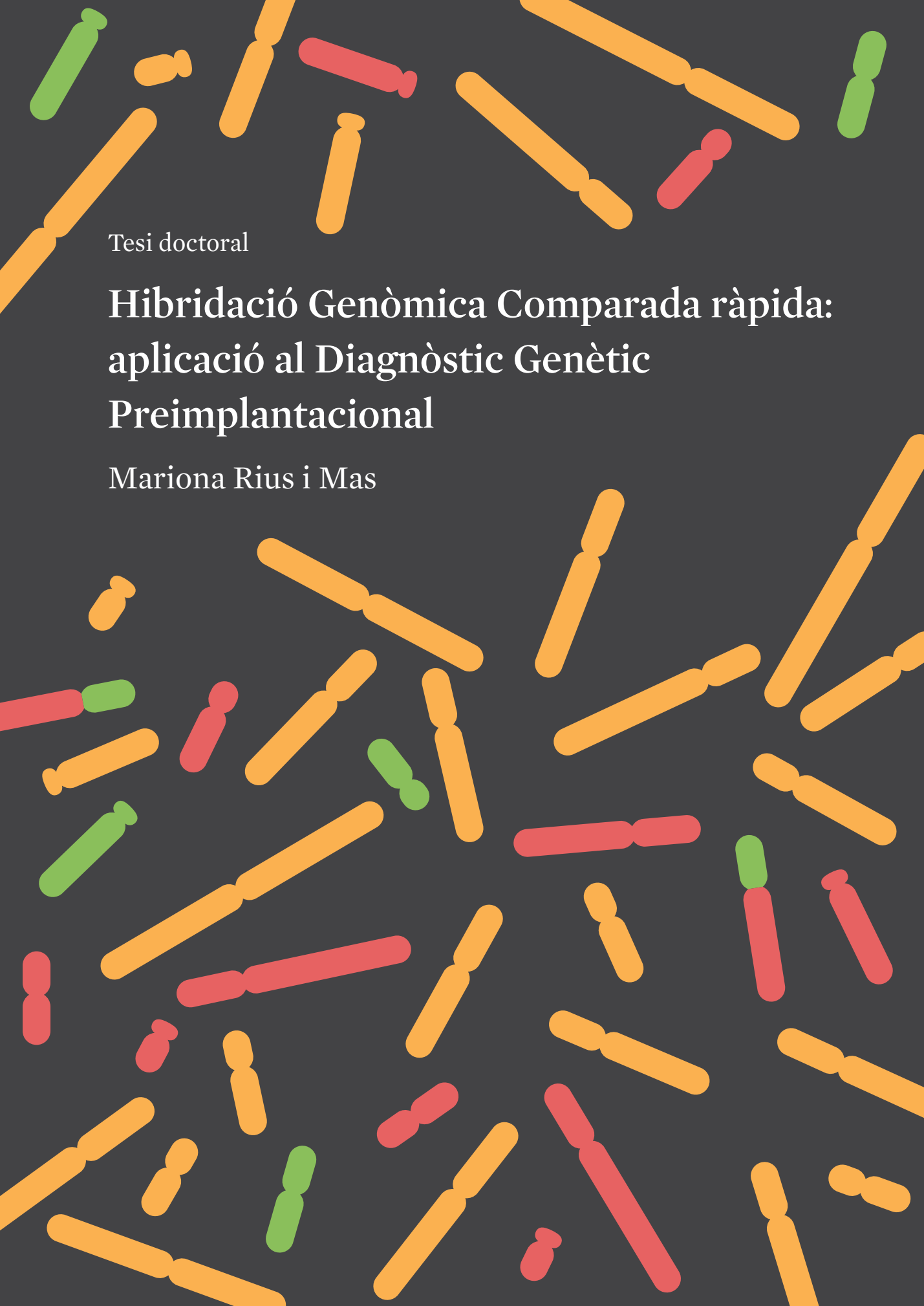


The background of the cover is a dark grey color. It is decorated with numerous stylized, elongated, capsule-shaped elements in three colors: orange, red, and green. These shapes are scattered across the entire page, some appearing as single units and others as pairs, resembling simplified representations of chromosomes or DNA segments. The text is centered in the upper half of the page.

Tesi doctoral

Hibridació Genòmica Comparada ràpida: aplicació al Diagnòstic Genètic Preimplantacional

Mariona Rius i Mas

Hibridació Genòmica Comparada ràpida: aplicació al Diagnòstic Genètic Preimplantacional

Mariona Rius i Mas

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el
programa de doctorat de Biologia Cel·lular.

Mariona Rius i Mas

Bellaterra, desembre de 2010

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

CERTIFIQUEN:

Que Mariona Rius i Mas ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada **“Hibridació Genòmica Comparada ràpida: aplicació al Diagnòstic Genètic Preimplantacional”** per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha portat a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dra. Joaquina Navarro Ferreté Dr. Jordi Benet Català Dra. Maria Oliver Bonet

Bellaterra, desembre de 2010

Aquesta tesi s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- PI 051395 i PI 080012, *Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III*
- 2005SGR00495 i 2009SGR1107 (AGAUR), Generalitat de Catalunya
- Càtedra de Recerca Eugin-UAB

Mariona Rius i Mas ha gaudit d'una beca predoctoral (AP2006-02211) per a la Formació de Professorat Universitari (FPU) concedida pel *Ministerio de Ciencia e Innovación*

Agraïments

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

- Clínica Eugin
- Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau
- Institut Valencià d'Infertilitat de Barcelona
- Institut Marquès
- Centro de Medicina Embrionaria
- Institut Universitari Dexeus
- Centre de Reproducció Assistida de la Clínica Sagrada Família

El meu agraïment a les persones que han contribuït a la realització d'aquesta tesi doctoral i que m'han fet costat durant aquest temps:

- A la Joaquina, per donar-me l'oportunitat de treballar en el seu equip i guiar-me; a la Maria i al Jordi, per la seva experiència.
- A l'Albert, per transmetre'm tot el que sabia i per ensenyar-me que l'actitud positiva és la millor opció per encarar els reptes.
- A la Gemma, la Juliana, la Laia i en Javi, per ajudar-me tant en la feina i per la seva amistat.
- A tots els membres de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, per la seva col·laboració, la seva companyia i les bones estones que hem compartit.
- A la Laura, la Irene, la Natàlia, la Clara, la Montse i a totes les persones de la Clínica Sagrada Família, amb qui també he compartit tot aquest temps.
- A la meva germana Anna, pel seu suport i per la correcció lingüística del manuscrit.

Als meus pares,
per animar-me a seguir aquest camí.

A l'Edmon,
per ser al meu costat al llarg de tot el camí.

Índex

1. Introducció

1.1. Aneuploïdia i reproducció humana	3
1.2. Edat materna i aneuploïdia	4
1.3. El diagnòstic genètic preimplantacional aplicat al cribatge d'aneuploïdies	6
1.3.1. Quines són les indicacions per al PGS?	7
1.3.2. Quines tècniques s'apliquen en el PGS?	8
1.3.3. Quin és el millor estadi cel·lular per aplicar el PGS?	
Una qüestió de mosaïcisme	10
1.4. Translocacions cromosòmiques	12
1.4.1. Translocacions cromosòmiques i reproducció	12
1.4.2. Diagnòstic genètic preimplantacional en portadors de translocacions	15
1.5. Fonament i descripció de les tècniques aplicades en el PGD	16
1.5.1. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	16
1.5.2. Hibridació genòmica comparada	17
1.5.3. <i>Microarrays</i> de CGH (<i>array</i> -CGH)	22
1.5.4. <i>Microarrays</i> amb SNPs (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)	23

2. Hipòtesi i objectius 29

3. Material i mètodes

3.1. Material i mètodes de l'objectiu 1	33
3.1.1. Procedència i aïllament de fibroblasts de línies cel·lulars	33
3.1.2. Hibridació genòmica comparada ràpida per a fibroblasts	34
3.2. Material i mètodes dels objectius 2 i 3	40
3.2.1. Procedència del material biològic de l'objectiu 2	40
3.2.2. Procedència del material biològic de l'objectiu 3	41
3.2.3. Aïllament dels blastòmers	41
3.2.4. Hibridació genòmica comparada ràpida per a blastòmers	42
3.3. Material i mètodes de l'objectiu 4	42
3.3.1. Selecció de casos clínics	42
3.3.2. Procediment del PGS emprant la CGH ràpida	43
3.4. Material i mètodes de l'objectiu 5	46
3.5. Material i mètodes de l'objectiu 6	47

3.5.1. Selecció de casos clínics	47
3.5.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent per al PGD de la doble translocació	47
3.5.3. Procediment del PGD emprant la CGH ràpida	49
3.5.4. Reanàlisi dels embrions descartats en els cicles de FIV-PGD amb CGH ràpida	50

4. Resultats

4.1. Resultats dels objectius 1 i 2	55
Article nº 1: Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. Human Reproduction, 2010; 25(7):1824-35	57
4.2. Resultats de l'objectiu 3	69
Article nº 2: Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. Fertility and Sterility, 24 d'agost de 2010 [Epub ahead of print]	71
4.3. Resultats de l'objectiu 4	77
Resultats de l'aplicació clínica de la CGH ràpida en casos d'edat materna avançada, avortaments de repetició i fallades repetides d'implantació	79
4.3.1. Casos 1 i 2. Indicació: edat materna avançada	79
4.3.2. Casos 3 i 4. Indicació: avortaments de repetició	81
4.3.3. Cas 5. Indicació: fallades repetides d'implantació	81
4.3.6. Resultats globals	82
4.4. Resultats dels objectius 5 i 6	87
Article nº 3 en revisió: Reliability of short comparative genomic hybridization for the detection of unbalanced chromosome segregations in PGD of translocations. (Pendent de revisar)	89

