueix en una inacceptable major taxa d'error diagnòstic.

Entrant ara en les consideracions tècniques, el protocol de MDA té dos característiques diferents a altres mètodes de WGA: l'enzim que utilitza i els encebadors. La MDA no utilitza una Taq Polimerasa com la que es sol usar en les reaccions de PCR convencional o en altres mètodes de WGA, sinó que utilitza l'enzim DNA Polimerasa del bacteriòfag Phi29. Aquest enzim polimeritza a 30 °C i té la particularitat que si mentre esta polimeritzant, es troba amb una doble-cadena de DNA, no s'atura ni la destrueix, tal com fan les Taq Polimerases, sinó que la desplaça i continua polimeritzant, així s'augmenta molt la quantitat de DNA generat.

Si combinem aquesta característica amb el fet de que els encebadors que s'utilitzen són hexàmers totalment degenerats, és a dir, sis bases sintetitzades a l'atzar, que per tant, poden hibridar en molts llocs el genoma, s'aconsegueix una amplificació massiva que a més cobreix tot el genoma (figura 1).

2.2.1.2. Detecció directa i indirecta amb Múltiplex PCR

La PCR és l'eina bàsica de diagnosi de malalties monogèniques en el DGP, com també en el diagnòstic prenatal, el postnatal i múltiples altres aplicacions de recerca bàsica o aplicada. Es va descriure fa casi un quart de segle per Mullis (Mullis et al., 1986) i, apart dels enzims utilitzats en la amplificació, el concepte de la PCR no ha variat gens des de aleshores.

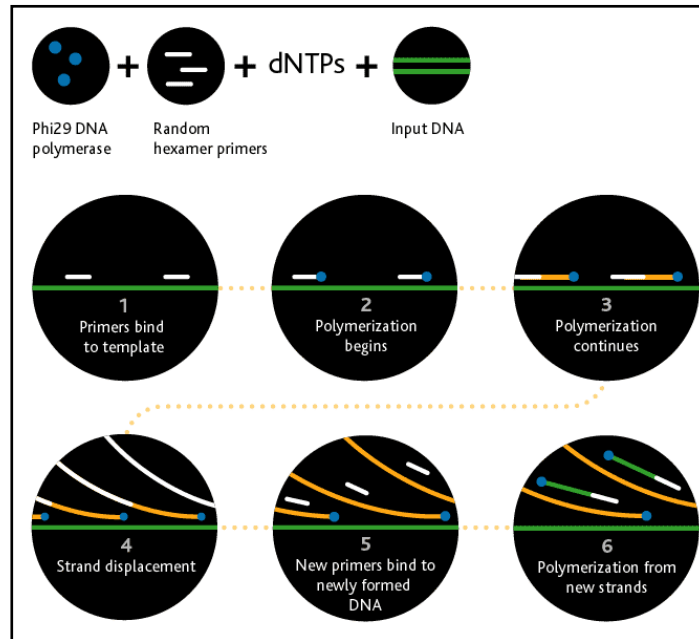


Figura 1. Esquema de la reacció de *Multiple Displacement Amplification* (MDA).

Bàsicament, es basa en la utilització d'una DNA polimerasa que al unir-se a un parell de encebadors específics per dues seqüències determinades, realitza la síntesi de dues noves cadenes de DNA que inclou la seqüència existent entre els dos encebadors. Això es repeteix unes 30-35 vegades, i d'aquesta forma es dupliquen cada cop el número de cadenes de DNA sintetitzades. Al finalitzar la reacció, s'obtenen 34.359.738.368 (2^{35}) còpies per cada una de les còpies originals del fragment de DNA present en la reacció.

El procés d'amplificació té tres passos: la desnaturalització inicial, els cicles i l'elongació final. La desnaturalització inicial té lloc en un pas a 95 °C, normalment de 5 minuts, en el que el DNA es desnaturalitza totalment, és a dir, que les seves dues cadenes complementàries s'obren per permetre la hibridació d'encebadors específics. Un cop fet això, segueixen els cicles, que a la seva vegada tenen tres passos: desnaturalització, hibridació dels encebadors i l'elongació. La desnaturalització del DNA, és requisit necessari per començar un nou cicle d'amplificació, per tal de possibilitar l'obertura de les cadenes i per permetre l'entrada de nous encebadors. Un cop el DNA s'ha desnaturalitzat a 95 °C, la temperatura es redueix fins a 55 °C-65 °C, segons el encebador utilitzat. En aquest pas, la temperatura menys restrictiva, permet als encebadors unir-se al DNA, però només entre seqüències 100 % específiques, en cas contrari, les unions entre bases no seran suficients fortes com per suportar la temperatura i per tant, es separen. És per aquest motiu, que cada parell de encebadors té

una temperatura òptima (T_m) a la qual només s'uneix al seu fragment 100 % complementari. Un cop units els encebadors, segueix l'elongació, que requereix una temperatura òptima de treball de l'enzim DNA polimerasa (68 °C-72 °C) per tal de permetre la síntesi de una cadena de DNA. A continuació, s'inicia un nou cicle com el idèntic al descrit fins a 30-35 cicles. Finalment hi ha un últim pas d'elongació, normalment de 5 minuts a la temperatura òptima de l'enzim, per tal de donar per acabada la síntesi de fragments de DNA.

Hi ha una gran varietat de kits de PCR disponibles, segons les cases comercials i les característiques de l'enzim. Entre ells, hi ha la *HotMaster Taq Polymerase* (5PRIME) que té dos característiques que la fan interessant. Per començar, té activitat *Hot-Start*, és dir, la polimerasa només s'activa després d'un pas de 5 minuts a 95 °C. Això és molt útil per evitar amplificacions inespecífiques, ja que quan es deixa el tub al termociclador, i la temperatura comença a pujar fins el primer pas de desnaturalització del DNA, els encebadors poden hibridar-se a temperatures menors de la seva T_m , i per tant, hibriden en seqüències no específiques. Si la polimerasa és activa en aquestes condicions, pot polimeritzar seqüències inespecífiques i això redueix considerablement l'eficiència de la reacció. En canvi, si la polimerasa només és activa després d'un pas a 95 °C, els encebadors, tot i unir-se inespecíficament al DNA, no s'amplificaran.

L'altre particularitat que presenten és que el tampó que s'adjunta amb el kit ajusta automàticament la concentració de magnesi ideal per la reacció. Aquest fet és altament útil, ja que la concentració de magnesi és clau per obtenir una amplificació òptima. Normalment, cal ajustar la concentració de magnesi per a cada reacció, amb aquest kit, al no requerir aquest pas d'optimització, es facilita considerablement el funcionament òptim de la PCR.

Pel que fa a la utilització de la PCR a la detecció de malalties monogèniques en el DGP, s'empra per a realitzar dos diagnòstics simultanis de la mutació causant de la malaltia familiar, la detecció directa i la indirecta.

La detecció directa de la mutació causant de la malaltia monogènica permet diagnosticar ràpidament l'afectació o no afectació de l'embrió. No sempre és possible ja que requereix conèixer el gen implicat i haver fet un estudi previ dels portadors de la malaltia en la família per tal de descriure la mutació particular que afecta a la família d'estudi. Si no es té aquesta informació, el diagnòstic s'ha de dur a terme mitjançant una detecció indirecta emprant microsatèl·lits de DNA

La detecció directa de la mutació mitjançant la determinació de la diferència de mida entre l'al·lel normal (o *wild-type*) i l'al·lel mutant només és possible quan la mutació impliqui una modificació de la mida del gen d'estudi, és a dir, mutacions tipus delecions i insercions.

Amb aquest senzill mètode, es poden genotipar directament algunes mutacions, però només les que impliquen variació en el nombre de nucleòtids. La majoria de mutacions, però, no són d'aquest tipus, sinó mutacions puntuals, és a dir, canvis de un nucleòtid per un altre de diferent, sense modificar el nombre final de bases.

Per detectar aquest tipus de mutacions, s'ha descrit el mètode de la *MiniSequencing*. fa tot just sis anys (Fiorentino et al., 2003) que ha resultat ésser molt eficaç i sensible.

El procés és semblant a la seqüenciació convencional, en la que a partir d'un encebador que s'uneix a la seqüència a estudiar, polimeritza en una nova cadena en la que cadascun dels nous nucleòtids incorporats estan marcats amb fluorocroms diferents, i que per tant, al llegir el producte en un seqüenciador de DNA, s'obté la seqüència del fragment amplificat.

En el *MiniSequencing*, no es seqüencia tot el fragment sinó només un nucleòtid, el subjecte a mutació puntual. Així, la reacció és més ràpida i eficient, i menys costosa, ja que només es detecta la presència o absència de la mutació, sense seqüenciar tot un fragment de DNA (figura 2).

Per aplicar el *MiniSequencing*, cal primer amplificar un fragment de DNA que inclogui la mutació. Per fer-ho, cal conèixer la posició exacta de la mutació per després dissenyar encebadors específics per la regió en concret. A més, i per tal, d'obtenir prou DNA amplificat per realitzar la reacció de *MiniSequencing*, es realitza una *Nested-PCR* enlloc de una PCR convencional. La diferència rau en que en la *Nested-PCR*, hi ha dos reaccions de PCR consecutives, utilitzant dues parelles de encebadors diferents. En la primera ronda de PCR, els encebadors s'uneixen a la regió d'interès del genoma, i es genera el fragment extern (o *outer*), després, en la segona ronda, s'usa com a DNA per amplificar el resultat de la PCR de la primera ronda i com a encebadors, uns de dissenyats específicament per estar inclosos en el producte de la primera ronda. Així, després de la segona ronda, es reamplifica el que ja havia estat amplificar anteriorment, obtenint així el fragment intern (o *inner*), que s'amplifica considerablement (figura 3).

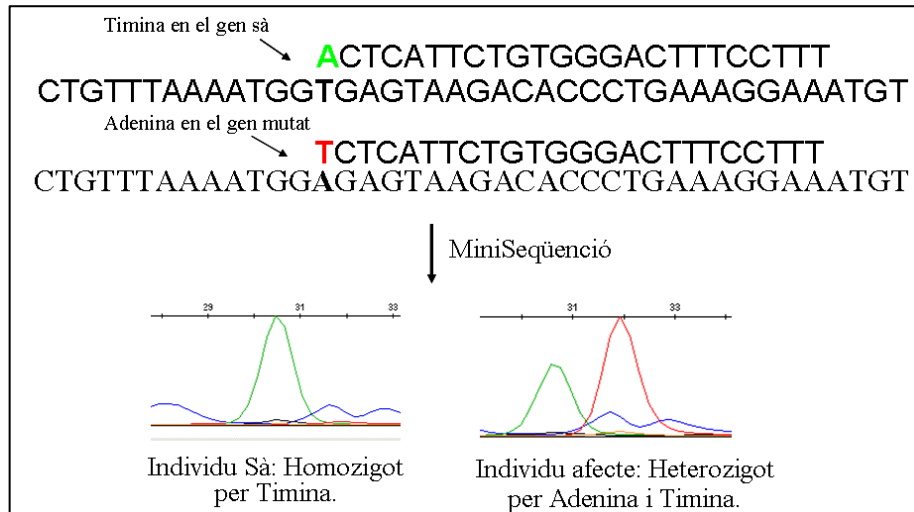


Figura 2. Esquema de la reacció de *MiniSequencing*.

Un cop aconseguida una gran quantitat del fragment de DNA amplificat que conté la mutació, es procedeix a començar amb la reacció de *MiniSequencing*.

La reacció de *MiniSequencing* consta de tres passos: la purificació del fragment de DNA, la reacció de *MiniSequencing* pròpiament dita i el rentat post-*MiniSequencing*.

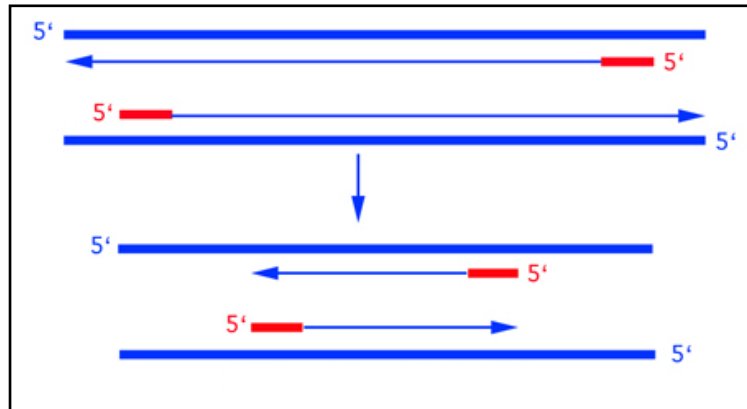


Figura 3. Esquema de la reacció de *Nested-PCR*.

La purificació es duu a terme per tal d'eliminar les restes de encebadors i de nucleòtids que no han estat utilitzats en la reacció de PCR anterior i que per tant, encara estan presents conjuntament amb el fragment de DNA generat. Aquest pas és molt important, ja que la reacció de *MiniSequencing*, tal com s'ha dit, es basa en la unió d'un encebador justament al costat del lloc de la mutació i en la posterior incorporació d'un nucleòtid que marca fluorescentment. Per tant, si conjuntament amb el fragment de DNA, hi ha encara encebadors de la reacció anterior, aquests poden tornar a unir-se al DNA, i com

que no ho faran al costat de la mutació, es sintetitzarà un nucleòtid marcat que al llegir el producte de la reacció en el seqüenciador de DNA, dona una senyal no esperada que pot confondre els resultats diagnòstics. Apart, si encara hi ha nucleòtids sobrants de la reacció anterior, al no estar marcats, competiran amb els que sí que estan marcats, i per tant, hi haurà una menor taxa de nucleòtids marcats fluorescentment incorporats, i això provocarà un resultat de menor qualitat que serà més difícil d'interpretar. Cal aleshores, eliminar les restes de encebadors i nucleòtids de la reacció. Per fer-ho, s'utilitza la mescla d'enzims ExoSAP-IT (USB), formada per dos enzims, l'Exonucleasa I i la Fosfatasa alcalina de Gamba (o *Shrimp Alkaline Phosphatase*) que eliminen els encebadors i els nucleòtids no incorporats, respectivament.

Tot seguit, es realitza l'últim pas del protocol, el rentat post- *MiniSequencing*. L'objectiu d'aquest pas és eliminar les restes de nucleòtids marcats fluorescentment que no s'han incorporat i que poden emascarar la lectura dels resultats en el seqüenciador. S'utilitza amb aquest fi, l'enzim SAP (USB), que tal com s'ha dit anteriorment, permet la degradació dels nucleòtids no incorporats

Després d'introduir la mostra a l'aparell, i esperar que es dugui a terme la lectura, s'obtenen els resultats, és a dir, els pics de fluorescència que equivalen a cadascun dels quatre nucleòtids. Habitualment, l'adenina apareix marcada en verd, la timina en vermell, la citosina en negre i la guanina en blau. Per tant, si p.e. en l'electroferograma d'un individu lliure d'una mutació d'una adenina per una timina mostraria un sol pic corresponen a les dues adenines (figura 4A), mentre que en un individu heterozigot, l'electroferograma evidenciaria dos pics un per l'adenina i l'altre per la timina del al·lel mutant (figura 4B).

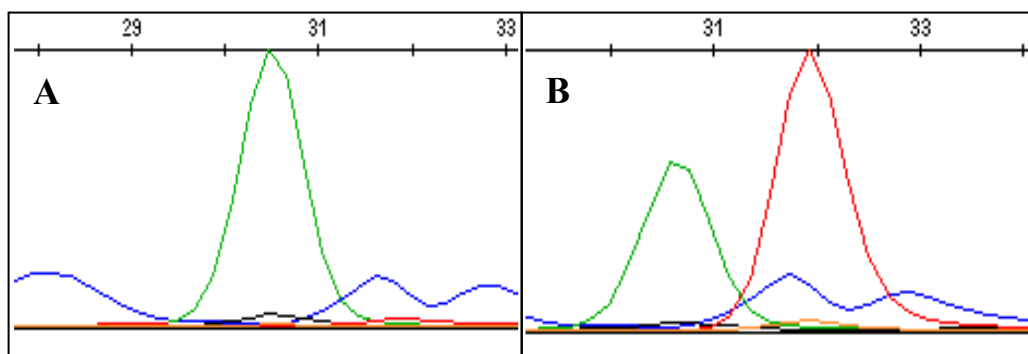


Figura 4. Electroferogrames corresponents a un individu homozigot sa amb dos adenines (un pic verd) (A), i a un individu portador de una mutació amb una Adenina (un pic verd) per una Timina (un pic vermell) (B).

Tal i com s'ha dit anteriorment, la detecció directe de la mutació permet visualitzar específicament la mutació causant de la malaltia, i per tant, diagnosticar l'embrió adequadament.

En el transcurs de la optimització d'un protocol de DGP, tot i que es pot realitzar un diagnòstic directe de la mutació, també està molt recomanat realitzar un diagnòstic indirecte mitjançant microsatèl·lits, ja que així, es realitzen dos diagnòstics independents, complementaris i per tant, es redueix el risc de diagnòstics erronis.

Els microsatèl·lits de DNA, també coneguts com a STRs (*Small Tandem Repeats*), són seqüències de DNA no informatives, és a dir, que no codifiquen per gens distribuïts per tot el genoma. Tal com diu l'acrònim en anglès, són repeticions de petites seqüències nucleotídiques en tàndem, és a dir, una al costat de l'altre. Les seqüències que es repeteixen poden tenir dos bases, aleshores, s'anomenen microsatèl·lits dinucleòtids, o bé, tres bases (trinucleòtids), quatre (tetranucleòtids) i fins a cinc (pentanucleòtids), sent els dinucleòtids, els més freqüents i els altres, cada cop menys freqüents a mesura que augmenten el nombre de nucleòtids de la repetició.

La particularitat que fa dels microsatèl·lits especialment interessants pel diagnosi, és que cada individu pot tenir diferent nombre de repeticions per un microsatèl·lit en particular, i per tant, diferents al·lels. Això permet realitzar un estudi de lligament d'uns determinats al·lels de microsatèl·lits amb una mutació en concret.

Per a la selecció dels microsatèl·lit més idonis cal aplicar els tres següents criteris:

- Que estiguin com a màxim a 2 Mb del gen d'interès. Ja que quan més distància hi hagi entre el gen i el microsatèl·lit, més probabilitats que hi hagi una recombinació entre ells, la qual cosa provocaria un error diagnòstic. En teoria, hi ha un 1% de recombinació per cada 1 Mb de distància, per tant, acceptem com a màxim un risc teòric del 2 % de recombinació.
- Que siguin microsatèl·lits tetranucleòtids, ja que són els que al amplificar-se amb PCR donen resultats més robusts, i fàcils de diagnosticar.
- Que tinguin el màxim de variació descrita possible. Com més alt sigui el valor de heterozigocitat o H_0 , més probabilitats hi ha que dos individus tinguin al·lels diferents. I per tant, més interessa el microsatèl·lit en qüestió.

Quan s'ha triat un microsatèl·lit tetranucleòtid i amb una variabilitat esperada elevada, situat a menys de 2 Mb del gen, cal que se'n trobi un altre a l'altre banda del gen. És a dir, com a mínim dos microsatèl·lits, un *upstream* i un altre *downstream* del gen.

Un cop seleccionats els microsatèl·lits, cal adquirirlos a través de la mateixa web del *Map Viewer*. Els encebadors els poden sintetitzar a múltiples laboratoris, adquirir comercialment (Roche, Applied Biosystems o Biomers). Cal tenir present que un dels encebadors, normalment el *forward*, ha de tenir l'extrem 5' marcat amb un fluorocrom, per tal de poder detectar el resultat de la seva amplificació en un seqüenciador de DNA. Amb els encebadors dels microsatèl·lits, cal estudiar a la família portadora de la malaltia en qüestió, per tal de determinar el lligament. Concretament, cal genotipar els dos membres de la parella, i fills afectes o no. També es poden estudiar els pares de cadascun dels membres de la parella, en el cas de ser una malaltia recessiva o bé els del membre afecte si es tracta d'una malaltia dominant.

Una vegada amplificat el DNA de la família, i analitzat els resultats en el seqüenciador, es valora si els microsatèl·lits són o no informatius per la parella. Genèricament, si cada membre de la parella té dos al·lells diferents, els microsatèl·lits són 100 % informatiu. I si comparteixen algun al·lel pot ser que no siguin informatius o bé informatius parcialment, depenent del genotip del fill o dels seus pares (figura 5).

1.2.1.3. Detecció de Fibrosi Quística amb el CF Assay

La Fibrosi Quística (FQ) és la malaltia genètica més freqüent en caucàsics, amb una prevalència 1 de cada 2.500 naixements afectes a Espanya, i amb 1 de cada 20 caucàsics portadors sans de la malaltia. La FQ, apart de ser tant freqüent, també és una malaltia fatal i sense cura actualment.

La FQ està provocada per mutacions en el gen CFTR, situat en el braç q del cromosoma 7. En concret, hi ha més de 1500 mutacions diferents, tot i que no totes tenen la mateixa freqüència. La mutació $\Delta F508$, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, apareix en el 70% dels cassos. Apart, hi ha unes altres 25 mutacions que també són més freqüents que la resta, tot i ser la $\Delta F508$, la més habitual de totes. Segons la xarxa europea de FQ (CF Network), l'anàlisi de 32 a 36 mutacions del gen CFTR mitjançant kit comercials, garanteix detectar al·lells mutants en el 95 % - 99 % dels pacients afectats de FQ (Dequeker et al., 2009).

Degut a la combinació d'aquests dos fets, la elevada freqüència en la població, i la gran variabilitat de mutacions causals possibles, s'han dissenyat kits comercials que permeten la detecció de múltiples mutacions de FQ alhora. Tot ells estan adreçats a ser aplicats en adults, per a l'estudi de mutacions a la població, i confirmar malalties en

adults o bé en el diagnòstic prenatal, en el cas de progenitors portadors de la malaltia. A més, són kits pensats per a una aplicació força generalitzada en laboratoris de genètica sense requerir massa complexitat metodològica obtenint els resultat de forma automatitzada. Tot i tenir l'inconvenient d'un cost elevat (aproximadament 3.000 Euros per 50 determinacions), aquestes metodologies s'utilitzen àmpliament en clíniques especialitzades en el diagnòstic prenatal.

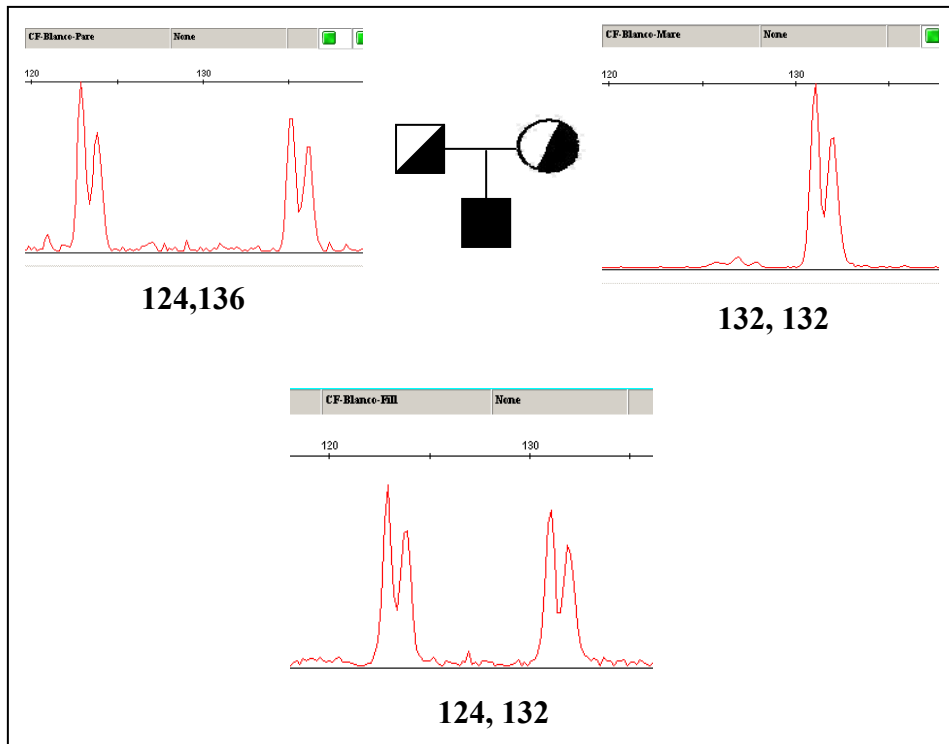


Figura 5. Genotipatge del microsatèl·lit D7S1817 en una família afecte de Fibrosi Quística. L'al·lel 124 està lligat amb la mutació paterna, aquest microsatèl·lit és per tant, parcialment informatiu de la mutació paterna.

Moltes famílies són candidates al DGP per tenir risc de descendència afectada de FQ. De fet, la majoria de cassos de DGP que es realitzen per a la detecció de malalties monogèniques són per FQ. Segons l'última recopilació de la Societat Europea de Reproducció, ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*), 457 dels 2.599 cassos (17.6 %) de DGP recollits per malalties monogèniques són de FQ, essent la malaltia que més diagnòstics acumula, seguida de la Beta Talassèmia amb 278 cassos comptabilitzats (Goossens et al., 2008).

Actualment, els protocols de DGP que es realitzen per la detecció de FQ són semblants als que s'ha comentat anteriorment: diagnòstic directe de les mutacions causant,

conjuntament combinat amb el diagnòstic indirecte utilitzant microsatèl·lits informatius. El problema particular de la FQ, degut al nombre elevat de mutacions descrites, unes 1.600, la majoria de parelles tenen mutacions diferents, i això provoca la necessitat de optimitzar un protocol de DGP específic per cada mutació fet que és problemàtic ja que requereix una gran inversió de temps i de personal qualificat. Això no és exclusiu de la FQ, sinó també d'altres malalties menys freqüents.

L'avantatge principal d'utilitzar un kit comercial, enlloc del protocol estàndard de detecció de mutacions específic per a cada parella, és l'estalvi de temps d'optimització del protocol, que sol ser d'uns quatre mesos per les mutacions específiques de cada parella. Durant aquests mesos, es realitzen tots els passos descrits en l'apartat 3.2.3 de Material i Mètodes, que inclou el disseny dels encebadors específics per les mutacions, la comprovació que detectin els mutacions de forma fiable, la selecció de microsatèl·lits informatius, i la optimització de la múltiplex-PCR per amplificar tots els locis alhora en cèl·lules úniques, prèviament amplificades amb MDA.

Per tant, si es considera el kit que detecta 32 mutacions, i s'agrupen de dos en dos, o combinacions diferents de mutacions possibles en el 95 % de parelles afectes de FQ, s'obté 528 ($CR^2_{32} = 528$) parelles de mutacions diferents, incloent les parelles amb progenitors amb la mateixa mutació. Si per optimitzar una parella d'encebadors es requereixen uns quatre mesos, calen 176 anys ($528 * 4 / 12 = 176$) de feina per optimitzar totes les combinacions possibles. És cert, però que operaris experts poden realitzar l'optimització simultània de varies parelles de mutacions alhora, normalment, es poden optimitzar uns 6 cassos a la vegada, tot i requerir molta feina, es podríem reduir el temps necessari a uns 30 anys ($176 / 6 = 29,3$ anys).

Aquests llargs períodes de temps, tot i semblar inversemblants, no s'aparten gaire de la realitat. En un treball recent que recull una sèrie important de cassos de DGP per malalties monogèniques realitzats en un centre de referència dels Estats Units de Amèrica (Gutierrez-Mateo et al., 2008), es descriu que per a realitzar més de dos-cents cicles de DGP, s'han optimitzat 106 protocols diferents de detecció de mutacions. Aquest treball s'ha realitzat en 51 mesos, és a dir 4,25 anys, per a realitzar tots els cassos clínics, incloent òbviament l'optimització, per tant, de manera orientativa, optimitzen 25 cassos l'any ($106 / 4,25 = 24,9$ cassos). Per tant, per optimitzar les 528 combinacions de mutacions de FQ possibles, es requeririen 21 anys ($528 / 25 = 21,1$ anys), enlloc dels 30 que postulat anteriorment.

Per tant, és evident que l'existència de kits comercials que detecten múltiples mutacions o malalties conjuntament, és altament avantatjós evitant l'optimització de protocols específics. Tan sols caldrà optimitzar el 1 %-5 % dels afectats de FQ que pateixen mutacions no incloses en el kit comercial.

Degut a que aquests kits estan optimitzats per a una gran quantitat de DNA, provinent de sang perifèrica o bé de líquid amniòtic, es requereix una amplificació del genoma de cèl·lules aïllades prèvia a la aplicació del kit. Hi ha descrita una aproximació metodològica en producte amplificat de DNA de cèl·lules aïllades amb PEP-PCR (*Primer Extension Preamplification PCR*) (Sanchez-Garcia et al., 2005) utilitzant el kit *Cystic Fibrosis Genotyping Assay v2* (Abbott). Emprant aquesta metodologia, en 30 cèl·lules de l'epiteli bucal, es va aconseguir una amplificació en el 90 %, és a dir, que es detectaven el 90 % de les mutacions. En canvi, tan sols el 40 % dels al·lels amplificats tenien una bona amplificació (alçada del pic superior a 250 rfu). A més, s'obtingueren un 74,5 % i un 44,5 % d'amplificació dels al·lels corresponents en producte amplificats de MII i de 1CPs de 10 oòcits descartats de cicles de FIV.

L'aparició posterior d'altres tècniques de amplificació del genoma com la MDA, planteja la possibilitat de millorar el rendiment d'un kit equivalent, el *Cystic Fibrosis Genotyping Assay v3* (Abbott), aplicant-lo en el producte de DNA de cèl·lules aïllades amplificat amb MDA. Aquest nou kit detecta 33 mutacions del gen CFTR més freqüents en Europa, incloent les 25 mutacions més freqüents mundialment, millorant la versió anterior del kit que en detectava 31.

El nou kit, igual que l'anterior, es basa amb la tecnologia de la OLA (*Oligonucleotide Ligation Assay*), és a dir, la hibridació de petites seqüències d'oligonucleòtids a la regió de la mutació. Concretament, hi ha un tres de oligonucleòtids específics per a cadascuna de les 33 mutacions, dos són específics per cada un dels al·lels, pel normal i pel mutant, que només es diferencien en una base. Cadascun d'ells té una mida diferent, essent el oligonucleòtid específic sempre més llarg per a la mutació. El tercer dels oligonucleòtids, està marcat fluorescentment i hibrida a la seqüència immediatament posterior a la mutació, i que per tant, no distingeix entre els dos al·lels. Quan es duu a terme la reacció, s'hibridarà específicament un dels dos oligonucleòtids o el mutant o el normal, i el tercer oligonucleòtid marcat. Un cop hibridats, es realitza la reacció de lligació entre els dos oligonucleòtids. Aleshores, s'analitzen els fragments originats en un seqüenciador de DNA. Depenent de la mida dels oligonucleòtids específics en el fragments de l'al·lel mutant o de l'al·lel normal, en un electroferograma es visualitzen

clarament dos pics de diferent mida, essent el de major alçada el pic de la mutació (figura 6).

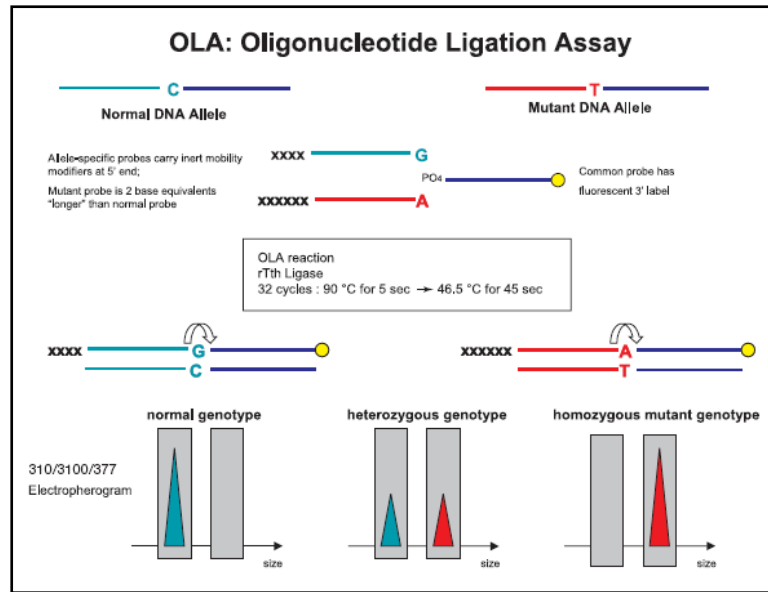


Figura 6. Esquema del protocol de OLA, que permet la detecció simultània de les 33 mutacions diferents de Fibrosi Quística.

En el kit *Cystic Fibrosis Genotyping Assay v3* hi ha 33 reaccions OLA simultànies al mateix temps una per a cada una de les 33 mutacions que analitza (figura 7).

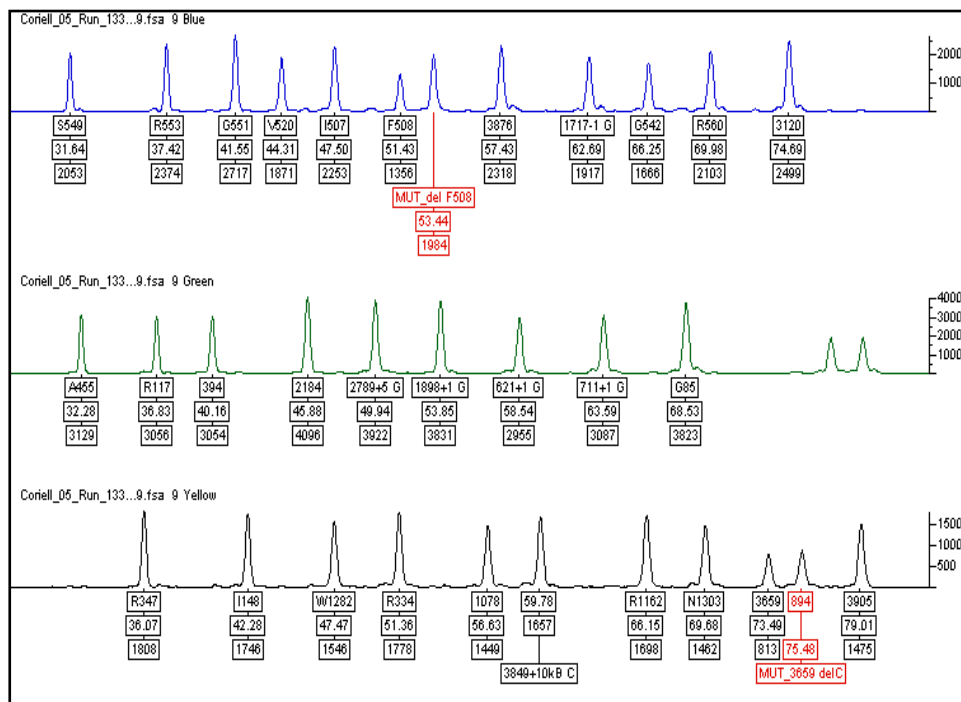


Figura 7. Resultat de *Cystic Fibrosis Genotyping Assay* obtingut d'un individu portador de les mutacions dF508 i 3659delC.

2.2.2. Metodologies de detecció d'aneuploidies en cèl·lules aïllades

2.2.2.1. Hibridació Genòmica Comparada

2.2.2.1.1. Amplificació del Genoma cel·lular amb DOP-PCR

Degut a que la quantitat de DNA present en una cèl·lula, aproximadament 6 picograms, és molt inferior de la que és necessària per a realitzar la CGH, al voltant d'uns 200 nanograms, cal amplificar el genoma de tota la cèl·lula prèviament per tal d'aconseguir perfils de CGH adequats de cèl·lules aïllades (Voullaire et al., 1999, Wells et al., 1999). Per fer-ho, s'utilitza la tècnica de la DOP-PCR (Degenerated Oligonucleotide-Primed PCR), (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b) que es caracteritza per utilitzar encebadors parcialment degenerats, en els que part de la seva seqüència està definida mentre una altre part té ells nucleòtids disposats a l'atzar (Telenius et al., 1992). Concretament, la seqüència del encebador és 5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3', en el que N significa qualsevol nucleòtid a introduït a l'atzar. D'aquesta manera, s'obté un solució de milers d'encebadors diferents que poden, hibridar en tot el genoma, aconseguint així, una cobertura completa del genoma i que per tan s'aconsegueix amplificar tot el genoma cel·lular.

La contaminació de DNA externa al de la cèl·lula també s'ha de evitar en realitzar CGHs de cèl·lules aïllades, ja que la DOP-PCR amplificarà tant, el DNA cel·lular problema, com també el DNA contaminant en detriment del DNA de la cèl·lula a analitzar. Per evitar això, s'ha de preparar la mescla amb el DNA cel·lular i requeriments de la DOP en condicions estèrils així com la dels controls, amb puntes amb filtre, guants i fins hi tot màscares.

2.2.2.1.2. Marcatge Fluorescent amb Nick-Translation

En la base de la CGH hi ha crear dues sondes marcades amb fluorocroms diferents: DNA control 46,XX, marcada en verd i DNA de la cèl·lula que volem cariotipar marcada en vermell (DNA problema; 1CP o MII). Un cop obtingudes les sondes, es realitza una hibridació conjunta d'ambdues sondes sobre les preparacions de limfòcits euploides 46,XY, per amb un programa informàtic adequat detectar els guanys o les pèrdues cromosòmiques en el DNA problema.

Per marcar fluorescentment els DNA productes amplificats de la DOP-PCR com s'ha dit, s'aplica la tècnica de la *Nick-Translation*: el DNA control amb fluorocrom verd (Spectrum Green, Vysis) i el problema amb fluorocrom vermell (Spectrum Red, Vysis).

La *Nick-Translation* consta de dos enzims, l'enzim DNAasa que talla el DNA, i l'enzim DNA polimerasa I, que s'uneix allà en s'ha produït un tall i sintetitzar una nova cadena de DNA emprant 4 dNTPs que es troben a concentracions diferents: l'adenina, la guanina i la citosina estan concentrades al 0,02 mM, mentre que la timina està al 0,01 mM. A més, l'uracil, a 0,01 mM, s'ha conjugat amb molècules fluorescents vermelles o verdes. Els dNTPs no marcats i els uracils marcats fluorescentment, competeixen amb timines, que es van incloure en la nova cadena, aconseguint marcar els DNA que s'empren com a sondes control i problema en una hibridació competitiva de llarga durada (40-44 hores) (Voullaire et al., 1999, Wells et al., 1999).

1.2.2.1.3. Anàlisi de Resultat de la CGH

Es capturen de 10 a 15 metafases de bona qualitat d'hibridació de les dues sondes i de bona extensió cromosòmica per a l'anàlisi del perfil de CGH. Un cop cariotipades adequadament, el software emprat genera els perfils d'acord amb la ràtio de fluorescència vermell/verd. Si el ràtio és igual a 1 per a un cromosoma determinat, significa que hi ha igual fluorescència vermella (DNA problema) que verda (DNA control), deduint que hi ha la mateixa dotació cromosòmica en els dos DNAs, i com que la cèl·lula control és euploide, la cèl·lula problema seria també euploide per al cromosoma en concret.

Si el ràtio és igual o superior a 1,2, significa que hi ha més fluorescència vermella (DNA problema) que de verd (DNA control), per tant, més dotació cromosòmica problema que control, és a dir, un guany del cromosoma en la cèl·lula problema.

En canvi, si el ràtio és igual o menor de 0,8, hi ha menys fluorescència problema que control, i això només s'explica amb una falta de material cromosòmic en la cèl·lula problema, és a dir, una monosomia pel cromosoma en qüestió (figura 8).

1.2.2.2. Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (MRC-Holland) és una tècnica de genètica molecular que permet la determinar la presència, absència i nombre de còpies de fins a 50 fragments cromosòmics simultàniament (Schouten et al., 2002). Degut a la seva sensibilitat, senzillesa metodològica i ha esdevingut, en molt poc temps, una tècnica de referència, havent-se publicats més de 400 articles des de la seva descripció. Hi ha molts kits de MLPA disponibles comercialment, cadascun amb una

combinació diferent de sondes que interroguen per a diferents regions del genoma. N'hi ha específics per a detectar delecions en gens responsables de malalties genètiques com la Neurofibromatosis, FQ, síndrome de Alport,...o bé, en gens implicats en càncer, en malalties mentals,...

Amés , hi ha kits específics per a detectar variacions de nombre de còpiaes en regions subtelo mèriques o centromèriques de tots els cromosomes humans. Aquests kits d'anàlisi de cromosomes s'usen amb èxit en diagnòstic prenatal, i postnatal, ja que al detectar zones subtelo mèriques, detecten pèrdues cromosòmiques petites que poden passar desapercebudes en un cariotip estàndard, però que poden causar greus problemes com el retard mental entre altres. En concret hi ha tres kits que detecten els dos subtelo mers de cada cromosoma, i dos kits més que detecten dos seqüències al cada costat del centròmer de cada cromosoma. En total doncs, amb 5 dels kits disponibles (P036, P069, P070, P181 i P182) emprats a l'hora, potencialment s'interrogarien 10 regions diferents dels 23 cromosomes humans.

La MLPA té, en comparació amb altres mètodes de detecció d'aneuploidies en diagnòstic prenatal, com són la FISH o la QF-PCR, la avantatge de que és molt més econòmica, amb un cost de 10 Euros per reacció.

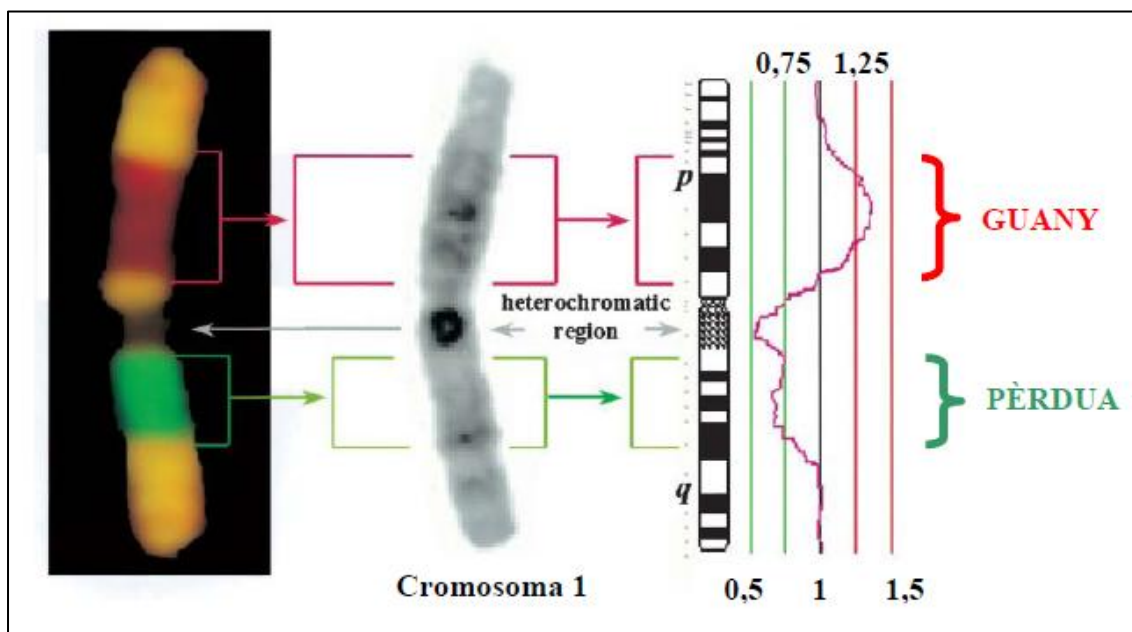


Figura 8. Esquema de la detecció de guanys i pèrdues pel cromosoma 1 detectades amb CGH (adaptat de Wells i Levy, 2003).

Coneixent l'èxit de la MLPA en el diagnòstic prenatal, sembla d'interès evident aplicar-la al DGP per l'anàlisi d'aneuploïdies en cèl·lules aïllades. Això comportaria moltes avantatges en comparació amb d'altres tècniques de cribrat d'aneuploïdies d'utilització habitual com ara la FISH i també en comparació amb la CGH. Pel que fa a la FISH, a més de ser més econòmica i permet la detecció de tots els cromosomes de la cèl·lula analitzada. Pel que fa a la CGH en cèl·lules aïllades, si bé ambdues tècniques analitzen tot el complement cromosòmic cel·lular a estudiar, la MLPA, també més econòmica que la CGH, requereix menys temps fins a la obtenció del resultat i té una complexitat metodològica molt menor. Aquest dos fets permetrien que amb la MLPA es disposés de resultats citogenètics de blastòmers d'embrions de cicles de FIV, a temps de realitzar la transferència embrionària, si és el cas, sense necessitat de, a l'espera dels resultats, congelar embrions. A més a més la MLPA no requereix de personal especialitzat amb alta qualificació, per a la seva aplicació com en el cas de la CGH.

El kit comercial de la MLPA, es basa principalment en la hibridació de d'oligonucleòtids complementaris per a fins una cinquantena de regions específiques del genoma a les que interroga per a la presència de guanys o pèrdues en aquestes regions. El kit conté dos oligonucleòtids per a cada fragment interrogat, que hibriden immediatament un després de l'altre. Un cop han hibridat, hi ha una reacció de lligació que uneix els dos oligonucleòtids, creant-ne un sol fragment. Els esmentats oligonucleòtids, apart d'una part de la seva seqüència específica per la regió del genoma en particular que detecten, tenen dos seqüències més no específiques del genoma humà. Una de les seqüències no específiques, és complementaria a una parella d'encebadors un cop amplificats els corresponents oligonucleòtids per detectar la seva presència guany o pèrdua i després del pas de la lligació s'uneixen. Aquesta seqüència és idèntica en tots els oligonucleòtids que participen en la reacció de MLPA, la qual cosa permet la seva amplificació simultània amb PCR, utilitzant una única parella de encebadors. Com que els encebadors estan marcats amb un fluorocrom, és possible realitzar posteriorment l'anàlisi de la reacció en un seqüenciador de DNA. L'altre seqüència no específica serveix per a diferenciar cada un dels oligonucleòtids de la resta per a poder realitzar l'anàlisi. Això es possible ja que cada parell de oligonucleòtids té aquesta part no específica d'una llargada determinada, i per tant, al amplificar-se, es genera un fragment de DNA de mida determinada, que és diferent per a cada parella de oligonucleòtids. Aleshores, a l'analitzar, en el seqüenciador, els fragments productes de la reacció, es

detecten en un electroferograma, pics d'una mida determinada per a cada parella d'oligonucleòtids, és a dir, per a cada regió del genoma (figura 9).

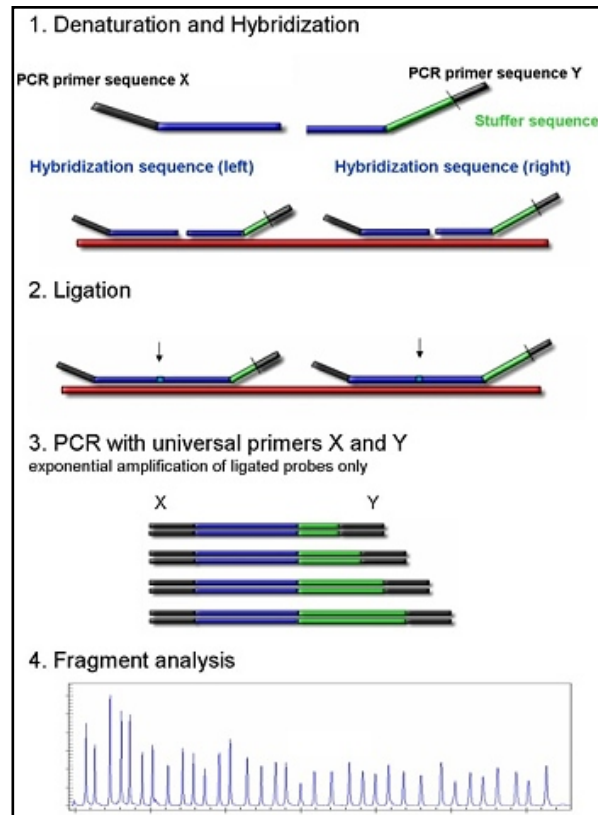


Figura 9. Esquema de la reacció de la MLPA.

Si hi ha una deleció total d'una regió interrogada, per exemple, una nul·lisomia per un cromosoma, l'electroferograma no visualitza el pic corresponent, mentre que es visualitza el pic corresponent quan està present.

La MLPA apart de permetre identificar la presència o absència d'una regió en concret, també possibilita detectar-ne el nombre de còpies, és a dir, si hi ha guany o pèrdua de fragments cromosòmics o trisomia o monosomia de qualsevol regió interrogada en concret. Per això però, cal comparar els resultats obtinguts amb els que s'obtenen per a un DNA control amb dotació cromosòmica euploide, de forma semblant a com es realitza amb la CGH. Quan un dels pics de l'electroferograma corresponent a la mostra problema és superior o inferior al corresponent a la mostra control, de forma estadísticament significativa, es pot afirmar que hi ha un guany, o una pèrdua de material corresponent en la mostra problema. Si a més, tots els fragments interrogants per d'un mateix cromosoma coincideixen indicant el guany o la pèrdua es pot deduir amb seguretat que hi ha un guany o una pèrdua del cromosoma corresponent.