5. Discussió

5.1. Posada a punt de la CGH ràpida en fibroblasts aïllats de línies cel·lulars amb alteracions cromosòmiques conegudes	121
5.2. La CGH ràpida per a l'anàlisi de blastòmers aïllats	122
5.2.1. Adaptació del protocol de CGH ràpida per a blastòmers aïllats	122
5.2.2. Validació i fiabilitat de l'anàlisi de blastòmers d'embrions descartats en casos de PGS-FISH mitjançant CGH ràpida	123

5.3. Estudi citogenètic complet d'embrions descartats en casos de PGS-FISH per a edat materna avançada	125
5.3.1. Tipus d'alteracions cromosòmiques detectades	125
5.3.2. Edat materna i mosaïcisme	127
5.4. Cribatge d'aneuploïdies amb CGH ràpida: aplicació clínica	129
5.4.1. Consideracions metodològiques sobre l'aplicació clínica de la CGH ràpida	129
5.4.2. Èxit del diagnòstic amb la CGH ràpida	130
5.4.3. Tipus d'alteracions cromosòmiques detectades amb la CGH ràpida	131
5.4.4. Implicació de l'aneuploïdia en els problemes de fertilitat associats a AMA, RM i RIF	132
5.5. Estudi citogenètic complet dels embrions de portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades mitjançant el PGD amb CGH ràpida	135
5.5.1. Consideracions metodològiques sobre l'aplicació de la CGH ràpida en el PGD per a translocacions	135
5.5.2. Detecció d'alteracions cromosòmiques parcials mitjançant CGH ràpida en embrions descartats d'un portador 46,XY,t(2;5)(q21;q33) i en el PGD per al portador 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10)	136
5.5.3. Proporcions de les segregacions cromosòmiques de les translocacions	137
5.5.4. Anomalies dels cromosomes no implicats en les translocacions	139
5.5.5. Importància de la CGH ràpida en els resultats dels casos de FIV-PGD per a portadors de translocacions cromosòmiques	140
5.6. Perspectives de futur de la CGH ràpida	143
6. Conclusions	147
7. Bibliografia	153

Llistat d'acrònims i abreviatures emprades:

- ADO: *allele drop out*
- AMA: *advanced maternal age*
- CGH: *comparative genomic hybridization*
- 1CP, 2CP: *primer corpuscle polar, segon corpuscle polar*
- CEP: *chromosome enumeration probe*
- DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DNA: *deoxyribonucleic acid*
- DOP-PCR: *degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction*
- ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embryology*
- FISH: *fluorescent in situ hybridization*
- FIV: *fecundació in vitro*
- FSH: *follicle-stimulating hormone*
- GnRH: *gonadotropin-releasing hormone*
- HCG: *human chorionic gonadotropin*
- IAC: *inseminació artificial de cònjuge*
- ICSI: *intracytoplasmic sperm injection*
- LH: *luteinizing hormone*
- LSI: *locus specific identifier*
- MII: *òcit en estadi de metafase II*
- PBS: *phosphate buffered saline*
- PGD: *preimplantation genetic diagnosis*
- PGS: *preimplantation genetic screening*
- PVA: *polivinil alcohol*
- RIF: *recurrent implantation failure*
- RM: *recurrent miscarriage*
- SDS: *sodium dodecyl sulfate*
- SNPs: *single nucleotide polymorphisms*
- SSC: *standard saline citrate*
- TE: *trofoectoderm*
- TEL: *sondes télomériques*
- WCP: *whole chromosome painting*
- WGA: *whole genome amplification*

Introducció

1. Introducció

1.1. Aneuploïdia i reproducció humana

L'espècie humana té una taxa de fecunditat molt baixa. Per a una dona en edat fèrtil, la probabilitat de concebre i portar a terme un embaràs fins el naixement és aproximadament del 25% en cada cicle menstrual (Short, 1978). En les parelles amb problemes de fertilitat, aquesta probabilitat és molt més baixa, entorn del 10%. En aquests casos, les tècniques de reproducció assistida ajuden a incrementar les possibilitats d'embaràs, seleccionant els millors embrions segons criteris de morfologia i grau de desenvolupament. Així doncs, la taxa d'implantació dels embrions seleccionats i transferits és del 25-30% (Wilton, 2005). Les causes per les quals el 70-75% dels embrions transferits no implanten poden ser molt diverses: anomalies en el citoplasma de l'oòcit o en els mitocondris (Krey i Grifo, 2001; Bartmann *et al.*, 2004), alteracions en els senyals entre l'embrió en estadi de blastocist i l'úter (Macklon *et al.*, 2002), una inadequada proliferació endometrial (Meldrum, 1993), etc. Però sembla ser que la principal causa de la baixa fecunditat humana és l'aneuploïdia, és a dir, l'alteració en el nombre de cromosomes de la dotació cromosòmica humana (46,XX o 46,XY). De fet, en estudis d'embrions descartats de cicles de fecundació *in vitro* (FIV), donats per a la recerca, en què s'analitzaven tots els cromosomes de les diferents cèl·lules un cop aïllades, es va detectar que el 75% d'aquests embrions presentava alteracions cromosòmiques, com a mínim en una de les cèl·lules, mentre que només el 25% era completament euploide (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000).

L'aneuploïdia, però, no només afecta el procés d'implantació. S'ha vist que el 60% dels avortaments espontanis són causats per alteracions cromosòmiques numèriques (Hassold *et al.*, 1980; Jacobs, 1992). En el 50% d'aquests casos, les alteracions corresponen a trisomies dels cromosomes 16, 21 o 22, mentre que el 10% està representat per la monosomia del cromosoma X (Hassold *et al.*, 1980). Rarament s'han detectat altres monosomies en embarassos clínicament reconeguts (Boue *et al.*, 1985); en canvi, les trisomies poden afectar qualsevol dels 24 cromosomes existents.

A més, és possible que, en gestacions més primerenques, molts fetus es perdin sense haver-los detectat, a causa de l'aneuploïdia. En un estudi d'avortaments induïts (Boue *et al.*, 1985), es va veure que la incidència d'aneuploïdies en fetus de tres i 10 setmanes de gestació era del 9% i del 5%, respectivament. D'aquestes dades es podria deduir l'existència d'una selecció negativa de

l'aneuploïdia, especialment de les monosomies, durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari (Jacobs i Hassold, 1995).

D'altra banda, hi ha anomalies cromosòmiques que permeten tot el desenvolupament embrionari i són compatibles amb la vida, però provoquen malformacions i/o retard mental en l'individu portador. Aquestes anomalies afecten els cromosomes sexuals i alguns autosòmics. En relació als cromosomes sexuals, trobem la síndrome de Turner (45,X0), que afecta un de cada 5000 naixements i és la única monosomia viable en humans. La resta d'alteracions cromosòmiques corresponen a trisomies, com la que produeix la síndrome de Klinefelter (47,XXY), que afecta un de cada 1000 naixements (amb variants tetrasòmiques 48,XXYY o 48,XXXY, menys comunes). També trobem altres cariotips viables com són els 47,XXX o 47,XYY. Pel que fa a les trisomies autosòmiques, la més freqüent és la del cromosoma 21, que produeix la coneguda síndrome de Down, amb una freqüència d'un de cada 667 naixements. Amb menys freqüència, trobem la síndrome d'Edwards (1/6250 naixements), provocada per la trisomia del cromosoma 18, i la de Patau (1/12048 naixements), resultat de la trisomia del cromosoma 13. En aquests dos casos, el 90% dels afectats no supera els primers mesos de vida (Jacobs i Hassold, 1995).

1.2. Edat materna i aneuploïdia

En condicions naturals, el 75% de les dones de 30 anys que intenten concebre ho aconsegueixen en un any. Als 35 anys, aquest percentatge disminueix lleugerament fins el 66%, però, als 40 anys, la probabilitat d'embaràs és només del 44% (Leridon, 2004). Per tant, a mesura que augmenta l'edat materna disminueix la taxa d'implantació. S'han indicat diversos factors implicats en aquesta davallada, dels quals els dos més acceptats són la disminució de la receptivitat de l'úter i l'envelliment dels oòcits (Meldrum, 1993). No obstant, s'han vist taxes d'embaràs elevades en dones d'edat avançada (*advanced maternal age*, AMA), receptores d'oòcits de dones joves (Abdalla *et al.*, 1993; Sauer *et al.*, 1996), de manera que el primer factor no estaria clarament lligat a la baixa implantació observada. En canvi, s'han trobat moltes evidències de la implicació oòcitària en els problemes de fertilitat associats a l'AMA i, especialment, de l'elevada incidència d'aneuploïdies en oòcits de dones de més de 37 anys (Dailey *et al.*, 1996; Nicolaidis i Petersen, 1998; Pellestor *et al.*, 2003; Pellestor *et al.*, 2005; Fragouli *et al.*, 2006).

De fet, l'aneuploïdia present en l'espècie humana té un origen predominantment femení. Això podria ser degut a una regulació menys estricta de la meiosi I en l'oogènesi que en l'espermatogènesi (LeMaire-Adkins *et al.*, 1997). Quan en un espermatòcit es produeix un error en la meiosi I, el procés s'atura per l'acció d'un punt de control i aquest s'elimina; en canvi, en la meiosi I femenina aquest punt de control toleraria la presència d'alteracions (Hunt *et al.*, 1995).

Així doncs, l'aneuploïdia s'observa en oòcits de dones de totes les edats (Obradors *et al.*, 2010), però, a més, incrementa de manera important a mesura que avança l'edat materna. Els mecanismes de producció d'aneuploïdia que primer es van establir són la no-disjunció de cromosomes homòlegs i la separació precoç de cromàtides germanes en la meiosi I. El primer mecanisme comporta el guany o la pèrdua d'un cromosoma sencer, mentre que el segon, que és més freqüent, comporta el guany o la pèrdua de cromàtides (Angell *et al.*, 1993; Angell, 1997). Durant la meiosi II també es poden produir errors cromosòmics, tot i que en una proporció molt menor. Finalment, també cal considerar els errors mitòtics produïts durant l'oogènesi, que condueixen a la presència d'oògonies aneuploides i que, conseqüentment, comporten la presència d'alteracions cromosòmiques restringides a l'oòcit en metafase II (MII) o al primer corpuscle polar (1CP), amb dotacions cromosòmiques no complementàries (Cozzi *et al.*, 1999; Pujol *et al.*, 2003a; Obradors *et al.*, 2010).

Més endavant, s'ha vist que els mecanismes acabats d'anomenar estan molt relacionats amb l'actuació conjunta de diversos factors, com per exemple la quantitat i posicionament dels punts calents de recombinació meiòtica en els bivalents (cromosomes homòlegs aparellats durant la meiosi I) (Lamb i Hassold, 2004). A més, s'han descrit patrons de no-disjunció específics de cromosomes concrets: per exemple, s'ha observat que tots els casos de trisomia del cromosoma 16 s'originen durant la meiosi I, mentre que la trisomia 18 es produeix en la meiosi II (Hassold *et al.*, 2007).

Les alteracions produïdes per aquests mecanismes es mantenen al llarg del desenvolupament oocitari i es troben també en estadis embrionaris posteriors (Sandalinas *et al.*, 2001). De fet, s'ha descrit que el 90% de les anomalies cromosòmiques dels embrions s'originen per no-disjunció en la meiosi I materna (Nicolaidis i Petersen, 1998). Així doncs, les alteracions cromosòmiques dels oòcits tenen repercussió en l'embrió. És a dir que, a part de la disminució de la taxa d'implantació, en dones d'AMA també hi ha un increment de la taxa d'avortament. Els cromosomes més freqüentment alterats en aquests casos són el 15, el 16, el 22 i l'X (Warburton *et al.*, 1986).

Finalment, l'AMA també comporta un augment del risc de tenir descendència afectada per alteracions cromosòmiques numèriques. El cas més conegut és el de la trisomia 21 (síndrome de Down), la incidència de la qual s'ha descrit que augmenta exponencialment amb l'increment de l'edat de la mare (Hassold i Jacobs, 1984). Així mateix, el risc també augmenta en la resta de casos de trisomies viables (13, 18, X i Y) (Warburton *et al.*, 1986).

1.3. El diagnòstic genètic preimplantacional aplicat al cribatge d'aneuploïdies

El diagnòstic genètic preimplantacional (*preimplantation genetic diagnosis*, PGD) va néixer com a complement del diagnòstic prenatal de malalties monogèniques. La primera aplicació la va portar a terme el grup de Handyside el 1990 i va permetre la selecció d'embrions no afectats per malalties com l'adrenoleucodistrofia o el retard mental lligat al cromosoma X, de les quals els pares n'eren portadors. Aviat, però, es va creure que, tenint en compte que l'aneuploïdia és una de les causes més evidents de la baixa fecunditat humana, la selecció d'embrions lliures d'alteracions cromosòmiques podria augmentar-ne la taxa d'implantació, reduir la taxa d'avortament i, òbviament, evitar el naixement d'individus amb síndromes produïdes per anomalies cromosòmiques. D'aquí va derivar el PGD per al cribatge d'aneuploïdies (*aneuploidy screening*, AS), també anomenat PGS (*preimplantation genetic screening*), que inicialment va consistir en l'anàlisi únicament dels cromosomes responsables de síndromes viables (Munne i Weier, 1996; Verlinsky *et al.*, 1996a; Verlinsky *et al.*, 1996b).

Des de les primeres aplicacions, però, el PGS s'ha anat convertint en una anàlisi rutinària en casos on se sap que l'aneuploïdia és un dels factors causants de la infertilitat. Així, en l'última recopilació de casos de PGD de l'*European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE)PGD Consortium* es comptabilitzen 12609 casos de PGS des del gener de 1997 fins el desembre de 2006 (Goossens *et al.*, 2009), amb una taxa global d'implantació dels embrions transferits després de ser seleccionats citogenèticament del 14,3% (embrions que arriben a mostrar batec cardíac positiu respecte els que s'han transferit).

1.3.1. Quines són les indicacions per al PGS?

El PGS es pot aplicar a qualsevol parella que vulgui fer una selecció d'embrions euploides per transferir a l'úter matern dins un cicle de FIV, però hi ha casos en què es considera especialment indicat. L'aplicació més extensa és en casos d'edat materna avançada (AMA), en els quals, com s'ha explicat anteriorment, l'aneuploïdia juga un paper fonamental. En alguns estudis s'ha descrit un efecte beneficiós en la taxa d'implantació o embaràs dels embrions seleccionats amb PGS (Gianaroli *et al.*, 1999; Munne *et al.*, 2003) i en altres, tot i que la taxa d'implantació no s'ha vist augmentada, sí que s'ha observat un increment significatiu en el manteniment de l'embaràs i el nombre de naixements després del PGS (Munne *et al.*, 1999).

Una altra aplicació àmpliament considerada del PGS és en pacients amb avortaments de repetició (*recurrent miscarriages*, RM). Aquest terme s'assigna a parelles que han tingut tres avortaments consecutius. La prevalència d'aquest fenomen en la població és de l'1% i en el 50% dels casos no hi ha una causa aparent (Li *et al.*, 2002). La presència d'aneuploïdies en els avortaments espontanis (Hassold *et al.*, 1980), juntament amb una elevada incidència (50-60%) d'alteracions cromosòmiques numèriques en embrions de parelles amb avortaments de repetició no explicats (Pellicer *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2003; Munne *et al.*, 2005a) va fer pensar que, en aquests casos, l'aplicació del PGS podria ser beneficiós. De totes maneres, els estudis fets fins ara són controvertits i no està clar que la taxa d'avortament es pugui reduir només amb una selecció cromosòmica (Werlin *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2005; Munne *et al.*, 2005a), ja que s'han apuntat altres factors implicats en aquest fenomen, com ara la qualitat de la morfologia embrionària, la receptivitat endometrial o el sistema immunitari.

El PGS també es considera indicat per a parelles amb fallades recurrents d'implantació (*repeated implantation failure*, RIF). Aquest terme es dona després de tres o més cicles de FIV sense èxit o bé quan no hi ha embaràs després d'haver transferit 10 o més embrions de bona qualitat (en diferents cicles de FIV) (ESHRE PGD Consortium Steering Committee, 2002). De la mateixa manera que en els avortaments de repetició, es creu que hi pot haver molts factors causants de la fallada d'implantació. L'elevada incidència d'aneuploïdia n'és un, però també una receptivitat endometrial disminuïda, patologies uterines o, fins i tot, una tècnica de transferència embrionària inadequada (Donoso *et al.*, 2007). A més, en aquests casos també cal tenir en compte altres circumstàncies com l'edat materna, la qualitat embrionària o el nombre d'òcits obtinguts. Hi ha poques dades sobre aquest tema, però en alguns estudis no s'ha vist millora en els resultats

clínic del PGS (Harper *et al.*, 2006), especialment en dones grans (Munne *et al.*, 2003). D'altra banda, en dones joves hi ha controvèrsia: mentre que alguns autors descriuen taxes d'implantació més elevades (Kahraman *et al.*, 2000; Pehlivan *et al.*, 2003; Platteau *et al.*, 2006), altres no troben millores després d'aplicar el PGS (Gianaroli *et al.*, 1999; Werlin *et al.*, 2003).

Finalment, també s'ha recomanat el PGS a dos grups en què l'aneuploidia sembla tenir un origen clarament masculí. Un grup és el de pacients amb azoospermia, obstructiva o no obstructiva, ja que s'ha vist una elevada incidència d'aneuploidies en embrions derivats d'homes azoospermics (Platteau *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2005). L'altre grup és el de pacients amb espermatozoides amb anomalies morfològiques severes, en els quals s'ha observat un nombre incrementat d'alteracions cromosòmiques (Bernardini *et al.*, 1998; Calogero *et al.*, 2003). De totes maneres, gairebé no hi ha estudis que demostrin l'efecte positiu del PGS sobre les taxes d'implantació i embaràs en casos de factor masculí i, per tant, aquesta és una indicació més minoritària.

1.3.2. Quines tècniques s'apliquen en el PGS?

Tradicionalment, la tècnica més emprada en el PGS ha estat la hibridació *in situ* fluorescent (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) amb sondes que permeten identificar, en el nucli fixat de la cèl·lula, alguns cromosomes predeterminats (Pinkel *et al.*, 1988). A causa de limitacions metodològiques, el nombre màxim de cromosomes analitzats en un PGS emprant la FISH és de 13, aplicant rondes d'hibridació successives (Abdelhadi *et al.*, 2003), tot i que rutinàriament se n'analitzen fins a nou (Pujol *et al.*, 2003a). S'estudien preferentment aquells cromosomes que s'han vist més freqüentment implicats en avortaments espontanis i en naixements amb alteracions cromosòmiques viables (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y).