La comparació entre els resultats obtinguts en DNA control euploide i el DNA problema, es basa en la comparació entre l'altura dels pics corresponents als fragments amplificat de les regions interrogades. Es realitza una ràtio entre la del pic del DNA problema i el pic del DNA control. Si aquesta ràtio és superior a 1,2, es deu un guany de material en el DNA problema, i és inferior a 0,8, es deu a una pèrdua cromosòmica. Si el valor està entre 0,8 i 1,2, es deu a que hi ha igual quantitat de DNA d'ambdues mostres considerant al segment interrogat del cromosoma en qüestió euploide.

L'existència de fins a 5 kits diferents que interroguen 5 regions diferents de cada un dels cromosomes i la coincidència en tots ells per a un mateix fragment cromosòmic es pot assumir amb seguretat que el cromosoma en qüestió és euploide o be aneuploide amb el guany o la pèrdua corresponent. Aquest fet fa de la MLPA un procediment summament interessants pel DGP.

2. Hipòtesi i Objectius

2.1. Hipòtesi del treball

El Diagnòstic Genètic Preimplantacional ha de millorar les taxes de implantació dels embrions transferits.

L'aplicació d'un procediment que simultàniament permeti tant l'estudi complet de les aneuploïdies d'origen femení com l'estudi de mutacions familiars hauria de ser una bona estratègia.

2.2. Objectius del treball

- 1) Estudi d'aneuploïdies d'òocits de dones donants de cicles de reproducció assistida.
- 2) Desenvolupar nous mètodes moleculars en cèl·lules aïllades.
- 3) Desenvolupar i aplicar el procediment del Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor (DF-DGP).

3. Material i Mètodes

S'ha organitzat aquest apartat descrivint per separat els materials i mètodes necessaris per assolir cadascun dels tres objectius de la tesi (vegeu Hipòtesi i Objectius pàgina 31).

3.1. Material i Mètodes de l'Objectiu 1

3.1.1. Hibridació Genòmica Comparada

3.1.1.1. Material Biològic

El material d'estudi procedeix de centres de reproducció, amb els que s'ha col·laborat que han facilitat les mostres biològiques a estudiar: la Clínica EUGIN, el Instituto de Reproducción CEFER i la Unitat de Reproducció Assistida del Hospital Matern Infantil de la Vall d'Hebron.

Han participat en l'estudi un total de 53 dones joves de programes de donació d'òcits, de entre 19 a 33 anys, amb una mitjana d'edat de 26,1 anys, del programa de donació d'òvuls. Aquestes dones han lliurat de 1-4 dels òcits obtinguts després d'haver estat sotmeses a un tractament hormonal d'estimulació ovàrica convencional. Els òcits han estat donats per esser utilitzats amb finalitat de recerca, prèvia signatura del corresponent consentiment informat.

El Dia 0, o dia de la punció fol·licular, s'han obtingut un total de 84 òcits classificables en dos grups segons el seu estadi de maduració. Vint-i-vuit òcits en els quals, un cop alliberades les cèl·lules del cúmulus, i en els que s'ha observat el primer corpuscle polar (1CP) i que s'han processat directament, i que s'han anomenat òcits "frescos". Els altres cinquanta-sis òcits, en els quals un cop alliberats de les cèl·lules del cúmulus, no s'ha observat el 1CP, (òcits immadurs en l'estadi de MI), els quals, s'han mantingut en medi IVF (Vitrolife, Gotenburg, Suècia) a 37 °C durant unes 20 hores fins a l'extrusió del 1CP, o maduració, i que s'han anomenat òcits madurats *in vitro* o "MIV".

Dinou de les 53 dones donants d'òcits, amb una mitjana d'edat de 26,7 anys, han donat els 28 òcits "frescos", mentre que les altres 35 dones donants d'òcits, amb una mitjana d'edat de 24,2 anys, han donat 56 òcits MIV.

3.1.1.2. Obtenció del 1CP i de la MII

Ambdues cèl·lules de cada òcit, el 1CP i la MII s'han separat, per a analitzar-les individualment.

Es prepara la placa de petri amb 2-3 gotes de 20 µL de solució salina estèril, PBS complementat amb 0,1 % de polivinil alcohol (PVA), que evita d'adhesió del material

cel·lular a la placa de petri, i dues gotes de àcid Tyrode estèril (Sigma, pH 2,5) per dissoldre la zona pel·lúcida.

Un cop s'ha preparat la placa, s'agafa l'òocit amb un capil·lar de plàstic de 100 µm de diàmetre (Cook) i es deixa a la primera gota de PBS per tal de rentar-lo de l'excés de medi IVF. Des de aquest moment, tots els passos es realitzen sota control de lupa binocular de 500 augments. Un cop rentat, s'agafa l'òocit i es col·loca en una de les gotes amb àcid Tyrode, controlant en tot moment el 1CP. En pocs segons, la zona pel·lúcida comença a degradar-se, eixamplant-se i augmentant així l'espai perivitel·lí que separa la MII de la zona pel·lúcida. Quan resta tan sols un petit tel de zona pel·lúcida al voltant del oòcit, s'aspira suaument l'òocit i es diposita en una nova gota de PBS. Sovint, en deixar l'òocit i degut al canvi osmòtic, la zona pel·lúcida s'acaba de desfer. No s'ha de perdre de vista el 1CP, amb l'enfocament de la lupa.

A continuació es fan tres rentats del 1CP en PBS. Finalment el 1CP es diposita amb compte dins d'un tub Eppendorf estèril de 0,2mL que es marca adequadament amb el seu codi. Es comprova que el 1CP no ha quedat en el capil·lar buidant el volum restant sota de la lupa. La corresponent MII del oòcit segueix el mateix procés que el 1CP.

Un cop tenim les dos cèl·lules aïllades individualment, es procedeix a o bé a lisar-les, o bé s'emmagatzemen a -80 °C fins el moment de ser processades.

Cèl·lules d'epiteli bucal d'una dona 46,XX euploide, que s'utilitzen en la hibridació genòmica comparada per a l'obtenció del DNA control, segueixen un procés semblant al que acabem de descriure. Les cèl·lules epitelials obtingudes glopejant aigua destil·lada, són rentades fins a quatre vegades amb PBS estèril i finalment se n'introdueixen tres cèl·lules en un mateix tub d'Eppendorff.

3.1.1.3. Lisi Cel·lular

La correcta accessibilitat del DNA s'aconsegueix aplicant el sistema de lisi enzimàtica que utilitza l'enzim proteïnasa K (Roche). La proteïnasa K es comercialitza a una concentració 20mg/mL, i es dilueix 1 µL amb 160 µL de aigua estèril (concentració de treball: 125 µg/mL). També es prepara l'altre component necessari per la lisi, el SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Sigma) que es comercialitza diluït al 10 %, i es dilueix 1/200 amb aigua destil·lada, i posteriorment d'aquesta es dilueix 1/100 amb aigua destil·lada (concentració de treball: 17 µM). Finalment es prepara, al moment, el tampó de lisi, mesclant 2 volums de la dilució de proteïnasa K amb 1 del SDS, i es deixa a 4°C fins a

la seva utilització. A cada tub amb les cèl·lules, 1CPs, MII o epitelis bucal, s'afegeixen 3 µL del tampó de lisi i una gota de oli mineral (Sigma), per evitar la contaminació i l'evaporació durant el procés de lisi. Després, s'homogeneïtza la mescla amb l'ajuda un vòrtex, es centrifuga i es posa al termociclador (TGradient, Biometra, Goettingen, Alemanya), seguint el següent programa: 1 hora a 37 °C, per permetre l'activitat de l'enzim i 10 minuts a 95 °C, per tal de degradar les restes de la proteïnasa K.

Un cop finalitzada la lisi cel·lular, es pot procedir a la amplificació del genoma amb DOP-PCR, o bé, a congelar les mostres a -80 °C fins a la seva utilització.

3.1.1.4. Amplificació del genoma amb DOP-PCR

El protocol seguit és la DOP-PCR descrita pel nostre grup (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b), que utilitza la següent mescla:

- 32 µL d'aigua estèril i lliure de activitat exonucleasa (Promega).
- 5 µL del 10X *Long PCR Buffer* – MgSO₄ (Ambion).
- 4 µL de PCR dNTP Mix (Ambion).
- 3,5 µL MgSO₄ 25mM (Ambion).
- 1 µL del encebador de DOP a 100 µM (Biomers).
- 0,5 µL de Super Taq Plus Polymerase (Ambion).

Un cop la tenim preparada, la mesclem bé amb el vòrtex, i posem 46 µL del Mix en cada tub que contingui la cèl·lula lisada. Considerant, que en el tub hi havia 3 µL del tampó de lisi més aproximadament 1 µL de la cèl·lula, el volum final de la reacció és de 50 µL.

Per a la DOP s'introdueixen els tubs en el termociclador i es segueix el següent programa: 4,5 minuts a 94 °C, 8 cicles de 30 segons a 95 °C, 1,5 minuts a 30 °C i 3 minuts a 68 °C; tot seguit es fan 40 cicles més de 30 segons a 95 °C, 1 minut a 56 °C i 3 minuts a 68 °C; per acabar es realitza un pas d'extensió de 8 minuts a 68 °C. És necessari incloure controls negatius que contenen tan sol aigua, enlloc de cèl·lules lisades, per controlar la contaminacions en els reactius.

3.1.1.5. Gel de electroforesi

Per a la comprovació de l'amplificació del genoma mitjançant la DOP-PCR, i l'absència de contaminació, es realitza una electroforesi en gel d'agarosa (Biotools) a poca concentració, aproximadament al 1,5 % en tampó TAE 1X (Qiagen). Al gel, s'hi

carrega una mescla de 5 µL de producte de DOP-PCR més 1 µL de tampó de càrrega (Invitrogen). Per tal de conèixer la mida dels fragments amplificats, també es carregen al gel 5 µL de marcador de pes molecular de 100 pb (Invitrogen) a 120 Volts durant 30 minuts aproximadament. Per a la visualització del DNA el gel es tenyeix amb una dilució aquosa de bromur d'etidi i s'observa al transil·luminador de llum ultraviolada.

El resultat òptim és una pinzellada intensa de fragments de DNA de 500 a 1.500 pb. En el cas de les MII, a més hi ha tres bandes ben aparents a 600, 1.250 i 1.700 pb, que corresponen a l'amplificació del DNA mitocondrial. En els carrils corresponents als controls negatius es sol observar també una pinzellada de DNA, però que es troba entre 100 i 500 pb.

3.1.1.6. Marcatge Fluorescent amb *Nick-Translation*

La reacció de *Nick-Translation* conté els següents components:

- 5 µL de la mescla d'enzim (Vysis).
- 5 µL de 10X *Nick Translation Buffer* (Vysis).
- 10 µL de la mescla de dNTPs (1C:1G:1A).
- 5 µL de timina a 0,1mM.
- 2,5 µL de Spectrum Red (0,1mM) o Spectrum Green (0,2mM) (Vysis).
- 22,5 µL del producte de la DOP-PCR.

La reacció es duu a terme en el termociclador durant 90 minuts a 15 °C i posteriorment 15 minuts a 65 °C. Degut a què dels 45 µL disponibles del producte de DOP-PCR, ja que s'han utilitzat 5 µL per la electroforesi, s'utilitzen 22,5 µL per a una reacció de *Nick Translation*, de manera que es pot repetir, el marcatge si és necessari.

3.1.1.7. Precipitació conjunta de les sondes

En la precipitació de les sondes, es mesclen les dues sondes en una proporció 1:1 (50 µL de la sonda de DNA problema marcada en verd i 50 µL de la sonda de DNA control marcada en vermell). S'afegeixen 5 µL de *Human Cot-1-DNA* (Vysis) que bloquejarà les regions repetitives com ara telòmers i centròmers. Per tal de què precipitin els DNAs, s'afegeix a la mescla 10,5 µL de acetat sòdic 3M pH 5,5 i 255 µL d'etanol 100%. Un cop mesclat, es deixa un mínim de 1 hora a -80 °C, i es centrifuga a 12.000 rpm durant 30 minuts. El botó del precipitat presenta un color rogenc. S'elimina amb

molt de compte el sobrenedant i s'eixuguen les restes de líquid del tub i es deixa assecar el precipitat a temperatura ambient durant uns 5 minuts.

Es resuspèn el pelet en 8 μ L de solució d'hibridació, que conté 50 % de Formamida desionitzada (Sigma), 10 % de Dextrà Sulfat (Sigma) en 2xSSC, i es deixa a l'estufa a 37 °C fins a la seva immediata utilització.

Per tal de obtenir una hibridació uniforme i sempre homogènia del DNA control, s'usa com a sonda control el producte de diverses DOP-PCR de cèl·lules aïllades, les quals un cop comprovat que la seva amplificació ha estat satisfactòria i que han estat marcades adequadament amb *Nick Translation* són ajuntades en un mateix tub. Un cop homogeneïtzades se'n utilitzen 50 μ L per a precipitar conjuntament amb el DNA problema corresponent.

3.1.1.8. Hibridació Genòmica Comparada

Amb un llapis de diamant es marquen les zones riques amb cèl·lules, per sota del portaobjectes de limfòcits euploides (Vysis), que solen tenir limfòcits en tres zones de definides. Aleshores, el portaobjectes es deshidrata sotmetent-lo durant 2 minuts a una sèrie ascendent d'alcohols (75 %, 85 % i 100 %) i posteriorment es deixa assecar a l'aire.

Per a la desnaturalització del DNA, es diposita el portaobjectes durant 5 minuts en una cubeta amb Formamida al 70 %/2XSSC, a 73 °C dins d'una cabina d'extracció, donat que és altament tòxica.

Després, es torna a deshidratar el portaobjectes amb banys d'alcohols a 4 °C durant 2 minuts per evitar la renaturalització del DNA i després els portaobjectes es deixen assecar a l'aire. Mentrestant, la sonda que estava a l'estufa a 37°C es posa durant 10 minuts al bany a 73 °C. Finalment, es col·loquen 8 μ L de sonda sobre cada zona del portaobjectes ben seca, es cobreix amb un cobreobjectes (20 mm x 20 mm), es segella amb cola i es posa durant 72 hores en una cambra humida a 37 °C (caixa amb paper humit, hermètica i protegida de la llum).

Passades les 72 hores, es treu amb compte la cola i el cobreobjectes, i es renta el portaobjectes durant 2 minuts amb 0,4xSSC/3 % NP40 a 73 °C, i amb 2xSSC/0,1 % NP40 en agitació a temperatura ambient. Es deshidraten en banys d'alcohol, i després es diposita sobre cada zona 10 μ L de DAPI (Sigma), que tenyeix el material cromosòmic de color blau que conté Vectashield (Vector Labs), i que evita que la fluorescència de la

preparació s'esgoti ràpidament. Finalment es posar sobre de cada zona un cobreobjectes i es procedeix a l'observació de les metafases en un microscopi de fluorescència.

3.1.1.9. Observació i captura de metafases al microscopi de fluorescència

S'han utilitzat dos microscopis de epifluorescència diferents, un Olympus BX60 acoblat a un ordinador amb el programa informàtic de Vysis i un Nikon acoblat a un ordinador amb el programa informàtic de Metasystem. Apart de petites diferències en el procediment de captura de les imatges, els dos programes funcionen de forma molt similar.

Els filtres emprats són els següents: per visualitzar el DAPI, el filtre U-MNU, per l'*Spectrum-Red* el U-MNIMBA i per l'*Spectrum-Red* el U-MWIY. La captura es realitza de forma seqüencial, es comença pel filtre DAPI, es continua pel senyal verd i s'acaba amb el fluorocrom vermell. Per obtenir resultats de CGH fiables, cal capturar com a mínim 10 metafases de qualitat.

La cerca de les metafases amb una bona senyal d'hibridació pels dos fluorocroms es fa amb l'objectiu de 60 augments, rastrejant el portaobjectes i seleccionant exclusivament les que no tenen més de dos cromosomes entrecruats i que no tenen soroll de fons al voltant.

Les metafases capturades es cariotipen mitjançant les bandes DAPI reverses, semblants a les bandes G. El programa informàtic unifica el resultat de la fluorescència de totes les metafases cariotipades, i calcula, per a cada cromosoma, la ràtio entre la fluorescència del DNA problema (vermell) i la del DNA control (verd).

3.2. Material i Mètodes de l'Objectiu 2

3.2.1. Tècnica de *Multiple Displacement Amplification* (MDA)

S'ha utilitzat el kit de MDA Genomiphi v2 de GE Healthcare que inicia el tractament amb la lisi de la cèl·lula utilitzant els següents components:

- 2,5 µL de solució alcalina (50 mM DTT / 200mM KOH).
- 5 µL de *Sample Buffer* (GE Healthcare).

Un cop s'ha homogeneïtzat, es deixa actuar durant tres minuts a 94 °C en el termociclador per tal de facilitar a més de la lisi cel·lular la desnaturalització del DNA. Es manté el tub en gel, per evitar la renaturalització del DNA, i s'hi addicionen la resta de reactius:

- 0,8 µL de tricina (20 mM / pH=4,95), que permet neutralitzar el pH de la solució alcalina.
- 8,2 µL de *Reaction Buffer* (GE Healthcare).
- 1 µL d'enzim Phi29 (GE Healthcare).

Es mescla amb cura i es manté durant 90 minuts a 30 °C, i després durant 10 minuts a 65°C, per tal d'inactivar l'enzim. Es manté el producte de la MDA a 4 °C fins el moment de la seva utilització.

3.2.2. Mètodes d'anàlisi de mutacions

3.2.2.1. Tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la identificació de les mutacions s'utilitza la reacció de PCR es duu a terme amb el següent mescla de reactius:

- 0,2 µL de enzim *HotMaster Taq Polimerase* (5PRIME).
- 2,5 µL de mescla de dNTPs (2mM) (Invitrogen).
- 2,5 µL de PCR 10X *Buffer* (5PRIME).
- 0,3 µL (50 µM) de cadascun dels encebadors de la reacció.
- 0,5 – 4 µL de DNA (segons sigui DNA genòmic o producte de MDA).
- Enrasar amb aigua fins a 25 µL.

La PCR consta dels següents passos en un termociclador:

- 2 minuts a 94 °C.
- 35 cicles de:
 - 20 segons a 94 °C.
 - 45 segons a la temperatura òptima de hibridació o T_m específica de cada parella d'encebadors.
 - 30 segons a 65 °C.
- 5 minuts a 65 °C.
- Mantenir el producte de PCR a 4 °C.

3.2.2.2. Detecció directa de la mutació

Durant la realització d'aquest treball, s'han usat dos mètodes diferents de detecció directa de les mutacions: la diferència de mida de fragments corresponents als al·lels normal i mutant i la *MiniSequencing*, que es detallen a continuació.

La diferència en la mida dels fragments generats per PCR corresponents als al·lels normal i mutant, s'ha utilitzat, per exemple, per detectar la mutació dF508 en el gen CFTR causant de la FQ. En aquest cas, el al·lel mutant és menor que el normal, degut a la deleció de 3 parells de bases, el que permet identificar-los.

Per tal de detectar la presència de la mutació, s'han dissenyat uns encebadors específics que hibriden a ambdós costats de la deleció mencionada, i es marca un dels encebadors amb un fluorocrom per tal de poder-lo detectar amb el seqüenciador de DNA. Concretament, en aquest cas, la seqüència del encebador *forward* és 5'6FAM-GTTTCCTGGATTATGCCTGGCAC3', mentre que la del encebador *reverse* és 5'GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC3'.

Així doncs, a l'amplificar el DNA d'un portador de la mutació amb aquests encebadors i visualitzar els fragments al seqüenciador (Servei de Genètica Molecular de la Facultat de Veterinària de la UAB) s'observen els dos al·lels: un de 94 pb que correspon l'al·lel normal i un de 91 pb que correspon l'al·lel mutant amb els 3 parells de bases delecionats (figura 10).

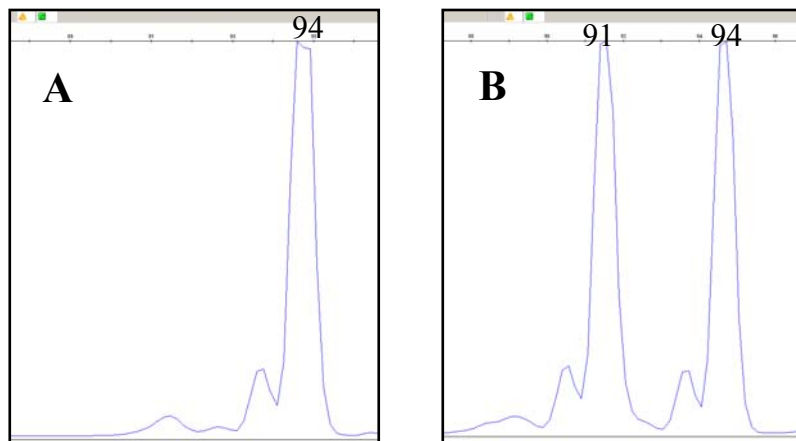


Figura 10. Pics observats en un individu sense la mutació dF508 (A) i en un portador de la mutació (B).

La identificació directa de mutació amb la reacció de *MiniSequencing* consta de tres passos: la purificació del fragment de DNA, la reacció de *MiniSequencing* pròpiament dita i el rentat post-*MiniSequencing*.

Per dur a terme la purificació del DNA, es mesclen 15 µL del producte de PCR amb 6 µL de *ExoSAP-IT* i es deixem 1 hora a 37 °C, seguit de 15 minuts a 75 °C, per aturar la reacció.

Un cop finalitzat el pas de purificació, es realitza pròpiament la reacció de *MiniSequencing*, mitjançant el kit comercial de *SnapShot Multiplex System* (Applied Biosystems), que conté els nucleòtids marcats fluorescentment i la DNA polimerasa. La reacció consta dels següents components:

- 5 µL del producte de PCR purificat.
- 5 µL de *SnapShot Mix* (Applied Biosystems).
- 1 µL d'encebador (2mM) específic per hibridar 1 nucleòtid abans de la mutació.
- 1 µL d'aigua.

Un cop s'han mesclat adequadament es realitzen, en un termociclador, 25 cicles de 10 segons a 96 °C, 5 segons a 50 °C i 30 segons a 60 °C.

Per dur a terme la reacció de rentat, s'introdueix 1 µL de SAP en el producte de *MiniSequencing* i s'incuba durant 1 hora a 37 °C, seguit de 15 minuts a 75 °C. Finalment, es llegeixen els resultats en el seqüenciador de DNA (ABIPrism 3730). Per fer-ho, s'utilitza 1 µL del producte de *MiniSequencing*, 10 µL de formamida i 0,04 µL de marcador de pes molecular Liz 500 (Applied Biosystems).

3.2.2.3. Detecció indirecte de la mutació usant microsatèl·lits

La recerca dels marcadors de DNA o microsatèl·lits adequats es fa a través de la *website Map Viewer*, que pertany al NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>).

En aquesta web, es selecciona *Homo Sapiens*, i el gen responsable de la malaltia concreta a la que es vol fer l'estudi de lligament. Aleshores, la web mostra el cromosoma que conté el gen. Al seleccionar-lo, apareix una representació de la situació del gen en el cromosoma pertinent, juntament amb els gens que estan contigus.

Per accedir als microsatèl·lits propers cal seleccionar "*Maps & Options*" i un cop dins, la base de dades STS, que recull tant microsatèl·lits com altres seqüències repetitives. S'obté una representació que mostra els microsatèl·lits que envolten el gen, per exemple, el gen CFTR responsable de la FQ (figura 11).

A cada costat del gen s'hi identifiquen les seqüències de microsatèl·lits amb la seva nomenclatura corresponent: "DXSYYYYY" a la que X és el número del cromosoma en el que es troba el gen i la numeració YYYY és un codi establert quan es va descriure.

En cas de no aparèixer cap microsatèl·lit dins del propi gen (microsatèl·lit intragènic), s'ha de cercar entre els posteriors (*downstream*) i els anteriors (*upstream*), però en tot cas sense superar la distància de 2 Mb del gen.

Un cop es localitza un microsatèl·lit, cal comprovar que és un tetranucleòtid, mitjançant una recerca en un buscador de pàgines web (tipus Google) per veure si apareix en alguna altre base de dades, o publicació i si en aquestes s'especifica el tipus de repetició que conté. Apart, d'aquesta manera també es pot obtenir la variabilitat esperada o heterozigocitat, mostrada amb H_0 , que té el microsatèl·lit.

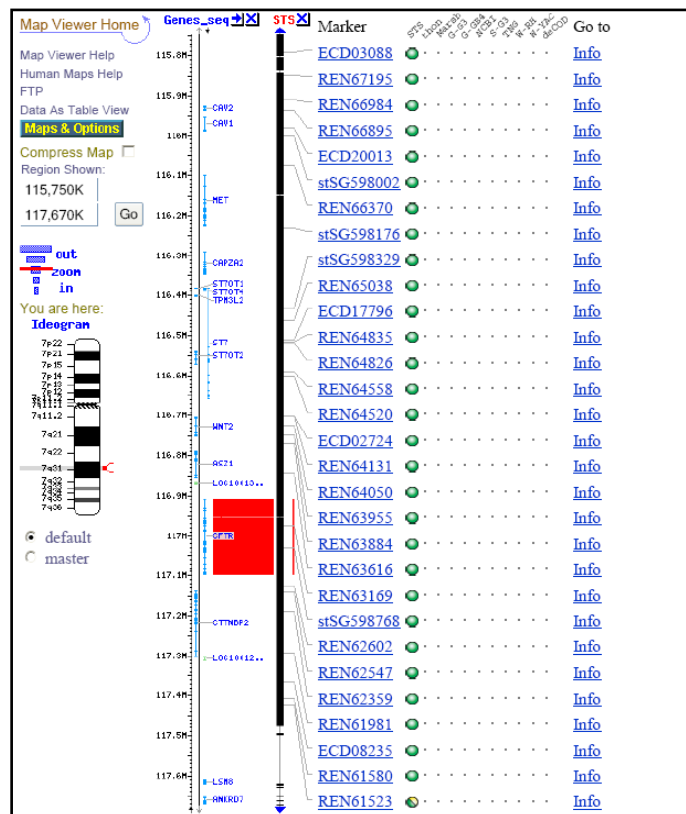


Figura 11. Representació obtinguda de la web *Map Viewer* que recull el gen CFTR i els microsatèl·lits que l'envolten.

3.2.2.4. Mètode de *Cystic Fibrosis Genotyping Assay*

A partir del producte amplificat amb la MDA, en primer lloc es dilueixen 5 μ L de DNA, amb 20 μ L de solució *Purified DNA Diluent* (Abbott). Després d'homogeneïtzar, es mesclen 5 μ L del DNA diluït amb 5 μ L de *CFv3 PCR* (Abbott), que conté els encebadors i l'enzim necessari per a realitzar l'amplificació de les regions del gen CFTR. Un cop mesclat, es realitzen els següents passos en el termociclador:

- 10 minuts a 50°C.

- 12 minuts a 94 °C.
- 5 cicles de 15 segons a 98 °C, 30 segons a 58 °C i 90 segons a 72 °C.
- 22 cicles de 15 segons a 94 °C i 2 minuts a 58 °C.
- 5 minuts a 72 °C.
- 30 minuts a 99.9 °C.
- Mantenir a 4 °C.

Tot seguit, s'afegeixen 9,5 µL de *CF v3 Core OLA* (Abbott) i 0,5 µL de *OLA Enzyme* (Abbott), per tal de realitzar la reacció de OLA seguint els següents passos al termociclador:

- 32 cicles de 5 segons a 90,5°C i 45 segons a 46.5 °C.
- 10 minuts a 99.9 °C.
- Mantenir a 4 °C.

Al finalitzar la reacció, ja es pot analitzar la mostra en un seqüenciador de DNA.

Per tal d'optimitzar l'ús del CF assay en Diagnosi Genètic Preimplantacional, s'han realitzat diferents proves. Bàsicament, s'ha modificat la quantitat de kit que s'empra per reacció, per tal de economitza i treure més rendiment a la kit, i per altre banda, s'ha adaptat el protocol de MDA per tal d'assolir uns resultats més satisfactoris.

Per començar, es van realitzar les proves d'economització dels reactius del kit, utilitzant com a DNA problema, un DNA genòmic extret de sang perifèrica d'un portador de Fibrosi Quística. Les proves que es van realitzar foren:

- Protocol estàndard, tal com s'explicat en aquest apartat.
- Protocol 50%, és a dir, utilitzant la meitat de volum dels reactius del kit.
- Protocol 25%, és a dir, utilitzant una quarta part del volum del kit.

3.2.3. Optimització del Protocol de PCR en cèl·lules úniques

La optimització de la reacció de detecció de mutacions responsables d'una malaltia monogènica per a l'aplicació en el DGP segueix els passos següents: un cop dissenyats els encebadors per a la detecció directa de la mutació, és a dir, les dues parelles de encebadors de la *Nested-PCR*, i l'encebador específic per la reacció de *MiniSequencing*, i determinats els microsatèl·lits informatius per la parella candidata al DGP, cal optimitzar la reacció de PCR per a poder amplificar tots els fragments simultàniament, a partir del producte de la amplificació total del genoma d'una cèl·lula única.

Per començar, s'ha de verificar que els encebadors, ja siguin per la detecció de la mutació o bé, per l'amplificació dels microsatèl·lits, són específics i funcionen correctament. Això es comprova fàcilment realitzant una PCR de cada un dels parells de encebadors amb DNA genòmic dels membres de la família candidata. Per tal de conèixer la temperatura òptima de hibridació o T_m de cadascun dels encebadors, es realitzen sis reaccions simultànies per a cada parella, amb la particularitat de que cada una de les reaccions té una T_m diferent dins d'un rang entre 53 °C a 63 °C. Aquest rang inclou la variació normal de temperatures d'hibridació de encebadors, per tant, la gran majoria dels encebadors s'uniran específicament en alguna d'aquestes temperatures. Un cop realitzada la PCR, es carreguen 5 μ L del producte en un gel d'agarosa, per tal de visualitzar si els encebadors generen el fragment del tamany esperat, i per tant, són específics o bé, generen bandes inespecífiques degudes a un mal disseny dels encebadors (figura 12).

El pròxim pas és comprovar que el fragment generat per la primera parella de encebadors (fragment extern), és suficient com per a generar el fragment intern durant la segona ronda d'amplificació de la *Nested-PCR*. La forma de fer-ho és simplement usar com a DNA a amplificar per a la segona ronda, el DNA producte de la primera ronda, i realitzar un gel d'agarosa per comprovar que efectivament s'ha amplificat.

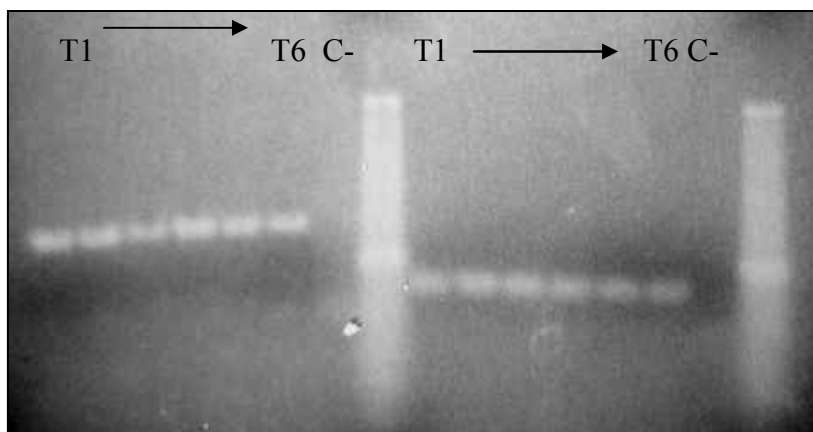


Figura 12. Gel d'electroforesi al 2% d'agarosa mostrant el resultat de dos parells de encebadors diferents, amplificats amb sis temperatures de T_m diferents.

Per acabar amb les comprovacions, cal verificar que l'encebador de *MiniSequencing* és específic i detecta la mutació per la qual ha estat dissenyat. Per constatar-ho, cal que es realitzi la reacció de *MiniSequencing* en el producte de la segona ronda de la *Nested-PCR*, preferiblement de un individu afecte de la mutació (homozigot mutant), un de

portador (heterozigot) i un de sà (homozigot normal), per així, detectar clarament els tres genotips possibles.

Una vegada verificada la funcionalitat de tots els encebadors i comprovat el seu correcte disseny, cal començar a optimitzar la reacció de PCR per amplificar els diferents loci alhora.

Per començar, s'usa DNA genòmic com a motlle per a les reaccions. La primera reacció de PCR, o primera ronda, conté els encebadors de la primera ronda de la *Nested-PCR* i els encebadors dels microsatèl·lits informatius, marcats fluorescentment. Tal com s'ha dit abans, al no conèixer quina temperatura òptima d'hibridació tindrà aquesta mescla de encebadors, es fan sis rèpliques de la reacció, emprant una T_m diferent per cada tub. Al acabar la primera ronda de PCR, s'agafa un alíquota del producte (0,5 - 1 μ L) i s'usa com a motlle per la segona ronda de PCR, que conté únicament els encebadors per amplificar el producte intern de la *Nested-PCR*. Per seleccionar la T_m de la reacció, es pot utilitzar la que ha donat millor resultat quan s'està comprovant l'eficiència dels encebadors, ja que només hi haurà una parella de encebadors. En el cas de parelles amb dos mutacions diferents, hi haurà dos parelles de encebadors, i per tant, per saber quina T_m és la òptima, caldrà realitzar primer un gradient de temperatures, i decidir després de córrer el producte de PCR en un gel d'agarosa, a quina temperatura s'obtenen millors amplificats.

Un cop ha finalitzat la segona ronda de amplificació de la *Nested-PCR*, es realitza un gel d'agarosa per detectar quina de les sis temperatures de la primera ronda, dona millor resultat en la segona ronda. Com que la temperatura de la segona ronda és la mateixa per a tots els tubs, la única diferència entre els productes de la segona ronda és la quantitat de DNA motlle, que s'ha generat durant la primera ronda de la *Nested-PCR*. Com que cadascuna de les reaccions de la primera ronda té una T_m diferent, això pot provocar que els seus encebadors no s'hibridin igual en tots els tubs, i que conseqüentment, es generi diferent quantitat de DNA. Així doncs, fent un gel d'agarosa del producte de la segona ronda de *Nested-PCR*, es pot avaluar quina de les T_m de la primera ronda generen més DNA motlle, i per tant, és la idònia (figura 13).

Cal tenir present, que al determinar la T_m de la primera ronda només es té en compte els encebadors de la *Nested-PCR*, és a dir, els de la detecció directa de la mutació. Finalment s'ha de considerar si la T_m escollida també és la òptima per l'amplificació dels encebadors dels microsatèl·lits. Per fer-ho, tant sols s'analitza al seqüenciador de DNA, una alíquota del producte de DNA de les primeres rondes de PCR que s'ha

generat en els sis tub, ja que tal com s'ha dit abans, també s'hi han introduït els encebadors dels microsatèl·lits. Un cop els productes de DNA s'han analitzat, cal decidir a quina de les Tm s'obté pics més alts per a tots els microsatèl·lits (figura 14). A més, si és possible, la Tm escollida, ha de coincidir amb la Tm idònia per a la detecció de la mutació.

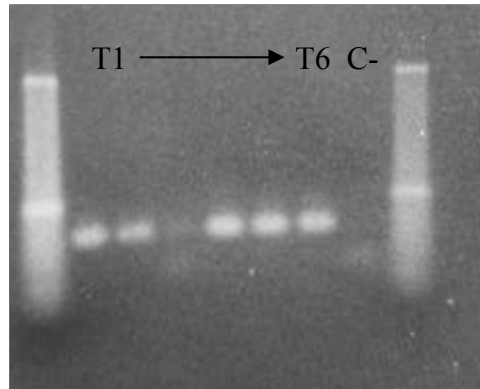


Figura 13. Gel d'agarosa al 2% del producte de la segona ronda de *Nested-PCR*. S'observa que en totes les temperatures de la primera ronda es genera motllo per la segon ronda, excepte la T3.

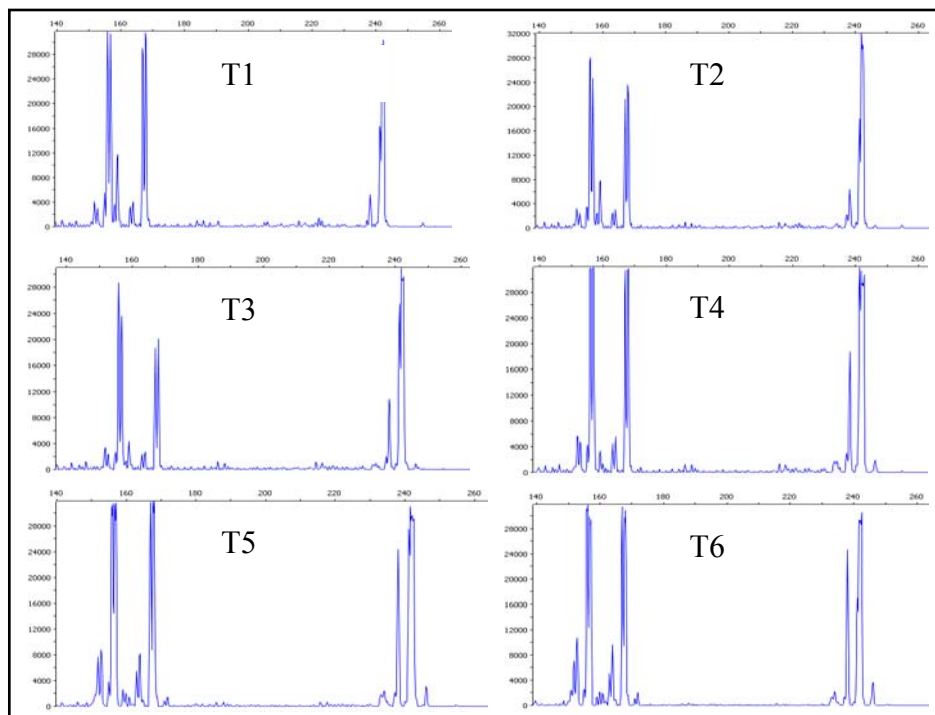


Figura 14. Resultat obtingut del seqüenciador de DNA dels sis productes de la primera ronda en sis temperatures diferents. Es mostren dos microsatèl·lits (D15S817 i D15S1513), i s'observa que es generen amplificats de quantitat semblant a les temperatures T4, T5 i T6.

Continuant el procés d'optimització del protocol, i després de determinar quines són les temperatures d'hibridació òptimes per les dos rondes de PCR emprant DNA genòmic, el pròxim pas és usar cèl·lules úniques amplificades amb MDA com a DNA diana per les PCRs. Normalment, s'amplifiquen fibroblasts euploides aïllats de cultius provinents de teixit ovàric fetal humà (amablement cedits pel doctorant Miguel Ángel Briño).

Després d'amplificar les cèl·lules úniques amb la tècnica del MDA, es realitza la primera ronda de amplificació, amb la T_m òptima escollida en el darrer pas i 4 μL del producte de MDA com a DNA diana.

Tal com s'ha fet quan s'usa el DNA genòmic, un cop ha finalitzat la primera ronda s'extrauen dos alíquotes del seu producte, una d'elles (1 μL) s'empra per la segona ronda de PCR, i l'altre per analitzar el resultat dels microsatèl·lits en el seqüenciador de DNA.

A l'analitzar els resultat dels dos processos, els microsatèl·lits i l'amplificació del fragment de mutació per la *Nested-PCR*, es veu si cal optimitzar la reacció, i si és així, que es pot fer per aconseguir-ho.

Conceptualment, si un dels locus no s'ha amplificat suficientment, es pot afegir més quantitat de encebadors a la reacció, o bé, disminuir la concentració de encebador dels locus que s'han augmentat massa, i que al consumir més reactius que la resta, dificulten l'amplificació dels encebadors menys eficients. També es pot augmentar la quantitat de producte de la primera ronda de PCR que s'usa com a DNA diana per la segona ronda, o bé, augmentar el número de cicles de PCR de les dos rondes (normalment, 35 i 30 cicles respectivament).

Fins i tot, si no obtenim resultats satisfactoris, es pot provar d'amplificar els microsatèl·lits en una reacció i els encebadors de la mutació en una altre reacció independent, o també varies reaccions per amplificar els microsatèl·lits separadament.

El pas d'optimització del protocol amb cèl·lula única, és el que requereix més temps, ja que cal provar diferents combinacions fins aconseguir la correcta amplificació de tots els locis de la reacció.

Un cop s'aconsegueix, cal valorar l'eficiència del protocol, és a dir, la taxa d'amplificació (el % de cèl·lules de les que tenim resultats informatius) i la taxa de l'ADO (el % de locis dels quals un dels al·lels no s'ha amplificat). Per descriure aquests dos valors, s'amplifiquen 30 cèl·lules del pacient portador, és a dir, heterozigot per la mutació i si és possible també pels microsatèl·lits analitzats, amb el protocol optimitzat.

Un cop acabades les PCRs, s'analitzen els resultats dels microsatèl·lits i del *MiniSequencing*, i es fa un recompte de les dos taxes.

Per finalitzar, es realitza un informe del cas, *l'Estudi de Informativitat* (Annex 1), que conté el sistema de detecció de la mutació, els microsatèl·lits informatius emprats i les taxes de eficiència del protocol, és a dir, la taxa d'amplificació i la de l'ADO.

3.2.4. Tècnica de *Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA).

Per el desenvolupament de la MLPA s'han adquirit comercialment 6 línies cel·lulars d'aneuploïdia coneguda (Coriel): amb guanys d'un sol cromosoma (cromosomes 9, 13 i 15, respectivament) (referència de les línies: GMO11115, GMO3330 i GMO3184) i amb guanys per a dos cromosomes (cromosomes 16 i 21, 2 i 21, i 18 i X, respectivament) (referència de les línies: GMO4435, GMO3576 i GMO03623). S'han cultivat al Servei de cultius cel·lulars de la UAB situat al IBB amb medi D-MEM (Gibco) amb 10% de serum boví fetal (Gibco) a 37°C. Els cultius són controlats a les 24, 48 i 72 hores i un cop assoleixen l'estadi confluent es sacrifiquen utilitzant un medi de cultiu amb tripsina (0,025 %) per desadherir les cèl·lules del substrat que són recollides en una suspensió. Les cèl·lules són aïllades seguint el mateix processat d'aïllament cel·lular descrit anteriorment (apartat 3.1.1.2). L'excedent de cèl·lules del cultiu és congelat i mantingut en nitrogen líquid.

Per a la tècnica de la *Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA), es segueixen tres passos: la hibridació dels oligonucleòtids, la lligació i l'amplificació.

En la hibridació, els oligonucleòtids s'uneixen a les regions diana específiques. La reacció comença amb la desnaturalització del DNA mostra (DNA control o DNA problema), per tal de permetre que els oligonucleòtids s'hibridin correctament. Concretament, 5 µL del DNA problema es deixen 5 minuts a 98 °C, en un termociclador. Tot seguit, la temperatura es baixa fins a 25 °C, i s'introdueix 1,5 µL de la mescla d'oligonucleòtids (*Probe Mix*) i 1,5 µL de tampó d'hibridació (*MLPA Hybridization Buffer*). Aleshores, es torna a desnaturalitzar la mostra durant 1 minut a 95 °C, i seguidament es manté el tub a 60 °C durant 16 hores, per tal de permetre la completa hibridació de tots els oligonucleòtids.

Un cop han passat 16 hores, es realitza la reacció de lligació, en la qual les parelles d'oligonucleòtids units a les regions complementaries del genoma, es lliguen per a

permetre la seva posterior amplificació mitjançant una PCR. La reacció es duu a terme després de dipositar la següent mescla en el tub:

- 25 µL d'aigua.
- 3 µL *Ligation Buffer A* (MRC-Holland).
- 3 µL *Ligation Buffer B* (MRC-Holland).
- 1 µL de *Ligase Enzyme* (MRC-Holland).

Un cop homogeneïtzada la mescla, es deixa en un termociclador durant 5 minuts a 54°C, per a permetre la lligació, i tot seguit, 5 minuts a 98 °C, per tal de aturar la reacció. Per finalitzar, i després de generar els nous oligonucleòtids, fruit de la lligació de dos oligonucleòtids contigus, cal amplificar-los amb encebadors marcats fluorescentment, per a poder analitzar-los amb el seqüenciador de DNA.

La mescla de PCR conté els següents components:

- 10 µL del producte de lligació.
- 31,5 µL d'aigua.
- 4 µL de *Salsa PCR Buffer* (MRC-Holland).
- 2 µL de *Salsa Primer* (MRC-Holland).
- 2 µL de *Dilution Enzyme Solution* (MRC-Holland).
- 0,5 µL de *Salsa Polymerase Enzyme* (MRC-Holland).

Aleshores, es realitzen en un termociclador, els següents passos:

- 35 cicles de 30 segons a 95 °C, 30 segons a 60 °C i 60 segons a 72 °C.
- 20 minuts a 72 °C.
- Mantenir a 4 °C.

Finalitzada l'amplificació de PCR, es realitza l'anàlisi dels fragments obtinguts en el seqüenciador de DNA (ABI 3700, Applied Biosystems).

Per analitzar els resultats, i poder comparar els obtinguts en les cèl·lules problema i en les cèl·lules control, primer cal normalitzar l'àrea dels pics observats per a cada cèl·lula. Això, es realitza sumant totes les àrees dels pics, mostrades en rfu (*Relative Fluorescent Units*), i dividir cada una de les altures individuals pel sumatori total, obtenint el que anomenem l'àrea relativa. D'aquesta manera, s'anul·la l'efecte artefactual que podria tenir comparar resultats diferents deguts a amplificacions globals de diferent intensitat en les diferents cèl·lules.

Després de normalitzar els resultats obtinguts, i realitzar la mitjana de les cèl·lules control, es comparen les àrees relatives del fibroblast aneuploides amb l'àrea relativa promig control per tal de detectar les variacions en les dotacions cromosòmiques

indicatives d'aneuploïdia. En els cromosomes euploides s'esperen valors entre 0,8 i 1,2, en cromosomes guanyats, valors superiors a 0,8 i en cromosomes perduts, valors inferiors a 0,8.

3.3. Material i Mètodes de l'Objectiu 3

3.3.1. Estructura del procediment de DF-PGD

Tot seguit es detallen els passos que es segueix des de la demanda de un protocol DF-PGD fins a la seva aplicació clínica.

Un cop arriba la proposta d'una família candidata a realitzar un protocol de DF-PGD, majoritàriament a través del Servei de Fibrosi Quística de l'Hospital de la Vall d'Hebrón, de la Fundació Puigvert, de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid o bé de la Clínica Quirón de Madrid, s'acorda la recollida de mostres biològiques de la parella i de un fill o familiar de primer grau afecte. Les mostres biològiques solen ser sang perifèrica o epíteli bucal extret amb uns raspalls específicament pensats per aquesta funció (*Catch-All Sample Collection Swabs*, Epicentre), i s'usaran per la posta a punt del protocol de detecció de la malaltia monogènica.

A més, s'aprofita la recollida de mostres biològiques per informar a les parelles del procediment de DF-PGD, explicant les limitacions del procés, i recomanant el diagnòstic prenatal en cas d'embaràs. Un cop la parella ha estat informada firmen els documents del *Consentiment Informat* (Annex 2) i del *Compromís Mutu* (Annex 3), en els quals confirmen entendre el procés que comencen, en esser inclosos com a famílies candidates al DF-PGD, en el marc del projecte de recerca (Fondo de Investigación Sanitaria Instituto de Salud Carlos III (FIS-ISCIII); PI 051395), en el que s'ha realitzat aquesta tesi.

A partir d'aquest moment, comença l'optimització del protocol, que acostuma a durar de 3 a 4 mesos segons la malaltia o la mutació.

Tal com hem dit anteriorment, un cop a finalitzat la optimització del protocol, s'envia el informe de l'*Estudi de Informativitat i posta a punt* (Annex 1) al centre de reproducció assistida en el que, en col·laboració, es realitzarà el DF-DGP. A partir d'aquest punt es pot iniciar l'estimulació ovàrica de la pacient, i programar el dia de la punció fol·licular (Dia 0).

Quan arriba el Dia 0, els oòcits madurs en estadi de MII de la pacient punxonats, rentat de les cèl·lules de la cúmulus, s'inseminen mitjançant ICSI. Immediatament es realitza

la biòpsia dels corresponents 1CPs, per a realitzar l'estudi cromosòmic indirecta del oòcit. La biòpsia es duu a terme per l'especialista en embriologia del centre, i s'usa la tècnica del PZD (*Partial Zone Dissection*)(Malter HE, 1989), amb l'ajut d'una agulla molt fina però dentada (*PZD Micropipette*, Humagen) amb la que es fa un forat a la zona pel·lúcida, pel qual amb una altre agulla de 20-30µm de diàmetre, s'aspira el 1CP (*MPB-BP-30 Micropipette*, Humagen). El 1CP obtingut es renta tres vegades amb PBS/0,1 % PVA estèril i es col·loca en un tub de PCR de 0,2 mL que es manté en gel fins a l'arribada al laboratori, on s'inicia el protocol de CGH descrit prèviament.

En els cassos de DF-PGD de centres madrilenys, els tubs amb 1CPs són enviats per missatgeria (MRW) cap a Bellaterra en una caixa amb blocs tèrmics congelats a -20°C. El matí del Dia+1 arriben al laboratori i es comença ràpidament amb el protocol de CGH. Quaranta-quatre hores després de preparar la CGH dels 1CPs i deixar-la hibridant a l'estufa a 37 °C, el matí o migdia del Dia+3, segons el centre de procedència sigui Barcelona o Madrid, es fan els rentats post-hibridació i comença l'anàlisi del resultat de la CGH en el microscopi de fluorescència. També al matí del Dia+3, i després de controlar la evolució dels oòcits fecundats el Dia 0, es realitza la biòpsia del embrions resultant que estan en estadi de 6-8 cèl·lules, per tal de detectar la presència o absència de la mutació de la malaltia monogènica.

La biòpsia es realitza pel mateix orifici creat durant la biòpsia del 1CP, tot i que es sol eixamplar amb àcid Tyrode, que degrada la zona pel·lúcida. Un únic blastòmer es biopsiat per cada embrió utilitzant una agulla comercial (*MPB-BP-30 Micropipette*, Humagen), i tal com s'ha fet amb el 1CP, el blastòmer es renta successivament en tres gotes de PBS/0,1 % PVA estèril abans de dipositar-lo en un tub de PCR i mantenir-lo en gel. Seguidament, comença el protocol de amplificació de la cèl·lula amb MDA i les posteriors rondes de PCR per a realitzar el diagnòstic genètic de l'embrió.

En els cassos de DF-PGD de centres de Madrid, els blastòmers biopsiats el Dia+3 s'envien per missatgeria en una caixa plena de blocs tèrmics. Al arribar, al matí del Dia+4, comença també el protocol de diagnòstic de mutacions de la malaltia monogènica. Així doncs, a la matí o bé a la nit del Dia+4, s'obtenen els resultats de tots els locis estudiats i per tant, es realitza el diagnòstic de la malaltia monogènica en els embrions. Aquests resultats es comparen amb els resultats de la CGH dels 1CPs, que s'obtenen a partir del Dia+4. Es redacta un informe detallat que inclou resultats d'ambdós anàlisis moleculars i que s'adreça al centre corresponent, màxim el Dia+4 al vespre (Annex 4).

Seguint l'objectiu del DF-PGD, es recomana, per a transferir, els embrions no afectes de la malaltia, derivats d'òocits potencialment euploides. Per tant, els responsables del centre de reproducció, transfereixen fins a tres embrions seleccionats pel DF-PGD, segons criteris morfològics i de qualitat embrionària.

Quinze dies després, es confirma o es descarta l'embaràs bioquímicament i posteriorment, es confirma mitjançant ecografia al cap de 30 dies de la transferència embrionària. En cas d'embaràs, es recomana a la parella la realització d'un diagnòstic prenatal, per tal de confirmar el diagnòstic.

3.3.2. Aplicació clínica del DF-PGD

Després de dos anys d'aplicació del DF-PGD, un total de vuit parelles s'han inclòs en l'estudi. La majoria d'elles, sis, són portadores de Fibrosi Quística (FQ), mentre que referent a les altres dues, una és portadora del Síndrome d'Angelman (SA), i l'altre del Síndrome de von Hippel-Lindau (VHL) (taula 1). El tres síndromes són de pronòstic molt greu i estan causats per mutacions en els gens CFTR, UBE3A i VHL, respectivament. Dos de les parelles (C i E) han realitzat un segon cicle de DF-PGD al no obtenir embaràs després del primer intent. Per tant, el protocol de DF-PGD s'ha aplicat fins al moment, deu cops.

Parella	Malaltia	Mutacions	Mètode de Detecció	Microsatèl·lits informatius
A	CF	M: 3849+10Kb (C to T) P: Y1092X	MiniSequencing	D7S1817 / D7S1799
B	AS	M: K109X	MiniSequencing	D15S1513 / D15S817
C	CF	M: dF508 P: dF508	Diferència de grandària	D7S2847 / D7S1799 INTRA
D	VHL	P: R161Q	MiniSequencing	D3S1675 / D3S1537
E	CF	M: dF508 P: dF508	Diferència de grandària	D7S1817 / D7S1799 INTRA / D7S2847 D7S3052
F	CF	M: dF508 P: 712-1 G to T	Diferència grandària de i MiniSequencing	D7S2847 / D7S1799 D7S3052
G	CF	M: dF508 P: dF508	Diferència de grandària	INTRA
H	CF	M:1811+1.6Kb A to G P: 2711delT	MiniSequencing	D7S1817 / D7S1799

Taula 1. Parelles que han participat en el procediment de DF-PGD presentat en aquesta tesi doctoral.

4. Resultats

4.1. Resultats de l'Objectiu 1

4.1.1. Article n°1 (en revisió)

Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in IVF-oocytes from donor females: CGH analyses in MII oocytes and their 1PB.

Obradors A.¹, Rius M.¹, Cuzzi JF.², Gutiérrez-Mateo CM.¹, Pujol A.³, Marina F.⁴, Márquez C.⁵, Benet J.¹, Navarro J.¹

1 Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

2 Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, CNPq Scholarship, Universidade de São Paulo, Brazil.

3 Clínica EUGIN, Barcelona, Spain.

4 Instituto de Reproducción CEFER, Barcelona, Spain.

5 Reproducción asistida, Hospital Materno Infantil Valle d'Hebron, Barcelona, Spain.

6 Correspondence address: (Edificio M) Facultat de Medicina, UAB Bellaterra, Barcelona, Spain.

Tel: 0034-93-581-1773; Fax: 0034-93-581-1025; E-mail: joaquima.navarro@uab.cat

Abstract

Introduction The aim of this work is to analyze the frequencies and the mechanisms involved in the production of aneuploidy events in donor oocytes, i.e. errors produced at the proliferative division stage of oogenesis and errors produced at first meiotic division. Two types of donor oocytes are analyzed, depending if they were obtained just after follicular puncture ("Fresh") or matured *in vitro* (IVM).

Methods A total of 84 oocytes, 28 "Fresh" and 56 IVM, obtained from 53 donors (mean donor age: 26.1 y.o.), have been analyzed with Comparative Genomic Hybridization applied to the oocyte (MII) and its corresponding First Polar Body (1PB).

Results A total of 27 doublet cells out of 84 (32.1%) were aneuploid. Two different origins were involved in these aneuploidies (i.e., mitotic errors during oogenesis or first meiotic division errors). Considering that 58 chromosomes were involved, 48.3% (28 out of 58) of aneuploid events originated during mitotic divisions errors, whereas 51.7% (30 out of 58) were produced in first mitotic division early in oogenesis.

Globally, 12 of the 53 donors (22.6%) produced aneuploid oocytes due to errors during the oocyte's mitotic divisions, and the same rate (22.6%) originated owing to first meiotic divisions.

Conclusion This unexpected high rate of donors containing mitotic errors has never been described before, although it had already been described in IVF patients. A

significant prevalence in euploid fetus ovaries of a pool of aneuploid oogonia and the trigger effect of the hormonal stimulation of these aneuploid oogonia may explain this elevated incidence.

Considering the importance of both meiotic and mitotic errors even on young women's oocytes, CGH-PGS, followed by confirmatory prenatal diagnosis, is highly recommended to avoid transferring potentially aneuploid embryos thus increasing their implantation rate.

Introduction

Aneuploidy is one of the main causes behind the low pregnancy rate in humans (Bahçe et al., 1999). Chromosome abnormalities are found in both early cleavage-state embryos and first-trimester spontaneously aborted fetuses (Boue et al., 1985, Munne et al., 1995).

Most of the aneuploidy is due to errors in the female first meiotic division (Nicolaidis i Petersen, 1998, Hassold i Hunt, 2001), therefore the cytogenetic study of oocytes may provide useful data. Moreover, it is proven that oocytes may present aneuploidy not only owing to errors in the first meiotic division, but also to mitotic errors on oogenesis (Cozzi et al., 1999, Mahmood et al., 2000, Cupisti et al., 2003, Pujol et al., 2003, Hulten et al., 2008). These errors are produced during the proliferative division stage of oogenesis on the fetus development, where a high number of mitotic divisions occur to generate the pool of oogonia that will be ovulated in puberty. Errors during this intense stage of mitotic divisions produce aneuploid oogonia, which once are ovulated will generate aneuploid oocytes (Figure 1).

In order to describe the aneuploidy rate in oocytes, several groups have analyzed the First Polar Body (1PB) and its corresponding Metaphase II-stage oocyte (MII). Most of the studies were performed using discarded oocytes generally MI immature oocytes from IVF patients that were *in vitro* matured (IVM) until they reached the MII stage. Different authors describe an aneuploidy rate of around 50%, analyzing IVM MII oocytes from IVF patients with a mean age of 40 y.o. (Pellestor et al., 2003, Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b, Pellestor et al., 2005a, Fragouli et al., 2006c, Wells et al., 2008). This considerably high aneuploidy rate found in this kind of patients is concordant with their low pregnancy expectations, considering that they are mostly patients included in an IVF program with an advanced maternal age (AMA) indication.

In contrast, oocytes from young women without a clinical history of fertility problems are expected to contain a low aneuploidy rate and, therefore, a high pregnancy rate. As it is difficult to assess the aneuploidy rate in oocytes of young control women, discarded eggs from donors have been used in this proposal. It is well known that women with no ovarian function, repetitive IVF failures or recurring abortions are strongly recommended to accept oocytes donated by young females (between 18 to 35 y.o.). In fact, when using donor oocytes in an IVF cycle, the pregnancy rate is increased up to

39.6%, compared to the approximately 30% when a patient's own oocytes are used (Andersen et al., 2008).

Since donor oocytes are very appreciated in IVF clinics, mostly the immature oocytes, which require an IVM process, are available for research. Several groups, after analyzing these IVM donor oocytes, have obtained aneuploidy rates varying from between 5% to 23%, depending upon the author (Pellestor et al., 2003, Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Fragouli et al., 2007), but in any case being, as expected, lower than the aneuploidy rates observed in the IVF patient's IVM oocytes.

Other studies have used donor oocytes at the MII stage after follicular puncture (i.e. "Fresh"), which are much more difficult to obtain from the IVF centers, in order to evaluate an aneuploidy rate without the effect of IVM. The obtained aneuploidy rate is unexpectedly high, between 29% to 65%, considering the origin of these oocytes and compared to the lower rates found in IVM donor oocytes (Sandalinas et al., 2002, Keskinetepe et al., 2007, Sher et al., 2007).

Moreover, different authors have observed a heterogeneous outcome in egg-sharing recipients undergoing IVF cycles using the same donor oocytes, and after the analysis of different physiological and embryological parameters of these recipients, no cause-effect relation was found, leaving other non-analyzed factors such as donor oocyte aneuploidy as a possible explanation (Garcia-Velasco et al., 2003, Bodri et al., 2007).

The aim of this work is to perform a complete aneuploidy screening of "Fresh" and MIV oocytes in both cells of the doublet (MII oocyte and its 1PB) by Comparative Genomic Hybridization (CGH) in order to contribute with more data in this field, as the CGH has also been a helpful tool for the single-cell cytogenetic analysis in very different issues (Voullaire et al., 1999, Wells et al., 1999, Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b, Fragouli et al., 2006b, Fragouli et al., 2006c, Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009). The aneuploidy rate and the origin for the detected aneuploidies also will be discussed.

Material & Methods

Obtainment of samples

A total of 84 oocytes were obtained from 53 IVF egg donors with a mean age of 26.1 y. o. using an antagonist-stimulation protocol described elsewhere (Galindo et al., 2009). Briefly, on Day 2 of the menstrual cycle, 225 IU of recombinant FSH (Gonal-F, Serono, Madrid, Spain) were administered in order to begin with the ovarian stimulation. Once the estradiol level reached 400 pg/mL or a leading follicle of a minimum of 14mm was observed, the GnRH antagonist (Cetrotide, Serono, Madrid, Spain) (0.25 mg/day) was introduced. Five days after stimulation, an ultrasonography and serum estradiol control analysis was performed, and according to the ovarian response, the daily dose of rFSH was adjusted. When at least three follicles of 18 mm were present, 0.2 mg of triptorelin (Decapeptyl, Ipsen Pharma, Barcelona, Spain) was administered for triggering. Oocyte recovery was performed 36 hours after triggering.

The day of the follicular puncture, the recovered oocytes were classified into two groups according to their meiotic stage. Twenty-eight of them were in the MII stage displaying a visible first polar body and were categorized as “Fresh” MII oocytes. The remaining 56 oocytes were characterized as *in vitro* matured oocytes (IVM oocytes). All of them came from either MI or germinal vesicle stages, which after having been kept in IVF medium (IVF, Vitrolife, Gothenburg, Sweden) at 37°C approximately 20 hours, the extrusion of the 1PB had been produced. The 28 “Fresh” oocytes were donated by 19 donors with a mean age of 26.7, whereas the 56 IVM oocytes were donated by 35 donors with a mean age of 24.2 y.o.

The donors signed an authorization in the IVF center to allow the donation of the rejected oocytes for basic research studies. The “Fresh” oocytes were not used in IVF and therefore rejected, when just one to four MII oocytes were recovered after follicular puncture. The samples were obtained from the Clínica EUGIN, Instituto de Reproducción CEFER and the IVF center of Hospital Valle d’Hebrón, all of them from Barcelona, Spain.

CGH procedure

The 1PB and MII doublet of each oocyte were processed as previously described (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b). Briefly, the oocytes were washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS)/0.1% polyvinyl alcohol in order to

remove the excess of medium and mineral oil. Then the oocyte was kept in a drop with Tyrode's acid solution until the zona pellucida was completely removed, and both MII and 1PBs were individualized. Following this, the cells were washed in four drops of PBS/0.1% polyvinyl alcohol and were placed in 0.2-mL sterile PCR tubes. Each tube was labeled with a code referring to the donor and the cell type (1PB or MII).

To be used as DNA reference, three buccal cells from a healthy female were isolated as describe above.

Cell lysis, the whole genome amplification method (DOP-PCR), DNA labeling with nick translation, the hybridization procedure, as well as the analysis and interpretation of the results were performed as described previously (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009).

Briefly, the single cell was lysated using Proteinase K for 60 minutes at 37°C followed with a 10-minute step at 65°C to stop the reaction. After that, the single-cell genome was amplified using DOP-PCR to obtain enough DNA to perform the CGH methodology. Then, 5 µL of the DOP-PCR product was loaded into a 1.5% agarose gel in order to assess successful lysis and amplification of the single cell. The nick-translation procedure was applied to 22.5 µL of the DOP-PCR product according to the manufacturer's instructions, considering that test and reference DNA were labeled with Spectrum Red (Vysis) and Spectrum Green (Vysis), respectively. Both nick-translation products were mixed, together with 5 µL of Cot-1-DNA in order to block repetitive sequences. The mix was co-precipitated and it was used as a hybridization probe on euploid lymphocyte metaphases. After 72 hours in a humid chamber at 37°C, the CGH was analyzed using an epifluorescent microscope. After capture and analysis of 10 metaphases, the single-cell karyotype was determined using the fluorescence ratio (test/reference) expressed by the software, assuming a chromosome loss or gain when the fluorescence ratio was 0.8 or 1.2, respectively.

It is important to mention that chromosomes that are potentially gained or lost artifactually (i.e., chromosomes 17, 19 and 22) were discarded from analysis when all three chromosomes were simultaneously gained or lost in the same cell; if not, they were considered as real aneuploidies.

In the present work no distinction between chromosome or chromatid gain or loss has been considered because, in our experience, after analyzing 1PBs and their corresponding MII using CGH and FISH, respectively, the CGH loss or gain profiles on

the 1PBs were indistinguishably equivalent to losses or gains of either chromosome or chromatid in the MIIs (Gutierrez-Mateo et al., 2004a).

Results

After analyzing all of the CGH profiles of a total of 84 doublets (the MII oocytes and their corresponding 1PB; MII-1PB), informative cytogenetic results were obtained from all of them, giving a CGH efficiency of 100%. Complementary chromosome sets were observed in 72 out of 84 MII-1PB doublets (85.7%).

Fifty-seven out of the 84 analyzed doublets presented euploid profiles (MII: 23,X and 1PB:23,X), therefore the euploidy rate was 67.9%. The other twenty-seven analyzed doublets were aneuploid, thus the global aneuploidy rate was 32.1%. Considering that in seven out of twenty-seven aneuploid doublets (IVM20, IVM28, IVM30, IVM32, IVM36, IVM38 and F28), the 1PB was aneuploid but the MII was euploid, the aneuploidy ratio per oocyte has been calculated as being 23.8% (20 out of 84) (Table 1). A total of 12 (F28, IVM18, IVM20, IVM28, IVM30, IVM32, IVM34, IVM36, IVM38, IVM49, IVM55 and IVM56) out of 84 oocytes (14.3%) displayed aneuploidies produced due to the corresponding oogonium being aneuploid, 14 (F20, F22, F27, IVM17, IVM19, IVM26, IVM37, IVM39, IVM40, IVM45, IVM46, IVM48, IVM51 and IVM52) out of 84 oocytes (16.7%) displayed aneuploidies owing to errors in the first meiotic segregation and one (F10) out of 84 oocytes (1.2%) displayed aneuploidies as a result of both abnormal processes mentioned: the corresponding oogonium was aneuploid and contained errors produced in the first meiotic segregation. In summary, the incidence of errors in aneuploid oogonia or in the first meiotic division was 15.5% (13 out of 84) and 17.8% (15 out of 84), respectively, including oocyte F10 in which both alterations were observed (Figures 2 and 3).

In the twenty-seven aneuploid doublets, all of the 23 chromosomes were observed except for Chromosomes 6, 7, 9, 12, 14 and 21. While in aneuploid events having a mitotic origin 14 chromosomes were involved (the 19 and the 3 four times, the 8, the 10 and the 11 three times, the 20 and the 17 twice and the 2, the 5, the 13, the 16, the 18, the 22, and the X once), in the aneuploid events having a meiotic origin eight different chromosomes were involved (the 16 six times, the 1, the 4, the 13, the 15 and the 19 four times, the 11 and the 18 twice)(Figure 4). Therefore, a total of 58 aneuploid events, defined as each of the chromosomes involved in aneuploidy, were found. From them, 48.3% (28 out of 58) and 51.7% (30 out of 58) of the aneuploid events originated either due to mitotic or meiotic errors, respectively.

The incidence of errors produced during first meiotic division observed in “Fresh” and in IVM oocytes analyzed (14.3%; four out of 28 and 19.6%; 11 out of 56, respectively) were different, but without significant differences

All meiotic segregation errors observed concerned just a single chromosome, while only four of the oocytes with mitotic segregation errors (33.3%) involved only one chromosome. The incidences observed were very significantly different (Fisher Test= 0.0002).

No statistical differences were observed in the size of the aneuploid chromosomes since 48.8% of the aneuploidy events involved large chromosomes (Groups A-C), whereas the remaining 51.2% were smaller chromosomes (Groups D-G). Also no correlation was observed between the chromosome size and its mitotic or meiotic error origin.

In practically all of the first meiotic division errors observed, 14 out of the 15 doublets (93.3%), the gained chromosome or chromatid was segregated to the 1PB and, consequently, the corresponding chromosome or chromatid loss was observed in its MII.

In the present work, 20 out of 53 (37.7%) of the donors produced at least one aneuploid oocyte. In 56.6% (30 out of 53) of the donors a single oocyte was analyzed, from which in 25 donors the single oocyte analyzed was euploid. In the five remaining donors the oocytes was aneuploid: two resulted from a mitotic segregation error (Donors BA and DA), two resulted from a meiotic segregation error (Donors AA and CA) and one resulted from both mitotic and meiotic segregation errors (Donor J).

In the remaining 23 out of 53 donors (43.4%) more than one oocyte was analyzed from which in 8 donors (34.8%) all of the oocytes analyzed were euploid (Donors EA, FA, GA, HA, KA, LA, UA and WA). In the following 13 donors euploid and aneuploid oocytes were observed: in five of them (Donors IA, JA, MA, XA, and ZA) euploid and aneuploid oocytes due to meiotic errors were observed, whereas in six donors (Donors NA, OA, PA, QA, RA and AB) euploid and aneuploid oocytes were due to mitotic errors, and in two donors (Donors VA and YA) euploid and aneuploid oocytes due to mitotic or meiotic errors were observed. In two of the 23 donors, all the analyzed oocytes were both aneuploid, in Donor TA, both aneuploidies originated due to meiotic segregation errors and in Donor SA, an aneuploid oocyte originated from meiotic segregation errors and the other due to mitotic alterations.

In the present work, the number of donors that produced at least one oocyte with aneuploidies due to mitotic segregation errors or first meiotic segregation errors were

eight out of 53 (15.1%) and eight out of 53 (15.1%), respectively. Moreover, four donors (Donors J, SA, VA and YA) produced both types of alterations.

Summarizing the incidence of donors that produced aneuploid oocytes due to mitotic segregation errors or first meiotic segregation errors, there were 22.6 % (12 out of 53) of the donors for each type of alteration.

Discussion

In this work very good CGH profiles were obtained from all of the 84 doublets (MII oocytes and their corresponding 1PB) from the donated oocytes analyzed. This high technical success allows us to obtain not only a more complete knowledge about the entire aneuploid events present in each oocyte and its incidence, but also to identify the mechanism responsible for the aneuploid event and the moment in which it took place: in the mitotic stage early in the oogenesis or during the first meiotic division.

There is very little published data concerning the rate of chromosomal errors in young, fertile female oocytes, obtained from egg donors. The great interest to use donor oocytes from cytogenetically normal young donors (<35 y.o. female) in ART clinics makes it very difficult to use them for basic research. In fact, it has been reported that about 28% of the reported treatment cycles performed are designated to be with egg donation (Andersen et al., 2008).

In previously published results referring to the aneuploidy incidence in “Fresh” oocytes from donors, a great variation in aneuploidy frequency has been observed depending on the research groups and the techniques of analysis used. Taking into account the works in which the whole chromosome complement has been analyzed, values from 29% aneuploid oocytes using the SKY approach (Sandalinas et al., 2002), until 56% (Keskinetepe et al., 2007) or 65% (Sher et al., 2007) using the CGH approach have been reported. In the present work, the incidence of aneuploid oocytes in “Fresh” oocytes has been 17.85%. This value is considerably lower than that mentioned before, even considering the ones in which CGH was also used. A modified CGH procedure was used in some studies, with respect to the previously described CGH procedure (Voullaire et al., 1999, Wells et al., 1999), in which the single-cell genome amplification technique applied was Multiple Displacement Amplification technique (MDA) instead of the DOP-PCR. This variation may have introduced some bias into the results, as has previously been suggested (Fragouli et al., 2007).

In previously published results referring to the aneuploidy incidence on IVM donor oocytes, a great variation in the aneuploidy frequency is also observed depending on the research groups and the techniques of analysis used. Again, taking into account the works in which the whole chromosome complement has been analyzed, values from 7.8% aneuploid oocytes (Pellestor et al., 2003) using R-banding, or 4.54% (Fragouli et al., 2007) also using CGH, until 23% aneuploid oocytes (Gutierrez-Mateo et al., 2004b)

also using CGH, have been reported. In the present work, the incidence of aneuploid IVM oocytes is much higher, 35.7% (20 out of 56 IVM oocytes). This variation may be explained by intrinsic differences existing between the groups of donors, the size of the sample analyzed, the *in vitro* maturation procedure used and also the consequence of different analysis criteria used by the research group using different CGH software systems (Cytovision, Metasystem or Vysis).

Considering the results included in the present work, even with an increased incidence of aneuploidy in the IVM oocytes, with respect to the “Fresh” oocytes, the observed values were not significantly different ($p=0.38$).

In the present work, 32.1% of doublets (MII-1PBs) were aneuploid, but the risk of producing aneuploid offspring due to aneuploid MII oocytes was 23.8% considering, exclusively, the incidence of the aneuploid MII. This aneuploid rate is considerably lower than the frequencies observed when oocytes from IVF patients are analyzed using CGH: 48% (12 aneuploid doublets out of 25 analyzed)(Gutierrez-Mateo et al., 2004b); 57.1% (24 aneuploid doublets out of 42 analyzed)(Gutierrez-Mateo et al., 2004a). In contrast, Fragouli et al. detected 22% of aneuploidy in IVF patients after analyzing 100 oocytes (Fragouli et al., 2006b).. This value is similar to the present work on young donors, but it must be considered that in just 48 oocytes both chromosome complements from the MII-1PBs were analyzed, a fact that makes it difficult to study the complementarity between both cells and, consequently, to identify not only complementary, but also uncomplimentary aneuploidies which are indicative of mitotic-originated errors

In this current work, first-meiotic-division cytogenetic errors or mitotic segregation errors produced early in oogenesis have been identified as being responsible for the aneuploidies observed in oocytes from donors. When aneuploid events in the 1PB and its MII doublets were complementary, they were considered to have resulted from first meiotic segregation errors. It was observed in 17.8% of the oocytes (15 out of 84), and this type of aneuploid events was observed with a frequency of 51.7% (30 out of 58) in the present work.

Since the donors had a normal karyotype, when aneuploid events in 1PB and MII doublets were uncomplimentary, they were considered to have resulted from aneuploid oogonia that had originated early in oogenesis and were produced as a consequence of segregation mitotic errors. This type of aneuploidy event was observed in 15.5% of the oocytes (13 out of 84), and with a frequency of 48.3% (28 out of 58) aneuploid events

in the present work. In one of the oocytes, a coincidence of both types of errors was detected (Oocyte F10).

Herein, the incidence of donors producing aneuploid oocytes due to segregation errors in the early mitotic stage of oogenesis or due to errors in the first meiotic stage is, in both cases, 22.6%. Even with this high frequency of alterations, all of the donors with more than one oocyte analyzed had some of their oocytes euploid, except Donor TA and Donor SA, who had the two oocytes analyzed aneuploid.

The presence of mitotic errors during oogenesis was firstly described after analyzing the oocytes of a patient with four previous pregnancies affected of Down's Syndrome (Cozzi et al., 1999). A phenomenon similar to this, aneuploid oocytes originated due to aneuploid oogonia, was also observed in two out of six patients of IVF with abnormal oocytes (33.3%) studying 7-chromosomes by FISH (Mahmood et al., 2000). The same group, with an study increasing the number of oocytes, also analyzing 1PB-MIIs but with 8-chromosome FISH, found that from the patients (mean age of 32.6 y.o.) where both cells were analyzed and determined as being aneuploid, 20% (2 out of 10) of them produced doublets which had originated from trisomic oogonia (Cupisti et al., 2003). Afterwards, a study of 1PB-MIIs using 9-chromosome FISH showed that 25.7% of the patients (66 women with a mean age of 33.7 y.o.) produced oocytes with extra chromosomes due to aneuploid oogonia (Pujol et al., 2003).

Moreover, studies using CGH to analyze MII-1PB also detected aneuploidies due to mitotic errors in the germ line. Two articles describe a percentage between 11.9% and 20% of aneuploidies due to mitotic errors (46 patients with a mean age of 34.9 y.o. and 21 patients with a mean age of 33.2 y.o., respectively) (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b), and a further CGH study summarizes that two of out the nine aneuploidy MII-1PB doublets (22.2%) originated by aneuploid oogonia (46 patients with a mean age of 32.5 y. o.)(Fragouli et al., 2006b).

In oocytes from donors, from what we know, this type of aneuploidy has never been described before. It could probably be due to the fact that in previously published works just one of the cells of the doublet from the whole chromosome complement (MII oocytes or their 1PB) was analyzed and, consequently, it was not possible to distinguish between meiotic or mitotic segregation errors (Sandalinas et al., 2002, Keskinetepe et al., 2007, Sher et al., 2007).

Our results suggest that it is probably time to consider that gonadal aneuploidy is much more frequent in the general population than was expected. The presence of aneuploid

oogonia has been recently assessed by Hultén *et al.* after detecting it in eight fetuses (14-22 weeks old), following pregnancy termination for social reasons and having a normal phenotype appearance, an average incidence of 0.54% (range between 0.20% - 0.88%) of trisomic 21 oogonia in ovarian cells, in practically all of them analyzing more than 1000 fetal ovarian cells oocytes (Hulten et al., 2008). They suggest that this is a normal situation in normal female fetuses, although it is inconsistent with age-related aneuploidy. But according to Zheng's mathematical prediction on oocytes selection, it is possible that aneuploid oocytes produced by mitotic errors during oogenesis undergo ovulation in the later period of the woman's reproductive life, thus increasing the risk of suffering aneuploid offspring in aged patients (Zheng et al., 2000, Hulten et al., 2008).

The fact that the incidence of mitotic errors observed in our group of donors (22.6%) is very close to the incidence observed in previous reports in patients from different groups using CGH (11.9%-22.5%) seems to be in contradiction with the mentioned model, as a higher rate of mitotic errors would be expected in aged patients. The main difference between the studies obtained from discarded oocytes after ART treatments (from IVF patients or donor oocytes) and the oocytes from Hulten's work is that only the first ones suffered hormonal induction. This treatment could possibly be responsible for selecting a large amount of aneuploid oocytes that would have ovulated later in the woman's natural reproductive life. The hormonal treatment would have a similar effect in young as in old females, and it could explain why a similar incidence of the mitotic-errors rate is observed in IVF patients' oocytes as in donor oocytes.

In the present work, none of the aneuploid oocytes originated by aneuploid oogonia displayed aneuploidy involving Chromosome 21. This can be explained as a consequence of the low number of oocytes analyzed per donor, and the average incidence of Chromosome 21 involved in that phenomenon in Hulten's work was 0.54% of the analyzed oogonia (range between 0.20% - 0.88%).

Nevertheless, the fact that more than half of the chromosomes that have been observed have been involved in mitotic errors tells us that the event mentioned does not exclusively affect Chromosome 21, but rather the whole-chromosome complement of the oocytes.

As is shown in the results, the incidence of aneuploid oocytes involving more than one chromosome is significantly different if the aneuploid oocytes originated by mitotic or meiotic errors are compared, 66.7% in front of 0%, respectively. That fact would suggest that the chromosome segregation errors could be caused by different types of

failures depending on the origin. While early on the proliferative phase of oogenesis failures could be involved in the cell-cycle checkpoint mechanisms that would affect the whole chromosome segregation (Barlow i Hulten, 1998, Tease et al., 2002), synaptic errors between specific homologous chromosomes, or reduction in the number of chiasmata because of a low recombination rate could subsequently affect the segregation of particularly unstable bivalents responsible for aneuploidies produced during the first meiotic division (Nicolaidis i Petersen, 1998, Wolstenholme i Angell, 2000, Hassold i Hunt, 2001).

Two different mechanisms responsible for first meiotic errors have been described: non-disjunction homologue chromosomes and pre-division chromatids (Angell, 1997). In the present work we are not distinguishing between them because by using the CGH approach it is really challenging to detect chromatid copy-number alterations. Nevertheless, a way has been suggested to discriminate between them based on the background fluorescence observed in the Y chromosomes (Fragouli et al., 2006c) and the different profiles observed in some chromosomes. In our hands and with our software (Vysis) analyzing the 1PB by CGH and the MII oocytes by FISH, we were sometimes able to see that similar deviations of the CGH profiles in either chromosome (ratios 4:2 or 0:2) or chromatid (ratios 3:2 or 1:2) abnormalities were observed (Gutierrez-Mateo et al., 2004a).

In agreement with the significantly increased frequency of monosomic embryos referred to by several authors (Munne et al., 1995, Marquez et al., 2000, Munne et al., 2004), in the present work the incidence of the most chromosome or chromatid gains (93.3%) observed in first meiotic division errors were found to be in the 1PB, whereas in its MII the corresponding chromosome or chromatid loss was observed. Despite the correlation between both events, our results differ from those previously published (Kuliev i Verlinsky, 2004), as a higher rate of chromosome and chromatid gains were found in the MII. These differences may be due to the different methodological approaches used: whole chromosome complement analyses by CGH versus FISH for five predetermined chromosomes and analyzing both cells of the doublet of the oocytes (1PB&MII) versus single 1PB analyses. More comprehensive aneuploidy studies using CGH on MII and 1PBs doublets of oocytes from donors are required in order to have a full understanding of this issue.

No relation has been observed between the chromosome size and the incidence of aneuploidies, as similar (48.8% vs. 51.2%) incidence of large chromosomes (Groups A-

C), as compared with small chromosomes (Groups D-G) has been observed. This result differs from the previously published data analyzing full-chromosome complements of oocytes from donors. In the Sandalinas' study, most of the aneuploidies involved small chromosomes, whereas in Sher's work, the most prevalent aneuploid chromosomes were 4, 5, 6 and 22 (Sandalinas et al., 2002, Sher et al., 2007). Probably, these differences are a consequence of the small size of the sample, so further investigations must be performed to attain conclusive results about the role of the chromosome size on aneuploidy.

Although many pregnancies using IVM oocytes have been achieved world-wide (Suikkari, 2008), few publications cytogenetically test the embryos produced from IVM oocytes prior to transfer by PGD techniques such as FISH or CGH. In the first case of pregnancies using IVM oocytes in which the embryos were analyzed with an 8-chromosome FISH, only 1 out of the 5 (20%) IVM-generated embryos were euploid (Ao et al., 2006). In the present work, when aneuploidy incidence originated in the first meiotic division observed in IVM oocytes and in "Fresh" oocytes from donors is compared, even being increased in the first group (19.6% as opposed to 14.3%), no significant differences were detected in the fifteen aneuploid doublets found. Probably a larger series of IVM oocytes from donors, analyzing the doublet (1PB and MII oocytes) by CGH, would be necessary for a more accurate establishment of cause-effect between IVM treatments and the incidence of aneuploidies.

This non-negligible aneuploidy rate in donors may explain the different clinical outcomes of donor egg-sharing recipients, as no conclusive effect appeared after analyzing different physiological and embryological parameters such as recipient age, gynecological variables, sperm and embryo quality, or number of embryos transferred (Garcia-Velasco et al., 2003, Bodri et al., 2007). This possibility could be in agreement with 57% of aneuploid embryos detected from donor-oocyte cycles using 8-chromosome FISH (Munne et al., 2006a).

To overcome this problem, PGD has traditionally been proposed as a useful tool to minimize the effect of oocyte aneuploidy during IVF. PGD using FISH is widely applied in most centers, but some groups declare that no increase, and even a decrease, of embryo implantation is observed when performing PGD with FISH in comparison to cycles without PGD (Mastenbroek et al., 2007). Referring to the data extracted from the last European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE) only 13.5% of the PGD-selected embryos transferred successfully implant and turn into a pregnancy

(1635 positive fetal heart beats out of 12131 transferred embryos)(Goossens et al., 2008), whereas ~30% of the embryos implant in conventional non-PGD cycles (Andersen et al., 2008). One of the reasons for the low outcome of PGD maybe the fact that only 5-9 chromosomes are analyzed using FISH (Cohen et al., 2007). In fact, in the oocytes analyzed in the present work, only 22.2% of the oocytes would have been diagnosed correctly, while 11.1% would have been partially diagnosed and 66.7 % would have been wrongly diagnosed as euploid due to chromosomes different than 13, 16, 18, 21, 22 and X being involved.

The CGH approach, while we are waiting to CGH arrays as a routine (Wells et al., 2004, Hellani et al., 2008, Wells et al., 2008), is so far the most useful tool in allowing us to perform the analysis of the whole-chromosome complement of the cell. In fact, the CGH approach has been applied in PGS successfully accomplishing, in some cases, full-term pregnancies (Wells et al., 2002, Wilton et al., 2003, Wilton, 2005, Sher et al., 2007, Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009).

In conclusion, according to the results obtained in the present work and in order to increase the embryo implantation rate of the recipients of oocytes donated by young women, it would be recommended to perform PGS protocol using CGH. Moreover, and due to the non-negligible incidence of aneuploidies caused from aneuploid oogonia it would be also recommended, as it is, in fact, always recommended in PGD, to perform the prenatal diagnosis in case of pregnancy.

Acknowledgements

This research study has been funded by the *Ministerio de Sanidad y Consumo Fondo de Investigación Sanitaria Instituto de Salud Carlos III* (FIS-ISCIH; PI 051395), the *Grup de Suport a la Recerca de la Generalitat de Catalunya* 2005SGR00495 and by the *Càtedra de Recerca EUGIN*. Albert Obradors has a predoctoral grant from the *Generalitat de Catalunya* (2005FI00108). The manuscript was read and corrected by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking Instructor of English at the authors' university.

Figures and footnotes

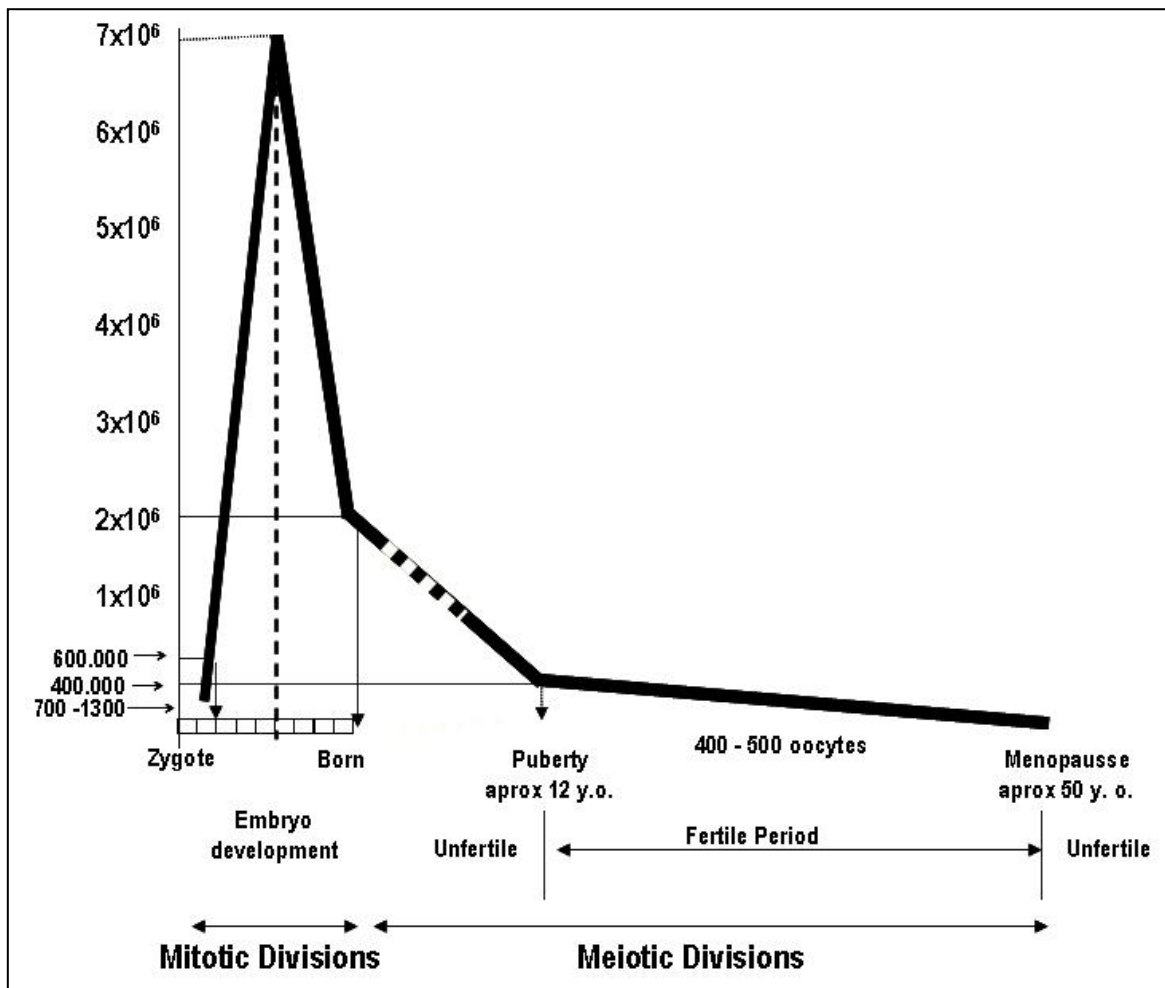


Figure 1. Representation of the different stages of human oogenesis: a proliferative stage of mitotic divisions where the oogonia are produced and a maturation stage prior ovulation of meiotic division.

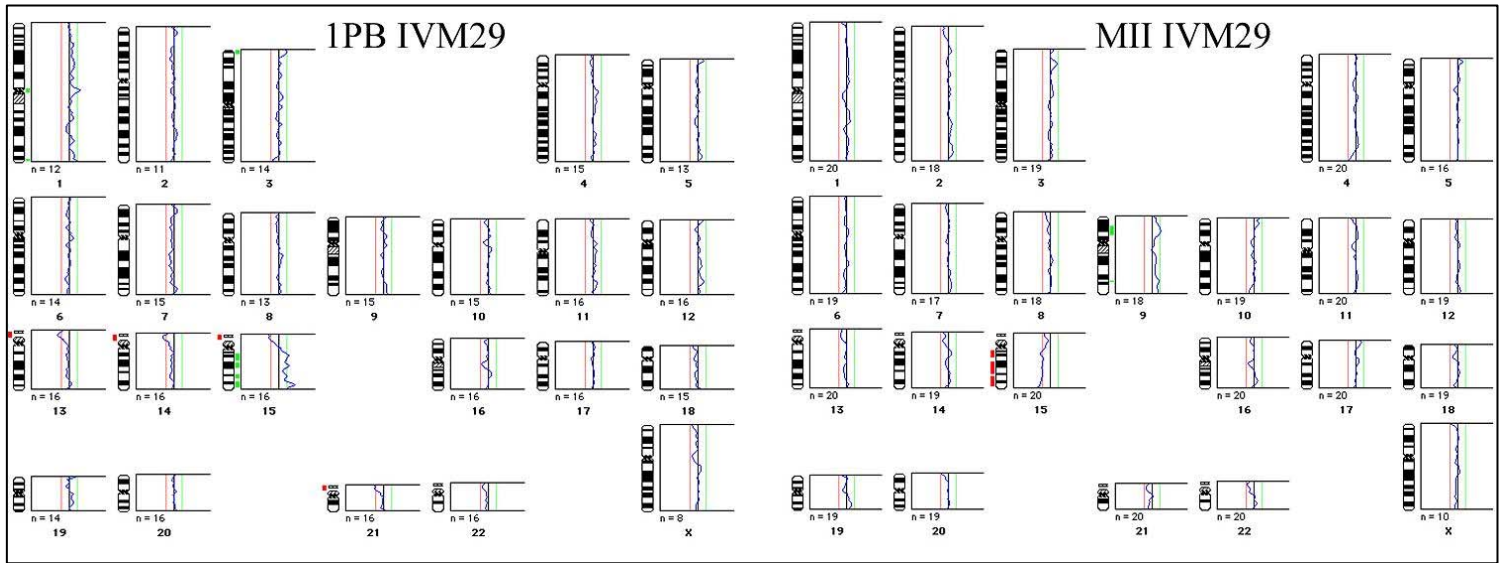


Figure 2. CGH profile of oocyte IVM29 (MII and 1PB) showing a gain of Chromosome 15 on the 1PB and a loss of the same chromosome in its complementary MII, which indicates a first meiotic division error.

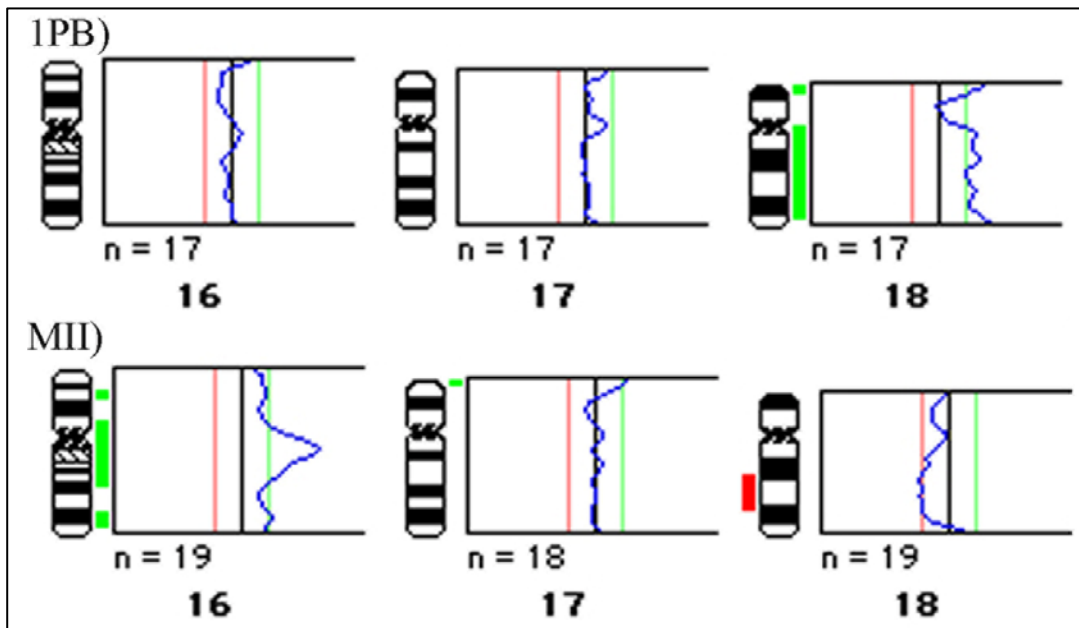


Figure 3. CGH profiles of oocyte F10 (1PB and MII) showing the two aneuploidy mechanisms described in this work; a first meiotic error affecting Chromosome 18 and a gain of Chromosome 16 in the MII due to being originated from an aneuploid oogonium for that chromosome. Chromosome 17 is euploid in both cells.

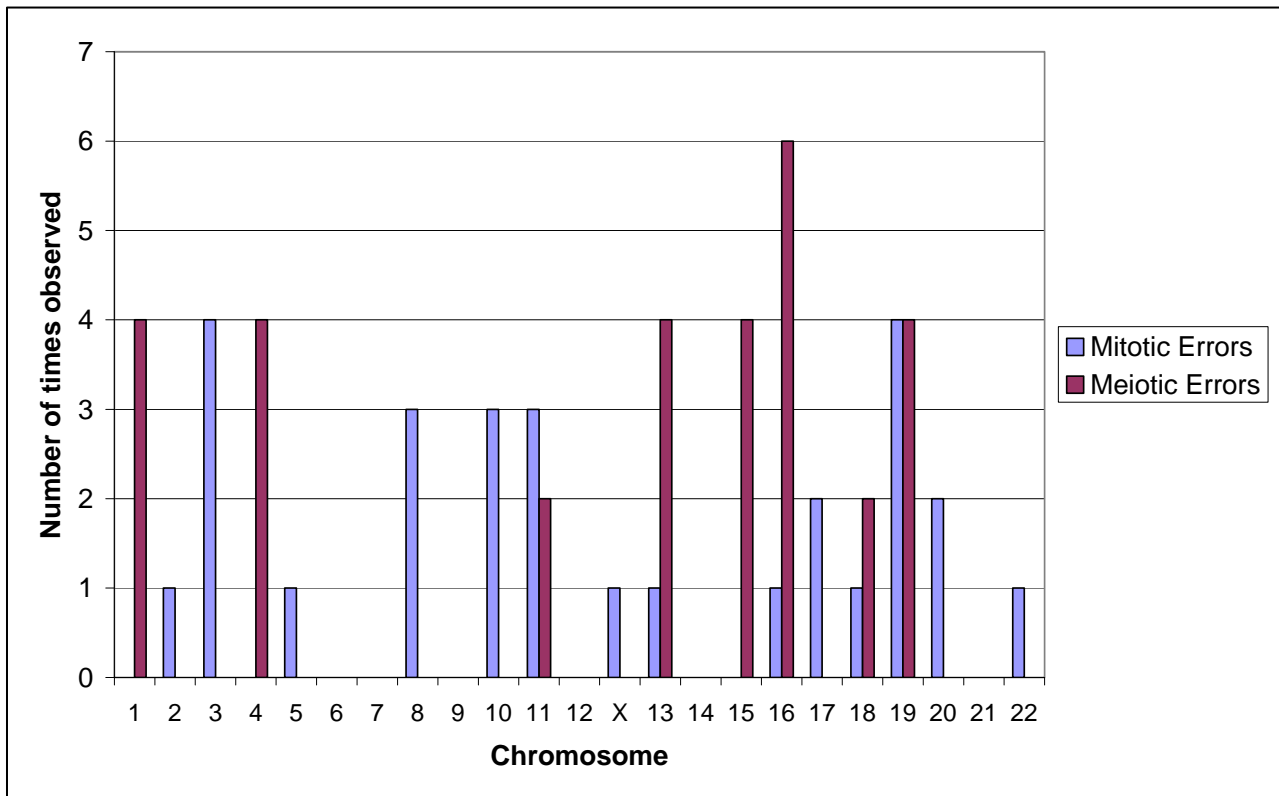


Figure 4. Chromosomes involved in aneuploidy in the 27 aneuploid doublets. The red bars represent the chromosomes found aneuploid due to meiotic errors and in the blue ones represent the chromosomes aneuploid due to mitotic errors.