Com s'ha dit abans, segons les últimes dades de l'ESHRE PGD Consortium (Goossens *et al.*, 2009) sobre PGS realitzat amb FISH, la taxa d'implantació (embrions que produeixen batec cardíac positiu respecte els embrions transferits) és tan sols del 14,3%. A més, estudis recents indiquen que el PGS no només no incrementa la taxa d'implantació embrionària, sinó que, en alguns casos, fins i tot la redueix (Staessen *et al.*, 2004; Mastenbroek *et al.*, 2007; Hardarson *et al.*, 2008; Staessen *et al.*, 2008). Una de les raons que podria explicar el fet que l'èxit del PGS no sigui tan elevat com s'esperava és el nombre limitat de cromosomes que s'analitzen amb la FISH, nou dels 24 existents. Per aquest motiu, l'alternativa plantejada és aplicar tècniques que permetin l'estudi simultani dels 22 cromosomes autosòmics i els dos sexuals.

La hibridació genòmica comparada (*comparative genomic hybridization*, CGH) és una de les tècniques més ben establertes per a l'anàlisi de tot el complement cromosòmic. Aquesta tècnica va ser descrita per Kallioniemi *et al.* el 1992 com a mètode per detectar marcadors cromosòmics en DNA tumoral. Posteriorment, el seu procediment s'ha adaptat a l'anàlisi de desequilibris cromosòmics presents en cèl·lules aïllades, prèvia amplificació del seu DNA (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999).

Tot i que la CGH s'ha anat aplicant de manera continuada en el PGS (Wells *et al.*, 2002; Wilton, 2005; Sher *et al.*, 2007; Obradors *et al.*, 2008; Fragouli *et al.*, 2009; Obradors *et al.*, 2009; Sher *et al.*, 2009), la complexitat de la tècnica i, sobretot, la seva duració han fet que rutinàriament no hagi estat la metodologia escollida. El PGS mitjançant la CGH requereix aproximadament quatre dies: un dia per al processat de les mostres, 40-72 hores per a la hibridació i, finalment, depenent del nombre de cèl·lules per diagnosticar, l'anàlisi dels resultats pot comportar un dia més. Per tant, la CGH convencional aplicada al PGS de blastòmers és incompatible amb la duració del cicle de FIV, fet que fa necessària la criopreservació dels embrions biopsiats i diagnosticats com a citogenèticament euploides per a la posterior transferència en un cicle addicional.

És ben sabut que la criopreservació afecta la viabilitat dels embrions (Joris *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2005) i en redueix el potencial d'implantació (Edgar *et al.*, 2000), de manera que l'eficiència del PGD en aquests casos es veu substancialment reduïda. Cal dir, però, que el desenvolupament d'una nova tècnica de criopreservació, la vitrificació (Mukaida *et al.*, 2003), ha millorat la taxa de supervivència dels embrions després de la descongelació, especialment dels que es troben en l'estadi de blastocist (Zhang *et al.*, 2009). Això podria millorar l'èxit del PGS emprant la CGH (Sher *et al.*, 2009). Malgrat tot, és evident que la situació ideal seria poder aplicar la CGH en el PGS evitant el procés de criopreservació.

En aquest sentit, una alternativa bastant utilitzada és l'aplicació de la CGH en el primer corpuscle polar (1CP) que, pel fet de tenir una dotació cromosòmica complementària a la de l'oòcit en metafase II (MII), informa indirectament de la dotació cromosòmica que l'embrió rep de la part femenina (Wells *et al.*, 2002; Obradors *et al.*, 2008; Fragouli *et al.*, 2009; Obradors *et al.*, 2009). Aquesta aproximació ha resolt el problema de la criopreservació, ja que la biòpsia es fa tres dies abans que en el cas dels blastòmers d'embrions en dia+3. Per contra, aquesta anàlisi no permet detectar les possibles alteracions cromosòmiques originades durant la meiosi II materna ni les alteracions cromosòmiques d'origen masculí.

Recentment, la metodologia de la CGH convencional s'ha adaptat a la tecnologia dels *microarrays*, fet que ha originat una nova varietat de la CGH, l'*array-CGH* (Hu *et al.*, 2004;

Wells *et al.*, 2004; Le Caignec *et al.*, 2006). Aquesta tècnica evita la criopreservació i la detecció parcial d'alteracions, ja que el procés del PGS té una durada de només unes 24 hores i, per tant, es pot aplicar en blastòmers d'embrions en estadi de 6-8 cèl·lules (dia+3). A més, ofereix una resolució més elevada que la de la CGH convencional. Actualment, ja s'han fet algunes aplicacions clíniques de l'*array*-CGH (Hellani *et al.*, 2008; Fishel *et al.*, 2010) alhora que s'avança en la validació de la metodologia (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2010) per acabar d'assegurar la fiabilitat del diagnòstic en el PGS. D'altra banda, la principal limitació de l'*array*-CGH és el seu cost, molt més elevat que el de la CGH convencional.

1.3.3. Quin és el millor estadi cel·lular per aplicar el PGS? Una qüestió de mosaïcisme

Un dels temes més polèmics, a part de la tècnica emprada, és l'estadi cel·lular en el qual s'ha de fer el PGS. I la controvèrsia ha nascut, principalment, a causa de l'existència de mosaïcisme. El mosaïcisme és la presència de dues o més línies cel·lulars diferents en un embrió i és un fenomen molt comú en embrions humans (Munne *et al.*, 1994; Bielanska *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2009). Recopilant diversos estudis de FISH, s'ha vist que la proporció d'embrions que presenten mosaïcisme es troba entre el 25% i el 70% (Bielanska *et al.*, 2002; Wilton, 2005). A més, aquest fenomen sembla ser inherent a tots els estadis del desenvolupament embrionari primerenc, ja que s'ha observat tant en embrions de 6-8 cèl·lules (Munne *et al.*, 1994; Delhanty *et al.*, 1997), com en blastocists (Evsikov i Verlinsky, 1998; Ruangvutilert *et al.*, 2000; Coonen *et al.*, 2004). Pel fet que la cèl·lula diagnosticada pot tenir una dotació cromosòmica diferent de la resta, el mosaïcisme és un dels problemes més importants del PGS en embrions.

De totes maneres, el mètode més emprat és l'anàlisi de blastòmers dels embrions en dia+3. De fet, les dades recopilades per l'ESHRE PGD Consortium (Goossens *et al.*, 2009) mostren que en el 85,6% dels casos de PGS s'ha fet biòpsia de blastòmer. Aquesta estratègia permet detectar alteracions cromosòmiques d'origen tant matern com patern, així com possibles anomalies generades en les primeres divisions mitòtiques de l'embrió.

Per poder detectar el mosaïcisme, s'ha recomanat fer l'anàlisi de dos blastòmers en el PGS (Baart *et al.*, 2006). Tot i que s'han descrit taxes d'implantació acceptables en casos on s'ha biopsiat dues cèl·lules (Van de Velde *et al.*, 2000), altres estudis recomanen una estratègia menys invasiva, biopsiant un sol blastòmer, per tal d'evitar comprometre el futur desenvolupament de l'embrió (Goossens *et al.*, 2008).

D'altra banda, alguns autors argumenten que la constitució cromosòmica dels blastòmers d'embrions en dia+3 podria no representar correctament la de l'embrió que implanta (en estadi de blastocist) (Li *et al.*, 2005; Fragouli *et al.*, 2008; Barbash-Hazan *et al.*, 2009). En aquesta línia, s'ha postulat que alguns embrions mosaics amb cèl·lules euploides i aneuploides podrien fer una auto-correcció de les alteracions cromosòmiques, mitjançant el creixement preferencial de les cèl·lules euploides sobre les aneuploides, durant els primers estadis de l'embriogènesi i després de la implantació (Li *et al.*, 2005; Barbash-Hazan *et al.*, 2009). Contràriament, altres estudis suggereixen que aquests embrions podrien acumular més alteracions cromosòmiques causades per errors mitòtics (Munne *et al.*, 2005b; DeUgarte *et al.*, 2008).

Independentment de si hi ha correcció o acumulació d'anomalies cromosòmiques, darrerament s'ha promocionat el PGS en l'estadi de blastocist, per tal d'obtenir el diagnòstic de l'embrió en el moment més proper a la implantació. En aquest cas, es poden analitzar diverses cèl·lules del trofoectoderm (TE) utilitzant la FISH, fet que possibilita la detecció del mosaïcisme (McArthur *et al.*, 2005). Però, consubstancial a la FISH, roman el problema de la limitació en el nombre de cromosomes que s'estudia. De nou, el procediment alternatiu d'elecció és la CGH. Aquest mètode, aplicat al DNA de 5-10 cèl·lules del TE, sembla que podria oferir un diagnòstic molt més acurat (Fragouli *et al.*, 2008; Schoolcraft *et al.*, 2010). Tot i que, en analitzar les cèl·lules juntes, el resultat obtingut és una mitjana de la constitució cromosòmica del material biopsiat i, per tant, no es pot descartar categòricament la presència de mosaïcisme. D'altra banda, el PGS aplicat a blastocists no és apropiat en pacients que produeixen embrions amb poc desenvolupament *in vitro* i, a més, actualment molts laboratoris encara tenen dificultats (metodològiques i relacionades amb els medis de cultiu) per aconseguir que els embrions arribin a l'estadi de blastocist.

Una altra limitació del PGS en l'estadi de blastocist és que, sigui quina sigui la tècnica utilitzada (però sobretot si es tracta de la CGH), es requereix la criopreservació dels embrions biopsiats mentre s'obtenen els resultats. Això és degut a que, en aquest estadi, l'embrió fa eclosió o *hatching*, quedant desproveït de la zona pel·lúcida, i és llavors quan adquireix la capacitat d'implantar en l'úter matern.