Donor	Age	Oocyte	Code	MII	1PB	Alteration Origin
A	21	1	F1	23,X	23,X	-
B	28	1	F2	23,X	23,X	-
C	26	1	F3	23,X	23,X	-
D	29	1	F4	23,X	23,X	-
E	29	1	F5	23,X	23,X	-
F	20	1	F6	23,X	23,X	-
G	28	1	F7	23,X	23,X	-
H	28	1	F8	23,X	23,X	-
I	23	1	F9	23,X	23,X	-
J	24	1	F10	23,X,+16,-18	24,X,+18	Mitotic and Meiotic
K	19	1	IVM1	23,X	23,X	-
L	25	1	IVM2	23,X	23,X	-
M	24	1	IVM3	23,X	23,X	-
N	23	1	IVM4	23,X	23,X	-
O	26	1	IVM5	23,X	23,X	-
P	22	1	IVM6	23,X	23,X	-
Q	27	1	IVM7	23,X	23,X	-
R	25	1	IVM8	23,X	23,X	-
S	23	1	IVM9	23,X	23,X	-
T	19	1	IVM10	23,X	23,X	-
U	26	1	IVM11	23,X	23,X	-
V	24	1	IVM12	23,X	23,X	-
W	27	1	IVM13	23,X	23,X	-
X	25	1	IVM14	23,X	23,X	-
Y	29	1	IVM15	23,X	23,X	-
Z	23	1	IVM16	23,X	23,X	-
AA	24	1	IVM17	22,X,-13	24,X,+13	Meiotic
BA	32	1	IVM18	23,X,+3,-22	23,X	Mitotic
CA	24	1	IVM19	22,X,-13	24,X,+13	Meiotic
DA	25	1	IVM20	23,X	24,X,+20	Mitotic

EA	26	2	F11	23,X	23,X	-
			F12	23,X	23,X	-
FA	34	2	F13	23,X	23,X	-
			F14	23,X	23,X	-
GA	24	2	F15	23,X	23,X	-
			F16	23,X	23,X	-
HA	33	2	F17	23,X	23,X	-
			F18	23,X	23,X	-
IA	27	2	F19	23,X	23,X	-
			F20	22,X,-19	24,X,+19	Meiotic
JA	27	2	F21	23,X	23,X	-
			F22	22,X,-16	24,X,+16	Meiotic
KA	20	2	IVM21	23,X	23,X	-
			IVM22	23,X	23,X	-
LA	28	2	IVM23	23,X	23,X	-
			IVM24	23,X	23,X	-
MA	29	2	IVM25	23,X	23,X	-
			IVM26	22,X,-1	24,X,+1	Meiotic
NA	20	2	IVM27	23,X	23,X	-
			IVM28	23,X	24,X,+8,+10,-19	Mitotic
OA	25	2	IVM29	23,X	23,X	-
			IVM30	23,X	24,X,+20	Mitotic
PA	24	2	IVM31	23,X	23,X	-
			IVM32	23,X	24,X,+3	Mitotic
QA	25	2	IVM33	23,X	23,X	-
			IVM34	25,XX,+5,+8,-19	22,X,-19	Mitotic
RA	20	2	IVM35	23,X	23,X	-
			IVM36	23,X	25,X,+8+10	Mitotic
SA	29	2	IVM37	24,X,+1	22,X,-1	Meiotic
			IVM38	23,X	25,X,+3,+11	Mitotic
TA	21	2	IVM39	24,X,-16	24,X,+16	Meiotic
			IVM40	24,X,-4	24,X,+4	Meiotic
UA	25	3	F23	23,X	23,X	-
			F24	23,X	23,X	-
			F25	23,X	23,X	-
VA	25	3	F26	23,X	23,X	-
			F27	22,X,-19	24,X,+19	Meiotic
			F28	23,X	25,X,+2,+17	Mitotic
WA	24	3	IVM41	23,X	23,X	-
			IVM42	23,X	23,X	-
			IVM43	23,X	23,X	-
XA	19	3	IVM44	23,X	23,X	-
			IVM45	22,X,-11	24,X,+11	Meiotic
			IVM46	22,X,-15	24,X,+15	Meiotic
YA	19	3	IVM47	23,X	23,X	-
			IVM48	22,X,-15	24,X,+15	Meiotic
			IVM49	24,X,+11	24,X,+11	Mitotic
ZA	21	3	IVM50	23,X	23,X	-
			IVM51	22,X,-4	24,X,+4	Meiotic
			IVM52	22,X,-16	24,X,+16	Meiotic
AB	29	4	IVM53	23,X	23,X	-
			IVM54	23,X	23,X	-
			IVM55	24,X,+3	24,X,+13	Mitotic
			IVM56	26,X,+17,+18	23,X,+10,-19	Mitotic

Table 1. CGH result of the 84 1PB-MII doublets analyzed. The oocytes code, the donor, the maturation process (F for "Fresh" or IVM), the cytogenetic result and the aneuploidy origin are included.

4.2. Resultats de l'Objectiu 2.

4.2.1. Resultats de l'optimització de la MLPA en cèl·lules aïllades.

Els fibroblast humans amb aneuploïdies conegudes, de la línies cel·lular referència GMO4435 amb cariotip 48,XY,+16,+21, adquirides a Coriel, un cop aïllats han estat sotmesos a l'amplificació adequada del genoma. Aquest material s'ha seleccionat, per al desenvolupament de la MLPA, en concret pel kit P095. Aquest kit detecta les aneuploïdies viables dels cromosomes 13, 18, 21 i X, mitjançant l'estudi de 8 sondes per a cada cromosoma analitzat en el producte amplificat de genoma cel·lular.

S'han aconseguit amplificats adequats del genoma de fibroblasts aïllats de Coriel, 48,XY,+16,+21 aïllats i de fibroblasts aïllats control 46,XX.

Els fibroblasts analitzats han presentat taxes d'amplificació del 90 % i del 97 %, en cas de fibroblasts aneuploides i euploides, respectivament. L'eficiència d'amplificació de la MLPA en cèl·lules úniques és d'entre el 78,1 i el 100 % (taula 2), i per tant, la MDA genera un amplificat que cobreix entre el 78,1 i el 100 % del genoma, segons la cèl·lula.

Eficiència Amplificació (%)	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	\bar{x}
Fibroblast Euploides	96,9	90,6	87,5	78,1	87,5	100	93,7	90,6
Fibroblast Aneuploides	100	91,7	97,2	100	-	-	-	97,2

Taula 2. Eficiència d'amplificació dels productes de MDA processats amb el *kit* de MLPA P095.

Pel que fa a la detecció de les aneuploïdies esperades, és a dir, el guany del cromosoma 21 i la pèrdua del cromosoma X, ja que es comparen cèl·lules XY amb cèl·lules XX, cal fer la comparació entre les àrees relatives de les cèl·lules problema (48,XY,+16,+21) amb les cèl·lules control (taula 3).

Per a la consideració d'euploïdia s'espera un valor de entre 0,8 i 1,2 en cromosomes guanyats en les vuit sondes del mateix cromosoma analitzat, mentre que un valor superior a 1,2 o un valor inferior a 0,8 correspondria a guanys o pèrdues, respectivament.

Analitzant els resultats obtinguts, podem dir que no són fiables, ja que apareixen moltes incoherències. Fins i tot, si en lloc de comparar la mitjana de les cèl·lules control amb cada cèl·lula problema individualment, la comparem amb la mitjana de mitjana de les cèl·lules problema i, per tant, homogeneïtzant els resultat de les cèl·lules problema per

fer-lo matemàticament més robust, també obtenim resultats no fiables i contraposats (taula 4). Per exemple, si ens fixem en els resultats per al cromosoma 21, cinc dels vuit senyals indiquen el resultat esperat (en verd), és a dir, un guany per a aquest cromosoma, mentre que de les altres tres, dues mostren pèrdua del cromosoma 21 i una és euploide (en vermell).

Cromosoma	pb	C#1	Cl#2	Cl#3	Cl#4	C#5	C#6	C#7	\bar{x}_C	T#1	T#2	T#3	T#4	\bar{x}_T
21	136	0,72	0	0	0,46	0,85	0,02	0,05	0,42	0,47	2,52	0,61	0,15	0,94
18	142	1,76	0,22	0,49	0	0,42	0,33	3,54	1,13	1,39	0,40	0,25	0,04	0,52
13	148	3,61	1,62	3,06	2,25	4,60	0,78	2,20	2,59	0,59	1,91	0,26	0,50	0,82
X	154	0,48	0,13	0,44	0,57	0	0,01	0	0,33	2,13	0,08	0,12	0,23	0,64
Y	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0,18	0,02	0,43	0,61	0,31
21	166	1,48	0,19	0,82	0,60	0,92	0,79	0,25	0,72	2,27	5,72	0,63	7,87	4,12
18	172	0,60	0,61	0,14	0,73	0,92	1,37	1,52	0,84	0,08	0,02	0,99	0,13	0,31
13	178	1,22	0,94	1,15	0,42	1,53	1,86	1,10	1,17	0,70	0,51	0,10	0,95	0,57
X	184	0,37	0,16	0,63	2,68	4,35	0,46	0,46	1,30	1,30	0,16	0,53	0,13	0,53
Y	193	0	0	0	0	0	0	0	0	0,18	0,10	0,28	0,13	0,17
21	202	2,90	1,15	0,40	0,49	1,66	1,46	0,05	1,16	0,86	1,10	1,36	0,43	0,94
18	211	0,72	0,12	0,72	0,44	0	1,00	0,07	0,51	2,50	0,08	0,63	0,32	0,88
13	220	1,36	1,10	2,24	0,66	0,42	0,79	0,75	1,04	0,33	3,38	0,09	2,49	1,57
X	229	0,67	0	0,68	0,22	0,81	0,94	0,00	0,55	0,10	0,04	0,20	0,02	0,09
Y	238	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04	0,02	1,19	0,23	0,37
21	247	0,61	0,55	0	0,35	0,58	1,15	0,15	0,05	0,63	0,17	0,27	1,76	0,71
18	256	0	0,11	0,49	0,33	0,27	0,32	1,37	0,04	0,11	0,15	0,06	0,09	0,10
13	265	2,91	1,00	1,64	0,17	0,01	1,12	0,50	1,05	0,63	0,03	2,32	1,34	1,08
X	274	0,84	0,63	0,33	0,19	1,09	3,00	0	1,19	0,51	0	0,31	0,02	0,02
Y	283	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0,86	3,61	4,23	2,20
21	292	0,62	0,13	0,17	0,46	0	0,78	1,57	0,62	0,47	0,59	0,52	0,17	0,44
18	301	0,33	0,67	0,61	0,00	1,21	0,62	1,41	0,81	0,47	0,00	0,18	0,25	0,30
13	310	0,16	1,41	0,20	0,99	0,97	0,32	0,13	0,60	0,98	0,04	0,49	1,18	0,67
X	319	0,25	2,07	0,48	0,00	0,37	0,02	1,86	0,84	0,11	1,55	8,39	0,09	2,54
21	337	0,86	2,39	0,93	0,34	0,92	0,79	0,64	0,98	3,27	0,44	2,59	2,61	2,23
18	346	1,19	1,10	0	0	1,36	1,10	0,51	1,05	2,49	0,67	0,14	2,23	1,38
13	355	1,22	4,02	1,48	0,76	0,04	0,44	1,07	1,29	1,04	0,22	1,02	0,40	0,67
X	364	0,44	2,35	0,80	1,14	0,93	4,11	0,58	1,48	0,01	0	1,50	0,66	0,72
21	382	0,24	0,50	0,68	5,36	0	1,17	0,09	1,34	0,44	0,21	1,30	0,62	0,64
18	391	1,42	0	1,76	1,03	0	1,29	2,35	1,31	1,92	0,24	2,52	0,69	1,34
13	400	0,59	1,10	2,01	2,14	0,45	0,57	0,81	1,10	4,70	0,10	0,00	0,69	1,83
X	409	0,96	0,34	1,14	0,00	1,32	0,40	2,02	1,03	0,61	0,02	0,06	0,67	0,34
21	427	1,24	3,08	3,50	0,74	0,13	2,35	1,06	1,73	1,21	8,70	0,70	1,09	2,93
18	436	0,15	0,80	0,72	0	0,11	0,14	0,06	0,33	0,38	0,59	0,67	1,89	0,88
13	445	0,26	0,21	0	0	0,26	0,39	0,27	0,28	0,10	0,17	0,39	0,92	0,40
X	454	0,53	0,29	0,33	0,94	0,32	1,13	0,34	0,55	2,69	2,18	0,33	0,19	1,35

Taula 3. Àrees relatives (àrea observada / sumatori de totes les àrees de la mostra) dels fibroblasts control (46,XX) i dels fibroblasts problema (48,XY,+16,+21), i mitjana, una vegada analitzats amb el *kit* P095 de la MLPA, que detecta els cromosomes que provoquen aneuploidies viables.

Resultats igualment incoherents s'han observat per al cromosoma X, ja que tan sols cinc dels vuit senyals mostren pèrdua cromosòmica, mentre que els altres tres senyals indiquen una trisomia per a aquest cromosoma.

També, els cromosomes que s'espera que siguin euploides, el 13 i el 18, han presentat resultats discordants. Mentre alguns senyals indiquen guany de material cromosòmic, altres n'evidencien pèrdua. Cap dels vuit senyals per als dos cromosomes no mostren un resultat compatible amb la seva euploidia.

Cromosoma	T#1 / \bar{x} C	T#2 / \bar{x} C	T#3 / \bar{x} C	T#4 / \bar{x} C	\bar{x} T / \bar{x} C
21	1,12	6,01	1,45	0,36	2,24
18	1,23	0,35	0,22	0,04	0,46
13	0,23	0,74	0,10	0,19	0,31
X	6,53	0,25	0,37	0,70	1,96
Y	0	0	0	0	0
21	3,14	7,92	0,87	10,90	5,71
18	0,09	0,02	1,17	0,15	0,36
13	0,60	0,43	0,09	0,81	0,48
X	1,00	0,12	0,41	0,10	0,41
Y	0	0	0	0	0
21	0,74	0,95	1,17	0,37	0,81
18	4,89	0,16	1,23	0,63	1,73
13	0,32	3,24	0,09	2,39	1,51
X	0,18	0,07	0,36	0,04	0,16
Y	0	0	0	0	0
21	12,45	3,36	5,34	34,79	13,98
18	2,55	3,47	1,39	2,08	2,37
13	0,60	0,03	2,21	1,28	1,03
X	0,43	0	0,26	0,02	0,02
Y	0	0	0	0	0
21	0,75	0,95	0,84	0,27	0,70
18	0,58	0	0,22	0,31	0,37
13	1,65	0,07	0,82	1,98	1,13
X	0,13	1,84	9,95	0,11	3,01
21	3,34	0,45	2,65	2,67	2,28
18	2,36	0,64	0,13	2,11	1,31
13	0,81	0,17	0,79	0,31	0,52
X	0,01	0	1,01	0,45	0,49
21	0,33	0,16	0,97	0,46	0,48
18	1,47	0,18	1,92	0,53	1,02
13	4,29	0,09	0	0,63	1,67
X	0,59	0,02	0,06	0,65	0,33
21	0,70	5,03	0,40	0,63	1,69
18	1,16	1,80	2,04	5,75	2,69
13	0,36	0,62	1,41	3,33	1,43
X	4,86	3,94	0,60	0,34	2,43

Taula 4. Resultat de l'anàlisi de MLPA en quatre fibroblasts aneuploides comparats amb set fibroblasts euploides. En verd, resultats coherents amb l'esperat i, en vermell, els no coincidents amb el cariotip de les cèl·lules de Coriel (GMO4435) d'aneuploidia del 16 i del 21 conegudes.

4.2.2. Resultats de l'optimització del CF assay.

Les proves realitzades per la optimització del *kit* CF Assay en DNA genòmic d'un portador de FQ, emprant el Protocol estàndard, amb el Protocol 50 %, i amb el Protocol 25 %, han mostrat respectivament una mitjana de pics de 251,8, 325,2 i 84,2 rfu (*relative fluorescence units*) (taula 5).

Mutació FQ	Tamany Pic (pb)	Protocol Estàndard (rfu)	Protocol 50% (rfu)	Protocol 25% (rfu)
S549N	30,97	186	260	66
R553X	36,7	208	321	215
G551D	40,9	168	222	51
V520F	43,65	293	417	106
I507del	46,85	364	490	70
delF508	50,80	212	255	70
delF508-Mut	54,19	208	306	83
3876delA	56,71	280	513	131
1717-1G to A	62,28	114	224	50
G542X	65,67	263	359	80
R560T	69,44	194	288	66
3120+1G to A	74,07	202	230	61
A455E	31,59	570	316	118
R117H	36,16	375	481	110
394delTT	39,76	464	561	143
2183AA to G	39,76	291	113	50
2789+5G to A	49,27	312	240	67
1898+1G to T	53,23	141	316	66
621+1G to T	57,86	286	426	105
711+1G to T	62,84	202	154	50
G85E	67,63	220	155	50
R347P	35,19	258	372	89
I148T	41,5	233	342	77
W1282X	46,8	286	511	113
R334W	50,73	236	369	82
1078delT	55,97	227	353	79
3849+10kb C to T	59,17	176	271	59
R1162X	65,36	223	304	67
N1303K	69,0	132	163	50
3659delC	72,83	242	345	83
3905insT	78,23	241	403	103
Mitjana	-	251.8	325.2	84,2

Taula 5. Recull de les rfu observades en els diferents protocols d'optimització del *kit* utilitzant DNA genòmic d'un portador de FQ.

Tot i reduir a una quarta part el volum del *kit*, s'han obtingut pics analitzables entre 50 i 215 rfu per a cadascuna de les 30 mutacions, i també es detecta la mutació dF508, per a la qual aquest DNA és heterozigot.

Sorprenentment, el protocol que genera pics més intensos, amb més rfu amb resultats més robustos, utilitzant la meitat del volum suggerit comercialment.

Posteriorment, s'ha adaptat l'aplicació a cèl·lules aïllades amplificades amb MDA. Per fer aquestes proves es van utilitzar blastòmers portadors de la mutació 3849+10kb C to

T de la fibrosi quística, en els quals es van realitzar les mateixes proves anteriors, és a dir, amb els tres protocols del *kit*, per comprovar si l'economització de reactius també era viable si s'utilitzaven blastòmers amplificats amb MDA com a DNA diana.

Mentre que en el protocol 25 % no es va observar cap pic, els resultat van ser de mitjana 211 rfu en el protocol estàndard i de 140,8 rfu en el protocol 50 % (taula 6). En tots dos casos es va detectar l'al·lel mutant del qual era portador el blastòmer estudiat.

Aquest resultats demostren que és possible aplicar el *kit* de CF assay en cèl·lula única amplificada amb MDA, la qual cosa és un dels nostres objectius.

Pel que fa a l'economització del *kit*, s'observa que el protocol que obté millors resultats és l'estàndard amb una alçada mitjana de pic de 211 rfu, molt semblant a la que s'obté amb DNA genòmic. Per tant, tot i aconseguir una bona amplificació del *kit* usant el producte de MDA d'un sol blastòmer, no s'aconsegueix economitzar el *kit*.

Mutació FQ	Mida Pic (pb)	Protocol Estàndard (rfu)	Protocol 50% (rfu)	Protocol 25% (rfu)
S549N	30,97	204	175	0
R553X	36,7	206	212	0
G551D	40,9	181	127	0
V520F	43,65	101	50	0
I507del	46,85	100	50	0
delF508I	50,80	114	53	0
3876delA	54,19	420	327	0
1717-1G to A	56,71	166	133	0
G542X	62,28	280	199	0
R560T	65,67	271	168	0
3120+1G to A	69,44	336	283	0
A455E	31,59	181	100	0
R117H	36,16	212	126	0
394delTT	39,76	587	366	0
2183AA to G	39,76	343	153	0
2789+5G to A	49,27	425	202	0
1898+1G to T	53,23	170	129	0
621+1G to T	57,86	153	103	0
711+1G to T	62,84	95	51	0
G85E	67,63	116	65	0
R347P	35,19	115	89	0
I148T	41,5	185	102	0
W1282X	46,8	217	164	0
R334W	50,73	140	77	0
1078delT	55,97	184	90	0
3849+10kb C to T	59,17	110	66	0
3849+10kb C to T-MUT	62,82	133	69	0
R1162X	65,36	66	50	0
N1303K	69	474	392	0
3659delC	72,83	124	75	0
3905insT	78,23	133	118	0
Mitjana	-	211	140.8	0

Taula 6. Resultat del tres protocols de CF assay testats amb productes de MDA d'un sol blastòmer.

Amb la intenció de millor la concentració de producte de MDA que s'obtenia d'un blastòmer, es va reamplificar el producte de MDA amb una segona reacció, o ronda, de MDA, per així, augmentar la seva concentració original.

Metodològicament, es realitza el protocol de MDA segons descriu el fabricant, és a dir, afegir 1µL de DNA (en aquest cas, de producte de MDA d'un blastòmer), 9 µL de *Sample Buffer* (GE Healthcare), i després es segueix el protocol descrit anteriorment a l'apartat de Material i Mètodes (3.2.1.). Un cop realitzada la segona reacció de MDA, o MDA de segona ronda (MDA2R), s'aplica el kit de CF assay tal i com hem fet anteriorment, és a dir, amb les tres variacions possibles.

Els resultats obtinguts mostren una mitjana d'alçada dels pics de 644 rfu en el protocol estàndard, de 509.5 rfu en el protocol 50% i 886.2 rfu en el protocol 25% (taula 7).

Apart, es detecta la mutació del blastòmer, en concret l'al·lel 3849+10kb C to T-mutant.

Mutació FQ	Tamany Pic (pb)	Protocol Estàndard (rfu)	Protocol 50% (rfu)	Protocol 25% (rfu)
S549N	30,97	667	613	837
R553X	36,7	691	531	848
G551D	40,9	617	496	821
V520F	43,65	467	391	609
I507del	46,85	381	299	474
delF508I	50,80	425	343	559
3876delA	54,19	789	649	945
1717-1G to A	56,1	523	435	710
G542X	62,28	912	731	1120
R560T	65,67	808	621	972
3120+1G to A	69,44	673	568	916
A455E	31,9	1381	1046	1.702
R117H	36,16	860	692	1.226
394delTT	39,76	1215	889	1.559
2183AA to G	39,76	1102	836	1.407
2789+5G to A	49,27	982	779	1.413
1898+1G to T	53,23	724	573	1.129
621+1G to T	57,86	768	501	932
711+1G to T	62,84	588	445	836
G85E	67,63	810	598	1086
R347P	35,19	504	420	828
I148T	41,5	444	365	727
W1282X	46,8	452	380	761
R334W	50,73	391	317	689
1078delT	55,97	522	412	762
3849+10kb C to T	59,17	303	233	459
3849+10kb C to T-MUT	62,82	217	164	308
R1162X	65,36	332	282	590
N1303K	69	452	374	643
3659delC	72,3	530	419	824
3905insT	78,23	433	393	780
Mitjana	-	644	509,5	886,2

Taula 7. Resultat obtingut del *kit* de CF assay utilitzant els tres protocols d'economització i productes de MDA de segona ronda de blastòmer

4.3. Resultats de l'Objectiu 3

4.3.1. Article nº2

Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: Case Report

Albert Obradors¹, Esther Fernández², Maria Oliver-Bonet¹, Mariona Rius¹, Alfonso de la Fuente², Dagan Wells³, Jordi Benet¹ and Joaquina Navarro^{1,4}

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain;

²Laboratori de FIV, Fundación Jiménez Díaz, Plaza Reyes Católicos 2, Madrid, Spain; ³Nuffield Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Oxford, Oxford, UK

⁴Correspondence address. Tel: +34-93-581-1773; Fax: +34-93-581-1025; E-mail: joaquina.navarro@uab.es

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for monogenic diseases is widely applied, allowing the transfer to the uterus of healthy embryos. PGD is also employed for the detection of chromosome abnormalities for couples at high risk of producing aneuploid embryos, such as advanced maternal (>35 years). A significant number of patients requesting PGD for monogenic diseases are also indicated for chromosome testing. We optimized and clinically applied a PGD protocol permitting both cytogenetic and molecular genetic analysis. A couple, carriers of two cystic fibrosis (CF) mutations (c.3849 + 10 KbC > T and c.3408C > A) with a maternal age of 38 years and two previously failed IVF–PGD cycles, was enrolled in the study. After ovarian stimulation, six oocytes were obtained. To detect abnormalities for all 23 chromosomes of the oocyte, the first polar body (1PB) was biopsied from five of the oocytes and analyzed using comparative genomic hybridization (CGH). CGH analysis showed that 1PB 1 and 1PB 4 were aneuploid (22X,–9,–13,+19 and 22X,–6, respectively), while 1PB 2, 1PB 3 and 1PB 6 were euploid. Blastomere biopsy was only applicable on embryos formed from Oocyte 3 and Oocyte 6. After whole-genome amplification with multiple displacement amplification, a multiplex PCR, amplifying informative short tandem repeats (D7S1799; D7S1817) and DNA fragments encompassing the mutation sites, was performed. MiniSequencing was applied to directly detect each mutation. Genetic diagnosis showed that Embryo 6 was affected by CF and Embryo 3 carried only the c.3849 + 10 KbC > T mutation. Embryo 3 was transferred achieving pregnancy and a healthy boy was born. This strategy may lead to increased pregnancy rates by allowing preferential transfer of euploid embryos.

Keywords: PGD; cystic fibrosis; aneuploidy; PCR; comparative genomic hybridization

Introduction

Preimplantation genetic screening (PGS) to detect chromosomal abnormalities has been applied to the patients of advanced maternal age (AMA), with recurrent spontaneous abortions, recurrent IVF failure or severe male factor, in order to identify aneuploid embryos. A negative selection against chromosomal abnormalities during the first stages of embryonic development is present (Boue *et al.*, 1985) and the consequent embryonic wastage is probably one of the main factors contributing to the low fertility rate in humans (Bahce *et al.*, 1999; Sandalinas *et al.*, 2001). It has been suggested that if embryos found to be euploid are prioritized for transfer during IVF cycles, pregnancy rates should be increased and spontaneous abortion rates decreased (Gianaroli *et al.*, 2002; Munne *et al.*, 2006; Farfalli *et al.*, 2007).

In most cases, PGS involves cytogenetic analysis of single blastomeres biopsied 3 days after fertilization or polar bodies (PBs) biopsied prior to the first mitotic division. Generally, chromosomes are assessed using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). However, according to the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) preimplantation genetic diagnosis (PGD) Consortium data collection I–VI (Sermon *et al.*, 2007), only in 15% (1013/6737) of the transferred embryos selected by PGS implant, as indicated by a positive HCG, and just 13.6% (918/6737) result in a pregnancy with detection of a fetal heartbeat. Different groups have found no difference or even lower implantation rate when comparing patients treated with PGS with control IVF patients (Staessen *et al.*, 2004; Mastenbroek *et al.*, 2007). In our opinion, the main limitation of PGS using FISH is the limited number of

chromosomes that can be analyzed (9–13 probes in two rounds of FISH) (Abdelhadi *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003), which means that 43–60% of chromosomes are not analyzed. In order to achieve a significant improvement in implantation rates per embryo transfer, full karyotype analysis would be recommended (Wells and Delhanty, 2000).

Comparative genomic hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic technique that allows the analysis of the full set of chromosomes by co-hybridization of a euploid reference DNA fluorescently labeled (in green) and a test DNA labeled with another fluorochrome (in red) to euploid metaphase spreads (Kallioniemi *et al.*, 1992). CGH has been optimized to be used on single cells (Voullaire *et al.*, 1999, 2000; Wells *et al.*, 1999; Wells and Delhanty, 2000; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a,b). Not only does CGH permit screening of the entire chromosome complement, but it also eliminates the need to spread the biopsied cell on a microscope slide, since single cells are placed intact into PCR tubes. Fixation and spreading of single cells is technically challenging, sometimes resulting in artefactual chromosome losses (Fragouli *et al.*, 2006a,b).

So far, two approaches for PGS employing CGH analysis have been developed. The first involves the application of CGH to a single blastomere. As there is not enough time to obtain the CGH result in the same IVF cycle (CGH requires 4 days to obtain results), embryo freezing is necessary (Voullaire *et al.*, 2002). Unfortunately, this strategy is problematic due to the fact that about 33–50% of the embryos do not survive the freezing–thawing process depending on the used protocol (Hill, 2003; Jericho *et al.*, 2003; Munne and Wells, 2003; Verlinsky and Kuliev, 2003; Wilton *et al.*, 2003). The second approach is to apply CGH to the first polar body (1PB). Since the 1PB is biopsied immediately after fertilization by ICSI on Day 0 (Durban *et al.*, 2001), CGH results can be obtained on Day +3 or +4 allowing for the transfer of embryos derived from cytogenetically normal oocytes to the maternal uterus, on Day +4 or +5, without the need for cryopreservation (Wells *et al.*, 2002).

CGH analysis of the 1PB permits indirect cytogenetic characterization of the corresponding oocyte. This, in turn, allows for the detection of aneuploidies resulting from abnormal meiosis I segregation, which are frequently observed in first-trimester spontaneous abortions (Nicolaidis and Petersen, 1998; Hassold and Hunt, 2001). CGH-1PB has been successfully applied for PGS (Wells *et al.*, 2002). In a research context, many 1PBs and metaphase II oocytes have been analyzed by CGH, revealing an aneuploidy frequency ranging from 22 to 53% (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a,b; Fragouli *et al.*, 2006a,b).

Another option in order to perform a full karyotype analysis is the application of CGH-array technology to either blastomeres or 1PBs (Hu *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Le Caignec *et al.*, 2006). This methodology has huge potential having all the benefits of conventional CGH, but being much quicker to perform and less labor intensive. However, a few studies have assessed the reliability of this approach using single cells and there are no published reports of clinical application.

PGD for monogenic diseases has been applied extensively on over 1200 clinical cases, as has been stated in the ESHRE PGD Consortium data collection I–VI (Sermon *et al.*, 2007). In order to select embryos free of the causative mutation, many PCR-based PGD protocols have been described, employing a wide range of methods for mutation detection (e.g. restriction digestion, variation of electrophoretic mobility by single-stranded conformation polymorphism or denaturing gradient gel electrophoresis and ‘MiniSequencing’) (Vrettou *et al.*, 1999; Piyamongkol *et al.*, 2001a; Abou-Sleiman *et al.*, 2002b; Bermudez *et al.*, 2003).

‘MiniSequencing’ is a versatile method allowing identification of many specific mutations (Fiorentino *et al.*, 2003). Basically, a specific primer is designed to anneal directly adjacent to the mutation site and a single fluorescent dideoxynucleotide (ddNTPs) complementary to the wild-type/mutation nucleotide in the template is added (i.e. primer extension reaction is performed). This process, which is repeated in successive rounds of extension and termination by PCR, generates fluorescent-labeled fragments that are analyzed by capillary electrophoresis. Each of the four possible ddNTPs is labeled with a different color, allowing the sequence of the template to be deduced. ‘MiniSequencing’ is a highly sensitive technique, capable of detecting multiple point mutations at once.

Furthermore, indirect diagnosis using linked short tandem repeats (STRs) to detect the haplotype associated with the mutated gene decrease the risk of misdiagnosis in PGD (Piyamongkol *et al.*, 2001b; Spits *et al.*, 2005).

Most PGD strategies use direct amplification and analysis of DNA from blastomeres. However, an alternative is to employ a more generalized amplification prior to amplification of individual loci (Ao *et al.*, 1998). Whole-genome amplification of the cell with multiple displacement amplification (MDA) prior to PCR amplification has been previously used (Hellani *et al.*, 2004, 2005; Lledo *et al.*, 2006), retrieving enough DNA from one single cell to amplify up to 64 loci (Renwick *et al.*, 2007).

Even in women younger than 35 years involved in PGD for monogenic disease, the implantation rate is, according to the ESHRE PGD Consortium data collection I–VI, only 15.9% (405/2543 HCG positive) and only 9% of the transferred embryos (230/2543) produced a pregnancy, as determined by detection of a fetal heartbeat (Sermon *et al.*, 2007). Since cytogenetic abnormalities could contribute to the low implantation rate, a PGD strategy accounting for both forms of genetic risk (monogenic disease and aneuploidy in embryos) would be beneficial. The aim of this work was to optimize a PGD procedure combining aneuploidy screening of the retrieved oocytes, achieved using CGH of 1PB, and monogenic disease detection using both ‘MiniSequencing’ and linkage analysis of biopsied blastomeres.

Materials and Methods

In a carrier couple of cystic fibrosis (CF[MIM 219700]) with an affected child, causative mutations in the CF transmembrane regulator (CFTR) gene were c.3849 + 10 Kbc > T and c.3408C > A, for the female and the male, respectively. Moreover, the female was

38 years old and had undergone two previous IVF–PGD cycles without achieving pregnancy, although an embryo transfer was only performed in one of the IVF cycles. Hence, the family had two factors risks; a risk of CF and an aneuploidy risk due to AMA. For this reason, a double factor PGD (DF-PGD) was recommended.

Gene analysis approach

Mutation detection in genomic DNA

Outer and inner pairs of primers (forward and reverse) for nested-PCR amplification of sequences encompassing each mutation were designed (Primer3, <http://frodo.wi.mit.edu>) and acquired. Two STRs close to the CFTR gene, D7S1799 and D7S1817, were chosen according to the National Center for Biotechnology Information database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606). Forward primers for these STRs were labeled with 6FAM and PET dyes, respectively (Table I). All primers were obtained from Roche Applied Science (Basel, Switzerland).

A multiplex PCR containing outer primers for each mutation site and labeled primers for the two STRs was performed. The reaction mix contained the primer volumes indicated in Table I, 0.5 μ l of genomic DNA, 2.5 μ l of a 2 mM dNTPs Mix, 1 \times HotMaster Buffer and 1 U HotMaster *Taq* Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Germany) in a final volume of 25 μ l. A first round of DNA amplification was performed in a thermocycler (TGradient, Biometra, Goettingen, Germany) using the following PCR protocol: 2 min at 94°C, 37 cycles of 20 s at 94°C, 45 s at 55°C and 30 s at 65°C, and finally 5 min at 65°C. The alleles of both STRs were detected by analyzing 1 μ l of the product in an ABIPrism 370 sequencer (AppliedBiosystems, CA, USA).

A second-round multiplex was performed with 0.5 μ l of the product of the first-round multiplex mix as a template DNA. The reaction mix contained the inner primers for both mutations in volumes indicated in Table I and 2.5 μ l of a 2 mM dNTPs Mix, 1 \times HotMaster Buffer and 1 U HotMaster *Taq* Polymerase (Eppendorf) in a final volume of 25 μ l.

The second round of DNA amplification was performed in a thermocycler (TGradient, Biometra) using the following PCR protocol: 2 min at 94°C, 30 cycles of 20 s at 94°C, 45 s at 57°C and 30 s at 65°C, and then 5 min at 65°C. The amplification of the inner fragments of both mutations was verified by agarose gel electrophoresis.

Direct mutation detection was performed by ‘MiniSequencing’, following the manufacturer’s instructions (Snapshot Multiplex Kit, AppliedBiosystems). Reverse inner primers of both mutations were designed to be used as ‘MiniSequencing’ primers. Because these

primers bind to the antisense DNA strand the nucleotide change detected for the c.3849 + 10 Kbc > T mutation will be G to A and for the C.3408C > A mutation will be G to T instead of the alteration mentioned above. The presence or absence of both mutations was detected by analyzing 1 μ l of ‘MiniSequencing’ product in an ABIPrism 3730 sequencer (Applied Biosystems, CA, USA).

Gene analyses in single-cell DNA

Prior to PGD, a total of 30 single buccal cells were used in the following protocol. Whole-genome amplification was performed on each single cell using the MDA technique using Genomiphi v2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Some slight modifications have been introduced from the recommended manufacturer protocol in order to perform the single cell lysis. Briefly, 2.5 μ l Alkaline Buffer (ALB; 200 mM KOH and 50 mM dithiothreitol) and 5 μ l of sample buffer were added to each 0.2 ml PCR tube containing a single buccal cell. The samples were kept 3 min at 95°C using a Thermocycler (TGradient, Biometra) and immediately put on ice. To neutralize the ALB, 0.8 μ l of Tricine (20 mM, PH 4.95) was added (Spits *et al.*, 2006). Then, 8.2 μ l of Reaction Buffer and 1 μ l of enzyme mix provided in the kit were added. The MDA reaction took place for 90 min at 30°C and 10 min at 70°C. Four microliters of the MDA-amplified cell product was used as a genomic DNA template and the genetic analysis was performed as has been described above.

PGD clinical case

IVF procedure and biopsy of 1PB and blastomere

The female of the couple underwent a routine superovulation procedure. The cells of the cumulus and corona radiata were completely removed by a combination of an enzymatic and mechanical procedure. The 1PB biopsy was performed on Day 0, as previously described (Durban *et al.*, 2001). Briefly, the 1PB was removed by the partial zone dissection (PZD) procedure using a thin and sharp glass micropipette (PZD Micropipette, Humagen, VA, USA) to create a hole in the zone pellucida by mechanical force (Malter, 1989). The 1PB biopsy was performed immediately after the corresponding oocyte was inseminated by ICSI. The 1PB was aspirated using a 13–15 μ m internal diameter (ID) micropipette (MPB-BP-30 Micropipette, Humagen), washed four times with different, sterile phosphate-buffered saline (PBS)/0.1% polyvinyl alcohol (PVA) droplets and put into a labeled 0.2 ml PCR tube and kept at –20°C. The 1PB biopsied on Day 0 was shipped from the IVF laboratory in Madrid to our

Table I. Primers sequences and their working volume used in the pre-clinical validation of the protocol and in the PGD.

Primer	Nucleotide sequence	Volume (Conc.: 50 μ M) (μ l)
3849 + 10-F-f	TGGATCTAAATTCAGTTGACTTG	0.3
3849 + 10-F-r	TGTTGAATTTGGTGCTAGCTG	0.3
3849 + 10-S-f	TGGAGACCACAAGGTAATGAA	0.6
3849 + 10-S-r	TTTCCTTTCAGGGTGTCTTACTC	0.6
3408C > A-F-f	GGCAGCCTTACTTTGAAACTC	0.3
3408C > A-F-r	GCAATGAAGAAGATGACAAAAATC	0.3
3408C > A-S-f	TGTTCCACAAAGCTCTGAATTT	0.3
3408C > A-S-r	ACCAGCGCAGTGTGACAG	0.3
D7S1799-f	6FAM-ATGGTATTAGGAGATGGGGC	1.2
D7S1799-r	TTGCATAAGCCAATTTCCAT	1.2
D7S1817-f	PET-CAAATTAATGGCAAAAACTGC	1.2
D7S1817-r	CCCCCATTGAGGTTATTAC	1.2

f, forward; r, reverse.

center at the Autonomous University of Barcelona in Bellaterra on dry ice 20 h after the follicular puncture.

On Day +3 after ICSI, one blastomere was biopsied from the 6–8 cell stage embryos using the same hole created previously in the 1PB removal and using a 35 μm ID micropipette (MBB-BP-M-30 Micropipette, Humagen). Each blastomere was washed in PBS/0.1% PVA solution and was put into a labeled 0.2 ml PCR and kept at -20°C .

Genetic analysis of the blastomere

Direct and indirect mutation analysis of each blastomere was performed in a product of MDA as described above.

CGH analysis in 1PB

To each 0.2 ml PCR-labeled tube containing 1PB, 1 μl of sodium dodecyl sulfate (17 μM) and 2 μl of proteinase K (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added. The lysis was performed by incubating at 37°C for 1 h followed by 10 min at 95°C to inactivate proteinase K, using a thermocycler (TGradient, Biometra). After that, whole-genome amplification by degenerate oligonucleotide-primed PCR was applied to the samples as previously described (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b) in order to increase the amount of DNA. For use as test DNA, amplified 1PBs were fluorescently labeled with Spectrum Red-dUTP (Vysis, Downers Grove, USA) by Nick Translation (Vysis) following the manufacturer's instructions. As reference DNA, three single, buccal epithelium cells from a euploid woman (46,XX) were isolated and treated like the 1PBs, but labeled with Spectrum Green-dUTP (Vysis). Precipitation of DNA and hybridization over euploid male metaphase spreads was performed as previously described (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a,b), but hybridization in a moist chamber at 37°C was for 44 h instead of 72 h.

At least 10 metaphases per 1PB-CGH were captured with an epifluorescence microscope by SmartCapture software (Digital Scientific, Cambridge, UK) and karyotyped by Vysis Quips CGH software (Vysis).

When the fluorescence ratio (test/reference) described by the software is <0.8 , a chromosome loss is present in the DNA test, whereas when the ratio is >1.2 , a chromosome gain is present (Wells *et al.*, 1999).

Results

Results from genomic DNA

The STRs are shown in Table II. The STR D7S1799 is informative for the maternal mutation (c.3849 + 10 KbC > T), while D7S1817 is informative for the paternal mutation (c.3408C > A).

Mutations c.3849 + 10 KbC > T and c.3408C > A were directly detected by 'MiniSequencing' as expected. In the DNA of the mother, a blue peak corresponding to the wild-type (Guanine) and a green peak corresponding to the mutated nucleotide (Adenine) were observed. In the DNA of the father, a blue peak to the wild-type allele (Guanine) and a red peak corresponding to the mutated nucleotide (Thymine) were obtained. In the DNA of the CF-affected son, both of the peaks, wild-type and mutated, corresponding to both parental mutations, were observed (Fig. 1).

STR and mutation results in single-cell MDA product

DNA from 30 isolated single cells from the affected member of the family was successfully amplified with MDA (30/30, 100%) and treated as described. The expected results for the corresponding informative STR were observed in 26/30

single cells for D7S1799, and in 22/30 single cells for D7S1817, indicating an allele drop-out (ADO) rate of 13 and 26%, respectively. Moreover, expected results for the corresponding mutation in the 'MiniSequencing' electropherograms were obtained in 19/30 cells for the c.3849 + 10 KbC > T mutation and in 22/30 cells for the c.3408C > A mutation of the analyzed cells, indicating an ADO rate of 36 and 26%, respectively.

In-vitro fertilization

In all cumulus–oocyte complexes retrieved, the corresponding 1PB was obtained following ICSI on Day 0, with the exception of Oocyte 5, which had no 1PB. On Day +1 after follicular puncture, fertilization was confirmed by identification of two pronuclei in zygotes 1, 3 and 6. On Day +3, only Embryos 3 and 6 achieved 6- to 8-cell stage and showed a good embryo quality. Therefore, only one blastomere from Embryos 3 and 6 was biopsied and subjected to testing.

Cytogenetic analysis in 1PB

All 1PBs biopsied and analyzed by CGH gave good results (Fig. 2). Two of the five 1PBs were aneuploid for one or more chromosomes. The 1PB 1 had a CGH profile corresponding to losses of chromosomes 9 and 13 and a gain of chromosome 19. An embryo derived from this oocyte would be at risk of trisomy for chromosomes 9 and 13 and monosomy for 19. 1PB 4 showed a loss of chromosome 6, which would lead to a chromosome 6 gained in the oocyte and, hence, a risk of trisomy 6. 1PB 2, 1PB 3 and 1PB 6 were totally euploid for the 23 chromosomes (Table II).

STR and mutation analysis in blastomeres

Concordant results were obtained by STR analysis and the direct mutation detection analysis in the product of MDA from the blastomere of Embryos 3 and 6. Although Embryo 3 was transferable, being the carrier of the c.3408C > A paternal mutation, Embryo 6 was affected by CF (Fig. 1 and Table II).

Final PGD outcome

Embryo 3 was transferred on Day (+4) achieving a pregnancy verified with a positive HGC value and fetal heartbeat. Prenatal diagnosis was performed by an external laboratory with quantitative fluorescent PCR and showed a normal copy-number of the analyzed chromosomes. A healthy boy, a carrier of the paternal mutation, has been delivered.

Re-analysis of rejected unfertilized oocytes or arrested embryos

Except for Oocyte 5, which did not display 1PB, the rest of the rejected materials (unfertilized Oocytes 2 and 4 and arrested Embryo 1) were processed for genetic analysis of the parental mutations, as previously described. Oocyte 2 was confirmed to be free of the maternal mutation. The arrested Embryo 1 was found to be a carrier of the paternal mutation and the maternal mutation was present in unfertilized Oocyte 4 (Table II).

Table II. Genomic DNA Results of the analysis of haplotypes of the family members for the two selected short tandem repeats (STRs) and mutation confirmation by MiniSequencing. The results of the double factor PGD (DF-PGD) for the analyzed cells are also included.

	IPB-CGH result	STR		MiniSequencing	
		D7S1799	D7S1817	c.3849 + 10 KbC > T	c.3408C > A
Genomic DNA					
Maternal DNA c.3849 + 10 KbC > T	—	173 /177	132/132	G-Blue/ A-Green	G-Blue/G-Blue
Paternal DNA c.3408C > A	—	181/181	123 /136	G-Blue/G-Blue	G-Blue/ T-Red
Son DNA c.3849 + 10 KbC > T and c.3408C > A	—	173 /181	123 /132	G-Blue/ A-Green	G-Blue/ T-Red
DF-PGD					
Embryo 1	-9, -13, +19	181/181	136/ 123	G-Blue/G-Blue	G-Blue/ T-Red
Oocyte 2 (Unfertilized)	Euploid	181/177	136/ 123	G-Blue/G-Blue	G-blue/G-Blue
Embryo 3	Euploid	181/177	123 /132	G-Blue/G-Blue	G-Blue/ T-Red
Oocyte 4 (Unfertilized)	-6	173 /181	123 /132	G-Blue/ A-Green	G-Blue/ T-Red
Oocyte 5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Embryo 6	Euploid	173 /181	123 /132	G-Blue/ A-Green	G-Blue/ T-Red

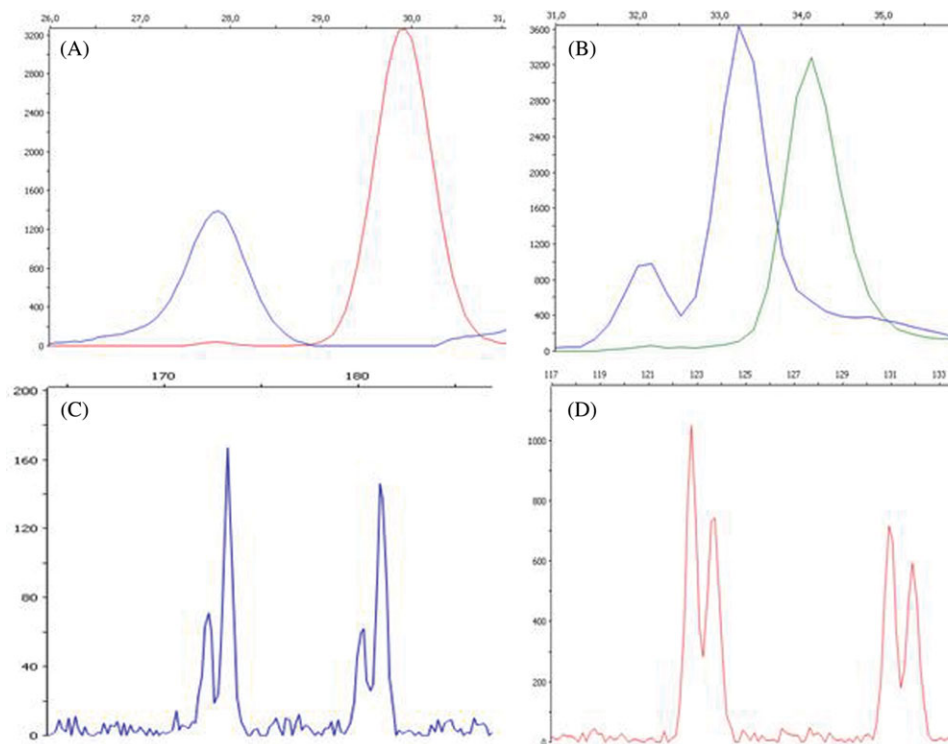
In the STR columns, the haplotypes obtained for D7S1799 and D7S1817 were used for indirect detection of the mutant copy of the CF transmembrane regulator (CFTR) gene. Allele 173 of the D7S1799, in bold, is linked to the maternal mutation (c.3849 + 10 KbC > T), and allele 123 of D7S1817, in bold, is linked to the paternal mutation (c.3408C > A). The 'MiniSequencing' columns show results of the analysis of the wild-type and/or mutated nucleotide performed on genomic DNA of the three members of the family: for mutation c.3408C > A, a Guanine (blue peak) is expected for the wild-type copy of the gene and a Thymine (red peak) for the mutant copy and for the c.3849 + 10 KbC > T mutation, a Guanine (blue peak) is expected for the wild-type copy and an Adenine (green peak) for the mutant. Double factor PGD (DF-PGD) results, including the analysis of the rejected embryo (Embryo 1) and unfertilized oocytes (Oocytes 2 and 4) are also included. The first polar body-comparative genomic hybridization (IPB-CGH) column shows the CGH profile result for all IPB, except for Oocyte 5 which had no IPB. Oocyte 5 was not available for reanalysis. Only Embryos 3 and 6 developed to 6–8 cell stage embryos on Day +3, both presented euploid IPBs. Embryo 6 was affected by CF, whereas Embryo 3 carried the c.3408C > A mutation. N.A., not analyzed.