Finalment, com s'ha apuntat anteriorment, una altra alternativa per al PGS és l'anàlisi del primer o del primer i segon corpuscles polars (1CP, 2CP) (Verlinsky *et al.*, 2001), basada en el fet que la majoria de les aneuploïdies són d'origen matern. L'avantatge principal d'aquesta estratègia és que s'analitza un cèl·lula que no interfereix en el desenvolupament embrionari i, tant emprant la

FISH com la CGH, no requereix la criopreservació dels embrions analitzats. Però, com també s'ha dit prèviament, no es poden detectar ni els errors cromosòmics d'origen patern ni els errors mitòtics produïts en l'etapa postzigòtica, responsables del mosaïcisme en l'embrió.

1.4. Translocacions cromosòmiques

1.4.1. Translocacions cromosòmiques i reproducció

Les translocacions són un tipus d'alteració cromosòmica estructural que comporta el trencament i la reordenació i fusió de fragments de cromosomes generalment no homòlegs. Si són equilibrades, és a dir, que no comporten guanys o pèrdues cromosòmiques, i els punts de trencament no afecten la funció de gens, les translocacions no produeixen alteracions fenotípiques en els portadors.

Es tracta de les anomalies genètiques més comunes en humans, amb una incidència del 0,2% en nounats, del 0,6% en parelles infèrtils i de fins un 9,2% en pacients amb avortaments de repetició (Stern *et al.*, 1999). Aquestes freqüències s'expliquen per la producció de gàmetes desequilibrats, resultants de la complexa segregació cromosòmica d'aquestes reorganitzacions en la meiosi I. Així doncs, tot i no afectar el fenotip dels portadors, sí que en comprometen la reproducció: les parelles portadores de translocacions cromosòmiques equilibrades tenen un elevat risc de no ser fèrtils, de patir avortaments repetidament i de tenir fills amb alteracions fenotípiques causades per desequilibris cromosòmics.

Hi ha dos tipus de translocacions: les robertsonianes i les recíproques.

Les translocacions robertsonianes es produeixen quan els braços "q" de dos cromosomes acrocèntrics (13, 14, 15, 21 i 22), fragmentats a nivell dels centròmers, es fusionen donant lloc a un únic cromosoma derivatiu anòmal. La freqüència d'aquestes alteracions és d'un de cada 900 individus. La més comuna és la que es dona entre els cromosomes 13 i 14 ($t(13;14)(q10;q10)$), amb una freqüència del 75%, i la que involucra els cromosomes 14 i 21 ($t(14;21)(q10;q10)$), amb una freqüència del 10% (Miller i Therman, 2001).

Durant la meiosi I, els fragments homòlegs dels cromosomes involucrats en la translocació (el derivatiu i els normals) s'aparellen entre ells formant una figura trivalent (Figura 1.1), que pot generar diferents combinacions cromosòmiques depenent de quin dels tres tipus possibles de segregació es produeixi: la 2:1 alternant, la 2:1 adjacent o bé la 3:0. Tan sols l'alternant produeix

gàmetes normals o equilibrats, mentre que l'adjacent i la 3:0 produeixen gàmetes monosòmics/disòmics i nul·lisòmics/trisòmics, respectivament. Els desequilibris en aquests gàmetes, a més d'impedir la implantació o induir l'avortament, poden produir síndromes viables en els nounats, com és el cas de la trisomia del cromosoma 13 (síndrome de Patau) o la del 21 (síndrome de Down).

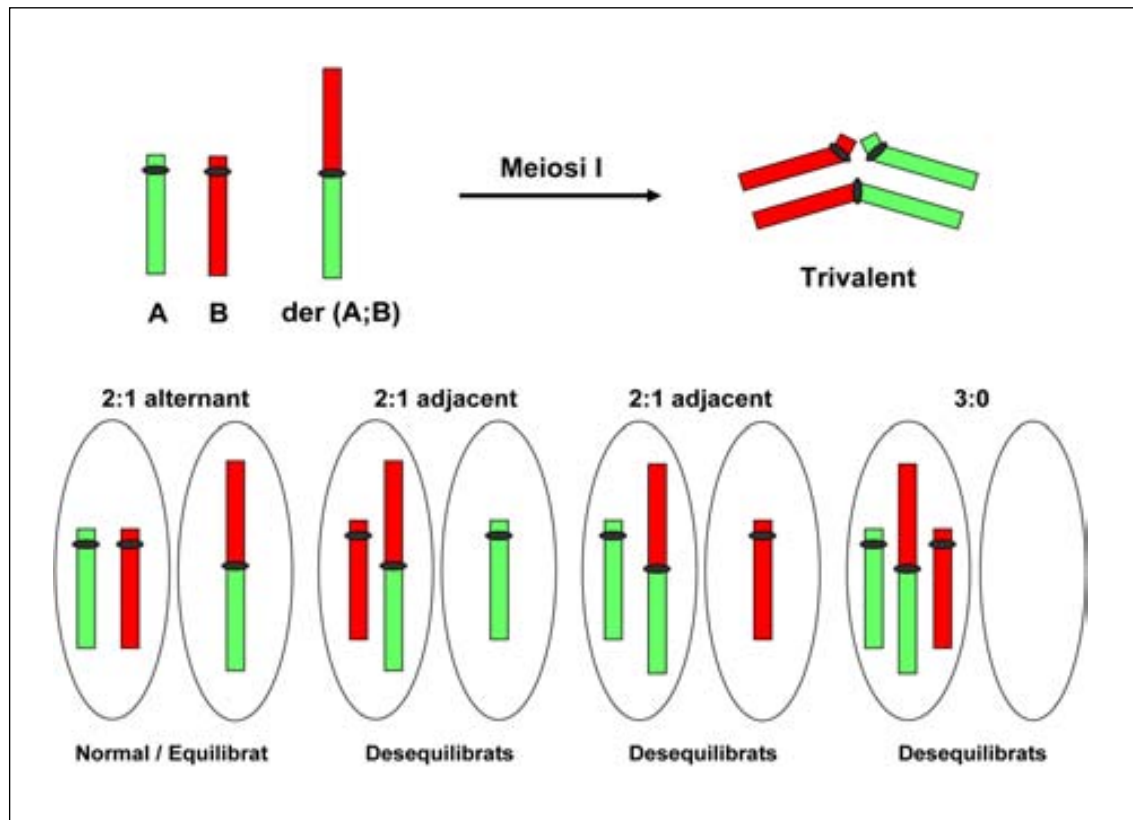


Figura 1.1. Esquema d'una translocació robertsoniana, el trivalent format en la meiosi I i les possibles segregacions resultants. A la part superior es mostren els cromosomes normals i el derivatiu i la figura trivalent formada per aconseguir l'aparellament dels fragments homòlegs. A la part inferior es mostren els possibles gàmetes resultants de les diferents segregacions després de la primera i la segona divisions meiótiques.

Les translocacions recíproques es produeixen quan dos cromosomes no homòlegs intercanvien fragments terminals, generant dos cromosomes derivatius anòmals. Aquest és el tipus d'alteració estructural més freqüent en la població, amb una incidència d'un de cada 500 individus.

Durant la meiosi I, els fragments cromosòmics homòlegs implicats (dels cromosomes normals i dels derivatius) s'aparellen i formen una figura quadrivalent (Figura 1.2), que pot generar diferents combinacions cromosòmiques depenent de quin dels cinc tipus de segregació possibles es produeixi: la 2:2 alternant, la 2:2 adjacent-1, la 2:2 adjacent-2, la 3:1 o la 4:0. Per tant, sense tenir en compte possibles recombinacions en la regió intersticial del quadrivalent, es poden produir fins a 32 gàmetes diferents, dels quals només els quatre resultants de la segregació

alternant seran normals (2) o equilibrats (2). Això implica que els portadors de translocacions recíproques tinguin poques oportunitats de concebre un nadó sa. Tot i així, hi ha consens sobre el fet que cada translocació té un patró de segregació específic, que depèn principalment dels cromosomes involucrats en la reorganització, dels punts de trencament, de la mida dels segments intersticials del quadrivalent i dels llocs calents en recombinació meiótica específics (Benet *et al.*, 2005; Oliver-Bonet *et al.*, 2005).