Discussion

The strategy for the direct analysis by 'MiniSequencing' of parental mutations c.3849 + 10 KbC > T and c.3408C > A performed well, allowing accurate identification of the complementary wild-type and mutated nucleotides (see results in Table II). A similar approach has been successfully applied to a variety of other monogenic gene disease PGD protocols

(Cram *et al.*, 2003; Fiorentino *et al.*, 2003; Iacobelli *et al.*, 2003).

Additionally, indirect detection of parental mutations using closely linked tetra-nucleotide STRs proved to be extremely useful for the detection of mutant or wild-type alleles, significantly improving diagnostic accuracy. The use of two independent mutation-detection approaches at the same time, direct

**Figure 1:** Electropherograms corresponding to Embryo 6.

(A) The MiniSequencing result for c.3408C > A mutation (Wt G-Blue/Mut T-Red). (B) The MiniSequencing result for c.3849 + 10 KbC > T mutation (WT: G-Blue/Mut: A-Green). (C) Result of short tandem repeat (STR) D7S1799 (alleles size: 173 and 181 bp). (D) Result for STR D7S1817 (alleles size: 123 and 132 bp).

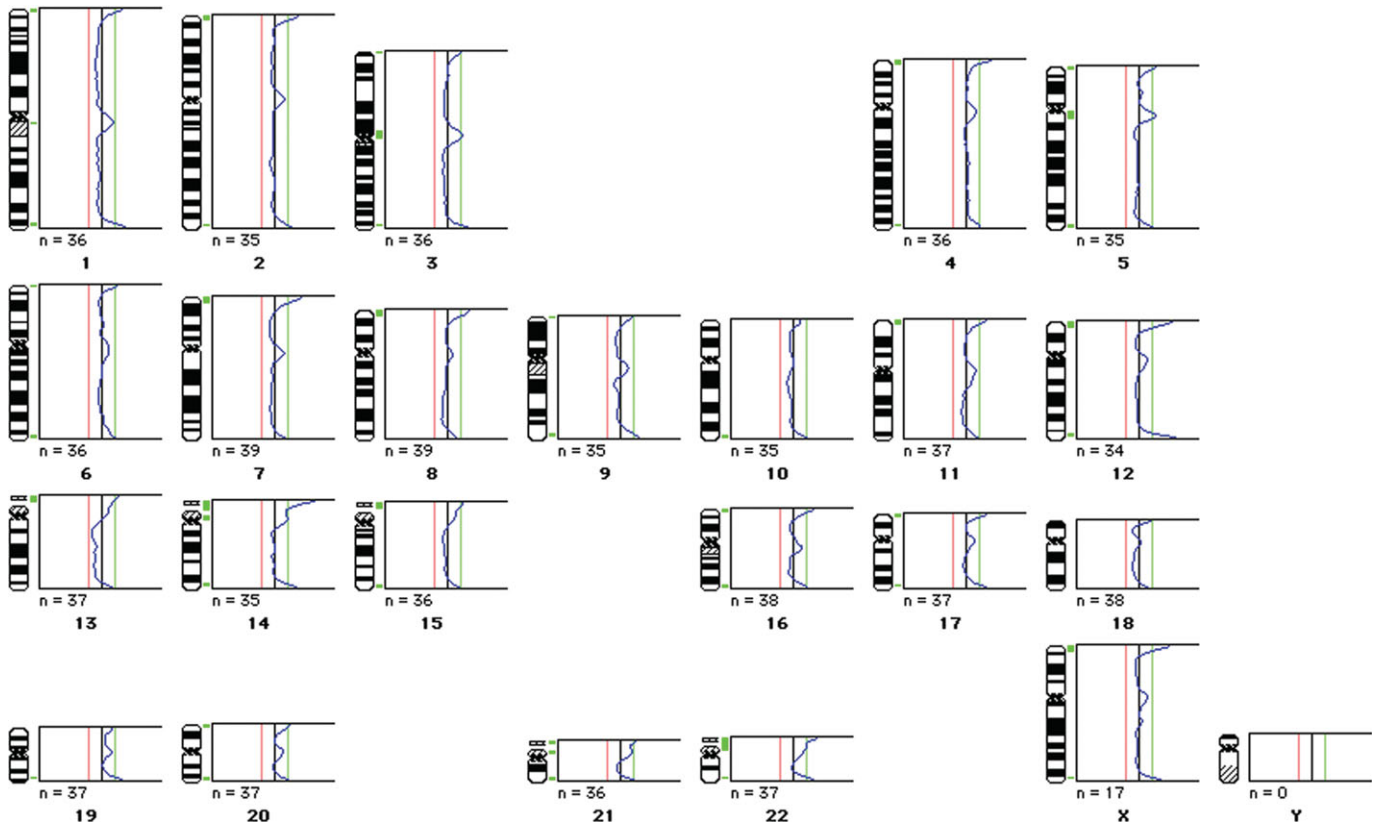


Figure 2: Comparative genomic hybridization profile of first polar body (1PB) 3 chromosome complement. A euploid profile is observed in all chromosomes. A similar profile was obtained for 1PB 2 and 1PB 6.

and indirect mutation analysis, is a very convenient and safe approach and it is widely applied by different groups currently performing PGD (Abou-Sleiman *et al.*, 2002a; De Rycke *et al.*, 2005; Kuliev *et al.*, 2006).

Whole-genome amplification of single cells using MDA was applied. MDA is a very useful procedure that produces a large amount of high-quality DNA. The PCR multiplex, used for the simultaneous amplification of the two mutation sites and two linked polymorphisms, displayed superior performance when applied to MDA products compared with direct application to single cells (Hellani *et al.*, 2004, 2005; Burret *et al.*, 2006; Lledo *et al.*, 2006; Coskun and Alsmadi, 2007). No differences in the size (bp) of the peaks were observed in the three genomic DNAs compared with those observed after MDA of a single cell when indirect or direct genetic analysis was performed (Table II).

The ADO rates observed during pre-clinical validation of the PGD test (13% for D7S1799 and 26% for D7S1817 following MDA of single buccal cells) are similar to the 28% described after analyzing 64 loci of 49 blastomeres in a previous study (Renwick *et al.*, 2007). In contrast, the ADO observed in one of the mutation sites was higher (36% of all cells for the c.3849 + 10 Kbc > T mutation). This may be explained by the fact that buccal cells are arrested in the G₀ stage and the apoptotic process can be present. Consequently, the DNA produced is likely to be of reduced quality compared with fresh proliferative cells, as was the case for single blastomeres. Despite relatively high ADO rates, the risk of misdiagnosis

of an affected embryo for a healthy embryo, due to ADO affecting the mutant allele for all four loci in the same cell, is estimated to be much lower than 0.02%. The low error rate is a consequence of assessing multiple diagnostically relevant markers (i.e. mutation sites and also linked markers). ADO is highly unlikely to simultaneously affect all diagnostic loci. In fact, the higher ADO rates observed in MDA products compared to conventional single-cell PCR is one of the main concerns of the MDA approach, a fact that could lead to a misdiagnosis on PGD. However, as demonstrated here, the ability to analyze multiple loci simultaneously permits a low misdiagnosis rate despite increased ADO. Using MDA, multiple independent PCR amplifications can be undertaken, allowing examination of multiple loci, while avoiding difficulties associated with multiplexing of PCR primers.

For the clinical PGD case, no ADO was observed for either the STR or the 'MiniSequencing' products of the blastomeres studied. Although the number of analyzed cells was small, this observation may indicate that proliferative cells are more appropriate for evaluating ADO rates than buccal cells, as stated above.

Informative results were obtained in five of the six mature oocytes that were cytogenetically analyzed during PGD by CGH, using a modified version of the protocol employed previously by our group (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b). Two of the five (40% of the analyzed oocytes) displayed abnormalities involving one or more chromosomes, the rest of the oocytes were euploid. The frequency of aneuploidy observed is in

accordance with the frequencies described in different published works using CGH from [22% (Fragouli *et al.*, 2006b) to 52% (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a,b)]. The chromosomes involved in the aneuploidies observed in the oocytes of the current study (6, 9, 13 and 19) have been previously observed in different studies using FISH or CGH analysis of oocytes and PBs (Anahory *et al.*, 2003; Cupisti *et al.*, 2003; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Pujol *et al.*, 2006).

One of the abnormal oocytes (4) would not have been identified as being aneuploid by conventional FISH analysis due to the fact that chromosome 6 is not included in the panels of FISH probes typically employed for the purposes of PGD/PGS. In order to accurately detect the copy number of all chromosomes, PGS by CGH-1PB analysis is an attractive alternative to PGS by FISH.

Considering the genetic results obtained in the direct and indirect analysis of the mutation in the two developing embryos, only Embryo 3 was found to be healthy (carrier of the paternal mutation). The other developing Embryo 6 was revealed to be affected by CF and was rejected for transfer. Re-analysis of Embryo 6 confirmed the result obtained in the initial PGD. Combining this genetic result of Embryo 3 with the CGH result for PB 3, a healthy euploid embryo was expected. After Genetic Counseling given to the family, Embryo 3 was transferred and a pregnancy was achieved. Prenatal diagnosis showed a chromosomally normal fetus and a healthy boy, carrier of the paternal CF mutation, has since been delivered.

The DF-PGD procedure applied in the present case had a satisfactory outcome. The analysis of the 1PB by CGH allowed comprehensive chromosomal screening, while avoiding the need for embryo freezing. It may also be worth considering the use of chromosome screening in PGD cycles in which the maternal age is not a risk for aneuploidy. Patients undergoing PGD of monogenic diseases are often of relatively young maternal age (33 years), yet implantation rates are only 15.6% (94/603) and 12.4% (75/603) as detected by positive HCG or positive heartbeat (Sermon *et al.*, 2007). The complete cytogenetic analysis of the oocytes may be a very good approach in order to increase the pregnancy rate, even in the case of young women, as these patients also have an appreciable aneuploidy rate in their oocytes, albeit significantly lower than older patients (Sher *et al.*, 2007).

In conclusion, in the present work a successful procedure combining comprehensive analysis of aneuploidy in 1PB with detection of two infrequent mutations in the CFTR gene (c.3408C > A and c.3846 + 10KbC > T) has been achieved for the first time.

The combination of chromosome screening using CGH analysis and single gene testing requires a highly coordinated and multidisciplinary team. In spite of the complexity of techniques needed and logistical difficulties in undertaking CGH in a fresh cycle, we believe this is a worthwhile challenge potentially increasing implantation rates for cycles of PGD for single gene disorders.

Funding

This research study was been funded by *Ministerio de Sanidad y Consumo Fondo de Investigación Sanitaria Instituto de*

Salud Carlos III (FIS-ISCIII; PI 051395) and by *Grup de Suport a la Recerca. Generalitat de Catalunya 2005SGR00 495*. Albert Obradors has a predoctoral grant of the *Generalitat de Catalunya (2005FI00 108)*.

References

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 2003;**6**:226–231.
- Abou-Sleiman PM, Apeessos A, Harper JC, Serhal P, Delhanty JD. Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis for Crouzon syndrome. *Mol Hum Reprod* 2002a;**8**:304–309.
- Abou-Sleiman PM, Apeessos A, Harper JC, Serhal P, Winston RM, Delhanty JD. First application of preimplantation genetic diagnosis to neurofibromatosis type 2 (NF2). *Prenat Diagn* 2002b;**22**:519–524.
- Anahory T, Andreo B, Regnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M, Demaille J, Pellestor F. Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:577–585.
- Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* 1998;**15**:140–144.
- Bahce M, Cohen J, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes? *J Assist Reprod Genet* 1999;**16**:176–181.
- Bermudez MG, Piyamongkol W, Tomaz S, Dudman E, Sherlock JK, Wells D. Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2003;**23**:669–677.
- Boue A, Boue J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 1985;**14**:1–57.
- Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, Bonnefont JP, Frydman R, Munnich A, Steffann J. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:647–652.
- Coskun S, Alsmadi O. Whole genome amplification from a single cell: a new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2007;**27**:297–302.
- Cram DS, Song B, Trounson AO. Preimplantation diagnosis of Lesch-Nyhan using mini-sequencing primer extension. *Reprod Biomed Online* 2003;**7**:342–345.
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD. Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 2003;**23**:663–668.
- De Rycke M, Georgiou I, Sermon K, Lissens W, Henderix P, Joris H, Platteau P, Van Steirteghem A, Liebaers I. PGD for autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**:65–71.
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernandez E, Calafell JM, Llailla JM, Sanchez-Garcia JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update* 2001;**7**:591–602.
- Farfalli VI, Magli MC, Ferraretti AP, Gianaroli L. Role of aneuploidy on embryo implantation. *Gynecol Obstet Invest* 2007;**64**:161–165.
- Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M, Gianaroli L. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:399–410.
- Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, 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, 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.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002;**4**(Suppl 3):31–36.
- Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J, Munne S. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II

- fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 2004a;**19**:2859–2868.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, Egozcue J, Munne S, Navarro J. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004b;**19**:2118–2125.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;**2**:280–291.
- Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, Ozand P. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:847–852.
- Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S. Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 2005;**10**:376–380.
- Hill DL. Aneuploidy screening of preimplantation embryos using comparative genomic hybridization versus fluorescence in situ hybridization techniques. *Fertil Steril* 2003;**80**:873–874 (Discussion 875).
- Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:283–289.
- Iacobelli M, Greco E, Rienzi L, Ubaldi F, Podini D, Nuccitelli A, Tesarik J, Baldi M, Fiorentino F. Birth of a healthy female after preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth type X. *Reprod Biomed Online* 2003;**7**:558–562.
- Jericho H, Wilton L, Gook DA, Edgar DH. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003;**18**:568–571.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;**258**:818–821.
- Kuliev A, Rechitsky S, Laziuk K, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Verlinsky Y. Pre-embryonic diagnosis for Sandhoff disease. *Reprod Biomed Online* 2006;**12**:328–333.
- Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S, Staessen C, Moreau Y, Fryns JP, Van Steirteghem A *et al.* Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**:e68.
- Lledo B, Ten J, Galan FM, Bernabeu R. Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using multiple displacement amplification. *Fertil Steril* 2006;**86**:949–955.
- Malter HECJ. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989;**51**:139–148.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM *et al.* In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;**357**:9–17.
- Munne S, Wells D. Questions concerning the suitability of comparative genomic hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2003;**80**:871–872 (Discussion 875).
- Munne S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006;**85**:326–332.
- Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998;**13**:313–319.
- Piyamongkol W, Harper JC, Delhanty JD, Wells D. Preimplantation genetic diagnostic protocols for alpha- and beta-thalassaemias using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 2001a;**21**:753–759.
- Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, Wells D. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 2001b;**21**:223–232.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J, 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.
- Pujol A, Benet J, Staessen C, Van Assche E, Campillo M, Egozcue J, Navarro J. The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduction* 2006;**131**:1025–1035.
- Renwick PJ, Lewis CM, Abbs S, Ogilvie CM. Determination of the genetic status of cleavage-stage human embryos by microsatellite marker analysis following multiple displacement amplification. *Prenat Diagn* 2007;**27**:206–215.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munne S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001;**16**:1954–1958.
- Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K, Viville S *et al.* ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 2007;**22**:323–336.
- Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, Baltaci V, Kotze D, 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.
- Spits C, De Rycke M, Van Ranst N, Joris H, Verpoest W, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I, Sermon K. Preimplantation genetic diagnosis for neurofibromatosis type 1. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**:381–387.
- Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, Sermon K. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum Mutat* 2006;**27**:496–503.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. 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* 2004;**19**:2849–2858.
- Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for aneuploidies using fluorescence in situ hybridization or comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2003;**80**:869–870 (Discussion 875).
- Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999;**19**:846–851.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;**106**:210–217.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:1035–1041.
- Vrettou C, Palmer G, Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadis T, Mastrominas M, Traeger-Synodinos J. A widely applicable strategy for single cell genotyping of beta-thalassaemia mutations using DGGE analysis: application to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1999;**19**:1209–1216.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**:1055–1062.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999;**27**:1214–1218.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;**78**:543–549.
- Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Chu L, Weier U, Cohen J, Munne S. Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. In: Papp Z, Rodeck C (eds). *Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis (Medimond)*. Bologna, Italy: Medimond, 2004, 9–17.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003;**80**:860–868.

Submitted on January 18, 2008; resubmitted on March 31, 2008; accepted on April 17, 2008

4.3.2. Article n°3

Outcome of twin babies free of Von Hippel–Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening

Albert Obradors, M.Sc.,^a Esther Fernández, Ph.D.,^b Mariona Rius, M.Sc.,^a Maria Oliver-Bonet, Ph.D.,^a Maria Martínez-Fresno, M.Sc.,^b Jordi Benet, Ph.D.,^a and Joaquina Navarro, Ph.D.^a

^aUnitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra; and

^bLaboratorio de Reproducción Asistida, Hospital Quirón, Madrid, Spain

Objective: To increase the embryo implantation rate, a double-factor preimplantation genetic diagnosis (DF-PGD) was performed, selecting for transfer potentially euploid evolved embryos free of the mutation responsible for Von Hippel–Lindau syndrome (VHL).

Design: Case report.

Settings: Medical university center and a private IVF center.

Patient(s): A patient carrier of the R161Q mutation on the VHL gene.

Intervention(s): After first polar body (1PB) biopsy, it was analyzed using comparative genomic hybridization (1PB-CGH). On day +3, mutation detection using minisequencing and short tandem repeat analysis was performed in multiple displacement amplification products of a single blastomere per embryo.

Main Outcome Measure(s): Transferring embryos free of the disease and originating from euploid oocytes.

Result(s): Nine of the twelve oocytes obtained were successfully analyzed using 1PB-CGH. One of them was aneuploid (1PB #1: 29XX,+2,+10,+12,+17,+19), and the rest were euploid. All of the oocytes were fertilized and became evolved embryos. Six of the embryos were VHL unaffected and had good quality. Five (83%) of them were potentially euploid. According to cytogenetic results, two of the evolved and healthy embryos were transferred, achieving the birth of healthy twin babies.

Conclusion(s): The DF-PGD can be a useful tool to increase implantation of transferred embryos in PGD for monogenic diseases. (Fertil Steril® 2009;91:933.e1–e7. ©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: PGD, CGH, VHL, aneuploidy, genetic diagnosis

Von Hippel–Lindau disease (VHL; OMIM #193300) is an autosomal dominant late-onset monogenic disease that leads to the development of several benign or malignant tumors, such as cerebellar, spinal cord, brainstem, nerve root, and renal carcinomas, as well as retinal hemangioblastomas. Von Hippel–Lindau disease is present in a frequency of 1 in 36,000

live births. Mutations in a VHL gene, a tumor suppressor located in 3p25–26 (1), produce the syndrome.

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) permits the genetic study of embryos from candidate couples and selects the unaffected ones for a particular disease for transfer into the uterus to obtain healthy offspring. Preimplantation genetic diagnosis applied to VHL has been described, although no detailed methodologic data were included in that publication (2).

According to the data extracted from the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), only 13.3% (962 out of 7,221) of PGD-selected and transferred embryos successfully implant and turn into a pregnancy (3). One of the reasons for this low implantation rate may be the presence of aneuploidy in the transferred embryos (4, 5).

Comparative genomic hybridization (CGH) in a single cell which allows for a complete analysis of all chromosomes, has been shown to be applicable for aneuploidy screening

Received September 8, 2008; revised November 3, 2008; accepted November 11, 2008.

A.O. has nothing to disclose. E.F. has nothing to disclose. M.R. has nothing to disclose. M.O.-B. has nothing to disclose. M.M.-F. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose. J.N. has nothing to disclose.

Supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo Fondo de Investigación Sanitaria Instituto de Salud Carlos III (FIS-ISCIII; PI 051395), the Grup de Suport a la Recerca de la Generalitat de Catalunya (2005SGR00495), and by the Càtedra de Recerca EUGEN. Albert Obradors has a predoctoral grant from the Generalitat de Catalunya (2005FI00108).

Reprint requests: Albert Obradors, Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain (FAX: 0034-93-581-1025; E-mail: albert.obradors@uab.es; or, joaquina.navarro@uab.cat).

in the first polar body (1PB) (6–11). It has been applied in PGD, achieving a pregnancy rate of up to 57% (26 of 45 transferred embryos) (12, 13). When analyzing blastomeres biopsied on day 3, both maternal and paternal chromosomes are screened, but because the CGH protocol requires up to 4 days, it is impossible to obtain a result before the embryo transfer on day 4/5. Therefore, it requires trying to preserve the embryos and performing the transfer of defrozed embryos in another menstrual cycle (14, 15). But when the 1PB is analyzed, biopsied on day 0, there is enough time to complete all of the CGH protocol and provide the results on days 3/4, allowing for embryo transfer in the same cycle. Analyzing the 1PB chromosome set, indirect information about its corresponding oocyte is obtained, owing to the fact that they are complementary, and errors which originated in female meiosis I, which is known to be causative of most constitutional embryo aneuploidies (16, 17), can be evaluated. In this case, no information about aneuploidies coming from the male partner, errors from female second meiotic division, or postmitotic and mosaicism errors can be assessed.

Our aim was to perform a type of PGD which would allow us to discard from transfer embryos that are genetically healthy for the monogenic disease but aneuploid due to maternal origin, to increase the pregnancy rate of the transferred embryos. In the protocol, defined as double-factor PGD (DF-PGD), previously applied in cystic fibrosis carriers (18), the mandatory monogenic disease analysis is performed simultaneously with the indirect oocyte aneuploidy screening diagnosis using CGH. We describe the successful application of DF-PGD in a carrier couple of VHL disease, with an extensive methodologic specification for the VHL diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

Patient Information

A couple at risk for VHL was included in an IVF program in collaboration with the Hospital Quirón Madrid to perform DF-PGD, owing to the male being a carrier of the R161Q mutation. The woman was 30 years old.

Both the family and the Ethical Commission of the hospital were informed about and consented to the application of the DF-DGP.

Gene Analysis Approach

Mutation detection in genomic DNA Genomic DNA from peripheral blood was acquired from the VHL-affected carrier, his partner, and his affected mother to verify the presence of the causative mutation (R161Q) and to improve the mutation-detection procedure for that patient. Moreover, the informative study of small tandem repeats (STRs) close to the mutated VHL gene was performed (Table 1).

To test the polymerase chain reaction (PCR) protocol on single cells, 30 lymphocytes from the VHL carrier were isolated after standard blood-culture procedures. The obtained lymphocytes were washed four times with sterile phosphate-buffered saline/0.1% polyvinyl alcohol solution and put into a labeled 0.2-mL PCR tube.

Single-cell PCR protocol A nested PCR specific for detecting the R161Q mutation on the VHL gene was designed using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) to directly detect the causative mutation by minisequencing (Snapshot Multiplex Kit; Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Moreover, to perform an indirect diagnosis, the D3S1537 and D3S1675 STRs, located 1.8 Mb upstream and 0.5 Mb downstream of the VHL gene, respectively, were selected using the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>; Table 1).

To obtain a higher amount of DNA from single cells, either lymphocytes or blastomeres, the multiple displacement amplification (MDA) Genomiphi v2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare; Buckinghamshire, U.K.) was applied as previously described (18).

Four microliters of MDA product was used as a template for a first-round multiplex PCR containing primers for the two STRs and for the mutation detection. In addition, the reaction mix contained 2.5 μ L of 2 mmol/L dNTPs Mix, 1 \times HotMaster Buffer, and 1 U HotMaster Taq Polymerase (Eppendorf; Hamburg, Germany) in a final volume of 25 μ L. The tubes were located in a thermo cycler (TGradient; Biometra, Goettingen,

TABLE 1

Primers, corresponding sequences and volumes used in the present work.

Primer	Nucleotide Sequence	Volume (Conc.: 50 μ M)
R161Q-F-f	CTGCCACTGAGGATTTGGTT	0.3 μ L
R161Q-F-r	GACTAGGCTCCGGACAACCT	0.3 μ L
R161Q-S-f	GCAAAGCCTCTTGTTCGTTTC	0.3 μ L
R161Q-S-r	TGACGATGTCCAGTCTCCTG	0.3 μ L
D3S1675-r	CTCTAACTACCAATTCATCCA	0.3 μ L
D3S1675-f	HEX-GATGGATGAATGGATGGCT	0.3 μ L
D3S1537-r	CTATTTTTGGACCCAGTAACC	0.3 μ L
D3S1537-f	HEX-CTATAAAATGGCTATACCCAG	0.3 μ L

Obradors. Double-factor PGD for VHL disease. Fertil Steril 2009.

TABLE 2

Results of the test of the family DNA for the D3S1675 and D3S1537 STR, and mutation-detection using MiniSequencing. DF-PGD results of the clinical case are also included for all embryos. The ADO present in Embryo #4 was detected due to incongruence with the other loci. Embryos #4 and #8 were positively double-selected and transferred to the patient's partner's uterus, achieving a twin pregnancy and the subsequent birth of twin, healthy babies.

Genetic Analysis	1PB-CGH	STR		MiniSequencing R161Q mutation	
		D3S1675	D3S1537		
Genomic DNA	Maternal DNA Wild-type	–	154 / 154	211 / 223	C-Black
	Paternal DNA R161Q carrier	–	140 / 150	211 / 223	C-Black / T-Red
	Paternal Mother DNA R161Q carrier	–	140 / 154	223 / 227	C-Black / T-Red
DF-PGD	Embryo #1	+X,+2,+10,+12, +17,+1	150 / 154	211 / 211	C-Black
	Embryo #2	Euploid	150 / 154	211 / 211	C-Black
	Embryo #3	Euploid	140 / 154	223 / 223	C-Black / T-Red
	Embryo #4	Euploid	150 / 154	<u>ADO</u> / 223*	C-Black
	Embryo #5	Euploid	150 / 154	211 / 223*	C-Black
	Embryo #6	Euploid	140 / 154	211 / 223 *	C-Black / T-Red
	Embryo #7	Euploid	150 / 154	211 / 211	C-Black
	Embryo #8	Euploid	150 / 154	211 / 223*	C-Black
	Embryo #9	Euploid	140 / 154	223 / 233	C-Black / T-Red
	Embryo #10	No CGH Diagnosis	140 / <u>ADO</u>	223 / 223	<u>ADO</u> / T-Red
	Embryo #11	No 1PB available	140 / 154	223 / 223	C-Black / T-Red
	Embryo #12	No 1tPB available	140 / 154	211 / 223 *	C-Black / T-Red

* = samples in which STR D3S1537 was confirmative of the result of the other two loci.

Obradors. Double-factor PGD for VHL disease. Fertil Steril 2009.

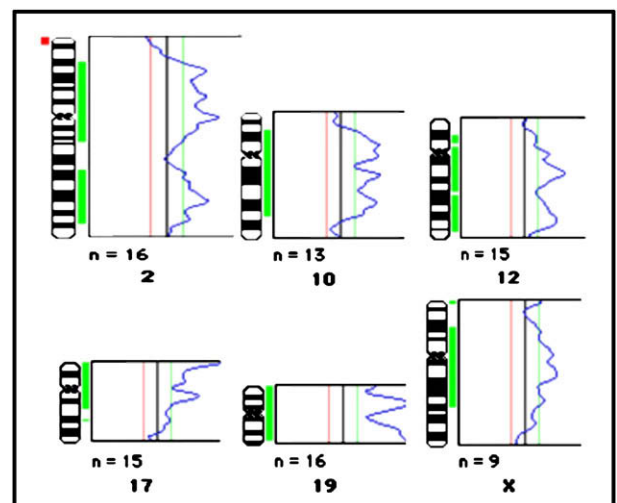
Germany), and the following PCR protocol was applied: 2 min at 94°C, 37 cycles of 20 s at 94°C, 45 s at 62°C, and 30 s at 65°C, and finally 5 min at 65°C. The alleles of both STRs were detected by analyzing 1 µL of the product in an ABIPrism 3730 sequencer (Applied Biosystems).

A second-round multiplex was performed with 0.5 µL of the product of the first-round multiplex mix as a template DNA. The reaction mix contained the inner primers for the mutation and the same reagents as the first round. It was amplified using the following PCR protocol: 2 min at 94°C, 30 cycles of 20 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 30 s at 65°C, and then 5 min at 65°C. The amplification of the inner fragment was verified by agarose gel electrophoresis.

Minisequencing was applied to the product of the second-round PCR, following the manufacturer's instructions (Snapshot Multiplex Kit; Applied Biosystems). The reverse inner primer was designed to be used as the minisequencing primer, because its 3' end hybridizes just after the causative mutation (guanine to adenine). Because the reverse primer interrogates the antisense DNA strand, the nucleotide change detected was not the one described, but rather it was cytosine to thymine. After analyzing 1 µL of the

FIGURE 1

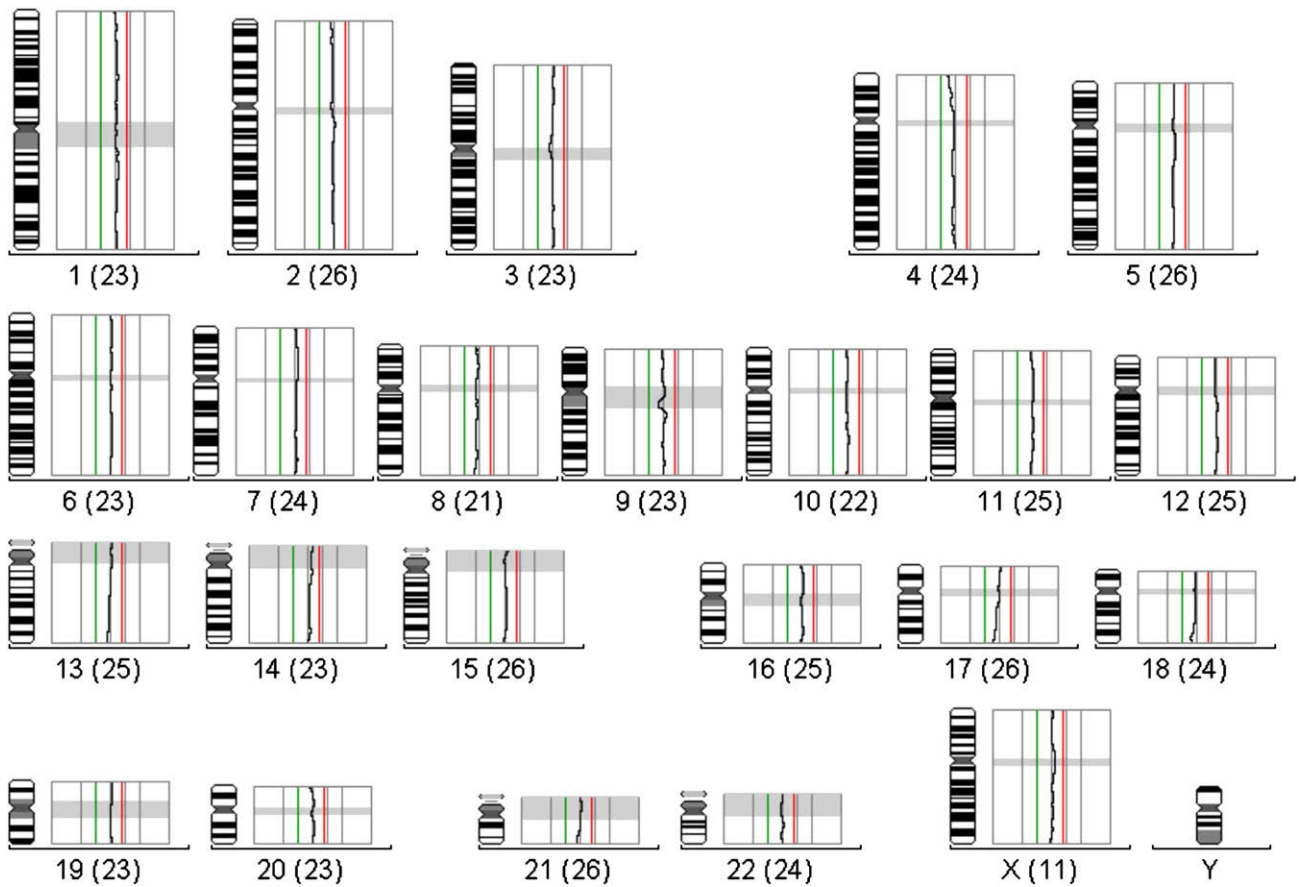
Aneuploid profiles observed for chromosomes #2, #10, #12, #17, #19, and #X of first polar body #1.



Obradors. Double-factor PGD for VHL disease. Fertil Steril 2009.

FIGURE 2

The comparative genomic hybridization result for first polar body #8. Euploid profiles are observed from all analyzed chromosomes. The embryo that originated from it was transferred to the uterus, together with embryo #4, after being diagnosed as unaffected by VHL.



Obradors. Double-factor PGD for VHL disease. Fertil Steril 2009.

minisequencing product in an ABIPrism 3730 sequencer (Applied Biosystems), a black peak corresponding to a cytosine was observed in wild-type DNA, whereas black and red peaks, corresponding to a cytosine and a thymine, respectively, were detected in R161Q mutation carriers (Table 2 and Fig. 3).

During the DF-PGD clinical case, the 1PB and blastomere biopsies were biopsied using the partial zone dissection method. The 1PB-CGH was performed as previously described (8, 9, 18). Briefly, the 1PBs were lysed using proteinase K, and the genome was amplified by degenerate oligonucleotide primed PCR and then labeled by nick translation following the manufacturer's protocol.

RESULTS

PCR Optimization

Results of the preclinical informative study of the D3S1675 and D3S1537 STRs for the patient's family are summarized in Table 2.

A successful amplification was observed in 26 out of the 30 lymphocytes'quo; (86.7%) MDA-amplified DNA product from the patient. The allele dropouts (ADOs) observed in the STRs D3S1675 and D3S1357 and in the mutation loci were 2 out of 26 (7.7%), 4 out of 26 (15.4%), and 2 out of 27 (7.7%), respectively. The mean ADO rate observed was 10.25% (8 ADO-affected loci out of the 78 correctly amplified loci).

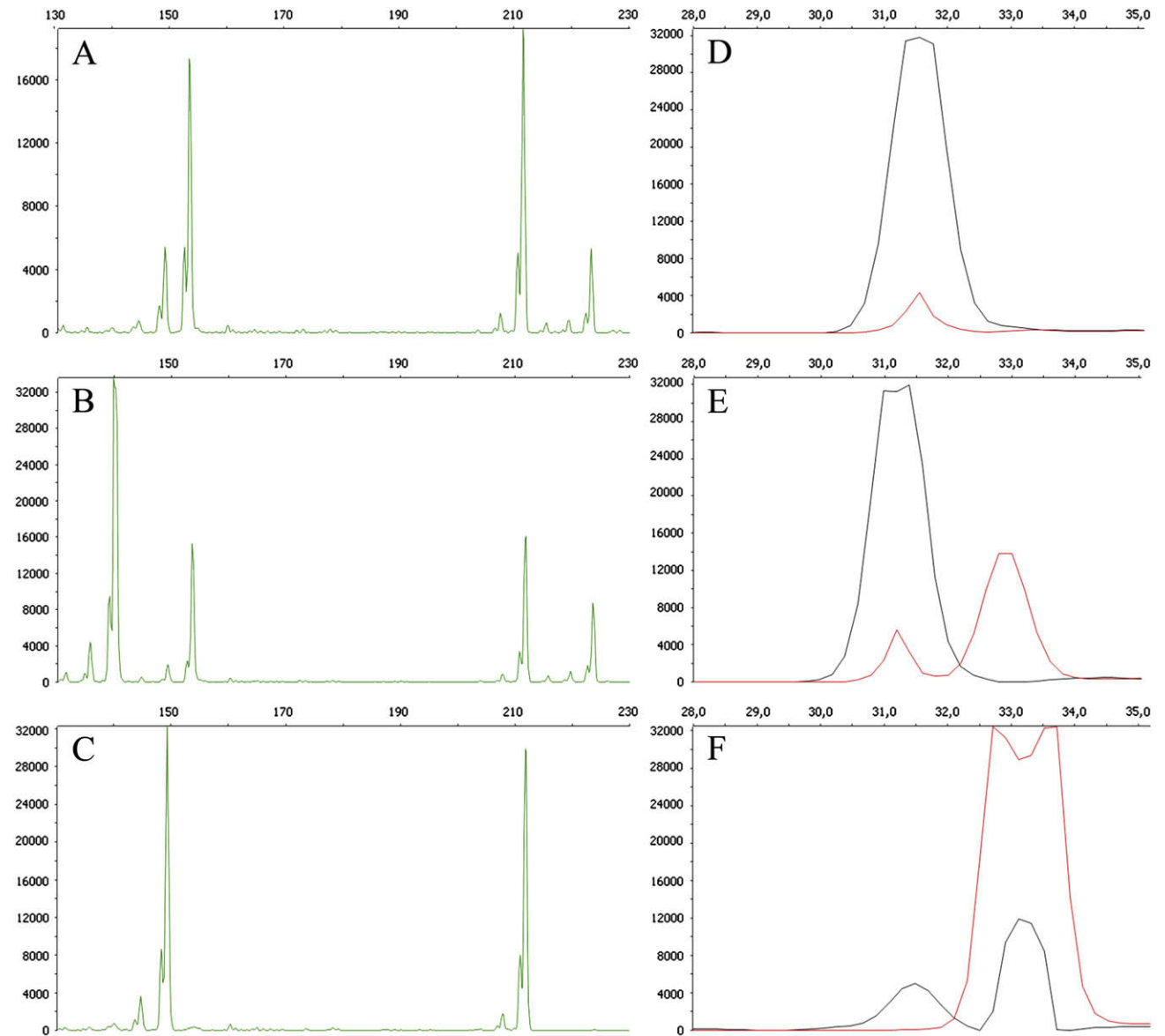
DF-PGD Results

Aneuploidy screening with CGH Ten out of the twelve mature oocytes obtained (83.3%) were successfully biopsied obtaining the 1PB. Reliable CGH profiles were obtained in nine out of ten 1PB-CGHs (90%). One of the nine 1PBs (11.1%) showed an aneuploid karyotype (1PB#1: 29XX,+2,+10,+12,+17,+19; Fig. 1) involving six chromosomes. The other eight 1PBs (88.9%) were euploid (Table 2 and Fig. 2).

Mutation analysis All twelve mature oocytes were fertilized and developed into 6–8-cell embryos on day 3. After

FIGURE 3

Electropherograms which resulted from the double-factor preimplantation genetic diagnosis of the biopsied embryos. **(A)** D3S1675 and D31537 short tandem repeat (STR) alleles from transferred embryo #8. **(B)** STR alleles from Von Hippel–Lindau syndrome (VHL)–affected embryo #6. **(C)** STRs from wild-type embryo #10, presenting allele dropout for allele 154 of D3S1675. **(D)** Minisequencing result for transferred embryo #8, showing a homozygote cytosine allele (*black line*). **(E)** Minisequencing result for VHL-affected embryo #6 with an allele for cytosine (*black line*) and the mutant one for thymine (*red line*). **(F)** Minisequencing result for VHL-affected embryo #10, presenting ADO for the wild-type allele (*black line*).



Obradors. Double-factor PGD for VHL disease. Fertil Steril 2009.

STRs and minisequencing analysis, consistent and coherent results were obtained from all of the loci (Table 2). Half of the twelve embryos (embryos #3, #6, #9, #10, #11, and #12) carried the R161Q mutation in the VHL gene, so they were affected and nontransferable, whereas the other six embryos were free of the causative mutation.

An ADO was observed in 1 out of 12 (8.33%), 1 out of 12 (8.33%), and 1 out of 12 (8.33%) of the D3S1675, D3S1537, and mutation loci, respectively. The mean ADO value was 8.33% (3 ADO-affected loci out of 36 amplified loci). A summary of the obtained electropherograms is shown in Figure 3.

Embryo Transfer

One of the six developing embryos unaffected by VHL (embryo #1), having the best embryonic morphology, but derived from a potentially aneuploid oocyte, was discarded for transfer. The five remaining embryos were free of the mutation and originated from potentially euploid oocytes. Two of them (embryos #4 and #8), also having the best embryonic morphology, were transferred to the uterus, achieving a twin pregnancy, confirmed by fetal heartbeat. The rest of the transferable embryos were frozen, and the six VHL-affected embryos were, unfortunately, discarded in the IVF lab and were not available for reanalysis. The family rejected having the indicated prenatal diagnosis performed. Twin healthy babies, a boy and a girl, were born. The family also decided to not have the postnatal genetic diagnosis performed.

DISCUSSION

The double independent but simultaneous diagnosis approaches, i.e., minisequencing and STR analysis, have been seen as a proven and robust protocol significantly minimizing the risk of misdiagnosis (19–21). Before the amplification of the three loci, MDA was used on the biopsied blastomeres to generate sufficient DNA to obtain satisfactory results on the downstream PCR as well as to minimize the amount of time needed for the PCR set-up (18). The ADO rate observed in lymphocytes during the protocol set-up was reasonably low, i.e., 10.25%, especially compared with the rate observed in other groups after using MDA amplification, which showed an ADO rate of ~25% (22–25). The ADO rates found in the blastomeres were similar to the ones found in the lymphocytes, which was 11.1%. In fact, both the ADO and the amplification efficiency rates obtained are similar to the ones recommended by the ESHRE PGD guidelines (10% and 90%, respectively) (26).

Comprehensive aneuploidy screening was also applied in this PGD protocol. One out of the nine 1PBs (11.1%) showed an aneuploid karyotype, involving six chromosomes (1PB#1: 29XX,+2,+10,+12,+17,+19). Remarkably, only one of these aneuploidies would have been detected in regular PGD using fluorescence in situ hybridization for five to seven chromosomes, despite its major chromosomal errors. The 1PB-CGH is a useful approach to perform comprehensive aneuploidy detection, even if the female partner is not at risk of aneuploidy, i.e., advanced maternal age (AMA), recurrent spontaneous abortions, or other situations. In our own experience (report submitted for publication), aneuploid events in the oocytes of young females do not have a negligible frequency (~30% of the PB1-MII doublets analyzed with CGH were aneuploid). Moreover, considering the data summarized in the recent ESHRE Consortium Steering Committee (3), after PGD for a monogenic disease, without any aneuploidy test and with a mean female age of 33 years, just 13.3% of the transferred embryos implant; therefore, a full karyotype aneuploidy screening may increase this implantation rate.

In the present case, one out of the six embryos free of the R161Q mutation, with the best embryonic morphology, orig-

inated from an oocyte predicted to have multiple aneuploidies; thus, it was at risk of being unviable. The other five were recommended for transfer because they came from oocytes predicted to be euploid. Two of them were chosen, and they did, in fact, implant. The two transferred embryos became a twin pregnancy and developed into the birth of healthy twins.

In a conventional PGD for a monogenic disease, only morphologic parameters are considered, and the embryo originating from an oocyte predicted to be aneuploid would have been transferred and most probably would not have implanted, therefore reducing the implantation rate.

Although more clinical applications of DF-PGD are required, performing the monogenic disease analysis simultaneously with the evaluation of complete maternal aneuploidy screening would allow the selection of embryos for transfer based not only on morphologic embryo quality but also on cytogenetic criteria (18). In turn, this would represent an increase in the pregnancy rate of the transferred embryos.

Acknowledgments: The manuscript was read and corrected by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking instructor of English at the authors' university. The authors would like to thank Javier del Rey, M.Sc., for useful assistance in Figure 3.

REFERENCES

1. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel–Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317–20.
2. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Ozen S, Masciangelo C, et al. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod Biomed Online* 2002;5:148–55.
3. Harper JC, de Die-Smulders C, Goossens V, Harton G, Moutou C, Repping S, et al. ESHRE PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. *Hum Reprod* 2008;23:741–55.
4. Pellestor F, Andreo B, Anahory T, Hamamah S. The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *Eur J Med Genet* 2006;49:103–16.
5. Boue A, Boue J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 1985;14:1–57.
6. Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006;21:2319–28.
7. Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res* 2006;114:30–8.
8. Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, et al. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 2004;19:2859–68.
9. Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:2118–25.
10. Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999;19:846–51.
11. Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1055–62.

12. Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, et al. 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;87:1033–40.
13. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78:543–9.
14. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33–41.
15. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003;80:860–8.
16. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280–91.
17. Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998;13:313–9.
18. Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, 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;23:1949–56.
19. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Masciangelo C, et al. Preimplantation diagnosis for neurofibromatosis. *Reprod Biomed Online* 2002;4:218–22.
20. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, et al. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 2006;21:670–84.
21. Kuliev A, Rechitsky S, Laziuk K, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Verlinsky Y. Pre-embryonic diagnosis for Sandhoff disease. *Reprod Biomed Online* 2006;12:328–33.
22. Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, et al. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006;12:647–52.
23. Renwick PJ, Lewis CM, Abbs S, Ogilvie CM. Determination of the genetic status of cleavage-stage human embryos by microsatellite marker analysis following multiple displacement amplification. *Prenat Diagn* 2007;27:206–15.
24. Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, Sermon K. Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum Mutat* 2006;27:496–503.
25. Ren Z, Zeng HT, Xu YW, Zhuang GL, Deng J, Zhang C, Zhou CQ. Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy by multiple displacement amplification. *Fertil Steril* 2008.
26. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al., ESHRE PGD Consortium. Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod* 2005;20:35–48.

4.3.3. Article nº 4 (en revisió)

A two-year experience of Double-Factor Preimplantation Genetic Diagnosis: preliminary results.

Obradors A.^{1,5,6}, Rius M.^{1,6}, Daina G.¹, Cuzzi JF.², Martínez-Passarell O.³, Fernández E.⁴, Polo A.³, Oliver-Bonet M.¹, Benet J.¹, Navarro J.^{1,5}

1) Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona; 08193; Bellaterra, Spain.

2) Departamento de Genetica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, CNPq Schorlarship, Universidade de São Paulo, Brazil.

3) Unitat de Reproducció Assistida. Fundació Puigvert. Hospital Sant Pau. Barcelona, Spain.

4) Laboratorio de Reproducción Asistida, Hospital Quirón, Avenida Europa 16; Pozuelo de Alarcón; 28224, Madrid, Spain.

5) Correspondence should be addressed to: Joaquina.Navarro@uab.es or Albert.Obradors@uab.es

6) The first two authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

BACKGROUND In couples affected by a monogenic disease, Double-Factor Preimplantation Genetic Diagnosis (DF-PGD) allows double selection of embryos, i.e., free of the monogenic disease and being potentially euploid. The intention of this manuscript is to evaluate the feasibility and possible positive effect on implantation of DF-PGD after two years of clinical application.

METHODS Eight couples participated in this study; three suffered AMA (≥ 35 y mean 39.2 y), but not the other five (< 35 y mean 32.3 y). After ICSI, the first polar bodies were biopsied and analyzed using CGH to screen aneuploidies in the whole-chromosome complement. On Day 3, a blastomere was biopsied and amplified using MDA, followed by couple-specific mutation detection protocol. On Day 4, both monogenic detection and 1PB-CGH results were obtained allowing for a double selection of embryos.

RESULTS During DF-PGD, only 1PB-CGHs from developing embryos were analysed, 45.45% of them being aneuploid (35/77), only fifteen obtained from AMA patients.

Forty-five blastomeres were unaffected by the respective disease. In 35 of them, the 1PBs-CGH was available, with the result that 15 (42.9%) were potentially euploid, thus classified as DF-PGD-transferable embryos. The remaining 10 unaffected embryos without informative 1PB-CGH were tagged as PGD-transferable.

Nine of the DF-PGD-transferable embryos and eight of PGD-transferable embryos were selected for transfer, achieving pregnancy in three (33.3%) and in one (12.5%) of the transferred embryos, respectively.

CONCLUSION Despite the low number of cycles performed using DF-PGD, it seems to be a good tool to increase the implantation rate in couples affected by a monogenic disease.

INTRODUCTION

Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) was first employed successfully for a monogenic disease detection almost 20 years ago (Handyside et al., 1990). PGD was also applied to screen for chromosomal abnormalities in couples at risk of aneuploidy (i.e., Preimplantation Genetic Screening: PGS) six years later (Munne i Weier, 1996, Verlinsky et al., 1996a, Verlinsky et al., 1996b). Currently, both approaches have been extensively used worldwide with more than 2,000 scientific publications in the field found on Pubmed.

Briefly, PGS aims for the selection of euploid embryos to transfer, aiming to increase their implantation rate. FISH for 9 chromosomes is mostly the technique applied in PGS. It seems, however, that according to recent publications PGS may not be useful (Staessen et al., 2004, Mastenbroek et al., 2007, Hardarson et al., 2008, Staessen et al., 2008). In fact, analyzing the latest data presented by the European Society of Human Reproduction and Embryology (E.S.R.H.E.), on average just 13.48% of the transferred PGS-selected embryos implant (1,635 positive heartbeats / 12,131 transferred embryos)(Goossens et al., 2008). On the other hand, after 167,192 ART cycles in Europe using ICSI, the pregnancy rate is 29.8% (Andersen et al., 2008). Obviously, PGS patients differ from ICSI patients since the first ones suffer from repetitive implantation failure (RIF) or have an advanced maternal age (AMA), but the low implantation rate obtained in these patients still remains as a problematic issue.

Similarly, also referring to the E.S.H.R.E. data, the implantation rate in patients undergoing PGD for a monogenic disease, in which the maternal age is not at risk of producing aneuploid gametes, is 13.17% (532 positive heartbeats / 4,039 transferred embryos)(Goossens et al., 2008). It appears clear, then, that an increase of the implantation rate would not only be advantageous for the PGS patients but also for the PGD ones.

In PGS patients, in order to increase the implantation rate, comprehensive chromosomal analysis techniques have been proposed to completely karyotype the embryo to be transferred. One of these techniques is Comparative Genomic Hybridization (CGH), which has been applied widely in PGS (Voullaire et al., 2002, Wells et al., 2002, Wilton, 2005, Keskinetepe et al., 2007, Sher et al., 2007), achieving up to a 74%-80% rate of implantation. Two different cells can be analyzed by CGH-PGS, the first polar body (1PB) and the blastomere (BL). Both options have their advantages and disadvantages; the use of 1PB-CGH permits the diagnosis of the cell within the same

IVF cycle, as the CGH procedure requires up to 4 working days, but the result obtained only reflects indirect information about the oocyte, despite it being known that it is during the first meiotic division when most embryonic aneuploidies occur (Nicolaidis i Petersen, 1998, Hassold i Hunt, 2001). On the other hand, BL-CGH gives information about the embryo directly, but it cannot be analyzed during the same IVF cycle and, therefore, involves a cryopreservation step followed by a defrost step of euploid embryos prior to transfer.

The other technique that allows for a full karyotype analysis and is potentially useful to increase implantation in PGS patients is array-CGH, which permits a diagnosis within the IVF cycle and investigates the embryo directly, as it is applied to blastomeres. So far, several publications have tested the efficiency of array-CGH on single cells with promising results (Hu et al., 2004, Wells et al., 2004, Le Caignec et al., 2006, Fiegler et al., 2007). More recently, it has been applied clinically for the first time, obtaining five pregnancies (Hellani et al., 2008). Although array-CGH is a capable technique, more research must be done to validate it and monitor any increase in the implantation rate.

Now considering the enhancement of the implantation rate on patients undergoing PGD for a monogenic disease (PGD-patients), several approaches have been published with this aim. A methodology called Cell Recycling, i.e., FISH analysis of a blastomere and posterior PCR amplification of the very same cell, was described as a possible option for selected the embryos both genetically and cytogenetically (Thornhill et al., 1994), but it was demonstrated that the protocol increased the allele drop-out (ADO) rate, thus reducing its diagnostic robustness (Rechitsky et al., 1996).

Another approach is the Double-Factor PGD (DF-PGD) where the 1PB is analyzed using CGH and a single blastomere of the produced embryo is biopsied in order to diagnose the monogenic disease. This method permits the double selection of the embryos for being free of the family disease plus having originated from a potentially euploid oocyte. In addition, as 1PB-CGH is used, the diagnosis is performed within the same IVF cycle, avoiding the need of cryopreservation. The DF-PGD has been previously applied on two couples, carriers of cystic fibrosis and von Hippel-Lindau syndrome, respectively, achieving the birth of three healthy children (Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009).

The aims of this work are to assess the feasibility and application of the DF-PGD after two year of experience and ten clinical applications and, moreover, to determine if it is a valuable tool to increase the implantation rate in PGD for monogenic-disease patients.

MATERIALS & METHODS

PATIENTS

Over two years, a total of eight couples affected by a monogenic disease participated in this study after fully understanding the protocol and the signing of an approved-consent form. The results of two of them were previously published (Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009) (Table 1). Two of the couples repeated the DF-PGD clinical protocol after no pregnancy on the first attempt.

The mean age of the patients was 35.1 years old. For comparison proposes, the patients were classified into two groups depending on the maternal age: four patients were classified with advanced maternal age (AMA) (mean age of 39.2 y.o.) and the other 6 patients were ≤ 35 y.o. (mean age of 32.3 y.o.).

Most of the couples (6 out of 8) were unaffected carriers of Cystic Fibrosis (CF, OMIM #219700) with an affected child. Considering the other two couples, one was affected by von Hippel-Lindau syndrome (VHL, OMIM #193300), a dominantly-inherited family cancer syndrome, and the other couple was an unaffected carrier of Angelman Syndrome (AS; OMIM #105830).

A summary of the mutations affecting each couple can be also found in Table 1.

MONOGENIC DISEASE DETECTION PROTOCOL

In order to minimize misdiagnosis and increase protocol robustness, two independent diagnoses were performed. A direct diagnosis of the causative mutation and an indirect diagnosis using informative Small Tandem Repeats (STRs) were optimized for each couple. The causative mutation detection, mostly point-mutations, was achieved after two rounds of nested-PCR amplification of a region surrounding the mutation using specific primers designer using the Primer3 website (<http://frodo.wi.mit.edu>) (Table 2). After PCR amplification, the mutant site was interrogated using the MiniSequencing Reaction (Snapshot Multiplex Kit, Applied Biosystems; CA, USA). During the reaction, a mutation-specific primer anneals a base before the point-mutation site; then, a polymerase incorporates a single ddNTP fluorescently labeled (Fiorentino et al., 2003). The product of the reaction (1 μ L) is analyzed in a DNA sequencer in order to detect the presence or absence of the causative mutation.

In order to detect mutations involving short deletions, such as dF508 mutation in the CFTR gene which is causative of Cystic Fibrosis (CF), where three nucleotides are deleted in the mutant allele, a pair of fluorescent primers was designed to anneal on both

sides of the deletion in order to detect the fragment analysis variation, between the alleles. After PCR amplification of genomic DNA of a CF carrier and analysis on a DNA sequencer, two different peaks appear, a wild-type peak at 94 bp followed by the mutant peak at 91 bp.

As commented upon before, an indirect diagnosis using STRs was also applied. A minimum of four STRs were found surrounding each of the genes causatives of the diseases. The STRs were chosen using the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>) according to the following criteria: to contain a tetranucleotide repetition core, to be located as close as possible to the gene (upstream or downstream) and to have the highest heterozygosity value. Once they were chosen, the fluorescent dyes of the forward primers of each STR were selected in order to avoid overlapping of the expected allele size for all STRs of the same disease, so they could be amplified and simultaneously analyzed if required.

To assess the diagnostic utility of the STRs, genomic DNA extracted from peripheral blood or from buccal cells was obtained from each member of the couple. The STRs were classified as being 100% informative if the both in the couple were both heterozygote, or to be partially informative if one of the couple was homozygote and the other one heterozygote for the same STR or, finally, not informative if both were homozygote. In order to detect which of the couple's alleles were linked to their mutated copy of the gene, DNA from an affected child or first-degree relatives was also analyzed.

With the aim of avoiding misdiagnosis due to the recombination process between the selected STRs and the gene of interest, a minimum of two 100% or partially informative STRs located on each side of the gene (upstream and downstream) were selected for the PGD protocol, or in the case of intragenic STRs, a single STR was considered .

Once both the STRs and the mutation-specific primers were chosen, the PGD protocols were optimized using genomic DNA from one of the patients. Briefly, a multiplex PCR containing the fluorescent primers for the STRs amplification, plus the first-round unlabeled primers for mutation detection was applied in most of the cases. When optimizing the $\Delta F508$ CF mutation, its primers were fluorescently labeled in order to detect the deletion, as described before. Between 0.5-1 μL of product of this PCR multiplex was used as a template for the second round of amplification of the mutation-specific primers. One microliter of the PCR amplification product was used in a DNA

sequencer to assess STRs efficiency on the multiplex, whereas agarose gel analysis was enough to detect to correct amplification of the mutation-specific loci.

When the multiplex was efficient in genomic DNA, it was tested in whole genome-amplified (WGA) single cells, usually cultured fibroblast. The Multiple Displacement Amplification (MDA) (Genomiphi, HE Healthcare; Buckinghamshire, UK) was used following the manufacturer's protocol, but with a previous step of alkaline lysis of the single cell, as described before (Spits et al., 2006b, Spits et al., 2006a, Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009). Finally, and in order to describe the allele drop-out (ADO) rate, 30 patients' lymphocytes were amplified with the optimized protocol.

In order to minimize the presence of contamination due to exogenous DNA, all PCR mixes which included primers, Taq polymerase and buffers were performed on a sterile hood. While the target DNA, i.e., MDA products, PCR amplicons after a first-round amplification and DNA extracted from peripheral blood or from buccal cells were introduced into a separate sterile hood in another room.

A report, the informative study report, including the STRs analyzed, the mutation detection procedure and ADO rate described for each couple, was sent to the IVF centers, which scheduled a date for the PGD case according to the patient's stimulation cycle.

FIRST POLAR BODY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

The 1PB-CGH procedure has been extensively described previously by our group (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b, Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009). Briefly, the 1PB was washed four times with sterile PBS/0.1%PVP, in order to avoid potential contamination from cumulus cells, and it was then placed in a 0.2mL PCR tube. Cell lysis (1 μ l of sodium dodecyl sulfate (17 μ M) and 2 μ l of proteinase K (125 μ g/ml)) was required to facilitate the cell genomic-DNA liberation. Afterwards, the cellular DNA was amplified by means of DOP-PCR, a WGA technique described to produce a sufficient amount of DNA to perform a CGH (Telenius et al., 1992, Voullaire et al., 1999, Wells et al., 1999). Briefly, the DOP-PCR reaction tubes contained 1X Buffer, 2 μ mol/l DOP primer (CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG), 0.2 mmol/l dNTP and 2.5U of SuperTaq Plus polymerase (Ambion, USA) in a final volume of 50 μ l. The tubes were placed in a thermocycler and underwent the following program: 94°C for 4.5 min; eight cycles of 95°C for 30s, 30°C for 1.5 min and 72°C for 3 min; 40 cycles of 95°C for 30s, 56°C for 1

min and 72°C for 3 min with a final extension step of 72°C for 8 min. After DOP-PCR amplification, fluorescent labeling with Spectrum-Red of the DOP-PCR product was performed by the Nick Translation Kit, following the manufacturer's indications (Vysis; Downers Grove, USA). With the purpose of obtaining reference DNA to compare with the 1PB (test DNA), between twelve to fifteen tubes containing three euploid female fibroblasts each were lysated and amplified like the 1PBs, but labeled with Spectrum-Green instead. The reference DNA produced from these twelve to fifteen cells was mixed in a single tube, kept at -20°C and used as reference DNA when required. The resulting reference-DNA mix avoids intrinsic cell-dependent amplification differences that could bias the CGH results and provides an intense homogeneous fluorescent signal.

Both test and reference DNA co-precipitated with Cot-1-DNA, which blocks repetitive DNA sequences such as telomeres and centromeres. The resulting cytogenetic probe hybridized during 44 hours into a slide of euploid lymphocyte metaphases. After that, the slide was washed to remove unspecific hybridization and analyzed using an epifluorescence microscope. Ten lymphocyte metaphases were captured and karyotyped using the Metasystem's software to obtain a CGH profile. When the fluorescence ratio (test/reference) of a CGH profile for a specific chromosome, reported by the software, was < 0.8 , the chromosome was lost in the DNA test, whereas when the ratio is > 1.2 , a chromosome gain was present (Wells et al., 1999).

Potentially artifactually gained or lost chromosomes (i.e., Chromosomes 17, 19 and 22) were discarded from analysis when all three chromosomes were simultaneously gained or lost in the same cell; if not, they were considered as being real aneuploidies.

In the present work, no distinction between chromosome or chromatid gain or loss has been considered because, in our experience, after analyzing 1PBs and their corresponding MII using CGH and FISH, respectively, the CGH-loss or CGH-gain profiles on the 1PBs were indistinguishably equivalent to losses or gains of either chromosome or chromatid in the MIIs (Gutierrez-Mateo et al., 2004a).

DOUBLE-FACTOR PGD CLINICAL SCHEDULE

Exhaustive information about the methodology and schedule, based on the following timetable (Figure 1), of the Double-Factor PGD (DF-PGD) clinical application performed in the families included in this work has been previously published (Obradors et al., 2008, Obradors et al., 2009). On Day 0, retrieved oocytes were cleaned

of cumulus cells to avoid cellular contamination during the PGD case. Following the IVF center's protocol, ICSI was performed on all MII oocytes, and immediately afterwards, the 1PB was biopsied using the partial zone dissection (PZD) procedure and washed four times with sterile PBS/0.1PVS as described above. In the cases, when the IVF center was located close to the lab (i.e., Barcelona), the cell lysis and DOP-PCR were done on Day 0; on the other hand, for cases located far from our lab (i.e., Madrid), the 1PB arrived in our lab in Bellaterra on Day +1, when the CGH protocol started. On the afternoon of Day +1, the CGH was placed to hybridize for 44 hours, thus, until the morning of Day +3. On Day +3, the CGH started to be analyzed; in general, a skilled technician took 1 hour to obtain a result for each CGH, so depending on the number of 1PBs it may last until Day +4. Also on Day +3, developing embryos reached the 6-8-cell stage and a single blastomere is biopsied using the same hole produced during the 1PB biopsy, but in order to increase the size of the hole, PZD or acid Tyrodes was used. Again, if the IVF center was located close to the lab (i.e., Barcelona), the PCR protocol started on Day +3, thus achieving the monogenic diagnosis results on Day +4. For IVF centers located in Madrid, the blastomere arrived on Day +4.

Late on Day +4, after the results from the DF-PGD were obtained, a written report was sent to the IVF center indicating not only the embryos free of each particular monogenic family disease, but also the results obtained after the complete cytogenetic analyses of the whole female chromosome complement. At that point, embryos free from the monogenic family pathology that were derived from oocytes that were predicted to be euploid and with a good morphological appearance can be selected and transferred. As is habitual in PGD, the family has been informed that performing a prenatal diagnosis in case of pregnancy would be recommended.

RESULTS

FIRST POLAR BODY AND BLASTOMERE OBTAINMENT

After ovary stimulation and follicular puncture, 146 oocytes were obtained from the 10 DF-PGD clinical cases presented (mean of 14.6 per couple). One-hundred-thirty-two of them (90.4%) were at the MII stage, thus containing the 1PB, and were inseminated using the couple's spermatozooids by ICSI. Immediately there after, the 1PBs were biopsied, obtaining 115 1PBs; therefore, the 1PBs biopsy efficiency was 87.1% (115/132). The oocytes were incubated at 37°C and checked for fecundation on Day +1. A total of 94 showed morphological signs of fecundation, obtaining a fecundation rate prior to the 1PB biopsy of 71.2%. As established in the IVF centers, embryos were checked for satisfactory division and quality on Day +2. On Day +3, 81 of the 94 (86.2%) fertilized oocytes did develop to 6-8-cell-stage embryos (mean of 8.1 embryos per cycle) and a single blastomere was biopsied. Blastomere biopsy was achieved in all embryos (100%), hence 81 blastomeres were acquired. A summary of the cells obtained can be found in Tables 3 and 5.

FIRST POLAR BODY CGH RESULTS

Analyzable CGH profiles were obtained in 111 of the 115 1PB-CGHs performed, resulting in a CGH success of 96.5%. Seventy-seven of them were successfully analyzed from Day +3 to Day +4, during the corresponding DF-PGD cycle. The other 1PB-CGHs analyses were temporally dismissed for analysis due to the fact they corresponded to embryos diagnosed as being affected by the monogenic disease studied. Forty-two of the 1PBs were diagnosed as euploid, whereas the remaining 45.4% (35 out of 77) were aneuploid (Tables 3 and 4). No differences in the incidence of aneuploidy were observed between the two maternal age groups (46.51% in ≤ 35 years vs. 44.12% in > 35 years).

Aneuploidies involving from one to seven chromosomes were observed. All chromosomes, except Chromosome 15, were involved in aneuploidy. The chromosomes that most frequently were found to be aneuploid were Chromosomes 19 (nine times), 18 (eight times), 16 (six times), and Chromosomes 1, 9 and 22 (five times each) (Figure 2). No differences were observed concerning chromosome size, as from the 81 chromosomes involved in aneuploidy, 40 (49.4%) and 41 (50.6%) were classified into the A-C groups or into the D-G groups, respectively.

Only six out the 35 aneuploid (17.2%) 1PBs would have been fully diagnosed using a FISH analysis for 9 chromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y), and a total of 15 (42.8%) of the aneuploid 1PBs would have been diagnosed incorrectly as being euploid (Figure 3). The remaining 14 1PBs (40%) would have been diagnosed as being aneuploid, but not all the chromosomal aneuploidies present would have been detected.

MONOGENIC DISEASE DETECTION RESULTS

All 81 blastomeres (a mean of 8.1 blastomeres per cycle) were amplified using MDA followed by a patient-specific mutation and STR detection multiplex-PCR as described. Six out of the 81 blastomeres (7.4%) did not provide a diagnostic result and thus were classified as non-diagnosed. Hence, as informative diagnostic result was notified in 92.6% of the blastomeres. Allele drop-out (ADO) affected 15.4% of the analyzed loci, and the PCR amplification efficiency was 93.3%.

Globally, of the 75 diagnosed blastomeres, 20 (26.1%) were homozygote wild-type, 21 (28%) homozygote mutant and the remanding 34 (45.3%) were diagnosed as heterozygote (Table 5). These ratios were not statistically different from the expected Mendelian inheritance rates.

Considering the studied monogenic diseases, 45 out of the 75 embryos were diagnosed as being non-affected (i.e., wild-type homozygotes in VHL and AS diseases, and both wild-type homozygotes and heterozygotes in CF).

DOUBLE-FACTOR DGP OUTCOME AND IMPLANTATION RATE VERSUS PGD

Of the 45 embryos free of the disease, in 35 the 1PB-CGH result was available, with the result that 20 of them (57.1%) originated from an aneuploid oocyte and the rest, 15 (42.9%), were potentially euploid. These 15 embryos, free of the monogenic disease and potentially euploid, were tagged as DF-PGD-transferable embryos. No informative 1PB-CGH profiles were obtained from the remaining 10 embryos free of the disease, so only the monogenic-disease diagnosis was performed; they were classified as PGD-transferable embryos.

Consequently, 56 embryos were DF-PGD non-transferable, due to being undiagnosed or affected by the corresponding monogenic disease (6 embryos and 30 embryos, respectively), or due to having originated from aneuploid 1PBs (20 embryos) (Table 6).

On Day +5, according to embryo-quality criteria, nine out of the 15 and eight out of the nine DF-PGD-transferable and PGD-transferable embryos were transferred to nine patients, respectively. Four of them received only DF-PGD-transferable embryos, two received only PGD-transferable embryos and the remaining three patients received both types (Table 6).

Four pregnancies were confirmed with both the hCG test and positive fetal heartbeat. None of the pregnancies involved patients receiving both types of embryos. A pregnancy which turned into the birth of a healthy girl was achieved in one of the patients with just PGD-transferable embryos transferred, and two pregnancies were achieved from the patients receiving only DF-PGD-transferable embryos, which resulted in the birth of three healthy children (one singleton and twins).

Due to most of the embryos were either at the morula stage or degenerated on Day +6, it was not possible to aise the blastomeres of the rejected embryos to perform a confirmation of both aneuploidy and monogenic disease diagnoses.

Prenatal diagnosis has been performed on two out of three pregnancies, according to the parents' decision. In Couple C, an embryo diagnosed as a healthy homozygote turned out to be carrier of one of the copies of the mutation due to ADO of the mutant allele; consequently, the girl delivered was a healthy heterozygote, but a carrier of CF (Figure 4).

Taking into consideration the implantation rate for the two types of embryos, one out of eight embryos healthy for the monogenic disease but undiagnosed for aneuploidies (i.e., PGD-transferable embryos) did implant, achieving an implantation rate of 12.5%, whereas three out of nine healthy embryos diagnosed as potentially euploid (DF-PGD transferable embryos) did implant, meaning an implantation rate of 33.3%. The differences between the groups are not significant for Fisher's test ($p= 0.576$).

Considering maternal age, none of the six embryos transferred into patients with AMA (mean age of 39.2 y.o.) did implant, whereas four out of the eleven embryos transferred into the patient without AMA (mean age of 32.3 y.o.) implanted. These differences are found to be significantly different ($p= 0.03$).

DISCUSSION

The embryo implantation rate is one of the most important values in IVF as long as the take-home-baby rate as the major aim of the clinicians is to achieve pregnancy in their IVF patients. Preimplantation Genetic Screening (PGS) appeared to satisfy this demand. It is well documented that aneuploidy affects between 50%-65% of first-trimester abortions (Hassold i Jacobs, 1984, Menasha et al., 2005). Therefore, a positive selection of euploid embryos to transfer should be a useful tool towards an increase of their implantation rate. However, it has been proved that, apart of embryonic mosaicism, the screening of embryos for a limited number of chromosomes is insufficient (Staessen et al., 2004, Mastenbroek et al., 2007, Hardarson et al., 2008, Staessen et al., 2008) and that a complete karyotype analysis may be needed to obtain satisfactory results (Wilton, 2005, Sher et al., 2007, Wells et al., 2008).

Comparative Genomic Hybridization (CGH) and array-CGH are the main techniques used for comprehensive aneuploidy screening of embryos. The array-CGH has been tested lately for single cells and even applied clinically, obtaining five pregnancies in eight couples with a clinical history of seven previous IVF failures. As two couples did not proceed to embryo transfer due to no euploid embryo being available, the take-home baby rate was 83.3% (pregnancy in five out of six couples)(Hellani et al., 2008). One of the main advantages of array-CGH versus conventional 1PB-CGH is that it is less labour-intensive plus it allows embryo diagnosis on Day 4 and may be more informative. On the other hand, its main drawback is the cost of the array-CGHs and the consequent processing and analysis equipment required. Thus, in anticipation of more studies of both economic and technical viability of the array-CGH, conventional CGH has been continuously applied with the objective of enhancing the implantation rate (Voullaire et al., 2002, Wells et al., 2002, Wilton, 2005, Keskinetepe et al., 2007, Sher et al., 2007).

The present manuscript recapitulates two years of the application of the Double-Factor PGD (DF-PGD), a methodology focused on the selection of both potentially full-karyotyped euploid embryos and free of a monogenic family disease. As commented previously, the 1PB-CGH allows for comprehensive aneuploidy testing with the result of the diagnosis within the same IVF cycle.

Considering the DF-PGD protocol referred to here, one single blastomere was biopsied from all 81 6-8-cell embryos on Day 3, as recommended by the ESHRE PGD consortium in order not to compromise embryo viability (Thornhill et al., 2005). All 81

blastomeres (a mean of 8.1 blastomeres per cycle) were amplified using MDA prior to PCR amplification with an efficiency rate of 92.59%, similar to the large series of MDA applications previously published, which analyzed 88 and 49 single cells, respectively (Burlet et al., 2006, Renwick et al., 2006). One of the main concerns about MDA is its high ADO rate, which, according to the same works, affects between 25%-27% of the heterozygote cells. In this work, and also analyzing a comparable number of cells, the ADO rate obtained was appreciably low (15.4%). Despite that, on one of the patients (Couple E), the ADO rate found after analyzing their embryos was considerably higher (50%), most probably due to intrinsic problems with this case in particular, as blastomeres quality or transportation issues. If the data from this couple is not included for the ADO rate calculation, its value becomes 11.5%, similar to the obtained from unamplified single cells, and also close to the recommended for the ESHRE PGD consortium (Thornhill et al., 2005). The differences in the ADO rates showed in this results compared with the previously published using MDA could be explained by the differences in the size of the PCR amplicons and the type or quality of the amplified cells (Wells, 2004). Unfortunately, and despite the low ADO rate, a misdiagnosis occurred affecting a healthy cystic fibrosis (CF) carrier who was wrongly diagnosed as being a wild-type homozygote. In that particular case, the family carried two different CF mutations (dF508 and 712-1G to T); moreover, they were fully informative for one STR and semi-informative for two more STRs (only informative for one of the progenitors). After MDA and PCR amplification, the analysis showed wild-type alleles for both mutations, failure of amplification on the full informative STR and consistent results on the other two STRs, thus the embryo was diagnosed as being free of both CF mutations. Pregnancy was achieved in this couple, and following the group's recommendation, prenatal diagnosis was performed showing a foetus carrier of the dF508 mutation. Hence, two ADO events did occur in that cell, one affecting the dF508 mutation site and the other on the semi-informative STR linked to the dF508 mutation. This result may indicate that the blastomere analyzed probably was insufficiently lysed. Nevertheless, prenatal diagnosis is mandatory in all PGD cases in order to avoid improbable, but possible misdiagnosis.

A total of 115 1PBs were biopsied from their corresponding oocytes on Day 0, but only 77 of them were analyzed by CGH since the producing embryo was diagnosed as being affected by the monogenic disease. Surprisingly, 45.45% of the 1PBs were aneuploid. This high rate is similar to that previously described in CGH studies of 1PBs-oocytes

doublets of IVF patients (Gutierrez-Mateo et al., 2004a, Gutierrez-Mateo et al., 2004b, Fragouli et al., 2006a, Fragouli et al., 2006b). It is noteworthy that the patients that underwent this study were selected for monogenic disease detection, not for sterility problems, so the fact that their aneuploidy rate is similar to that of IVF patients emphasizes the importance of aneuploidy screening even in patients without fertility problems. Moreover, after dividing the patients into two age groups, ≤ 35 or > 35 years old, a similar rate of aneuploidy was found between them (46.51% vs. 44.12%, respectively).

These results, although higher, are comparable to the ones obtained on a previous study of our group after analysis, with CGH, 1PB-MII doublets from 53 IVF donors with a mean age of 26.1 years old (Obradors et al. 2009, submitted). The study shows that, despite being produced by young women, 32.1% of the analyzed oocytes were aneuploid. Moreover, it demonstrates that almost 40% of the donors had at least one aneuploid oocyte.

This high aneuploidy rate found in young fertile women, concordant with that described in this manuscript, may be explained due to the ovarian stimulation process (Weghofer et al., 2008a, Weghofer et al., 2008b). This suggests that not only aged patients may benefit from aneuploidy screening with CGH, but also younger women without sterility problems.

Almost half of the detected aneuploid 1PBs (42.8%), some of them containing up to 5 chromosome abnormalities (such as 1PB#5 from Patient A), would have been diagnosed as being completely euploid if a nine-chromosome (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y) FISH had been used instead of CGH. This means that even performing an exhaustive FISH aneuploidy screening, almost half of the aneuploid embryos could still have been transferred into the patient's uterus, despite their intrinsic impossibilities to develop a pregnancy.

Consequently, in order to increase the implantation rate, not only a partial chromosome screening must be performed but also it must be done using a full-chromosome analysis technique such as CGH.

Referring to the data presented here, from the 45 developing embryos healthy for their specific monogenic disease, 20 of them originated from a potentially aneuploid oocyte diagnosed with 1PB-CGH, whereas 15 of them were diagnosed as being potentially euploid (tagged as DF-PGD transferable embryos). In the remaining ten embryos, no CGH results had been obtained, and they were classified as PGD transferable embryos.

Nine out of fifteen and eight out of ten embryos were transferred to the patients from the DF-PGD-transferable and PGD-transferable groups, respectively. Three patients (A', B, and E) received both types of embryos. Three from the nine and one out of the eight transferred embryos from each group implanted and developed into the birth of four healthy children. In none of the patients receiving both types of embryos did implantation occur. Also, none of the patients with AMA (mean age of 39.2 y.o.) became pregnant although six embryos were transferred; on the other hand, the four pregnancies achieved did occur in younger patients after transferring 11 embryos. These differences are found to be significantly different ($p=0.03$), and may be explained by other factors, rather than aneuploidy, that might affect the implantation rate in aged women like gynaecological or immunological aspects, although more studies are required to reach clear conclusions.

Therefore, the implantation rate was 33.3% in the embryos doubly selected (DF-PGD transferable embryos) and 12.5% in the embryos selected as being of the monogenic disease but not screened for aneuploidy, a value that is very similar to the average value (13.17%) obtained in the last ESHRE Consortium Steering Committee recompilation (Goossens et al., 2008). Despite the differences between the implantation rate of the DF-DGP transferred embryos being almost three times higher than the DGP transferred embryos are promising, these differences were not significant. Most probably, the reduced number of clinical applications presented in this work is not enough to have major differences.

A limitation on the 1PB-CGH is that only first meiotic errors can be identified, thus leaving the second meiotic division errors undetected. This is an undeniable fact as similar aneuploidy rates have been found after analyzing both the 1PB and 2PB (Kuliev et al., 2005). Seeing that, in order to get a higher implantation rate, such as the one obtained after array-CGH analysis (Hellani et al. 2008), totally euploid embryos is needed to identify and select for transfer. Therefore, all the aneuploidy maternally originated, due to first or/and second meiotic division errors, plus the one's originated due to germinal mosaicism (Hulten et al., 2008) (Obradors et 2009, submitted), and the one's with a paternal origin must be checked.

In conclusion, although the DF-PGD-selected embryos did not obtain a significant increase of implantation compared with embryos undiagnosed for aneuploidy, it seems clear that comprehensive aneuploidy screening of oocytes using a PGD protocol might benefit the clinical outcome of their corresponding embryo. Therefore, in order to

increase the implantation of embryos selected that are free of a monogenic disease, and until the routine assessment of CGH-array methodology, 1PB-CGH is the preferred technique to positively doubly select potentially euploid embryos.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Josep Lluís Seculi, M.D., and Sílvia Gartner, M.D., for their contribution on proposing the candidate families for this work and Olga López, M.SC., for skilled technical assistance during the IVF cycles. This research study has been funded by the *Ministerio de Sanidad y Consumo Fondo de Investigación Sanitaria Instituto de Salud Carlos III* (FIS-ISCIII; PI 051395), the *Grup de Suport a la Recerca de la Generalitat de Catalunya* 2005SGR00495 and by the *Càtedra de Recerca EUGIN*. Albert Obradors has a predoctoral grant from the *Generalitat de Catalunya* (2005FI00108). The manuscript was read and corrected by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking Instructor of English at the authors' university.

FIGURES FOOTNOTES

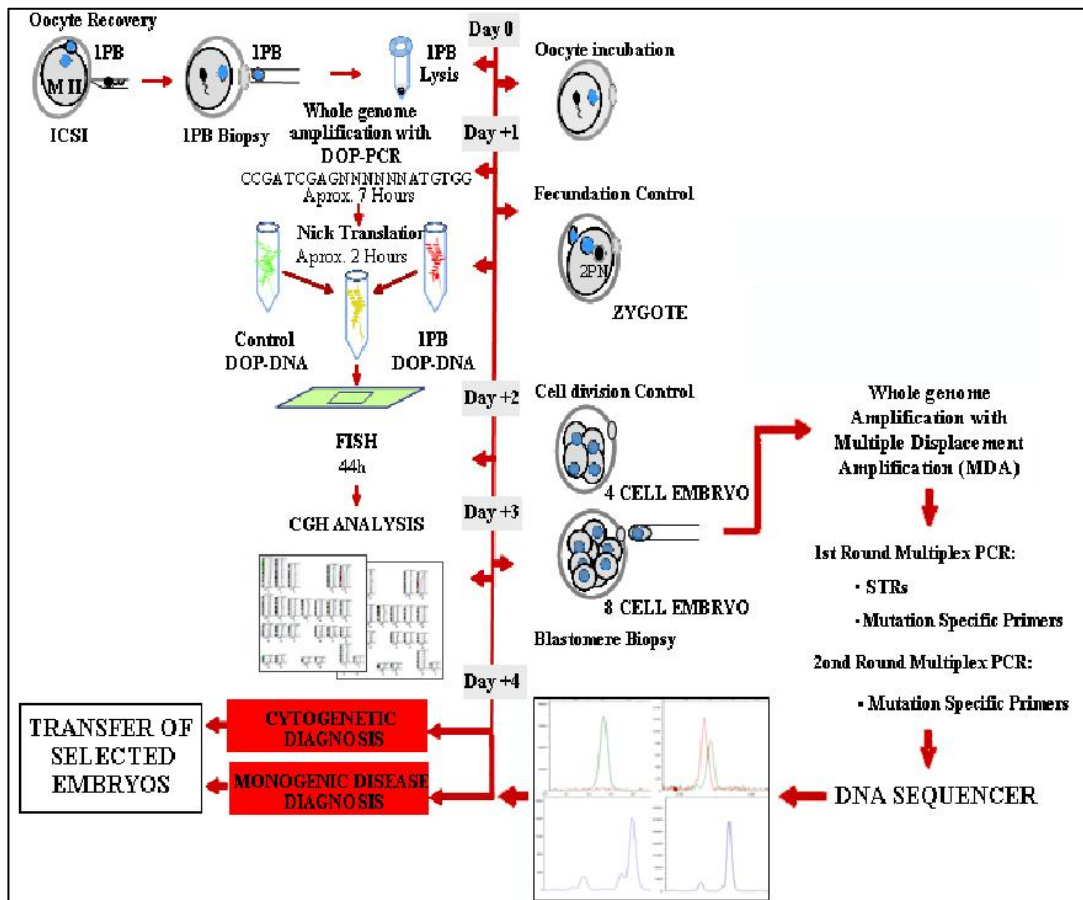


Figure 1. Illustration showing the DF-PGD timing combined with the IVF procedure.

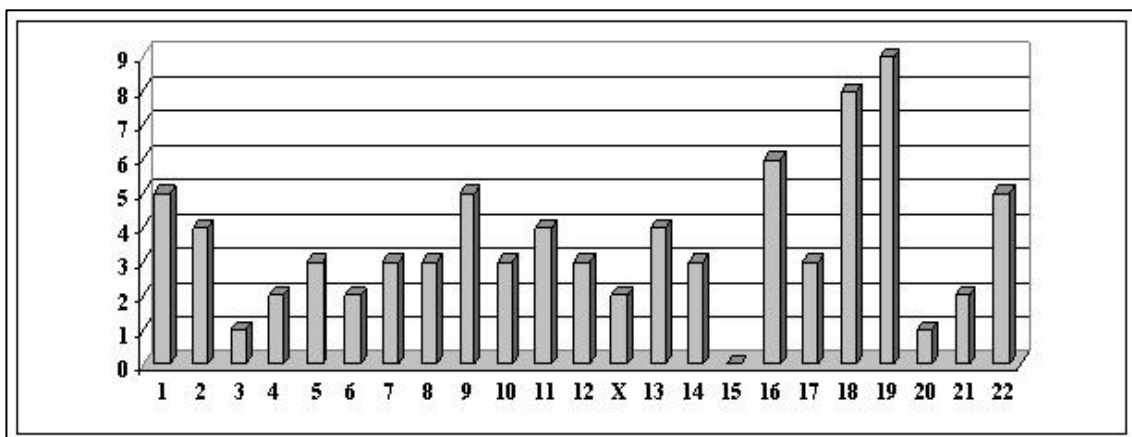


Figure 2. Incidence of aneuploid chromosomes found in the 1PB-CGH results of the couples included in the present DF-PGP program.

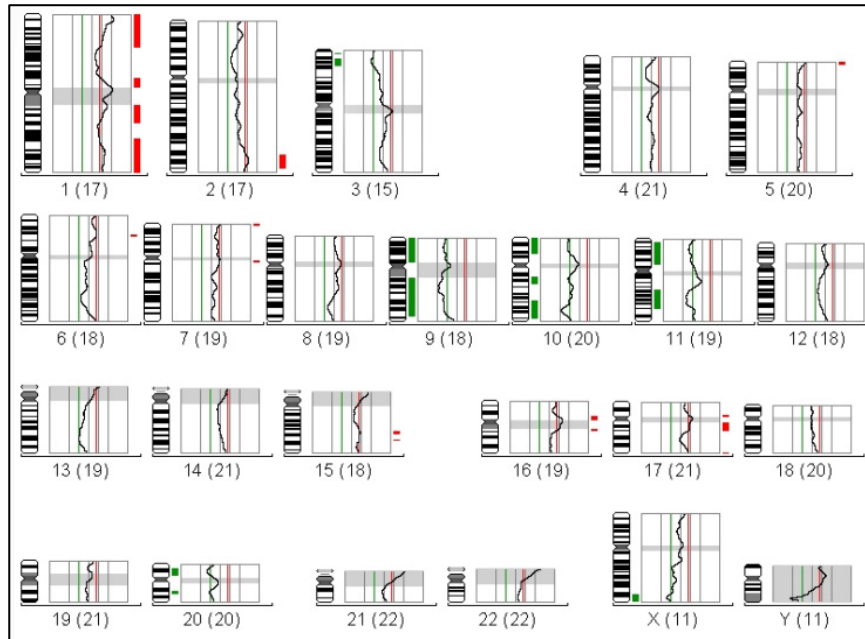


Figure 3. Comparative Genomic Hybridization profile of 1PB#1 from Patient D, indicating a gain of Chromosome 1 and a loss of Chromosomes 9, 10 and 11. The 1PB would have been misdiagnosed as euploid if instead of CGH; a nine-chromosome FISH would have been used.

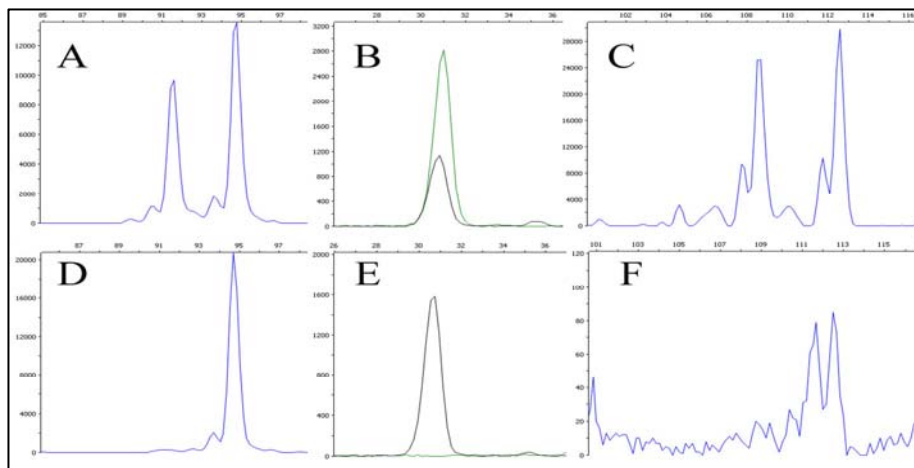


Figure 4. Monogenic diagnosis results of embryos #4 and #5 of Patient C, carrier of CF. Embryo #4 was affected of both mutation, dF508 (A) and 712GtoC (B), and confirmed with the STR D7S3025 (C), whereas Embryo #5 (D, E, F) was free of both mutations. Embryo #5 was transferred to the patient, achieving a pregnancy. Prenatal diagnosis showed that the foetus carried the dF508 mutation. Therefore, two ADO events occurred in that blastomere, one in the dF508 locus and another in the STR D7S3025 (D and F).

Couple	Maternal age	Disease	Gene	Mutation	Direct detection	Indirect detection
Obradors et al. 2009	30	Von Hippel-Lindau, Dominant	VHL	P: R161Q	MiniSequencing	D3S1675 D3S1537
A	32	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: dF508 M: dF508	Fragment analysis	INTRAGENIC D7S1799 D7S1817 D7S3025 D7S2847
A'	32	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: dF508 M: dF508	Fragment analysis	INTRAGENIC D7S1799 D7S1817 D7S3025 D7S2847
B	32	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: dF508 M: dF508	Fragment analysis	INTRAGENIC
C	33	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: 712-1GtoT M: dF508	MiniSequencing and Fragment analysis	D7S1799 D7S3025 D7S2847
Obradors et al. 2008	35	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: 3408C>A M:3849+10Kb (CtoT)	MiniSequencing	INTRAGENIC D7S1799
D	37	Angelman Syndrome, Dominant	UBE3A	M: K109X	MiniSequencing	D15S817 D15S1513
E	38	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P:1811+1.6KbAtoG M:2711delT	MiniSequencing	D7S1799 D7S1817
F	41	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: dF508 M:dF508	Fragment analysis	INTRAGENIC D7S1799 D7S2847
F'	41	Cystic Fibrosis, Recessive	CFTR	P: dF508 M:dF508	Fragment analysis	INTRAGENIC D7S1799 D7S2847

Table 1. Diseases and causative mutations of the eight couples included in the present DF-PGP program. The mutation detection methods and the informative STRs to perform direct and indirect analysis, respectively, are also included. The dF508 mutation is detected by the 3-bp difference between the mutant and the wild-type alleles.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
K109X-outer	GCCTAGAATGTTTGGCTGTTT	CTCTTCCAATAACACGGATTAAA
K109X-inner	GAACTTTTTGCAACAGAGTAAACA	ATCCTCTCTTTCTCTACATAATTCAAG
K109X-miniseq	AGATGTGACTTACTTAACAGAAGAG	-
dF508	6FAM-TGGAGCCTTCAGAGGGTAAA	TGGGTAGTGTGAAGGGTTCAT
712-1 G to T-outer	TGTTAGTTTCTAGGGGTGGAAGA	AAAGGAGCGATCCACACG
712-1 G to T-inner	GACACCTGTTTTGCTGTGC	<u>AAATGTGCCAATGCAAGTCC</u>
1811+1.6Kb-outer	AAAGTTTTGCCATTGGTTTTT	AAAGATGAAGACACAGTTCCCATA
1811+1.6Kb-inner	TTGTGTGCTGAATACAATTTTCTTT	AAAGATGAAGACACAGTTCCCATA
1811+1.6Kb-miniseq	AGAGAATCCTATGTACTTGAGAT	-
2711delT-outer	GGAGAGCATAACCAGCAGTGA	AAGCACCAAATTAGCACAAAA
2711delT-inner	TTCGATATATTACTGTCCACAAGAGC	<u>AAGCACCAAATTAGCACAAAA</u>
D15S1513	6FAM-GAACTGGGGAAAATCAGGAT	ACACATTTTAAGCCAGCAGC
D15S817	6FAM-GCACCAATAGGCTAGACACG	AGCTTTACATGGCATGTGGT
D7S2847	HEX-TCACCTTCAGAAAGTATTGCC	TGAGGTGTTTCTCCAAGCTC
D7S3052	6FAM-AGTGAGACTAGCAGATGTACTTGG	GCCTCCCCATTTTCATCTATT
INTRA	HEX-CAAGTCTTTCCTGATCTTC	TGAGCAGTTCTTAATAGATAA

Table 2. Sequences of the primers used in this study. The underlined primers were also used as MiniSequencing primers, as their 3' end hybridizes a base before the point-mutation. The other primers' sequences are cited in the previous applications of DF-PGD .

Couple	Maternal age	Oocytes retrieved	MII oocytes	1PB	Successful 1PB biopsy %	Analyzable 1PB-CGH	CGH Success %	CGH analyzed at the DF-PGD	EUPLOID 1PBs	ANEUPLOIDS 1PBs	ANEUPLOIDY RATE %
Obradors et al. 2009	30	12	12	12	100	12	100	9	8	1	11.1
A	32	16	16	14	87.5	14	100	11	6	5	45.4
A'	32	23	17	15	88.2	14	93.3	8	3	5	65.5
B	32	13	11	9	81.8	9	100	5	1	4	80
C	33	11	11	9	81.8	9	100	5	2	3	60
Obradors et al. 2008	35	6	5	5	100	5	100	5	3	2	60
D	37	7	5	5	100	5	100	4	2	2	50
E	38	33	32	23	71.9	20	86.9	13	4	9	69.2
F	41	11	11	11	100	11	100	9	7	2	22.2
F'	41	14	12	12	100	12	100	8	6	2	25
TOTAL		146	132	115	87.1	111	96.5	77	42	35	45.4

Table 3. Summary of the oocytes retrieved from the eight couples included in the present DF-PGP program and cytogenetic results obtained after the 1PB-CGH analysis.

Patient	Age	Aneuploidies detected in 1PB-CGH	Aneuploid oocytes/ oocytes analysed (%)
Obradors et al. 2009	30	1PB#1: +2,+10,+12,+17,+19	1/9 (11.1)
A	32	1PB#1: +10 1PB#2: -19 1PB#3: +16,+18 1PB#4: -1 1PB#5: +2,+4,+5,+10,+14	5/11 (45.4)
A'	32	1PB#1: +7,+12 1PB#2: +8 1PB#3: +8 1PB#4: +6,+11,+13 1PB#5: +9,+14,+18	5/8 (62.5)
B	32	1PB#1: +11,+14 1PB#2: +21,+22 1PB#3: +18 1PB#4: +X,+5,+18	4/5 (80)
C	33	1PB#1: +17 1PB#2: +20 1PB#3: +5,+13,+18	3/5 (60)
Obradors et al. 2008	35	1PB#1: -9,-13 1PB#2: -6,+19	2/5 (40)
TOTAL	≤35		20/43 (46.5)
D	37	1PB#1: +1,-9,-10,-11 1PB#2: +3,+13,-16,-17,-18	2/4 (50)
E	38	1PB#1: +1,+16,+18 1PB#2: +11,+16 1PB#3: +22 1PB#4: +2,+19 1PB#5: +7,+9 1PB#6: +16,+19 1PB#7: +12,+22 1PB#8: +1,+9,+22 1PB#9: -X,+16	9/13 (69.2)
F	41	1PB#1: -19 1PB#2: +2,-19	2/9 (22.2)
F'	41	1PB#1: +1,+4,+7,+8,+18,+19,+22 1PB#2: -21	2/8 (25)
TOTAL	>35		15/34 (44.1)

Table 4. Relation of the aneuploidies observed in the eight couples included in the DF-PGP program. The aneuploidy rate per oocyte retrieved, per patient and in both groups of patients (female \leq or $>$ than 35 y.o.) are shown.

Couple	Developed Embryos	Successful Embryo Biopsy	Biopsy Success %	HOMOZ. Wt / Wt (%)	HETEROZ. Wt / Mut (%)	HOMOZ. Mut / Mut (%)	Undiagnosed (%)	ADO %	WGA Success %
Obradors et al. 2009	12	12	100	6	6	0	0	8.3	90
A	8	8	100	1	3	4	0	13.3	86
A'	11	11	100	5	3	2	1	10	90
B	6	6	100	3	0	2	1	8.3	100
C	6	6	100	3	2	1	0	16.6	100
Obradors et al. 2008	2	2	100	0	1	1	0	0	100
D	4	4	100	1	3	0	0	25	100
E	18	18	100	1	8	5	4	50	85
F	5	5	100	0	3	2	0	12.5	91.6
F'	9	9	100	0	5	4	0	10	90
TOTAL	81	81	100	20 (26.7)	34 (45.3)	21 (28)	6 (7.4)	15.4	93.3

Table 5. Summary of the mutation analysis performed in blastomeres produced by the couples included in the present DF-PGP program. ADO=Allele dropout, obtained during the analysis of the blastomeres; WGA=Whole genome amplification.

Couple	Maternal Age	Diagnosed Embryos	DF-DGP Transferable (%)	DF-DGP Non – Transferable (%)	PGD Transferable (no 1PB-CGH) (%)	DF PGD Transferred Embryos	PGD Transferred Embryos	Take-Home Baby (%)
Obradors et al. 2009	30	12	5	7	0	2	0	2 DF PGD
A	32	8	3	5	0	2	0	0
A'	32	10	2	6	2	1	1	0
B	32	5	1	3	1	1	1	0
C	33	6	0	4	2	0	2	1 PGD
Obradors et al. 2008	35	2	1	1	0	1	0	1 DF PGD
D	37	4	0	4	0	0	0	0
E	38	14	1	11	2	1	1	0
F	41	5	1	4	0	1	0	0
F'	41	9	1	5	3	0	3	0
TOTAL		75	15 (20)	50 (66.7)	10 (13.3)	9	8	3:1 (33.3):(12.5)

Table 6. Clinical outcome after DF-PGD. The implantation rate achieved with the embryos doubly selected (DF-PGD transferable embryos) and the embryos singly selected for the monogenic disease (PGD transferable embryos) are compared.

5. Discussió

5.1. Estudi d'aneuploidies d'oòcits de donants de cicles de reproducció assistida.

S'han obtingut perfils de CGH molt satisfactoris dels 84 dobles (1CP i MII) obtinguts de 53 dones joves donants d'oòcits de centres de FIV. L'eficiència de la tècnica de CGH, per a l'estudi de tot el complement cromosòmic, possibilita una anàlisi detallada d'un material biològic que fins ara ha estat molt poc estudiat. Això és probablement degut a la seva poca disponibilitat atesa la gran demanda que aquests oòcits tenen en la seva aplicació clínica. De fet, els oòcits obtinguts de donants s'empren en el 28 % dels cicles de FIV (Andersen i col·l., 2008).