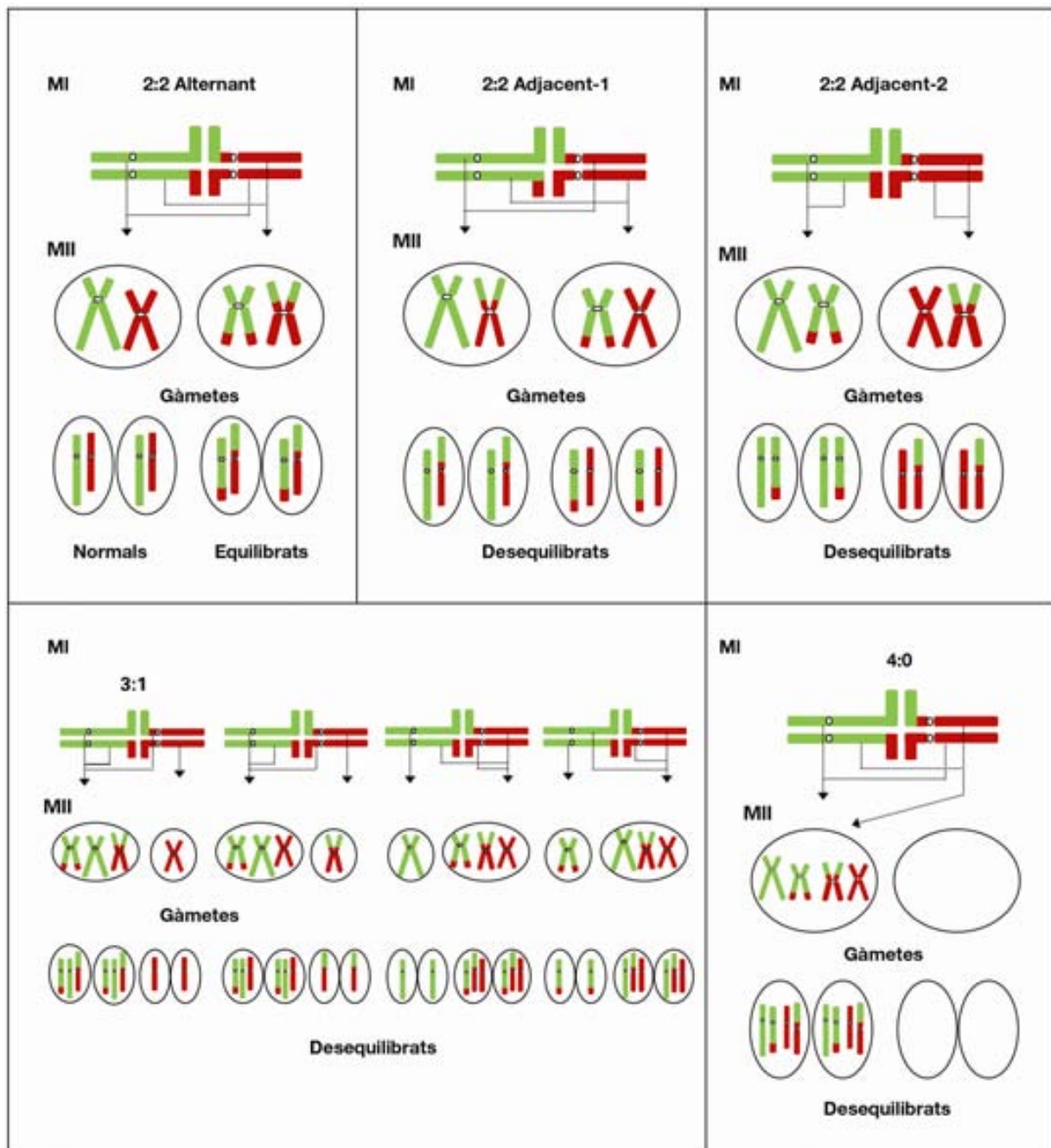


Figura 1.2. Esquema d'una translocació recíproca amb els diferents tipus de segregació del quadrivalent format per aconseguir l'aparellament dels fragments homòlegs durant la meiosi I. S'indiquen les diverses combinacions cromosòmiques possibles, sense tenir en compte la recombinació, i els gàmetes formats després de la meiosi II. (Adaptació de Benet *et al.*, 2005).

1.4.2. Diagnòstic genètic preimplantacional en portadors de translocacions

El diagnòstic genètic preimplantacional s'aplica de manera regular en portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades. La seva funció principal és seleccionar embrions amb complements cromosòmics normals o equilibrats i transferir-los, evitant així els avortaments repetits, el naixement de nadons afectats per alteracions cromosòmiques resultants d'una segregació desequilibrada i, fins i tot, la manca d'implantació relacionada amb els corresponents desequilibris cromosòmics.

Novament, la tècnica fins ara més utilitzada per a aquesta finalitat ha estat la FISH. En aquest cas, s'empren combinacions de sondes de DNA de regions cromosòmiques específiques dels cromosomes involucrats en la translocació, marcades amb fluorocroms, de manera que permeten diferenciar clarament els cromosomes normals dels derivatius.

La taxa d'implantació actual aconseguida amb el PGD emprant la FISH, segons la recopilació que realitza l'ESHRE PGD Consortium, és del 16% per a les translocacions robertsonianes i del 13% per a les recíproques (Goossens et al., 2009). Aquesta taxa és força baixa, considerant que els embrions seleccionats per a transferir són normals o equilibrats per als cromosomes implicats en les reorganitzacions. No obstant, alguns estudis apunten que en els embrions seleccionats la incidència d'aneuploïdia podria ser elevada (Gianaroli *et al.*, 2002; Kuliev i Verlinsky, 2002; Pujol *et al.*, 2003b). De fet, el grup de Gianaroli va evidenciar, l'any 2002, l'existència d'efectes intercromosòmics (*interchromosomal effect*, ICE), fenomen ja descrit per Lejeune el 1963; aquest ICE causaria aneuploïdies en altres cromosomes diferents dels implicats en les translocacions, especialment en portadors de translocacions robertsonianes.

Partint d'aquesta base, el cribatge d'aneuploïdies simultani al PGD de translocacions podria millorar les taxes d'implantació i reduir encara més el risc d'avortament dels embrions transferits en aquests casos. Emprant la FISH, com s'ha dit, es pot analitzar tan sols un nombre limitat dels cromosomes del complement. Per tant, la utilització d'una tècnica com la CGH, que permetés detectar les segregacions cromosòmiques desequilibrades i alhora analitzar tot el complement cromosòmic, seria una bona opció per al PGD de famílies amb progenitors portadors de translocacions (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2005).

1.5. Fonament i descripció de les tècniques aplicades en el PGD

1.5.1. Hibridació *in situ* fluorescent

Com ja s'ha explicat, la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) sobre nuclis de blastòmers fixats és la tècnica més freqüentment emprada en el PGD, tant per al cribatge d'aneuploidies, com per a la detecció de productes de segregació desequilibrats en casos de translocacions. Permet identificar en la mostra biològica (*in situ*), generalment blastòmers però també corpuscles polars, desequilibris cromosòmics mitjançant l'ús de sondes fluorescentes de DNA específiques i complementàries a determinades regions cromosòmiques conegudes (Munne i Weier, 1996; Verlinsky *et al.*, 1996a).

Els tipus de sondes més comuns són: a) sondes centromèriques (*chromosome enumeration probe*, CEP), complementàries de seqüències centromèriques dels cromosomes i que produeixen senyals grans i intensos; b) sondes locus-específiques (*locus specific identifier*, LSI), complementàries de seqüències gèniques úniques en el genoma i que produeixen senyals més puntuals; c) sondes telomèriques (TEL), complementàries de seqüències subtelomèriques específiques dels cromosomes i que generen senyals molt més petits i d) sondes de pintat cromosòmic (*whole chromosome painting*, WCP), complementàries de múltiples seqüències al llarg d'un cromosoma, de manera que marquen el cromosoma sencer.

Aquesta tècnica permet identificar i localitzar la presència del material cromosòmic que, de forma predeterminada, es vol estudiar. És un procediment ràpid i senzill, i l'anàlisi dels resultats no requereix una excessiva especialització del personal que la realitza. Però també comporta certes limitacions:

Per poder aplicar la FISH cal fixar prèviament el material nuclear en un portaobjectes. Aquest procediment pot produir pèrdues de cromatina, que es reflectiran en pèrdues cromosòmiques artefactuals. A més, de vegades els senyals de la FISH poden ser difícils d'interpretar: per exemple, senyals dobles poden correspondre a regions replicades d'un cromosoma i, per tant, haver-hi disomia; o bé a duplicacions cromosòmiques, que produeixen una trisomia.

D'altra banda, el nombre màxim de cromosomes que s'ha pogut analitzar en un nucli de blastòmer és 13 (Abdelhadi *et al.*, 2003). Això és degut a la limitació en el nombre de fluorocroms disponibles i a les probabilitats de solapament dels senyals (Wilton, 2005). Per tant, s'han de fer diverses rondes d'hibridació per tal d'analitzar més de cinc cromosomes (el nombre

màxim de cromosomes que es pot estudiar en una sola ronda, en el millor dels casos). Però no és factible fer més de tres rondes d'hibridació sobre un blastòmer, ja que s'ha descrit que en la tercera ronda es malmet ja gran part de la cromatina (Liu *et al.*, 1998). Així doncs, no és possible analitzar tot el complement cromosòmic d'un blastòmer o d'un corpuscle polar mitjançant la tècnica de la FISH.

1.5.2. Hibridació genòmica comparada

El fonament de la hibridació genòmica comparada (CGH) rau en hibridar de forma competitiva, és a dir, amb una ràtio 1:1, el DNA d'una mostra problema (p.e., un blastòmer aïllat) i el d'una mostra control (p.e., un fibroblast euploide) sobre metafases de limfòcits euploides (46,XY) fixades en un portaobjectes. Abans de posar-les a hibridar, les mostres de DNA es marquen fluorescentment amb dos colors diferents, per exemple, en verd el DNA control i en vermell el DNA problema. Cal, llavors, disposar del programa informàtic adequat per avaluar la ràtio entre les dues fluorescències hibridades en cadascun dels cromosomes de les metafases capturades. D'aquesta manera, si la intensitat de la fluorescència per a un cromosoma en concret és igual en ambdues mostres (control i problema), aquest cromosoma es visualitzarà en la metafase amb color groc/ataronjat (verd + vermell). En canvi, si la intensitat de fluorescència de la mostra problema és superior a la de la mostra control (vermell > verd) el cromosoma metafàsic en qüestió es veurà més vermellós. Finalment, si la intensitat de fluorescència de la mostra problema és inferior a la de la mostra control (vermell < verd), llavors el cromosoma metafàsic en qüestió es veurà més verdós. A partir dels resultats obtinguts d'una dotzena de metafases capturades i cariotipades, el programa informa dels guanys o pèrdues de qualsevol dels cromosomes, de manera que s'obté un diagnòstic citogenètic complet de la cèl·lula problema (Figura 1.3).

La CGH, per tant, permet analitzar tots els cromosomes i en tota la seva llargada, essent el seu límit de resolució de l'ordre de 10-20 Mb (Griffin *et al.*, 1998; Malmgren *et al.*, 2002). A més, la CGH aplicada a l'anàlisi d'una sola cèl·lula aïllada té un gran avantatge: com que la cèl·lula analitzada enlloc de ser fixada en un portaobjectes s'introdueix en un tub de PCR i es lisa per alliberar el seu DNA, obvia el problema de les pèrdues cromosòmiques artefactuals degudes al procés de fixació, que és una limitació present en la FISH.