Dins d'aquest objectiu s'han estudiat dos tipus d'oòcits de donants diferents, oòcits "frescos", és a dir, que en el moment de la punció fol·licular són madurs i que, per tant, han extrusionat el 1CP, i oòcits madurats *in vitro* (MIV), els quals, com que estan en estadi de MI després de la punció fol·licular, s'han incubat a 37 °C fins que han assolit l'estadi de MII.

En estudis publicats anteriorment s'han estudiat oòcits "frescos" de donants, hi ha una gran variació en la taxa d'aneuploidia observada segons el grup de recerca i la tècnica usada. Considerant tan sols els estudis en què s'ha fet l'anàlisi de tots els cromosomes, s'han obtingut valors d'aneuploidia entre el 29 % (Sandalinas i col·l., 2002) i el 65 % (Sher i col·l., 2007), passant pel 56% (Keskintepi i col·l., 2007).

Aquests valors contrasten amb els obtinguts en el present estudi, en el qual només el 17,85 % del oòcits "frescos" contenen alguna aneuploidia. Aquesta diferència, molt més marcada en els treballs de Sher (Sher i col·l., 2007) i de Keskintepi (Keskintepi i col·l., 2007), que també utilitzen la CGH, pot ser explicada pel mètode d'amplificació del DNA de cèl·lules úniques (1CP i MII) utilitzat. En lloc d'emprar la DOP-PCR, segons explica l'autor, que descriu inicialment la CGH (Voullaire i col·l., 1999, Wells i col·l., 1999), usen la tècnica de la MDA (*Multiple Displacement Amplification*). Aquesta modificació metodològica, segons s'ha proposat, pot alterar la mostra i generar falsos positius (Fragouli i col·l., 2007).

D'altra banda, també hi ha estudis citogenètics d'oòcits de donants MIV, publicats, que evidencien unes diferències rellevants en la incidència d'aneuploidies segons el grup i la tècnica emprada. Altre cop, només considerant els estudis que inclouen l'anàlisi de tot el complement cromosòmic, els valors d'aneuploidia varien entre el 4,5 % (Fragouli i

col·l., 2007), el 7,8 % (Pellestor i col·l., 2003) fins al 23 % Gutierrez-Mateo, i col·l., 2004a).

Segons els resultats d'aquest estudi, el 35,7 % dels oòcits MIV presenten aneuploïdies, un valor també diferent dels publicats anteriorment. Aquestes discordances, possiblement, serien degudes a diferències en la mida de les mostres analitzades, diferències en els processos de maduració *in vitro* utilitzats, o bé a diferències intrínseques en les donants.

Sigui com sigui, la gran variació entre les taxes d'aneuploïdia publicades en les dues categories d'oòcit fa difícil la seva comparació i l'extrapolació d'algun efecte lligat a la maduració *in vitro*.

El nostre estudi és el primer que analitza simultàniament, emprant la mateixa tècnica i amb els mateixos criteris d'anàlisi, tots dos grups d'oòcits ("frescos" i MIV). Els resultats indiquen que tot i que hi ha un increment d'aneuploïdia en els oòcits MIV respecte dels "frescos", aquesta diferència no és estadísticament significativa ($p = 0,38$). Considerant els 84 dobles analitzats, en un sol grup, se n'ha detectat aneuploïdia en el 32,1 %. Però si tan sols comptabilitzem els dobles que tenen l'oòcit (o MII) aneuploide i que, per tant, són potencialment responsables d'originar un embrió aneuploide en ser fecundats, el risc de aneuploïdia per a la descendència es redueix al 23,8 %.

En aquest treball s'han identificat aneuploïdies de dos orígens diferents: 1) aneuploïdies degudes a errors produïts en la primera divisió meiótica i 2) degudes molt probablement a errors mitòtics originats durant l'ovogènesi.

Quan l'aneuploïdia detectada en el ICP és complementària amb la de la MII, és a dir, que una de les cèl·lules presenta, per exemple, pèrdua de material cromosòmic, mentre que en l'altra apareixia un guany pel mateix cromosoma, o a l'inrevés, es considera que l'aneuploïdia és deguda a un error en la primera divisió meiótica.

Però també s'ha identificat oòcits en les cèl·lules del doblet (el ICP i la MII) són no complementàries, ja que una presenta aneuploïdia mentre l'altra és euploide. En aquests casos, sent les donants euploides 46,XX, l'aneuploïdia present a l'oogònia s'ha originat per un error produït en les divisions mitòtiques en l'ovari dels fetus durant la gestació. Aquest fet es coneix inequívocament com a mosaïcisme gonada, i més correctament com ovaris amb oogònies aneuploides.

Un total del 17,8 % oòcits estudiats (15 de 84) presentaven aneuploïdia deguda a errors en la primera divisió meiótica, mentre que un total del 15,5 % (13 de 84) de les aneuploïdies detectades mostraven alteracions degudes a oogònies aneuploides.

Si es té en compte el total de cromosomes aneuploides detectats, el 51,7% (30 de 58) estaven involucrats en aneuploïdia per errors en la primera divisió meiótica, mentre que la resta, el 48,3 % (28 de 58), van ser deguts a errors en les divisions mitòtiques de les oogònies.

D'altra banda, el 22,6 % de les donats van generar com a mínim un oòcit aneuploide per errors en la primera fase meiótica, i també un altre 22,6 % de les donants van produir oòcits amb aneuploïdies originades durant la fase mitòtica de l'ovogènesi.

El mosaïcisme gonadal, o l'existència de oogònies aneuploides en l'ovari originades en la fase mitòtica de la ovogènesi, va ser descrit inicialment en una pacient amb cariotip euploide que va presentar quatre gestacions aneuploides afectades de síndrome de Down (Cozzi i col·l., 1999). Immediatament després, també es va identificar estudiant amb FISH set cromosomes en oòcits (1CP i MII) de sis pacients de FIV. Dues d'elles presentaven errors en els seus oòcits explicables per el mosaïcisme (Mahmood i col·l., 2000). En el nostre grup, i també emprant FISH, però aquest cop per nou cromosomes, es va descriure que el 25,7% de les 66 pacients estudiades (edat mitjana de 33,7 anys) havien produït també aneuploïdies per causa d'errors mitòtics en les oogònies (Pujol i col·l., 2003).

Alhora, en el mateix any, un altre estudi que analitzava deu pacients (edat mitjana de 32,6 anys) amb FISH per vuit cromosomes, va detectar que el 20 % de les pacients presentaven oòcits aneuploides provocats per oogònies trisòmiques (Cupisti i col·l., 2003).

A més, hi ha treballs que utilitzant la CGH també detecten aquest tipus d'alteracions. En dues publicacions prèvies del nostre grup, l'11,9 % i el 20 % de les alteracions detectades en 46 i 21 pacients amb edat mitjana de 34,9 i 33,2 anys, respectivament, eren degudes a oogònies aneuploides (Gutierrez-Mateo i col·l., 2004a, Gutierrez-Mateo i col·l., 2004b). I en altre estudi que emprava la CGH, per a l'anàlisi d'oòcits de 46 pacients de 32,5 anys de mitjana, el 22,2 % de les aneuploïdies observades eren provocades per mosaïcisme gonadal (Fragouli i col·l., 2006b).

Tot i que els errors mitòtics han estat descrits àmpliament en pacients de FIV, mai fins ara no s'havien descrit en oòcits de donants, tal com s'ha fet en aquest estudi. Això es pot explicar pel fet que les publicacions en les quals s'ha estudiat la citogenètica d'oòcits de donants, només s'ha analitzat una de les dues cèl·lules del doblet (el 1CP o bé la MII) i, en conseqüència, no ha estat possible diferenciar entre ambdós orígens

d'aneuploïdies esmentats: l'error meiòtic de l'error mitòtic (Sandalinas i col·l., 2002, Keskinetepe i col·l., 2007, Sher i col·l., 2007).

Els nostres resultats indiquen que cal considerar el mosaïcisme gonadal com un fet molt més freqüent en la població del que s'havia pensat inicialment. De fet, la generalització d'aquest fenomen també ha estat proposada recentment per Hultén i col·l. després de detectar en vuit fetus euploides de fins a 22 setmanes, una incidència del 0,54 % de les oogònies trisòmiques pel cromosoma 21 (Hultén i col·l., 2008).

Aquests autors postulen que el mosaïcisme gonadal és un fet normal en els fetus femella, tot i que aquesta hipòtesi no és consistent amb el conegut efecte de l'edat en l'increment de la incidència de la aneuploïdia. Aquesta incongruència queda resolta segons el model matemàtic de Zheng i col·l., que prediu la selecció d'oòcits en l'ovari. Segon (Zheng i col·l., 2000) és possible que els oòcits aneuploides presents a l'ovari, originats per errors mitòtics durant l'ovogènesi, ovulin al final de la vida reproductiva de la dona, i que, per tant, s'expliqui l'increment del risc de patir descendència aneuploide en pacients amb edat avançada

Però, el fet que la incidència d'errors mitòtics observats en les donants joves estudiades en aquest treball (22,6 %) (edat mitjana de 26,1 anys) sigui semblant a l'observada prèviament en pacients de FIV analitzades (11,9 % – 22,5 %) (amb un rang d'edat mitjana entre 32,5 a 34,9 anys) sembla que està en contradicció amb el model proposat per Zheng i col·l. i suggerit per Hultén i col·l., ja que s'esperaria un increment de la incidència d'aneuploïdies degudes a errors mitòtics en oòcits de pacients respecte dels oòcits de donants.

Cal tenir en compte una de les diferències entre els estudis que utilitzen oòcits descartats de cicles de FIV (ja siguin de donants o bé de pacients) i l'estudi realitzat per Hultén i col·l., és que només els primers han sofert una inducció hormonal. Aquest procés d'estimulació ovàrica pot ser responsable de seleccionar per a ovular els oòcits aneuploides que probablement s'haguessin ovulat, en condicions normals, en els últims episodis reproductius de la dona.

Els tractament hormonal aplicats en els cicles de FIV poden tenir un efecte similar tant en dones joves com en dones d'edat avançada, fet que podria explicar la incidència d'aneuploïdies d'origen mitòtic, a tots dos grups d'edat.

En el present treball, cap dels oòcits aneuploides deguts al mosaïcisme gonadal no presentaven aneuploïdia pel cromosoma 21. Això es pot explicar pel reduït nombre

d'òocits analitzats per donant (una mitjana d'1,5 òocits per donant) i per la reduïda incidència detectada (0,54 %) pel cromosoma 21 en el treball d'Hultén.

Tot i això, el fet que més de la meitat dels cromosomes han estat implicats en errors mitòtics de la línia germinal femenina, ens indica que aquest fenomen no només afecta el cromosoma 21 sinó qualsevol cromosoma del complement de les oogònies.

Un altre fet que cal ressaltar és que tal com es mostra a l'apartat de Resultats 4.1.1 (pàg. 66), cap dels òocits aneuploides originats per errors de la primera divisió meiótica no presenta aneuploïdies per a més d'un cromosoma. Tots ells són aneuploides només per a un sol cromosoma. D'altra banda, el 66,7 % dels òocits aneuploides deguts a anomalies meiótiques tenen més d'un cromosoma implicat. Aquesta diferència és significativa, la qual cosa suggereix que són conseqüència d'errors d'origen diferents. Les aneuploïdies originades durant la fase proliferativa de l'ovogènesi poden haver estat provocades per errors en el control del cicle cel·lular i, per tant, poden afectar la segregació cromosòmica d'una forma més generalitzada a tots els complements, la qual cosa pot explicar que la majoria d'òocits d'aquels grup presentin més d'un cromosoma involucrat (Barlow i Hultén, 1998, Tease i col·l., 2002).

En canvi, les aneuploïdies originades durant la primera divisió meiótica poden haver estat provocades per errors de sinapsi entre cromosomes homòlegs de forma específica, degut, per exemple, a una reducció en el nombre de quiasmes com a conseqüència d'alguna alteració en el patró de recombinació específic d'un bivalent. Així, aquests errors afectarien la segregació d'un bivalent en particular, i no pas el conjunt de cromosomes del complement i, per tant, s'explicaria també que a tots els òocits d'aquest grup només hi hagi un cromosoma implicat (Nicolaidis i Petersen, 1998, Wolstenholme i Angell, 2000, Hassold i Hunt, 2001).

S'han descrit àmpliament dos mecanismes responsables dels errors en la primera divisió meiótica: la no-disjunció dels cromosomes homòlegs i la predivisió de cromàtides germanes (Angell, 1997). En el present treball, però, no s'ha pogut distingir entre aquests dos mecanismes ja que utilitzant la CGH és molt difícil afirmar que el perfil de guany o pèrdua detectat implica un cromosoma o bé una cromàtide.

Aquesta limitació metodològica l'ha intentat resoldre el grup del Dr. Wells, usant la fluorescència residual (o *background*) que ha hibridat el cromosoma Y, que en analitzar òocits i ICP només pot ser artefactual, per a discriminar l'aneuploïdia deguda a cromosomes o a cromàtides (Fragouli i col·l., 2006c). En el nostre grup, i basant-nos en la nostra experiència prèvia (Gutierrez-Mateo i col·l., 2004a), en analitzar de forma

combinada el 1CP amb CGH i la MII emprant FISH per a comprovar la complementarietat, es va veure que perfils de guany o pèrdua en la CGH podien correspondre indistintament a guanys o pèrdues de cromàtides o de cromosomes en la MII.

D'acord amb l'increment significatiu de la presència d'embrions monosòmics respecte dels embrions trisòmics indicat per diferents autors (Munne i col·l., 1995, Márquez i col·l., 2000, Munne i col·l., 2004), en el present treball el 93,3 % dels guanys cromosòmics s'han observat en el 1CP. L'embrió que es produiria, per tant, seria molt probablement un embrió monosòmic per al cromosoma en qüestió.

Tot i la correlació entre aquests dos fets, els nostres resultats difereixen respecte dels publicats anteriorment, en què es mostrava un increment de guanys cromosòmics a la MII en lloc del 1CP (Kuliev i Verlinsky, 2004). Aquestes diferències poden ser degudes a les diferents tècniques utilitzades per fer els estudis, ja que a l'estudi citat s'usà la FISH per cinc cromosomes i tan sols s'analitzà el 1CP, i es va deixar la MII sense estudiar. Aquest fet pot provocar que possibles pèrdues artefactuals de material cromosòmic en el 1CP, degudes a la complicada fixació del 1CP, pugin haver estat comptabilitzades com a reals i que, per tant, impliquin un increment artefactual de les MII amb suposats guanys cromosòmics. Calen, doncs, més estudis complets de les dues cèl·lules del doblet (el 1CP i la MII), emprant tècniques d'estudi de tot el complement cromosòmic, amb la finalitat d'assolir conclusions definitives en aquest aspecte.

En els resultats del present treball es mostra que no hi ha cap relació entre la mida dels cromosomes i la seva implicació en l'aneuploïdia, ja que el 48,8 % dels cromosomes aneuploides eren de mida gran (grups A a C), mentre que el 51,2 % restant eren considerats de mida petita (grups D a G). Aquests resultats difereixen dels publicats anteriorment, que estudien tot el complement cromosòmic d'oòcits de donants. A l'estudi de Sandalinas i col·l., la majoria de les aneuploïdies van involucrar cromosomes petits, mentre que en el treball de Sher i col·l., els cromosomes més freqüentment implicats eren els cromosomes 4, 5, 6 i 22 (Sandalinas i col·l., 2002, Sher i col·l., 2007). Per tant, cadascun dels tres treballs mostren relacions diferents entre la mida dels cromosomes i l'aneuploïdia observada; per tant, calen més treballs per concloure definitivament aquest possible efecte.

Considerant ara la maduració *in vitro* d'oòcits, mundialment hi ha hagut força embarassos emprant oòcits MIV (Suikkari, 2008), tot i que hi ha molt pocs estudis que analitzin citogenèticament els embrions produïts amb aquest tipus d'oòcits. En el primer

cas que es va obtenir un embaràs després de transferir embrions de donants (MIV positius), només un dels cinc embrions era euploide per als vuit cromosomes diagnosticats amb FISH (80 % d'aneuploïdia) (Ao i col·l., 2006).

En el present treball, en els quinze dobles aneuploides deguts a errors de la primera divisió meiótica, l'aneuploïdia observada en oòcits "frescos" i MIV, tot i que és superior en els MIV (14,3 % i 19,6 %, respectivament), no són significativament diferents. Caldrien estudis superiors amb una mostra de dobles analitzats utilitzant CGH, o altres tècniques que permetin l'estudi de tots els cromosomes, per definir la relació entre la maduració in vitro d'oòcits i l'increment de l'aneuploïdia.

Per acabar, la no despreciable taxa d'aneuploïdia (37,7 %) en dones joves que participen en programes de donació d'oòcits per a cicles de FIV (20 de les 53 donants presentaven com a mínim un dels oòcits estudiats aneuploides), pot explicar el fet que s'obtinguin diversos resultats reproductius després d'usar els oòcits d'una mateixa donant per a diferents receptores. Prèviament, s'han analitzat altres factors que podrien explicar aquesta diferència, com per exemple, l'edat de la receptora, variables ginecològiques, la qualitat de l'esperma i dels embrions, o bé el nombre d'embrions transferits, però cap d'aquests factors no ha resultat significativament diferent entre les receptores que aconseguen un embaràs amb els oòcits de donants, comparat amb les que no l'assolien, tot i emprar oòcits de la mateixa donant (Garcia-Velasco i col·l., 2003, Bodri i col·l., 2007). Aquesta explicació és concordant amb el fet que el 57 % dels embrions, analitzats amb FISH per vuit cromosomes, derivats d'oòcits de donants presenten aneuploïdies (Munne i col·l., 2006).

A fi de superar aquest problema, el diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) ha estat proposat per minimitzar-ne l'efecte, en els cicles de FIV, de l'aneuploïdia present en els oòcits. El DGP emprant FISH s'aplica àmpliament en la majoria dels centres de FIV, tot i que recentment s'ha demostrat que no hi ha un increment clar de la taxa d'implantació, o fins i tot una disminució, després de l'estudi d'aneuploïdies usant FISH, comparat amb cicles de FIV sense DGP (Staessen i col·l., 2004, Mastenbroek i col·l., 2007, Hardarson i col·l., 2008, Staessen i col·l., 2008). Fins i tot, si analitzem els resultats presentats pel ESHRE (European Society of Human Reproduction & Embryology), només el 13,5% dels embrions seleccionats amb DGP usant FISH que es transfereixen acaben implantant i desenvolupant l'embaràs desitjat (Goossens i col·l., 2008), mentre que, tal com s'ha comentat anteriorment, en cicles de FIV sense DGP el 30 % d'embrions implanten (Andersen i col·l., 2008).

Un dels motius per a aquesta reduïda taxa d'implantació, tal com s'explicarà detalladament en el punt 3 de la Discussió, es deu al fet que s'analitzen tan sols de 5 a 9 cromosomes del complement (Cohen i col·l., 2007).

De fet, si en lloc de CGH el present estudi hagués estat fet amb FISH per a nou cromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y), només el 39,1 % de les cèl·lules aneuploides s'haurien pogut detectar totalment, el 2,2 % s'haurien detectat parcialment les aneuploïdies, i el 58,7 % de cèl·lules restants, la FISH no hagués detectat cap aneuploïdia en els 9 cromosomes estudiats i, per tant, haguessin estat diagnosticades com a euploides, tot i haver detectat aneuploïdies en altres cromosomes per CGH.

Per tant, basant-nos en els resultats obtinguts en aquest treball i amb l'objectiu d'augmentar la taxa d'implantació dels embrions transferits, no només és recomanable fer el DGP en receptores d'oòcits de pacients de FIV, sinó també en dones joves com a donants d'oòcits, i es recomana l'ús de la CGH. Cal recordar que a causa de l'alta incidència d'aneuploïdies degudes al mosaïcisme gonadal també és necessari, tal com sempre es recomana en el DGP, que es faci un diagnòstic prenatal en cas d'embaràs.

5.2. Mètodes moleculars alternatius d'aplicació al Diagnòstic Genètic Preimplantacional.

5.2.1. Detecció d'aneuploïdies mitjançant la MLPA.

En el present treball, mentre s'ha observat una bona amplificació de les sondes que s'analitzen amb els *kits* de MLPA, de l'ordre del 90 – 97 % de les sondes (vegeu l'apartat 4.2.1 de Resultats), els resultats citogenètics han estat molt incongruents.

Si bé l'enzim Phi29 que s'utilitza en la MDA afavoreix l'amplificació de la totalitat de genoma cel·lular, cosa que expressa una elevada eficiència qualitativa, per contra la MDA presentaria una baixa eficiència quantitativa. Això produiria una elevada variació en el nombre de còpies de les sondes de cada cromosoma que analitza un *kit* de MLPA. És a dir, la MDA amplifica totes les sondes però de forma no proporcional. Per aquest motiu després de la MDA, ja no és possible detectar les diferències existents entre les quantitats de sondes en el producte de la cèl·lula aneuploides respecte de l'euploide.

Aquest fet pot estar lligat a l'amplificació preferencial de determinades regions del genoma. Tot i que la MDA utilitza primers totalment degenerats, i que, per tant, s'uneixen per tot el genoma, algunes regions poden amplificar-se més que altres.

Aquests resultats sembla que contrasten amb els recentment obtinguts en emprar la MDA per amplificar blastòmers per a la seva posterior anàlisi amb array-CGH (Le Caignec i col·l., 2006, Hellani i col·l., 2008), ja que tots detecten les aneuploïdies previstes, i les confirmen mitjançant FISH. La diferència principal entre la MLPA i l'array-CGH és el nombre de sondes que s'analitza per cromosoma. Mentre la MLPA detecta un màxim de vuit sondes, l'array-CGH n'analitza milers, depenent del model d'array-CGH emprat. En concret, en el treball citats (Le Caignec i col·l., 2006, Hellani i col·l., 2008) va ser d'una sonda cada 1.000 kb (1 kb equival a 1000 parells de bases) o d'una per cada 44 kb, respectivament.

El gran nombre de sondes analitzades en els arrays-CGH justifica, tot i emprar la MDA, la seva capacitat de detectar aneuploïdies. En fer servir tantes sondes per cromosoma (per exemple, el cromosoma 21 que té 47 Mb; 47,000 kb, per tant, un total de 47 o de 1,068 sondes, respectivament segons l'array). Les variacions quantitatives que genera la MDA degut a l'amplificació preferencial queden diluïdes i afecten la majoria de les sondes. Per tant, fa possible detectar l'alteració cromosòmica.

Recordem que emprant el MLPA, cinc de les vuit sondes ja detectaven l'aneuploïdia. Així doncs, si en lloc de vuit sondes, se n'utilitzessin 1.068, possiblement, l'efecte perjudicial de la MDA quedaria diluït i es podria detectar l'alteració, tal com es mostra que succeeix en l'array-CGH.

Així doncs, tot i que la MLPA s'aplica àmpliament en el diagnòstic prenatal, no hem estat capaços d'adaptar el seu ús al diagnòstic preimplantacional. La utilització d'altres mètodes d'amplificació cel·lular diferents de la MDA, com la DOP-PCR, la PEP-PCR o el Genomeplex, o l'aparició de nous *kits* de MLPA que permetin detectar més sondes per cromosoma, poden ser diferents opcions per possibilitar la futura aplicació de la MLPA en el DGP. Amb els nostres resultats, podem de moment concloure que no és viable la seva utilització en cèl·lules aïllades.

5.2.2. Optimització de la detecció de múltiples mutacions en cèl·lula aïllada mitjançant *CF Assay*.

L'aplicació de la MDA, alternativament a la I-PEP-PCR, prèvia a l'aplicació del *kit* CF Assay ha rendit un 100 % d'amplificació respecte del 90 %, però el que encara és més important, s'obté una alçada dels pics a l'electroferograma molt superior: mentre que amb la I-PEP-PCR només un 40 % dels al·lels tenien alçades superiors a 250 rfu, amb la

MDA, el 100 % dels al·lels tenen una alçada superior a 250 rfu i, de fet, tenen una alçada mitjana de 886,2 rfu. Així doncs, la MDA genera un DNA de major qualitat, que permet una amplificació més eficient de cadascun dels 32 al·lels del *kit* de CF assay. Per altre banda, la MDA no ha permès optimitzar el consum de reactius del kit, ja que el Protocol del 25% no va donar cap resultat.

Així doncs, calia augmentar la qualitat i concentració del producte de la MDA per tal de intentar millorar els resultats. Tenint això present, es va optar per un mètode per augmentar la concentració del DNA, com la pròpia reacció de MDA. El protocol de la MDA, de fet, no està plantejar originalment pel seu fabricant com a una tècnica d'amplificació del genoma d'una sola cèl·lula, sinó més aviat per amplificar DNA de mostres amb DNA de mala qualitat o poc concentrat, o mostres de DNA de molt valor o difícil d'obtenir que s'està exhaurint. Per tant, seguint les utilitats originals del protocol de MDA, podem reamplificar un producte de MDA amb una segona reacció, o ronda, de MDA, per així, augmentar la seva concentració original.

Aplicant una MDA de segona ronda (MDA2R), el rendiment del *kit* és encara més superior i permet quadruplicar el nombre de reaccions del CF Assay respecte de les previstes comercialment. És remarcable comentar, que fins i tot utilitzant MDA2R amb el 25 % dels reactius recomanats, s'obté una amplificació amb uns al·lels que presenten uns valors de rfu molt superiors al que s'obtenen amb DNA genòmic utilitzant el 100 % dels reactius, concretament de 886,2 i 251,8 rfu, respectivament.

Aquests resultats preliminars són molt prometedors, tot i que en ser aplicats a un sol blastòmer portador de la mutació 3849+10kb C to T, abans de la seva aplicació a casos clínics de DGP, caldrà efectuar totes les verificacions pertinents.

5.3. Descripció i aplicació clínica del protocol de Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor (DF-DGP).

La selecció d'embrions més adequats per a la transferència ha estat sempre un pas decisiu per a l'èxit final de cicles de fecundació *in vitro* (FIV). En la majoria de casos, aquesta selecció es basa en paràmetres morfològics de l'embrió, tals com el nombre de blastòmers presents, la seva simetria o la presència de fragments, etc. Segons l'ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*), quan s'utilitza aquest mètode de selecció s'assoleix una taxa d'implantació (embrions transferits / embrions implantats) del 30,1 % (Andersen i col·l., 2008). Tot i aquests valors relativament

favorables, hi ha determinats grups de pacients, com ara pacients amb edat avançada (AMA: *Advanced Maternal Age*), és a dir, majors de 35 anys, o bé pacients amb avortaments de repetició, que requereixen una selecció embrionària més exhaustiva a fi d'assolir la seva consegüent implantació. Justament amb aquest objectiu va néixer el PGS (*Preimplantacional Genetic Screening*), que permet la selecció d'embrions lliures d'aneuploïdies per a la transferència, ja que està descrit que errors en el nombre de cromosomes presents a l'embrió són la causa més freqüent d'avortaments (Hassold i Jacobs, 1984, Menasha i col·l., 2005).

En la immensa majoria de PGS s'utilitza la tècnica de FISH com a mètode de detecció d'aneuploïdies, que permet l'estudi de fins a tretze cromosomes (Abdelhadi i col·l., 2003), tot i que, rutinàriament, s'utilitzen tan sols sondes específiques per als següents nou cromosomes: 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y (Pujol i col·l., 2003). Emprant la FISH, per tant, un 60 % (14/23) dels cromosomes de l'embrió no s'analitzen. Tot i aquestes limitacions, la FISH s'aplica intensament des de la seva descripció, ara fa ja més de dotze anys (Munne i Weier, 1996, Verlinsky i col·l., 1996a, Verlinsky i col·l., 1996b).

Recentment, però, han aparegut diversos estudis que després de comparar la taxa d'implantació de pacients tractats amb PGS amb la taxa obtinguda de pacients de FIV control sense PGS, han descrit que no hi ha increment de la taxa d'implantació després del PGS emprant FISH, i que, fins i tot, aquesta és menor que en pacients de FIV control (Staessen i col·l., 2004, Mastenbroek i col·l., 2007, Hardarson i col·l., 2008, Staessen i col·l., 2008). Conclusions semblants es poden assolir en analitzar les dades de l'ESHRE, on tan sols el 13,5 % dels embrions transferits seleccionats amb FISH acaben implantant (Goossens i col·l., 2008), comparat amb el 30,1 % d'implantació en pacients de FIV sense PGS citat anteriorment per la mateixa organització.

Una possible explicació per aquest reduït efecte del PGS usant FISH en la taxa implantació és que tal com hem apuntat anteriorment, només es detecten aneuploïdies en el 40 % dels cromosomes, i es deixa la majoria sense analitzar, la qual cosa pot provocar que un embrió diagnosticat com a euploide per FISH i, per tant, recomanat per a la transferència, pugui contenir altres alteracions en els cromosomes no detectats i, consegüentment, amb nul·les possibilitats d'èxit. Cal, doncs, fer una detecció de tots els cromosomes de l'embrió per assegurar que és totalment euploide, i que és recomanable per a la transferència.

Hi ha diverses tècniques que permeten analitzar tots els cromosomes en cèl·lules aïllades, la CGH i l'array-CGH. La diferència bàsica entre totes dues tècniques rau que en la CGH convencional, les sondes generades a partir de la cèl·lula problema i de la cèl·lula control hibriden sobre metafases de limfòcits euploides, mentre que en l'array-CGH, ho fan sobre petits fragments dels cromosomes (oligonucleòtids). Això provoca que l'array-CGH tingui més resolució, és a dir, detecti anomalies que impliquin més material cromosòmic i, a la vegada, que sigui un procés molt més ràpid que la CGH convencional. Recentment, s'ha aplicat l'array-CGH en el PGS, i s'han obtingut cinc embarassos en pacients amb una història prèvia de com a mínim set intents fallits de FIV (Hellani i col·l., 2008). A més, prèviament, diverses publicacions ja havien demostrat l'aplicabilitat de l'array-CGH en el PGS (Hu i col·l., 2004, Wells i col·l., 2004, Le Caignec i col·l., 2006, Fiegler i col·l., 2007). Tot i aquest resultat tan encoratjador, l'ús de l'array-CGH en el PGS queda de moment limitat pel preu del fungible i de la infraestructura necessaris i a l'espera de més estudis clínics per demostrar-ne la veritable eficiència. Així doncs, fins a la seva total implantació, la CGH convencional continua sent la tècnica d'elecció per al diagnòstic d'anomalies a tots els cromosomes.

La CGH s'ha aplicat múltiples vegades al PGS, en les dues opcions possibles, en l'anàlisi del 1CP (1CP-CGH) o del blastòmer (BI-CGH) (Voullaire i col·l., 2002, Wells i col·l., 2002, Wilton, 2005, Keskinetepe i col·l., 2007, Sher i col·l., 2007). Les dues opcions tenen els seus avantatges i els seus inconvenients. La BI-CGH aporta informació de tot l'embrió i, per tant, s'analitzen les possibles aneuploïdies originades pel factor femení, pel masculí, com també les originades en les primeres divisions del propi embrió. Per contra, en requerir el protocol de CGH, de tres a quatre dies per començar a obtenir resultats, cal congelar els embrions, esperar el diagnòstic de la CGH, descongelar els embrions euploides i transferir-los en un altre cicle. Això implica dos desavantatges importants: el primer és el procés de congelació i descongelació, que provoca que un 33 % – 50 % dels embrions descongelats no sobrevisquin al procés (Hill, 2003, Jericho i col·l., 2003, Munne i Wells, 2003, Verlinsky i Kuliev, 2003, Wilton i col·l., 2003). El segon fa referència a les molèsties que rep la pacient per passar un altre cop per un procés d'estimulació hormonal, necessari per a preparar l'endometri per a la transferència.

D'altra banda, la 1CP-CGH té l'avantatge que en obtenir el 1CP en el moment de la fecundació, hi ha prou temps com per obtenir els resultats de la CGH entre el dia +3 i

+4 i, per tant, possibilita la transferència dels embrions seleccionats en el dia +5, dins del mateix cicle de FIV, sense la necessitat de congelar els embrions. Per contra, l'anàlisi del 1CP només ens informa de les alteracions originades durant la primera divisió meiótica femenina, mentre queden inadvertides les alteracions de la segona divisió meiótica femenina, les originades en les divisions meiótiques masculines, com també les provocades per errors mitòtics en l'embrió. Tot i no detectar tots els possibles orígens d'aneuploïdia, està descrit que la majoria d'aneuploïdies embrionàries s'originen en la primera divisió meiótica (Nicolaidis i Petersen, 1998, Hassold i Hunt, 2001). Per tant, la 1CP-CGH, en detectar aquest tipus d'alteracions, aporta una informació rellevant de la probabilitat que l'embrió originat de l'oòcit analitzat indirectament per 1CP-CGH sigui euploide, en el cas que el 1CP també ho sigui.

En el nostre grup, que ja tenia experiència en 1CP-CGH (Gutierrez-Mateo i col·l., 2004a, Gutierrez-Mateo i col·l., 2004b) ens vam plantejar aquesta opció com la més aplicable per al PGS.

Com a pacients candidats per l'anàlisi de 1CP-CGH es van escollir famílies portadores de malalties genètiques que havien contactat amb nosaltres per fer un DGP per detectar la seva malaltia genètica en particular. Aquest tipus de parelles, segons l'ESHRE, tot i que no tenen problemes d'esterilitat, ni presenten AMA (edat mitjana de 33–34 anys), tenen una baixa taxa d'implantació del 13,2 %, semblant a la dels pacients de PGS (13.5%) (Goossens i col·l., 2008). Aquest tipus de pacients, per tant, també es podrien beneficiar de l'anàlisi completa del complement cromosòmic dels seus embrions amb 1CP-CGH, ja que tal com s'ha dit anteriorment, l'aneuploïdia podria provocar aquesta reduïda taxa d'implantació.

Així doncs, els embrions provinents d'aquest pacients se sotmetran a dos diagnòstics preimplantacionals diferents: el de detecció de la malaltia monogènica que pateixen i el de detecció d'aneuploïdies. Per tal de seleccionar per a transferir, els embrions lliures de la malaltia familiar, i originats per un oòcits euploide i, per tant, potencialment euploides.

Aquesta doble anàlisi l'hem batejat "Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor (DF-PGD)".

En aquest treball, es recullen els resultats de les primeres aplicacions clíniques del DF-PGD, aplicades en els primers dos anys d'experiència, que es discuteixen detalladament a continuació.

Pel que fa al diagnòstic de les malalties monogèniques, l'estratègia seguida ha estat satisfactòria, basada en la combinació de dos mètodes diagnòstics independents: un mètode directe i un d'indirecte, el que minimitza les probabilitats d'error. Com a mètode de detecció directe, s'ha emprat el *MiniSequencing*, que ha permès el genotipatge directe de la mutació, sempre que implica un canvi de nucleòtid. La tècnica del *MiniSequencing* és molt sensible i, a més, permet la detecció de més d'una mutació alhora en la mateixa reacció, la qual cosa fa que sigui un mètode molt utilitzat en DGP (Cram i col·l., 2003, Fiorentino i col·l., 2003, Iacobelli i col·l., 2003). En mutacions que impliquen un canvi del nombre de bases de la còpia mutant, com en la dF508, en la qual hi ha una deleció de tres nucleòtids, no s'ha utilitzat el *MiniSequencing* sinó que s'ha detectat la mutació mitjançant la diferent mida de fragments corresponents a cada al·lel. Emprant aquesta metodologia, s'obté el resultat molt més ràpidament que amb el *MiniSequencing*, ja que amb una sola ronda d'amplificació ja es poden observar en el seqüenciador de DNA els productes amplificats, sent, a més, igual de sensible i fiable. Com a mètode indirecte per a la detecció de la mutació monogènica, s'han usat els microsatèl·lits tetranucleòtids, com a mínim un a cada costat del gen implicat en la malaltia. L'avantatge d'emprar els microsatèl·lits rau que cadascun d'ells aporta informació sobre el genotip de l'embrió. Com més STR implicats en el diagnòstic hi ha, més robust i acurat és.

La combinació de tots dos sistemes de diagnòstic és imprescindible per fer un DGP per a malalties monogèniques, tal com es fa en la majoria de grups dedicats a aquesta tasca (Abou-Sleiman i col·l., 2002, De Rycke i col·l., 2005, Kuliev i col·l., 2006).

Prèviament a l'amplificació per PCR dels loci necessaris per fer tant el diagnòstic directe com l'indirecte, els blastòmers s'han amplificat emprant la tècnica del MDA (*Multiple Displacement Amplification*) amb l'objectiu d'augmentar la quantitat de DNA d'un sol blastòmer disponible i, en conseqüència, de generar en les amplificacions de PCR posteriors, amplicons més intensos. L'ús de la MDA, a més, possibilita la repetició de les reaccions de PCR, en el cas de dubte o errors deguts, per exemple, a contaminació.

A més, l'ús de la MDA també ha estat favorable en l'optimització de reaccions de PCR. Ha permès realitzar reaccions de PCR en lloc de fer-ho amb un mínim de quatre loci simultàniament (vuit encebadors diferents que han d'unir-se al DNA diana correctament alhora), amb menys loci involucrats. D'aquesta manera s'obtenen millors

amplificacions i, ahora, redueix el temps requerit per a la posada al punt del protocol de detecció de les mutacions (Coskun i Alsmadi, 2007).

La MDA, tot i que té molts avantatges, també té un gran inconvenient: l'ADO (*Allele Drop Out*) que és el fenomen que explica que en una cèl·lula heterozigota per a un locus en particular, tan sols es detecti un dels dos al·lels presents en la cèl·lula. Aquest fet, característic en l'anàlisi de cèl·lules úniques, és crític ja que pot provocar errors en la diagnosi. En el cas d'una patologia monogènica dominant, per un embrió heterozigot afectat si l'al·lel mutant pateix un ADO, serà diagnosticat erròniament com a sa, es recomanarà la seva transferència, i si implanta, donarà lloc a descendència amb la malaltia dominant en qüestió.

L'ADO no només afecta els productes de MDA, sinó quan s'utilitzen directament els blastòmers sense amplificar en les reaccions de PCR. Segons es descriu en estudis de sèries de cèl·lules amplificades amb MDA més grans, entre un 25 % – 27 % de les cèl·lules heterozigotes amplificades amb MDA presenten ADO (Burllet i col·l., 2006, Renwick i col·l., 2006). D'altra banda, quan no s'aplica la MDA, l'ADO sol afectar un 10 % dels loci amplificats (Thornhill i col·l., 2005). Tot i que encara no es coneix el motiu d'augment de l'ADO és un dels major inconvenients pels de tractors de la MDA. Per superar aquesta limitació intrínseca de la MDA i reduir el risc d'error en el diagnosi degut a l'ADO, s'amplifiquen el màxim de loci possibles i, d'aquesta manera, tot i que l'ADO pot afectar algun d'ells, la informació que es pot extreure dels altres permetrà la seva detecció de l'ADO i, per tant, s'evita el risc de diagnòstics erronis. Aquesta aproximació també s'aplica en el PGH (*Preimplantation Genetics Haplotyping*) en què s'amplifiquen fins a 57 loci per a cada blastòmer, prèviament amplificats per MDA (Renwick i col·l., 2006). En aquest cas, el risc de cometre un error diagnòstic queda reduït de forma casi total, ja que implicaria l'aparició d'ADO de forma simultània en cada un dels 57 loci estudiats.

En els resultats preliminars inclosos en el present treball, dels 81 blastòmers analitzats, tan sols un 15,4 % presentaven ADO. Aquest valor és molt per sota del descrit per altres grups amb un nombre de cèl·lules analitzades semblants, i semblant també al que s'observa en blastòmers no amplificats per MDA. Aquesta diferència pot ser deguda a la mida del fragment amplificat per PCR, ja que està descrit que com més llarg siguin els amplicons, més taxa d'ADO presenten, ja que es postula que l'ADO està provocat, en part, per fragments de cadena única en el DNA diana que cal amplificar, que impossibiliten la seva amplificació exponencial via PCR. Segons aquesta hipòtesi, com

més llarg és el fragment a amplificar, més opcions hi ha que es produeixin trencaments monocadena de DNA i, per tant, més ADO (Wells, 2004).

Malauradament, tot i la considerablement baixa taxa d'ADO observada en els nostres resultats, un dels embrions diagnosticats com a sans, la fibrosi quística (família C) que va ser transferit a la pacient i, a més, va implantar, resultà un individu sa heterozigot portador de la mutació dF508 detectat en el diagnòstic prenatal realitzat externament. En aquest cas l'ADO ha afectat d'una banda l'al·lel mutant per a la mutació dF508, i a més, ha afectat l'al·lel mutant del microsatèl·lit semiinformatiu per a aquesta mutació. Creiem que aquesta alta incidència d'ADO en una mateixa cèl·lula, conjuntament amb la no amplificació d'un dels microsatèl·lits s'ha degut al fet que, o bé, la cèl·lula en qüestió estava degradada en el moment de la biòpsia, o bé no es va lissar correctament en començar el protocol de MDA. Ambdós incidències impliquen que la qualitat del DNA que s'amplifica és altament determinant dels resultats. Aquest fet reforça la indicació de procedir sempre al diagnòstic prenatal en cas d'assolir un embaràs a fi de comprovar el diagnòstic fet amb DGP, ja que tot i tractar-se d'un procediment plantejat per assolir la seguretat i màxima robustesa diagnòstica, mai no ho és amb el 100 %.

Pel que fa a l'anàlisi de les aneuploidies d'origen femení mitjançant l'estudi citogenètic del 1CP mitjançant CGH, una primera observació morfològica del 1CP dona molta informació que ha correlacionat amb els perfils obtinguts en la seva CGH. En general, s'ha establert força coincidència entre 1CPs amb morfologia anòmala, és a dir, bilobulats, multilobulats o fragmentats, i l'existència d'una amplificació de la DOP-PCR pobre, inexistent o no satisfactòria, visualitzada en el gel d'agarosa com una pinzellada de DNA semblant al control negatiu. Així mateix, en visualitzar la hibridació al microscopi, el senyal és molt tènue o bé amb molt de soroll de fons que, en qualsevol dels casos, coincideix amb l'absència de perfils de CGH adequats i, per tant, no és analitzable i impedeix el diagnòstic del corresponent oòcits. En canvi, s'ha observat que el 1CPs totalment esfèrics i d'una mida estàndard, solen amplificar-se correctament amb DOP-PCR, fet que es comprova també amb un gel d'agarosa informatiu del producte de la DOP adequadament amplificat, i en molts casos coincident amb una hibridació de la CGH en el microscopi de fluorescència, de senyal intens, uniforme per a tots els cromosomes.

Dels 115 1CP analitzats dins del DF-DGP fets en aquest treball, tan sols quatre no s'han pogut analitzar degut al fet que la qualitat de la CGH no ho ha permès, per la morfologia anòmala dels 1CPs. Per tant, l'eficiència global de la CGH ha estat del 96,5 %.

Durant el transcurs del DF-PGD, per causa que els resultats del diagnòstic de les malalties genètiques s'obté al final del dia +3, quan encara no s'han analitzat les 1CP-CGH, només s'han analitzat les 1CP-CGH provinents d'embrions diagnosticats sans per a la malaltia genètica hereditària familiar en qüestió.

Així doncs, dels 115 1CP obtinguts, s'han analitzat 77 1CPs; per tant, la resta són afectes de les malalties genètiques en qüestió.

Un total de 42 (54,5 %) dels 77 1CP-CGH són euploides, mentre que els altres trenta-cinc (45,4 %) presenten aneuploïdies com a mínim per a un cromosoma. Aquest valor tan elevat d'aneuploïdia és semblant al descrit prèviament per altres autors, també analitzant 1CP-CGHs (Gutierrez-Mateo i col·l., 2004a, Gutierrez-Mateo i col·l., 2004b, Fragouli i col·l., 2006a, Fragouli i col·l., 2006b, Fragouli i col·l., 2006c).

La diferència, però, entre l'estudi mostrat aquí i els publicats anteriorment és el tipus de pacient implicat. Mentre que en els estudis previs, els 1CPs provenien de pacients de FIV, és a dir, potencialment infèrtils, els d'aquest estudi provenen de pacients portadors de malalties monogenètiques familiars sense una història prèvia d'infertilitat. La majoria d'ells són fèrtils ja que han tingut descendència. Tot i que algunes de les parelles tenen una edat materna amb risc d'incidència d'aneuploïdies (de més de 35 anys), en dividir les parelles en els dos grups d'edat (≤ 35 i > 35 anys, d'edats mitjanes de 32,3 i 39,2 anys, respectivament), s'ha observat que la taxa d'aneuploïdies dels 1CPs no són massa diferents: 46,51 % i el 44,12 %, respectivament, sense diferències a ressenyar.

Això concorda amb les dades de la incidència d'aneuploïdies de dones joves donants d'oòcits que s'inclou en aquesta tesi. S'ha vist que el 32,1 % dels oòcits analitzats de 53 dones joves (edat mitjana de 26,1 anys) que participaven en cicles de donació d'oòcits en centres de FIV són, de fet, aneuploides. I a més, que gairebé el 40 % de les dones donants incloses en el grup d'estudi, ha generat com a mínim un oòcit aneuploide.

Aquestes taxes d'aneuploïdia, sumades a les detectades en les pacients a les quals s'ha realitzat el DF-PGD, remarquen la importància del diagnòstic d'aneuploïdies per tal d'augmentar la taxa d'implantació dels embrions transferits i, per tant, la possibilitat d'assolir l'embaràs i el naixement d'un nadó sa. En aquest grup d'estudi, l'anàlisi completa de tots els cromosomes del complement amb la CGH ha fet evident que l'anàlisi parcial de nou cromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) amb la FISH, comporta que el 42,8 % dels 1CPs aneuploides s'haurien diagnosticat erròniament euploides. Per tant, amb la FISH, gairebé la meitat dels 1CPs aneuploides s'haurien

diagnosticat com a euploides, i recomanat per a transferència uns embrions amb probabilitats reduïdes d'implantar i de generar un embaràs sa, donat de derivar d'oòcits aneuploides.

Unificant els resultats per als dos factors de risc, l'anàlisi de les malalties monogèniques i l'estudi d'aneuploïdies dels 81 embrions analitzats genèticament, 45 són aptes per transferir, és a dir, o bé heterozigots portadors sans o bé homozigots sans. D'aquests 45 embrions, en 20 la 1CP-CGH ha mostrat anomalies cromosòmiques i, per tant, no s'han recomanat per a ser transferits. Dels 25 restants, 15 s'han originat d'un oòcit euploide i, per tant, són embrions sans i potencialment euploides, per aquest motiu s'han classificat transferibles via DF-PGD.

Dels 10 embrions sans restants, no s'ha obtingut informació de la 1CP-CGH, ja sigui per no obtenir el 1CP en el moment de la biòpsia, o bé perquè aquest no ha generat una CGH analitzable. Aquest embrions sans de la malaltia monogènica, però sense anàlisi de possibles alteracions cromosòmiques, s'han classificat com a transferibles via DGP convencional.

Després d'una selecció morfològica en el centre de FIV, nou dels quinze embrions transferibles via DF-PGD i vuit dels deu embrions transferibles via DGP convencional s'han transferit a nou de les deu pacients. Quatre d'elles han rebut només embrions transferibles via DF-PGD, dues pacients només embrions transferibles via DGP convencional, i les altres tres pacients han rebut ambdós tipus d'embrions.

Un cop feta la transferència, i després d'efectuar una prova d'embaràs rutinària, s'ha constatat que tres dels nous embrions transferibles via DF-PGD han generat un embaràs, mentre que només un dels vuit embrions transferibles via DGP convencional ha implantat. Cap de les pacients amb els dos tipus d'embrions transferits no ha aconseguit l'embaràs.

S'ha constatat que cap de les pacients amb AMA (edat mitjana de 39,2 anys), a les quals s'ha transferit un total de sis embrions (dos transferibles via DF-PGD i quatre transferibles via DGP convencional), ha aconseguit embaràs. En canvi, els quatre embarassos després de transferència d'onze embrions s'han produït en el grup de dones més joves (edat mitja de 32,3 anys). Aquestes diferències són significatives ($p = 0,03$), i poden ser explicades per altres possibles factors que poden dificultar la implantació en dones que presenten AMA, a part de l'aneuploïdia, com per exemple factors ginecològics o immunològics. Tot i aquestes hipòtesis, caldria fer una sèrie més àmplia amb un major nombre de parelles per arribar a conclusions més definitives.

Tot i això, i tornant a considerar les dades d'implantació, observem que la taxa d'implantació dels embrions transferibles via DF-PGD i la dels transferibles via DGP convencional és del 33,3 % i 12,5 %, respectivament. Aquest últim valor és semblant al 13,2 %, recollit a la ESHRE, després de la transferència de 4.039 embrions diagnosticats com a sans per una malaltia monogènica, però sense anàlisi citogenètica completa (Goossens i col·l., 2008). Això indica que tot i la diferència substancial del nombre d'embrions analitzats, la taxa d'implantació és similar quan als embrions transferits no s'hi fa detecció d'aneuploïdies.

Malgrat que la taxa d'implantació en el grup amb embrions diagnosticats amb DF-PGD és quasi el triple que la dels embrions sense anàlisi d'aneuploïdies, aquestes diferències no són significatives. Molt possiblement caldrà augmentar la mida de la mostra de DF DGP per assolir una diferència significativa.

Tot i que la 1CP-CGH permet un considerable increment de la implantació i, a més, sense la necessitat de congelar i descongelar l'embrió, cal dir que té limitacions, tal com hem comentat ja anteriorment. No detecta errors en la segona divisió meiòtica, que s'ha demostrat que poden ser tan freqüents com els de la primera divisió (Kuliev i col·l., 2005), ni tampoc els produïts durant la meiosi masculina, com tampoc els produïts en les primeres divisions del propi embrió. A això cal sumar-hi les darreres observacions publicades, respecte de l'existència en ovaris de fetus euploides, d'oogònies aneuploides (Hulten i col·l., 2008). Els oòcits generats per aquests oogònies podrien passar inadvertits tot i analitzar el 1CP mitjançant CGH, ja que mentre que el 1CP seria euploide, l'oòcit corresponent podria continuar estant incorporant l'aneuploïdia generada a l'oogònia.

Per tant, tot i que la 1CP-CGH resulta útil, altres metodologies enfocades a l'anàlisi de l'embrió que no requereixi la congelació embrionària, tal com l'array-CGH, poden ser altament beneficioses per avançar cada cop més en la millora de les taxes d'implantació d'embrions transferits seleccionats mitjançant la realització de diagnòstic genètic preimplantacional cada cop més acurats.

6. Conclusions

1. Un total de 32,1 % d'oòcits de dones joves analitzats són aneuploides. La meitat d'aquests errors detectats (51,7 %), s'han originat durant la primera divisió meiòtica, just abans de l'ovulació. La resta (48,3 %) d'errors s'han originat durant la fase proliferativa de l'oogènesi, en els ovaris a l'etapa fetal de la donant.
2. En aquesta etapa les alteracions de la segregació cromosòmica mitòtica generen una població d'oogònies aneuploides. Els tractaments d'inducció hormonal que s'apliquen a les donants d'oòcits per al cicles de FIV podrien tenir un efecte de selecció dels oòcits aneuploides per a l'ovulació.
3. Les aneuploïdies d'origen mitòtic impliquen més d'un cromosoma i es podrien atribuir a anomalies del control de la segregació mitòtica, mentre que les aneuploïdies d'origen meiòtic, que tan sols impliquen un sol cromosoma, podrien ser degudes a alteracions més puntuals.
4. La incidència d'aneuploïdia no és despreciable en oòcits de dones joves donants de cicles de FIV. Aquest fet indica que fins i tot les dones sense edat de risc per aparició d'aneuploïdies en la descendència es poden beneficiar de la selecció d'embrions potencialment lliures d'aneuploïdies en el DGPs.
5. S'ha optimitzat l'aplicació del CF assay en Diagnosi Genètic Preimplantacional. S'ha modificat la quantitat de reactius que s'empra per reacció, per tal d'economitzar i treure més rendiment del kit comercial. Això ha estat possible utilitzant el producte amplificat mitjançant MDA de segona ronda (MDA2R) del genoma de cèl·lules aïllades.
6. La combinació de sistemes de detecció directa, com el Minisequencing, amb la utilització sistemes de detecció indirecta, com els STR tetranucleòtids informatius o parcialment informatius, fa del protocol de diagnòstic genètic en cèl·lules aïllades un procediment segur per a la seva aplicació al DF- DGP.

7. La combinació de l'anàlisi de les aneuploïdies d'origen femení amb 1CP-CGH i l'anàlisi de mutacions responsables de la malaltia genètica familiar, definit com "Diagnòstic Genètic Preimplantacional de Doble Factor" (DF-PGD), és un procediment aplicable clínicament, que requereix un equip de genetistes moleculars ben format i coordinat donada la seva complexitat.
8. L'increment de la taxa d'implantació dels embrions transferits diagnosticats amb el DF-DGP és del 33,3 %, gairebé tres vegades superior a la obtinguda en embrions transferits a partir del DGP estàndard (13,5 %). Aquest augment mostra que és un procediment vàlid per aconseguir una millora de la taxa d'implantació.
9. L'estudi de les aneuploïdies d'origen femení per a tots els cromosomes és una eina útil per millorar la taxa d'implantació, si es compara amb la taxa d'implantació obtinguda en analitzar un nombre limitat de cromosomes de l'embrió. Una aplicació més àmplia d'aquest protocol acabarà de confirmar aquest resultats preliminars.

7. Bibliografia

A

- Abdelhadi, I., Colls, P., Sandalinas, M., Escudero, T. and Munne, S. (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online*, **6**, 226-231.
- Abou-Sleiman, P. M., Apessos, A., Harper, J. C., Serhal, P., Winston, R. M. and Delhanty, J. D. (2002) First application of preimplantation genetic diagnosis to neurofibromatosis type 2 (nf2). *Prenat Diagn*, **22**, 519-524.
- Andersen, A. N., Goossens, V., Ferraretti, A. P., Bhattacharya, S., Felberbaum, R., de Mouzon, J. and Nygren, K. G. (2008) Assisted reproductive technology in europe, 2004: Results generated from european registers by eshre. *Hum Reprod*, **23**, 756-771.
- Angell, R. (1997) First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet*, **61**, 23-32.
- Ao, A., Jin, S., Rao, D., Son, W. Y., Chian, R. C. and Tan, S. L. (2006) First successful pregnancy outcome after preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in embryos generated from natural-cycle in vitro fertilization combined with an in vitro maturation procedure. *Fertil Steril*, **85**, 1510 e1519-1511.

B

- Bahçe, M., Cohen, J. and Munne, S. (1999) Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: Were we looking at the wrong chromosomes? *J Assist Reprod Genet*, **16**, 176-181.
- Barlow, A. L. and Hulten, M. A. (1998) Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis i oocytes from normal human females. *Zygote*, **6**, 27-38.
- Bodri, D., Colodron, M., Vidal, R., Galindo, A., Durban, M. and Coll, O. (2007) Prognostic factors in oocyte donation: An analysis through egg-sharing recipient pairs showing a discordant outcome. *Fertil Steril*, **88**, 1548-1553.
- Boue, A., Boue, J. and Gropp, A. (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet*, **14**, 1-57.
- Burlet, P., Frydman, N., Gigarel, N., Kerbrat, V., Tachdjian, G., Feyereisen, E., Bonnefont, J. P., Frydman, R., Munnich, A. and Steffann, J. (2006) Multiple displacement amplification improves pgd for fragile x syndrome. *Mol Hum Reprod*, **12**, 647-652.

C

- Cohen, J., Wells, D. and Munne, S. (2007) Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril*, **87**, 496-503.
- Coskun, S. and Alsmadi, O. (2007) Whole genome amplification from a single cell: A new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*, **27**, 297-302.
- Cozzi, J., Conn, C. M., Harper, J., Winston, R. M., Rindl, M., Farndon, P. A. and Delhanty, J. D. (1999) A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet*, **104**, 23-28.

- Cram, D. S., Song, B. and Trounson, A. O. (2003) Preimplantation diagnosis of lesch-nyhan using mini-sequencing primer extension. *Reprod Biomed Online*, **7**, 342-345.
- Cupisti, S., Conn, C. M., Fragouli, E., Whalley, K., Mills, J. A., Faed, M. J. and Delhanty, J. D. (2003) Sequential fish analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn*, **23**, 663-668.

D

- De Rycke, M., Georgiou, I., Sermon, K., Lissens, W., Henderix, P., Joris, H., Platteau, P., Van Steirteghem, A. and Liebaers, I. (2005) Pgd for autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Mol Hum Reprod*, **11**, 65-71.
- Dean, F. B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A. F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J. et al. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5261-5266.
- Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M. A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., Cuppens, H., des Georges, M., Ferec, C., Macek, M. et al. (2009) Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and cftr-related disorders--updated european recommendations. *Eur J Hum Genet*, **17**, 51-65.

F

- Farfalli, V. I., Magli, M. C., Ferraretti, A. P. and Gianaroli, L. (2007) Role of aneuploidy on embryo implantation. *Gynecol Obstet Invest*, **64**, 161-165.
- Fiegler, H., Geigl, J. B., Langer, S., Rigler, D., Porter, K., Unger, K., Carter, N. P. and Speicher, M. R. (2007) High resolution array-cgh analysis of single cells. *Nucleic Acids Res*, **35**, e15.
- Fiorentino, F., Magli, M. C., Podini, D., Ferraretti, A. P., Nuccitelli, A., Vitale, N., Baldi, M. and Gianaroli, L. (2003) The minisequencing method: An alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod*, **9**, 399-410.
- Fragouli, E. (2007) Preimplantation genetic diagnosis: Present and future. *J Assist Reprod Genet*, **24**, 201-207.
- Fragouli, E., Delhanty, J. D. and Wells, D. (2007) Single cell diagnosis using comparative genomic hybridization after preliminary DNA amplification still needs more tweaking: Too many miscalls. *Fertil Steril*, **88**, 247-248; author reply 248-249.
- Fragouli, E., Wells, D., Doshi, A., Gotts, S., Harper, J. C. and Delhanty, J. D. (2006a) Complete cytogenetic investigation of oocytes from a young cancer patient with the use of comparative genomic hybridisation reveals meiotic errors. *Prenat Diagn*, **26**, 71-76.
- Fragouli, E., Wells, D., Thornhill, A., Serhal, P., Faed, M. J., Harper, J. C. and Delhanty, J. D. (2006b) Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod*, **21**, 2319-2328.
- Fragouli, E., Wells, D., Whalley, K. M., Mills, J. A., Faed, M. J. and Delhanty, J. D. (2006c) Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human mii oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res*, **114**, 30-38.

G

- Galindo, A., Bodri, D., Guillen, J. J., Colodron, M., Vernaev, V. and Coll, O. (2009) Triggering with hcg or gnrh agonist in gnrh antagonist treated oocyte donation cycles: A randomised clinical trial. *Gynecol Endocrinol*, **25**, 60-66.
- Garcia-Velasco, J. A., Isaza, V., Caligara, C., Pellicer, A., Remohi, J. and Simon, C. (2003) Factors that determine discordant outcome from shared oocytes. *Fertil Steril*, **80**, 54-60.
- Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Tabanelli, C., Trombetta, C. and Boudjema, E. (2002) The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online*, **4 Suppl 3**, 31-36.
- Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Scriven, P. N., Traeger-Synodinos, J., Sermon, K. and Harper, J. C. (2008) Eshre pgd consortium data collection viii: Cycles from january to december 2005 with pregnancy follow-up to october 2006. *Hum Reprod*, **23**, 2629-2645.
- Gutierrez-Mateo, C., Benet, J., Wells, D., Colls, P., Bermudez, M. G., Sanchez-Garcia, J. F., Egozcue, J., Navarro, J. and Munne, S. (2004a) Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase ii fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod*, **19**, 2859-2868.
- Gutierrez-Mateo, C., Sanchez-Garcia, J. F., Fischer, J., Tormasi, S., Cohen, J., Munne, S. and Wells, D. (2008) Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: Experience with more than 200 cycles conducted by a reference laboratory in the united states. *Fertil Steril*.
- Gutierrez-Mateo, C., Wells, D., Benet, J., Sanchez-Garcia, J. F., Bermudez, M. G., Belil, I., Egozcue, J., Munne, S. and Navarro, J. (2004b) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase ii oocytes. *Hum Reprod*, **19**, 2118-2125.

H

- Handyside, A. H., Kontogianni, E. H., Hardy, K. and Winston, R. M. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by y-specific DNA amplification. *Nature*, **344**, 768-770.
- Hardarson, T., Hanson, C., Lundin, K., Hillensjo, T., Nilsson, L., Stevic, J., Reismer, E., Borg, K., Wikland, M. and Bergh, C. (2008) Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: A randomized controlled trial. *Hum Reprod*, **23**, 2806-2812.
- Hassold, T. and Hunt, P. (2001) To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*, **2**, 280-291.
- Hassold, T. J. and Jacobs, P. A. (1984) Trisomy in man. *Annu Rev Genet*, **18**, 69-97.
- Hellani, A., Abu-Amero, K., Azouri, J. and El-Akoum, S. (2008) Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in pgs-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* **17**, 841-847.
- Hellani, A., Coskun, S., Benkhalifa, M., Tbakhi, A., Sakati, N., Al-Odaib, A. and Ozand, P. (2004) Multiple displacement amplification on single cell and possible pgd applications. *Mol Hum Reprod*, **10**, 847-852.

- Hill, D. L. (2003) Aneuploidy screening of preimplantation embryos using comparative genomic hybridization versus fluorescence in situ hybridization techniques. *Fertil Steril*, **80**, 873-874; discussion 875.
- Hu, D. G., Webb, G. and Hussey, N. (2004) Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*, **10**, 283-289.
- Hulten, M. A., Patel, S. D., Tankimanova, M., Westgren, M., Papadogiannakis, N., Jonsson, A. M. and Iwarsson, E. (2008) On the origin of trisomy 21 down syndrome. *Mol Cytogenet*, **1**, 21.

I

- Iacobelli, M., Greco, E., Rienzi, L., Ubaldi, F., Podini, D., Nuccitelli, A., Tesarik, J., Baldi, M. and Fiorentino, F. (2003) Birth of a healthy female after preimplantation genetic diagnosis for charcot-marie-tooth type x. *Reprod Biomed Online*, **7**, 558-562.

J

- Jericho, H., Wilton, L., Gook, D. A. and Edgar, D. H. (2003) A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod*, **18**, 568-571.

K

- Keskintepe, L., Sher, G. and Keskintepe, M. (2007) Reproductive oocyte/embryo genetic analysis: Comparison between fluorescence in-situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online*, **15**, 303-309.
- Kuliev, A., Cieslak, J. and Verlinsky, Y. (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res*, **111**, 193-198.
- Kuliev, A., Rechitsky, S., Laziuk, K., Verlinsky, O., Tur-Kaspa, I. and Verlinsky, Y. (2006) Pre-embryonic diagnosis for sandhoff disease. *Reprod Biomed Online*, **12**, 328-333.
- Kuliev, A. and Verlinsky, Y. (2004) Meiotic and mitotic nondisjunction: Lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update*, **10**, 401-407.

L

- Le Caignec, C., Spits, C., Sermon, K., De Rycke, M., Thienpont, B., Debrock, S., Staessen, C., Moreau, Y., Fryns, J. P., Van Steirteghem, A. et al. (2006) Single-cell chromosomal imbalances detection by array cgh. *Nucleic Acids Res*, **34**, e68.

M

- Mahmood, R., Brierley, C. H., Faed, M. J., Mills, J. A. and Delhanty, J. D. (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: Fish analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet*, **106**, 620-626.

- Malter HE, C. J. (1989) Partial zona dissection of the human oocyte: A nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertily Sterility*, **51**, 139-148.
- Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M. and Munne, S. (2000) Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online*, **1**, 17-26.
- Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J. C., Verhoeve, H. R., Vogel, N. E., Arts, E. G., de Vries, J. W., Bossuyt, P. M. et al. (2007) In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*, **357**, 9-17.
- Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K. and Kardon, N. B. (2005) Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genet Med*, **7**, 251-263.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Munne, S., Alikani, M., Tomkin, G., Grifo, J. and Cohen, J. (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*, **64**, 382-391.
- Munne, S., Ary, J., Zouves, C., Escudero, T., Barnes, F., Cinioglu, C., Ary, B. and Cohen, J. (2006a) Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online*, **12**, 340-346.
- Munne, S., Bahce, M., Sandalinas, M., Escudero, T., Marquez, C., Velilla, E., Colls, P., Oter, M., Alikani, M. and Cohen, J. (2004) Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online*, **8**, 81-90.
- Munne, S., Fischer, J., Warner, A., Chen, S., Zouves, C. and Cohen, J. (2006b) Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: A multicenter study. *Fertil Steril*, **85**, 326-332.
- Munne, S. and Weier, H. U. (1996) Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, x, and y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet*, **75**, 263-270.
- Munne, S. and Wells, D. (2003) Questions concerning the suitability of comparative genomic hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*, **80**, 871-872; discussion 875.

N

- Nicolaidis, P. and Petersen, M. B. (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*, **13**, 313-319.

O

- Obradors, A., Fernandez, E., Oliver-Bonet, M., Rius, M., de la Fuente, A., Wells, D., Benet, J. and Navarro, J. (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**, 1949-1956.
- Obradors, A., Fernandez, E., Rius, M., Oliver-Bonet, M., Martinez-Fresno, M., Benet, J. and Navarro, J. (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**, 933 e931-937.

P

- Pellestor, F., Anahory, T. and Hamamah, S. (2005a) The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum Reprod Update*, **11**, 15-32.
- Pellestor, F., Anahory, T. and Hamamah, S. (2005b) Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res*, **111**, 206-212.
- Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C. and Demaille, J. (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: New data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet*, **112**, 195-203.
- Pujol, A., Boiso, I., Benet, J., Veiga, A., Durban, M., Campillo, M., Egozcue, J. and Navarro, J. (2003) Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase ii oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet*, **11**, 325-336.
- Rechitsky, S., Freidine, M., Verlinsky, Y. and Strom, C. M. (1996) Allele dropout in sequential pcr and fish analysis of single cells (cell recycling). *J Assist Reprod Genet*, **13**, 115-124.

R

- Renwick, P. J., Trussler, J., Ostad-Saffari, E., Fassihi, H., Black, C., Braude, P., Ogilvie, C. M. and Abbs, S. (2006) Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping--a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online*, **13**, 110-119.

S

- Sanchez-Garcia, J. F., Benet, J., Gutierrez-Mateo, C., Luis Seculi, J., Monros, E. and Navarro, J. (2005) Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol Hum Reprod*, **11**, 463-468.
- Sandalinas, M., Marquez, C. and Munne, S. (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Molecular Human Reproduction*, **8**, 580-585.
- Sandalinas, M., Sadowy, S., Alikani, M., Calderon, G., Cohen, J. and Munne, S. (2001) Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod*, **16**, 1954-1958.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F. and Pals, G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, **30**, e57.
- Sher, G., Keskinetepe, L., Keskinetepe, M., Ginsburg, M., Maassarani, G., Yakut, T., Baltaci, V., Kotze, D. and Unsal, E. (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**, 1033-1040.

- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. and Sermon, K. (2006a) Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum Mutat*, **27**, 496-503.
- Spits, C., Le Caignec, C., De Rycke, M., Van Haute, L., Van Steirteghem, A., Liebaers, I. and Sermon, K. (2006b) Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nat Protoc*, **1**, 1965-1970.
- Spits, C. and Sermon, K. (2008) Pgd for monogenic disorders: Aspects of molecular biology. *Prenat Diagn*.
- Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I. and Van Steirteghem, A. (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**, 2849-2858.
- Staessen, C., Verpoest, W., Donoso, P., Haentjens, P., Van der Elst, J., Liebaers, I. and Devroey, P. (2008) Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod*, **23**, 2818-2825.
- Suikkari, A. M. (2008) In-vitro maturation: Its role in fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **20**, 242-248.

T

- Tease, C., Hartshorne, G. M. and Hulten, M. A. (2002) Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet*, **70**, 1469-1479.
- Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A. and Tunnacliffe, A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed pcr: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, **13**, 718-725.
- Thornhill, A., Holding, C. and Monk, M. (1994) Recycling the single cell to detect specific chromosomes and to investigate specific gene sequences. *Hum Reprod*, **9**, 2150-2155.
- Thornhill, A. R., deDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., Moutou, C., Robinson, M. D., Schmutzler, A. G., Scriven, P. N. et al. (2005) Eshre pgd consortium 'best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (pgd) and preimplantation genetic screening (pgs)'. *Hum Reprod*, **20**, 35-48.

V

- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidine, M., Ivakhnenko, V., Wolf, G., Kovalinskaya, L., White, M., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J. et al. (1996a) Polar body diagnosis of common aneuploidies by fish. *J Assist Reprod Genet*, **13**, 157-162.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Lifchez, A., Strom, C. and Kuliev, A. (1996b) Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation genetics group. *Fertil Steril*, **66**, 126-129.
- Verlinsky, Y. and Kuliev, A. (2003) Preimplantation diagnosis for aneuploidies using fluorescence in situ hybridization or comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*, **80**, 869-870; discussion 875.

- Voullaire, L., Wilton, L., McBain, J., Callaghan, T. and Williamson, R. (2002) Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod*, **8**, 1035-1041.
- Voullaire, L., Wilton, L., Slater, H. and Williamson, R. (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn*, **19**, 846-851.

W

- Weghofer, A., Munne, S., Brannath, W., Chen, S., Barad, D., Cohen, J. and Gleicher, N. (2008a) The impact of lh-containing gonadotropin stimulation on euploidy rates in preimplantation embryos: Antagonist cycles. *Fertil Steril*.
- Weghofer, A., Munne, S., Brannath, W., Chen, S., Tomkin, G., Cekleniak, N., Garrisi, M., Barad, D., Cohen, J. and Gleicher, N. (2008b) The impact of lh-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: Long protocol stimulation. *Hum Reprod*, **23**, 499-503.
- Wells, D. (2004) Advances in preimplantation genetic diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **115 Suppl 1**, S97-101.
- Wells, D., Alfarawati, S. and Fragouli, E. (2008) Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: Microarrays and cgh. *Mol Hum Reprod*.
- Wells, D., Bermudez, M., Steuerwald, N., Chu, L., Weier, U., Cohen, J. and Munne, S. (2004) Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. In Papp, Z. and Rodeck, C. (eds), *Recent advances in prenatal genetic diagnosis*. Medimond, Bologna, Italy.
- Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J. D. and Munne, S. (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril*, **78**, 543-549.
- Wells, D., Sherlock, J. K., Handyside, A. H. and Delhanty, J. D. (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1214-1218.
- Wilton, L. (2005) Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update*, **11**, 33-41.
- Wilton, L., Voullaire, L., Sargeant, P., Williamson, R. and McBain, J. (2003) Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril*, **80**, 860-868.
- Wolstenholme, J. and Angell, R. R. (2000) Maternal age and trisomy--a unifying mechanism of formation. *Chromosoma*, **109**, 435-438.

Z

- Zheng, C. J., Guo, S. W. and Byers, B. (2000) Modeling the maternal-age dependency of reproductive failure and genetic fitness. *Evol Dev*, **2**, 203-207.

8. Annexes

8.1. Annex 1: Estudi de informativitat i posta apunt



DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica
Facultat de Medicina. UAB

Dades Personals:	Dona: XXX Nascuda: 22 9 75 Home: XXX Nascut:
Adreça: XXX; Telf: XXX; E-mail: XXX	
Cartilla SS: XXX	

Mutacions CFTR:	Dona: dF508 Home: dF508
Centre on es va diagnosticar les mutacions : XXX	

	Dona	Home	fill
Fenotip	Portadora	Portador	Afectat
Mutacions	dF508	dF508	dF508/dF508
Tamany Pics Normal/mutant	94/ 91	94/ 91	91/91
STR D7S1799 (100%informatiu)	174/182	182/190	174/190
STR D7S3025 (100% informatiu)	108/112	112/116	108/112
STR D7SINTRA (100% informatiu)	102/106	102/106	102/102
STR D7S1817 (Informatiu Pare)	128/128	124/128	124/128
STR D7S2847 (Informatiu Mare)	176/188	184/184	184/188

Informe de la posta a punt metodològica per a la mutació dF508

S'ha acomplert la posta a punt dels procediments que s'han d'aplicar en el DGP per a la detecció de les mutacions que té la **Família XXX / XXX**, per a les que tenen un risc de tenir descendència afectada de FQ.

Estem en condicions de realitzar el DGP següent:

- 1) Per a la detecció d'aneuploidies per a tots els cromosomes en 1CP (mitjançant CGH)
 - 2) Per a les mutacions indicades en blastòmer (primers específics per la mutació i anàlisi de STRs)
- Atentament,

Dra. Joaquina Navarro

Bellaterra, XX de XX de 200X

8.2. Annex 2: Consentiment Informat

Consentimiento informado de Diagnóstico Genético Preimplantacional para doble factor de riesgo genético (DF-DGP): de enfermedades monogénicas y aneuploidías (en colaboración con la Unidad de Biología Celular y Genética Médica de la UAB)

Los abajo firmantes,

Dña.....con cariotipo.....

(Nombre y dos apellidos de la paciente), mayor de edad con domicilio en.....

y D.N.I. N°.....

y D.....

(Nombre y dos apellidos del paciente), mayor de edad con domicilio en.....

y D.N.I. N°.....

I. En qué consiste

El Diagnóstico Genético Preimplantacional para doble factor de riesgo genético (DF-DGP) es una innovadora técnica de detección de anomalías genéticas y de aneuploidías en embriones de ciclos de FIV previa a su transferencia al útero de la mujer.

Se trata de una técnica utilizada como complemento de la fecundación *in vitro* (FIV). Su médico puede recomendarle el DGP si existe riesgo de transmisión de una enfermedad genética. El DF-DGP puede ayudar a prevenir el desarrollo de embriones afectados y aumentar la tasa de implantación de los embriones sanos trasferidos, por tener además el número de cromosomas normal (euploides). La técnica del DF-DGP combina la aplicación de un DGP estándar para análisis de mutaciones con un de aneuploidías (PGS) completo en el que se estudian todos los cromosomas del embrión (23c-PGS).

Este procedimiento aplica la siguiente técnica de reproducción asistida: 1) la fecundación *in vitro*, 2) la biopsia de células embrionarias por medio de la micromanipulación, y 3) las técnicas de diagnóstico genético (monogénico para la mutación y citogenético para todos los cromosomas).

El objetivo de esta técnica es la selección y transferencia al útero materno de solo embriones libres de la anomalía familiar genética (génica y citogenética).

II. Objetivo

Análisis de mutaciones

Las características que determinaran como ha de funcionar nuestro organismo así como nuestras características morfológicas están escritas en los genes. Los genes están formados por DNA y se encuentran localizados en los cromosomas. El ser humano tiene 23 cromosomas diferentes organizados en 23 parejas. Al tener parejas de cromosomas, por cada gen tendremos dos copias. Una copia de cada gen es heredada del padre y la otra se hereda de la madre. Existen características determinadas por un solo gen, llamadas monogénicas, y otras por más de uno, se llaman entonces poligénicas.

En la especie humana existe un número muy elevado de enfermedades genéticas que se producen como consecuencia de defectos (mutaciones) en un único gen, y las llamamos enfermedades monogénicas. Como los genes están en los cromosomas y estos se heredan, si existe una mutación, ésta pasará a la descendencia.

Existen diferentes tipos de herencia:

- autosómica recesiva: es necesario que las DOS copias del gen, en un cromosoma autosómico, estén mutadas para que se manifieste la enfermedad (25% de la descendencia afecta).
- autosómica dominante: solo es necesario que UNA de las copias del gen, en un cromosoma autosómico, esté mutada para que se manifieste la enfermedad (50% de la descendencia afecta) recesiva ligada al sexo: el gen mutado se encuentra en uno de los cromosomas sexuales (25% de la descendencia o 50% de la descendencia masculina en el caso que esté ligada al cromosoma X; 50% de la descendencia, todos los varones, en el caso que esté ligada al cromosoma Y).
- dominante ligada al sexo: el gen mutado se encuentra en uno de los cromosomas sexuales (50% de la descendencia afecta).

Análisis de aneuploidías:

Permite identificar embriones con alteraciones cromosómicas que pueden estar impidiendo la implantación de los embriones transferidos o incluso generar el nacimiento de niños con anomalías cromosómicas.

Desafortunadamente, no se pueden distinguir los embriones cromosómicamente alterados mediante análisis morfológico en el laboratorio de FIV. Embriones viables, evolutivos y con buena morfología pueden ser portadores de anomalías cromosómicas. La gran mayoría de embriones portadores de anomalías cromosómicas o no dan lugar a un embarazo o abortan dentro del primer trimestre de embarazo.

El DGP para el estudio de aneuploidías está indicado en mujeres mayores de 36 años, pacientes con dos ciclos de FIV previos sin embarazo, mujeres con abortos espontáneos previos, mujeres con algún aborto previo cariotipado con alguna alteración cromosómica, pacientes con factor masculino severo (oligozoospermia severa, azoospermia obstructiva, análisis genético en espermatozoides (FISH)

alterado o meiosis patológicas) y pacientes portadores de alguna alteración cromosómica.

III. Procedimiento

El proceso completo consta de cinco fases diferentes, normalmente llevadas a cabo por diferentes especialistas y laboratorios.

1ª.-La primera fase es la obtención de los embriones. Se trata de obtener los embriones que serán objeto del diagnóstico. Deben producirse *in vitro* mediante técnicas de reproducción asistida a pesar de que la pareja no presente ningún tipo de anomalía reproductiva que impida la procreación natural. Esta parte del proceso se realiza en *su Centro de Reproducción Asistida*.

2ª.-La segunda fase es la biopsia embrionaria. Consiste en extraer dos células del embrión sin que por ello se comprometa su desarrollo normal. Una célula será para el análisis de las aneuploidías con la técnica de la hibridación genómica comparada (CGH) y la otra para el análisis monogénico con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la minisequenciación. Una vez realizada la biopsia, el embrión es devuelto al incubador donde se mantendrá en cultivo *in vitro* hasta el momento de la transferencia. Esta parte del proceso se realiza en *su Centro de Reproducción Asistida*.

3ª.-La tercera fase es el procesado de la célula, esta realizada por el equipo de la Dra. Joaquina Navarro de la Unidad de Biología celular y Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona (UAB).

4ª.-El análisis genético (monogénico y citogenético) de las células es realizado por el equipo de la Dra. J. Navarro.

5ª.-La última fase es la transferencia embrionaria. El resultado del análisis genético se comunica al *Centro de Reproducción Asistida* y se decide, conjuntamente con la pareja consultante, qué embriones van a ser transferidos en función del diagnóstico genético y las características de viabilidad embrionaria. Esta fase se realiza en *su Centro de Reproducción Asistida*.

Este consentimiento es para la segunda, tercera y cuarta fase (*táchese lo que no proceda*). Se le pedirá que firme otros consentimientos informados, como el de FIV y transferencia embrionaria.

IV. Biopsia de blastómeros

La biopsia embrionaria consiste en extraer uno o dos blastómeros (células que forman el embrión) a través de un orificio practicado en la zona pelúcida. Este procedimiento se lleva a cabo en el tercer día de desarrollo embrionario, cuando los embriones tienen entre 5-10 células. Las células biopsiadas son introducidas en tubos separados y es procesada para los análisis génicos y citogenético respectivamente. Durante el análisis del blastómero, el embrión se mantiene en cultivo en un incubador.

La biopsia de una o dos células del embrión no afectará el desarrollo del feto. Todas las células del embrión son totipotentes hasta al menos el cuarto día de desarrollo. Totipotente significa que tiene "todo el potencial". El procedimiento detiene momentáneamente la división celular, después, el embrión alcanza el mismo número de células que antes y continúa su desarrollo con normalidad.

V. Análisis genético

5.1 Análisis génico

Las células biopsiadas se analizan mediante una técnica llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se utiliza en aquellos casos en que es necesario detectar una mutación génica a nivel de DNA, y que ocasiona una enfermedad monogénica. Cada célula contiene una cantidad minúscula de DNA (el material del que los genes están formados). La/s célula/s biopsiada/s se analizan de forma específica para la enfermedad genética de la que los progenitores son portadores. Si el resultado confirma la ausencia de la enfermedad, entonces es altamente probable que el embrión del que proviene también esté libre de la enfermedad. Los embriones libres de la enfermedad se transfieren a la mujer o se criopreservan para futuras transferencias. Los embriones afectados no se transfieren, si no que serán analizados en el laboratorio para confirmar los resultados previos o se descartarán.

La PCR consiste en la amplificación de determinadas secuencias de DNA de forma específica. La aplicación de un determinado número de ciclos de amplificación permite amplificar el DNA hasta un nivel de observación detectable. Una vez la amplificación ha tenido lugar, se utilizan diferentes técnicas de Biología Molecular para analizar el gen.

La utilización de la técnica de PCR permite detectar cambios en el código genético que dan lugar a enfermedades hereditarias. Esto es posible incluso si el defecto (mutación) afecta a una sola letra de las 3, 000, 000,000 letras del código genético.

La utilización de la PCR comporta el desarrollo de protocolos específicos para cada enfermedad que se quiera diagnosticar.

El análisis de las células las destruye ya que sus membranas se rompen para liberar el DNA. Por ello, no pueden utilizarse para otro fin, así como tampoco pueden ser devueltas al embrión. Este análisis se lleva a cabo en unas horas.

5.2 Análisis citogenético

La célula a analizar (problema), una vez aislada es procesada dentro de un tubo de PCR. Una vez aislada se amplifica su genoma aplicando la técnica de la DOP-PCR, procedimiento de genética molecular que utiliza cebadores degenerados, (ccgactcgagnnnnnatctgg), y que consigue hacer suficientes copias del genoma celular para poder aplicar la técnica de la CGH. El mismo procedimiento se realiza a células aisladas citogenéticamente normales (46XY) o células CONTROL. La CGH se basa en hacer una hibridación competitiva sobre metafases también controles (46XY) aplicando una sonda preparada en proporción 1:1 de productos amplificados de las células problema (marcadas en rojo) con productos

amplificados de células control (marcadas en verde). Se analizan 10-12 metafases por célula y para el análisis se utiliza un software que identifica las proporciones de cada fluorocromo (color) por cromosoma. Si la proporción entre los dos fluorocromos es 1 los cromosomas aparecen en amarillo y el perfil de color queda centrado si la proporción es <0.8 indica que existe una pérdida cromosómica, el perfil se desplaza a la izquierda y el cromosoma aparece en verde, pero si la proporción es $>1,2$ indica que existe una ganancia cromosómica y el perfil se desplaza a la derecha y el cromosoma aparece en rojo. Es una técnica que tiene la ventaja de analizar todos los cromosomas a simultáneamente y que requiere de una elevada experiencia que actualmente únicamente se realiza en este grupo en toda España y en menos de una docena de grupos en todo el mundo.

Permite seleccionar embriones citogenéticamente normal para todos los cromosomas.

VI. Limitaciones de la técnica

Los métodos actuales de diagnóstico genético preimplantacional de mutaciones con estudio de aneuploidías (DF-DGP) mejoran las posibilidades de conseguir un hijo no afecto, pero no pueden garantizar que el embarazo conseguido sea no afecto. En consecuencia, recomendamos encarecidamente que en caso de embarazo tras DF-DGP, se realice un diagnóstico prenatal. El diagnóstico prenatal revelará si el DF-DGP ha sido correcto y confirmará si el feto es o no afecto de la enfermedad genética analizada.

El DGP que se realizará únicamente informará de la mutación específica que estamos analizando, por lo que cualquier otra mutación no sometida a análisis o de la que no hayamos sido informados, así como posibles alteraciones cromosómicas, no serán determinadas.

Enfermedad (*especificar*): _____.

VII. Riesgos

7.1.-Riesgo en la biopsia embrionaria

Si un embrión es dañado durante el proceso de biopsia detendrá su crecimiento y no será apto para su transferencia. El riesgo de dañar el embrión durante la biopsia embrionaria es menor al 1%.

La biopsia de una o dos células del embrión no afectará el desarrollo del feto. El procedimiento detiene momentáneamente la división celular, después, el embrión alcanza el mismo número de células que antes y continúa su desarrollo con normalidad. Hasta Junio de 2003, más de 1000 niños han nacido tras FIV-DGP sin que se haya notificado diferencia alguna en la tasa de anomalías congénitas respecto la población general, que es de un 3-5%. No obstante, no se han realizado todavía suficientes casos como para descartar un posible efecto negativo en el desarrollo embrionario. En consecuencia, se recomienda que se realice un diagnóstico prenatal en caso de embarazo.

Se desconoce si los embriones biopsiados implantan menos que los no biopsiados. La biopsia embrionaria puede disminuir ligeramente la capacidad de implantación del embrión, mientras que la selección de embriones libres de anomalías genéticas mediante DF-DGP puede compensar ampliamente cualquier efecto negativo de la biopsia embrionaria.

7.2.-Riesgo en el análisis

Para maximizar la posibilidad de diagnosticar como mínimo un embrión como no afecto, numerosos embriones se producen durante el ciclo de FIV-DGP. No obstante, es posible que no se detecte ningún embrión no afecto y, en consecuencia, no se disponga de embriones para la transferencia. Además, puede ocurrir que se excluyan embriones para la transferencia debido a un desarrollo embrionario anormal.

En estos momentos la precisión del DGP de enfermedades monogénicas es aproximadamente del 90% en términos generales. Esto significa que puede ocurrir un error de diagnóstico. En este riesgo de error del 10% contabilizamos aquellos embriones sanos diagnosticados como afectados y aquellos afectados diagnosticados erróneamente como sanos. Además, alrededor de un 10% de los embriones analizados no se pueden diagnosticar debido a resultados inconcluyentes. En muchos casos esto es debido a fallos en la amplificación del DNA hasta un nivel detectable. No obstante, la posibilidad de conseguir un embarazo de un feto afecto tras DGP es menor que en una concepción natural.

Ocasionalmente pueden producirse problemas en los procesos de biopsia y amplificación del material genético que comportarían la ausencia de resultados en alguno o todos los embriones bajo estudio.

Existe la posibilidad de no obtener un diagnóstico genético concluyente en alguno o todos los embriones debido a la complejidad de las técnicas diagnósticas utilizadas.

Los embriones sin diagnóstico genético concluyente o con diagnóstico de afecto serán considerados como embriones no viables desaconsejando su transferencia.

Debido al riesgo de error, así como también a la presencia de problemas no relacionados con la técnica como por ejemplo una anomalía cromosómica, para la cual no se realiza el análisis, su embarazo ha de ser cuidadosamente monitorizado. Se recomienda encarecidamente que en caso de embarazo se realice un diagnóstico prenatal. El embarazo ha de ser también monitorizado ecográficamente para controlar el crecimiento y desarrollo del feto. No existe garantía de que un niño nacido tras FIV-DGP sea normal.

Comentarios/Aspectos	Particulares	(si	aplica)
----------------------	--------------	-----	---------

—

VIII. Posibles beneficios

Los beneficios del DF-DGP incluyen la disminución de nuestras posibilidades de tener un hijo afecto de la enfermedad genética de la que somos portadores. Esto significa que tendremos menos posibilidades de tener que enfrentarnos a la decisión de realizar un aborto terapéutico en caso de embarazo afecto.

Entendemos, no obstante, que, ni la posibilidad de embarazo, ni la prevención de la enfermedad genética en el feto o la descendencia pueden asegurarse tras el DF-DGP.

El DF-DGP no le causará ninguna molestia añadida a las que se experimentan durante un ciclo normal de FIV.

IX. Alternativas

Existen alternativas al ciclo de FIV-DGP como:

- Gestación natural seguida de diagnóstico prenatal, siempre que la pareja considere la posibilidad de interrupción voluntaria del embarazo si se detectan anomalías en el feto.

- Utilización de gametos (ovocitos o semen) de donante.

- Adopción legal.

El diagnóstico genético preimplantacional no es una sustitución al diagnóstico prenatal clásico.

X. Coste

El coste del DF-DGP se ha de sumar al del ciclo de FIV. Consulte precios del coste actual del DGP. El *Centro de Reproducción Asistida* le informará del coste del DF-DGP realizado el equipo de la Dra. J. Navarro.

Algunas familias candidatas al DGP, por sus condiciones pueden, si lo desean, solicitar ser incluidas en el programa de DF-DGP, de Proyecto FIS PI080012 cuya Investigadora Principal es la Dra. J.Navarro. Las pacientes incluidas en este programa, ven cubiertos los costes del DF-DGP siempre y cuando asuman las condiciones establecidas por el proyecto y así lo certifiquen firmando el documento "Compromiso Mutuo UAB-pacientes". Este documento debe ser entregado junto con las muestras biológicas necesarias realizar el estudio de informatividad previo al posible inicio del ciclo de FIV.

XI. Seguimiento

Le rogamos encarecidamente que en caso de embarazo nos haga llegar, o autorice al facultativo responsable de su ciclo de FIV-DGP, los resultados del diagnóstico prenatal (si se lo realiza) así como de los datos relacionados con el seguimiento de su embarazo y del parto. Esta información se mantendrá en estricta confidencialidad y solamente se utilizará para monitorizar los resultados del programa de DF-DGP.

XII. Aspectos legales generales relacionados con la reproducción asistida y particulares sobre el diagnóstico genético preimplantacional

Las técnicas de reproducción asistida tienen como finalidad fundamental la actuación médica ante la esterilidad humana, para facilitar la procreación, cuando otras terapias se hayan descartado por inadecuadas o ineficaces.

También pueden utilizarse en la prevención y tratamiento de enfermedades de origen genético o hereditario, cuando sea posible recurrir a ellas con suficientes garantías diagnósticas y terapéuticas y estén estrictamente indicadas.

Sólo pueden llevarse a cabo cuando haya posibilidades razonables de éxito y no supongan riesgo grave para la salud, física o psíquica, de la mujer o la posible descendencia.

El marco jurídico regulador de la reproducción humana asistida está constituido básicamente por la Ley 14/2006 de 27 de Mayo sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida.

Artículo 12. *Diagnóstico preimplantacional.*

1. Los centros debidamente autorizados podrán practicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para:

a) La detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptible de tratamiento curativo posnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los preembriones no afectos para su transferencia.

b) La detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión.

2. La aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para cualquiera otra finalidad no comprendida en el apartado anterior, o cuando se pretendan practicar en combinación con la determinación de los antígenos de histocompatibilidad de los preembriones *in vitro* con fines terapéuticos para terceros, requerirá de la autorización expresa, caso a caso, de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, que deberá evaluar las características clínicas, terapéuticas y sociales de cada caso.

En el Art. 13, apartado 1, se establece que “cualquier intervención con fines terapéuticos sobre el preembrión vivo *in vitro* solo podrá tener la finalidad de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas”, y ello bajo los siguientes requisitos (Art. 13, apartado 2):

a) Que la pareja o, en su caso, la mujer sola, haya sido rigurosamente informada sobre los procedimientos, pruebas diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapia propuesta y las hayan aceptado previamente.

b) Que se trate de patologías con un diagnóstico preciso, de pronóstico grave o muy grave, y que ofrezcan posibilidades razonables de mejoría o curación.

c) Que no se modifiquen los caracteres hereditarios no patológicos, ni se busque la selección de los individuos o la raza.

e) Que se realice en centros sanitarios autorizados y por equipos cualificados y dotados de los medios necesarios, conforme se determine mediante real decreto.

Finalmente, debe significarse la relevancia para esta técnica del Convenio de Oviedo sobre Derechos Humanos y Biomedicina de 1.997, que limita las pruebas predictivas de enfermedades genéticas a fines médicos o de investigación médica y con un asesoramiento genético apropiado.

Una vez leído, o nos ha sido leído, y comprendido este consentimiento quedamos informados de:

Que los procedimientos pueden ser cancelados en cualquier momento antes de su realización, bien por razones médicas, bien a petición de la interesada, siempre que no suponga daño alguno para los pacientes o los embriones viables producidos.

Que el DF-DGP tiene beneficios y riesgos, algunos de los cuales son desconocidos actualmente.

Que es posible que no se obtenga resultado del DF-DGP. Tendremos entonces la posibilidad de decidir si se realiza o no la transferencia de aquellos embriones de los que no se ha obtenido resultado alguno, pero entendemos que estos embriones tienen la misma posibilidad de ser afectados de la enfermedad hereditaria como si fueran embriones no analizados. Entendemos también que el objetivo del DGP es mejorar nuestras posibilidades de obtener un embarazo libre de la anomalía genética para la cual se ha realizado, pero no ofrece una garantía absoluta de embarazo o de descendencia no afecta.

El coste económico del tratamiento.

Que el DF-DGP no descarta la necesidad de realizar un diagnóstico prenatal clásico. La necesidad de este diagnóstico es la misma se realice o no el DGP de enfermedades monogénicas y aneuploidías. Entendemos que en caso de necesitar más información sobre el diagnóstico prenatal clásico podemos preguntar a nuestro obstetra o pedir un consejo genético.

Que hemos tenido oportunidad de preguntar sobre el procedimiento DGP y el contenido de este consentimiento informado.

Autorización:

Autorizamos al personal de (*su centro de reproducción asistida*) y al personal del Centro _____ (*nombre del centro externo*) a efectuar las biopsias embrionarias y/o la preparación de éstas en nuestros embriones.

Autorizamos al personal de la Unidad de Biología celular y Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona (UAB) (*nombre del centro externo*) a realizar el estudio genético propuesto (análisis de enfermedad monogénica) de las biopsias embrionarias realizadas en nuestros embriones.

En _____ a ___ de _____ de _____

Fdo. la pareja

Fdo. (*su centro de reproducción asistida*) Fdo. _____ (*centro externo*)

8.3. Annex 3: Compromís Mutu

COMPROMISO MUTUO PARA LA SOLICITUD DE FAMILIAS CANDIDATAS AL DGP, A SER INCLUIDA EN EL GRUPO DE FIV, DENTRO DEL PROYECTE DEL FIS PI051395

La Sra..... y el Sr.....

Expresamos que :

-Se nos ha explicado y conocemos que tenemos un riesgo incrementado de tener descendencia con alteraciones cromosómicas viables por lo que somos candidata al Diagnóstico Genético Preimplantacional dentro del Proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI051395 del que la Dra J Navarro, es la investigadora principal vigente hasta finales del 2008.

-Se nos ha explicado y conocemos que la Dra XXX embrióloga de la Clínica XXX, forma parte del equipo investigador del proyecto FIS mencionado.

- Se nos ha explicado y entendemos que haciendo donación de muestras biológicas necesarias para el desarrollo previo al DGP (epitelio bucal, sangre o muestra de DNA) estamos evidenciando que solicitamos ser incluidos en el programa de FIV dentro de dicho proyecto FIS mencionado.

- Se nos ha explicado y entendemos que los procedimientos que se deben establecer y realizar previamente y durante el DGP tienen un coste económico.

- Se nos ha explicado y entendemos que el coste de análisis genético de las mutaciones valorado por al Unidad de Biología y Genética Médica de la Facultad de Medicina de la UAB, se desglosa en dos partes:

1) 2400€ para la puesta a punto de los procedimientos, previamente al DGP.

2) 685-900€ respectivamente, para la realización del DGP, dependiendo de si se analizan, <6 ó >6 embriones.

-Se nos ha explicado y entendemos que dado que el objetivo del proyecto FIS mencionado es aplicar dicho procedimiento de DGP al máximo número de familias candidatas que desean realizar la selección de embriones como alternativa a la interrupción del embarazo de un feto afectado, el coste total del análisis genético indicado estaría cubierto por dicho proyecto FIS.

- Se nos ha explicado y aceptamos que si, una vez hemos sido incluidas com familias candidatas al DGP dentro del proyecto FIS, se genera por nuestra parte alguna situación que impide la realización del DGP, p.e. un embarazo, deberemos hacernos cargo del coste correspondiente a los estudios previos al DGP (2400€)

CENTRO	NOMBRE	FIRMA
Centro de FIV	Dr XXX,dede 200..
Unidad de Biología Celular y Genética Médica. UAB	Dra. J Navarro,dede 200..
Familia	Sra.
	Sr

8.4. Annex 4: Model Informe DF-PGD

Dr. XXX
 Responsable del Laboratori de Reproducció Assistida
 Clínica XXX, Barcelona

Resultat del DF-DGP de XXX (anàlisi citogenètica amb Hibridació Genòmica Comparada (1CP-CGH) i anàlisi de Mutacions dF508 amb STRs informatius

TAULA DE RESULTATS GLOBAIS DE L'ESTUDI D'AMBDÓS FACTORS DE RISC

E	ESTUDI DE MUTACIONS (BL)	ESTUDI D'ANEUPLOIDIA (1CP)	EMBRIONS TANSFERIBLES
3	Homozigot SA	Pendent	NO
4	Heterozigot	EUPLOID 46, XY	SI
5	Homozigot Afecta FQ	51, XXY, +1,+9,+18+20	NO
7	Heterozigot	50,XY, +7,+8,+13,+14	NO
8	Homozigot Afecta FQ	49,XXYY, -1,+2,+3, +4, +5, -6, -11, -15, -18, +20, +21	NO
9	Heterozigot	39, Y, -3, -5, -7, -11, -14, -19, -X	NO

CONCLUSIÓ:

Embrions sans per a la Fibrosi Quística = 4

Embrions sans per a la Fibrosi Quística i que són euploides= 1

Embrions transferibles= Embrió #4

Com és habitual en els Diagnòstic Genètic Preimplantacional, que es realitzi el Diagnostico Genètic Prenatal complet en cas d'embaràs, donat que no s'han analitzat els cromosomes procedents del espermatozoide
--

Quedem a la seva atenció per a qualsevol aclariment
 Atentament,

Dra. Joaquina Navarro
 Bellaterra, XX de XX del XX