D'altra banda, la CGH també presenta determinades limitacions ben conegudes pel que fa al diagnòstic. Una d'elles és que no permet detectar canvis de ploïdia (triploïdies, tetraploïdies, etc.) ni tampoc permet distingir entre euploïdia i presència d'alteracions cromosòmiques equilibrades. A més, les regions centromèriques i heterocromàtiques, constituïdes per DNA repetitiu, no es poden valorar en l'anàlisi, ja que la possible amplificació preferencial d'aquestes zones implica un resultat no informatiu de la CGH (Wells *et al.*, 1999).

En l'aspecte metodològic, la CGH requereix personal amb una considerable especialització per poder portar a terme tot el procés i, sobretot, per fer-ne l'anàlisi adequada. A més, el temps necessari per poder aplicar aquesta tècnica és d'aproximadament quatre dies, ja que la hibridació transcorre durant 40-72 hores; per tant, l'aplicació de la CGH en el PGD de blastòmers aïllats implica la criopreservació dels embrions biopsiats i la transferència dels seleccionats en un cicle de FIV posterior (Wilton, 2005).

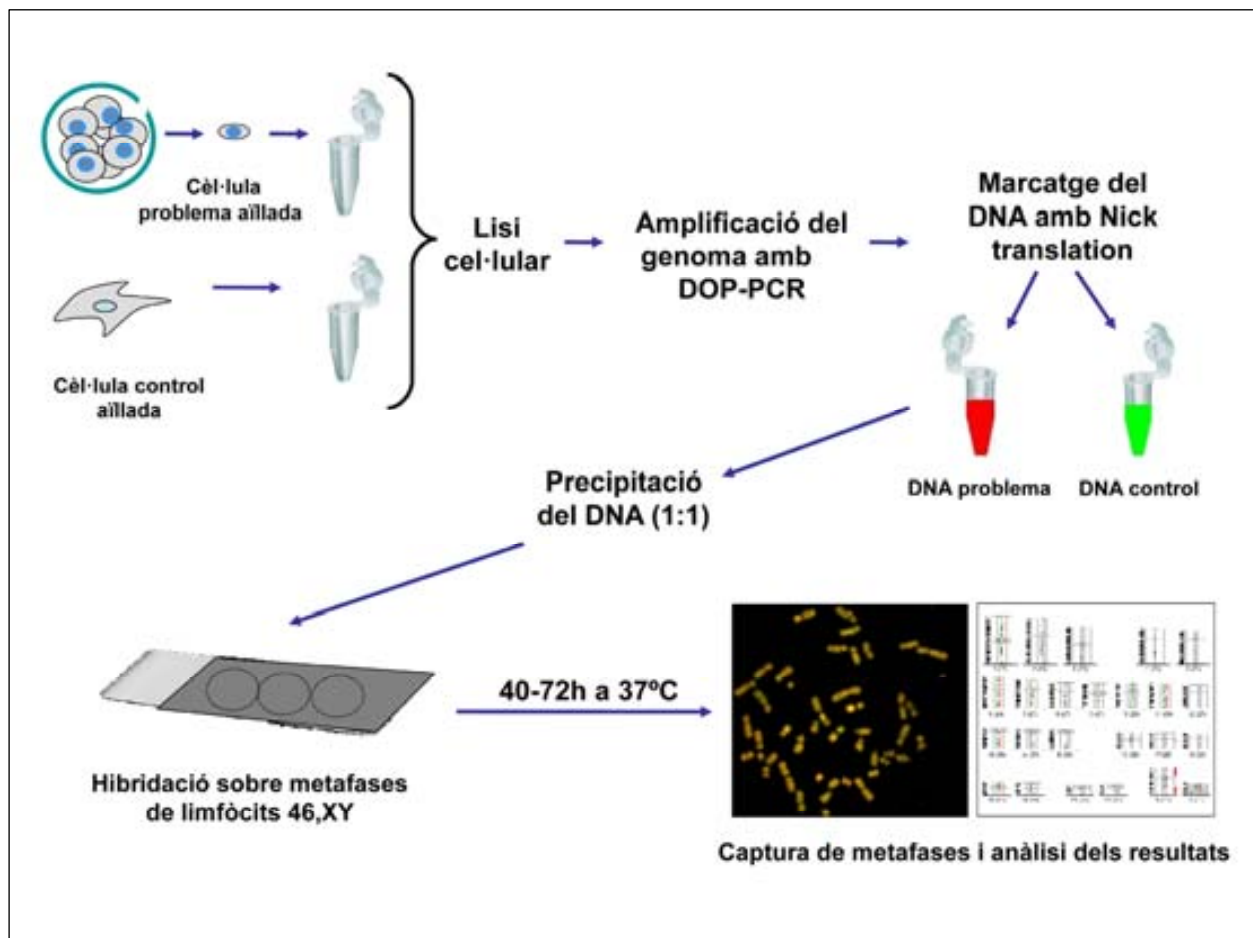


Figura 1.3. Esquema del procés global de la CGH convencional en cèl·lula aïllada.

1.5.2.1. Amplificació del genoma cel·lular amb DOP-PCR

Per poder aplicar la CGH es necessiten aproximadament 200 ng de DNA i una cèl·lula aïllada en conté uns 6 pg. Per tant, un cop s'ha produït la lisi cel·lular, s'ha de fer una amplificació del genoma mitjançant la tècnica de DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction*) (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999).

En aquesta PCR no s'utilitzen encebadors per amplificar una regió concreta, sinó que es fa servir una solució amb milers d'encebadors parcialment degenerats, que podran ser complementaris de regions repartides per tot el genoma. La seqüència patró que tenen aquests encebadors és 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3', en la qual N equival a qualsevol nucleòtid introduït a l'atzar (Telenius *et al.*, 1992) (Figura 1.4).

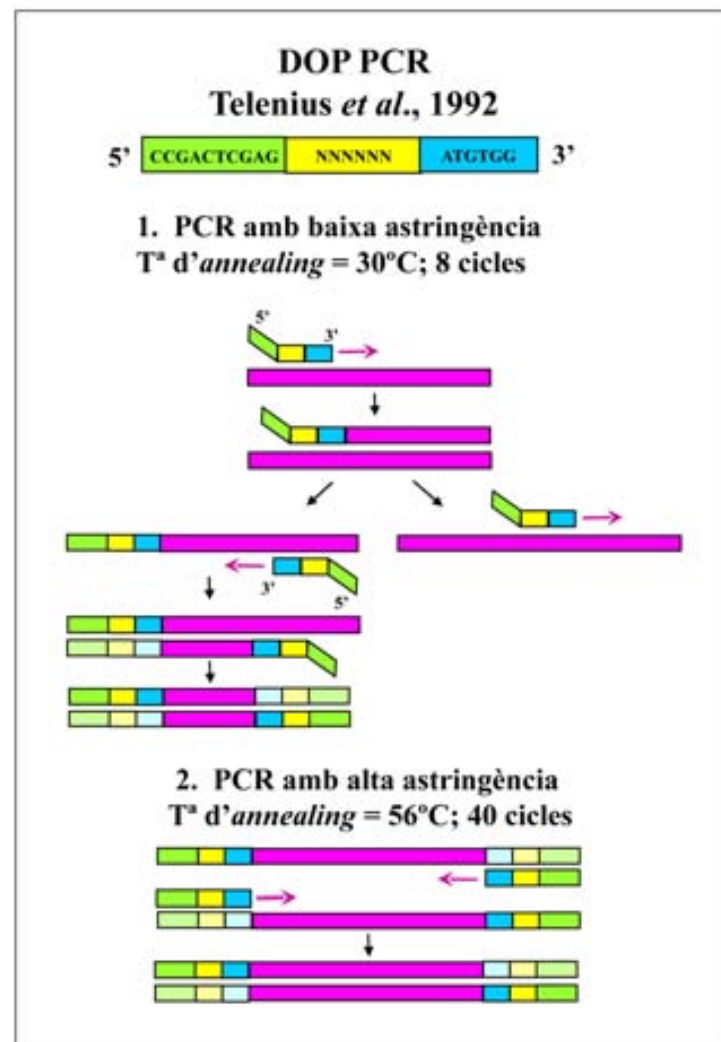


Figura 1.4. Esquema del procés de DOP-PCR

Pel fet d'haver d'amplificar el DNA d'una cel·lula aïllada per poder aplicar la CGH, el risc de contaminació amb altres DNAs és molt elevat, ja que la PCR emprant encebadors degenerats pot amplificar qualsevol seqüència de DNA de l'ambient. Per tant, és imprescindible treballar en cabines estèrils de flux laminar, amb guants, puntes de pipeta amb filtres, etc. Cal, a més, avaluar sempre la presència de possibles contaminacions incloent blancs de les mostres i controls negatius de la reacció.

1.5.2.2. Marcatge fluorescent mitjançant *nick-translation*

Un cop amplificats els genomes de les cèl·lules control i problema, aquests es marquen amb fluorescència mitjançant *nick-translation* (Voullaire et al., 1999; Wells et al., 1999). En aquesta tècnica es fa servir una mescla de reactius formada per dos enzims, la DNasa i la DNA polimerasa I, dNTPs i uracil conjugat amb molècules fluorescents. El procés de marcatge és el següent: la DNasa fa talls en una de les cadenes de la doble cadena de DNA. Llavors la DNA polimerasa I s'enganxa a l'extrem 3' i va elongant la cadena, combinant l'activitat exonucleasa 5'-3', que elimina els nucleòtids de la cadena original, amb l'activitat polimerasa, que n'afegeix dels que hi ha en el medi. Entre els nucleòtids del medi hi ha guanina, citosina i adenina a concentració 0,2mM, timina a concentració 0,1mM i uracil marcat fluorescentment a concentració 0,1mM. De manera que entre els nucleòtids que s'incorporen a la nova cadena, alguns portaran fluorescència i la conferiran al DNA tractat.

1.5.2.3. Precipitació i hibridació de les sondes sobre metafases de limfòcits

Després del marcatge del DNA control (verd) i del DNA problema (vermell), se'n fa una mescla 1:1 per ser usada com a sonda en una hibridació competitiva sobre metafases de limfòcits euploides (46,XY).

El procés d'hibridació requereix una desnaturalització prèvia tant de les sondes ja marcades com de la cromatina de les metafases fixades en els portaobjectes. Un cop desnaturalitzades, les sondes es dipositen sobre els portaobjectes i es realitza una llarga hibridació de fins a 72 hores (Voullaire et al., 1999; Wells et al., 1999), tot i que s'ha proposat introduir petites modificacions en el procediment que fins ara han aconseguit escurçar el temps de la hibridació fins un màxim de 40-44 hores (Gutierrez-Mateo et al., 2004a).

1.5.2.4. Captura i anàlisi d'imatges de CGH

Tot i que de vegades es poden observar clarament al microscopi, les diferències entre les proporcions de fluorescència verda i vermella s'analitzen de manera precisa amb un programa informàtic, com s'ha esmentat anteriorment. El programa emprat permet capturar imatges de metafases, integrar els valors de fluorescència i extreure'n resultats.

Es capturen i cariotipen unes 10-12 metafases de bona qualitat, és a dir, amb una bona extensió cromosòmica sense superposicions i amb una correcta hibridació de les sondes vermella i verda sense dipòsits.

Per obtenir el resultat final, el programa informàtic integra el resultat de la fluorescència de totes les metafases i calcula per a cada cromosoma la ràtio entre la fluorescència vermella i la verda al llarg de tot el cromosoma. Aquesta ràtio es visualitza en forma de perfil cromosòmic.

Hi ha diversos criteris d'anàlisi de fluorescència disponibles, dels quals el més utilitzat fins el moment és el "criteri fix" (Figura 1.5). Amb aquest mètode s'estableixen uns llindars de fluorescència fixos que determinen el punt a partir del qual hi ha guany o pèrdua cromosòmica. És a dir, si la ràtio entre la fluorescència vermella (DNA problema) i la verda (DNA control) per a un cromosoma determinat és propera a 1 (entre 0,8 i 1,2; ~ proporció 1:1) significa que hi ha la mateixa dotació cromosòmica en el DNA problema i en el control, i el programa mostra un perfil centrat. Però si la ràtio és inferior a 0,8, en el DNA problema hi haurà una pèrdua cromosòmica (proporció 1:2) i el programa mostrarà un perfil desplaçat cap a l'esquerra, mentre que si la ràtio és superior a 1,2, en el DNA problema hi haurà un guany cromosòmic (proporció 2:1) i el programa mostrarà un perfil desplaçat cap a la dreta (Figura 1.5).

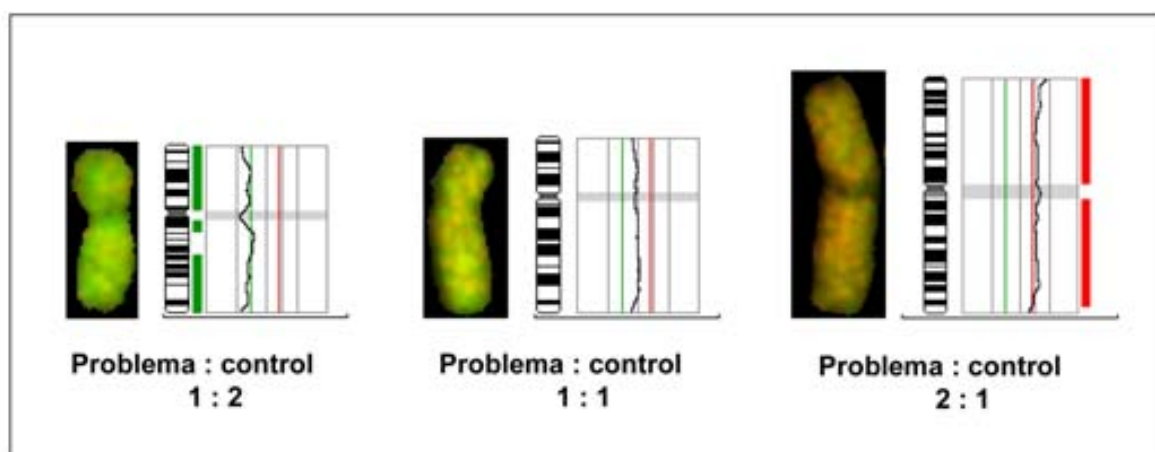


Figura 1.5. Visualització de pèrdues i guanys cromosòmics mitjançant l'anàlisi de la fluorescència i dels perfils de CGH obtinguts per a cada cromosoma.

1.5.3. *Microarrays* de CGH (*array*-CGH)

En l'*array*-CGH, els DNAs control i problema no s'hibriden en metafases de limfòcits fixades en un portaobjectes, sinó que s'utilitza un *microarray*, un portaobjectes on s'han adherit seqüències de DNA que cobreixen tot el genoma. Per tant, el resultat de la CGH s'obté avaluant la fluorescència hibridada en cadascun dels punts que conté el *microarray*.

Aquesta tecnologia té dos avantatges principals respecte la CGH convencional:

En primer lloc, la resolució és més elevada, ja que ve donada per la grandària de les seqüències adherides al portaobjectes. Actualment, però, els criteris d'anàlisi disponibles només permeten detectar amb certesa alteracions que involucrin unes 10 Mb del cromosoma (Hellani *et al.*, 2008; Vanneste *et al.*, 2009).

En segon lloc, la duració del procés pot arribar a ser de 16-18 hores i l'anàlisi dels resultats es fa de forma automatitzada.

En aquest moment, hi ha diverses plataformes d'*array*-CGH, que es poden combinar amb diferents mètodes d'amplificació de tot el genoma (*whole genome amplification*, WGA). Segons els tipus de seqüències que contenen, els *microarrays* de CGH es poden classificar en (Wells *et al.*, 2008):

a) *Microarrays* de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*)

Es tracta d'*arrays* que contenen uns quants milers de punts constituïts per seqüències de 150-200 kb, els clons dels BACs, que cobreixen fragments bastant grans dels cromosomes humans. En aquest tipus de plataforma, es necessita combinar diversos clons derivats de la mateixa regió genòmica per tal de reduir la influència d'artefactes tècnics, ja que les metodologies de WGA aplicades en el processament de les cèl·lules problema i control poden produir l'amplificació preferencial d'alguna petita regió. En aquest sentit, un dels problemes que presenta aquest tipus de *microarray* rau en la seva fabricació, ja que la utilització de clons pot produir variacions de reproductibilitat.

b) *Microarrays* de biblioteques cromosòmiques

En aquest cas, les mostres de DNA adherides al substrat deriven de cromosomes individuals, obtinguts per microdissecció o per separació en citometria de flux.

Tot i que les seqüències repetitives dels cromosomes s'eliminen en un tractament previ amb Cot-1 DNA, algunes repeticions no queden completament bloquejades, de manera que poden afectar negativament els resultats. Una altra limitació d'aquest tipus de plataforma és la manca de

resolució, ja que utilitzant cromosomes sencers com a punts de l'*array*, només es poden detectar alteracions que afectin cromosomes sencers i no part d'aquests.

c) *Microarrays* d'oligonucleòtids

Aquesta plataforma utilitza oligonucleòtids que se sintetitzen *in situ*, és a dir, directament en la superfície del suport sòlid (p.e., el portaobjectes) que forma la base del *microarray*. Les seqüències tenen una mida aproximada de 25-85 nucleòtids, segons el fabricant. Tot i que és un dels tipus més prometedors d'*array*-CGH, la mida tan petita dels oligonucleòtids que constitueixen els punts augmenta el risc de detectar guanys i pèrdues artefactuals, causades per errors introduïts durant l'amplificació de tot el genoma.

En resum, la metodologia de la CGH convencional traslladada a la tecnologia dels *microarrays* obre una nova via, més ràpida i amb més resolució, per a la detecció d'alteracions cromosòmiques. Malgrat tot, actualment encara hi ha certes limitacions tècniques en les diferents plataformes que existeixen. A més, el cost de la infraestructura i els reactius requerits per poder portar a terme tot el procediment és molt més elevat que el de la CGH convencional (Harper i Harton, 2010).

1.5.4. *Microarrays* amb SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)

Aquesta metodologia ofereix una anàlisi més completa del DNA problema que la dels *microarrays* de CGH: permet determinar el nombre de còpies dels cromosomes i, a més, proporciona una “empremta digital” única del DNA analitzat, que identifica el genotip de la mostra problema.

Es basa en l'anàlisi de seqüències de DNA polimòrfiques, en les quals el polimorfisme afecta un sol nucleòtid (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs), repartides al llarg del genoma humà. En aquest cas, el material amplificat que es vol analitzar no es combina amb un DNA control, sinó que els DNAs problema i control s'hibriden separatament en diferents àrees d'SNPs d'un mateix portaobjectes. Per tant, es pot fer servir el mateix fluorocrom per marcar els dos DNAs.

El nombre de còpies de cada cromosoma es calcula comparant les intensitats de fluorescència obtingudes per la hibridació problema i la control. Si els punts per a un determinat cromosoma mostren senyals més intensos per al DNA problema que per al control, s'associa a un guany de material cromosòmic, com per exemple una trisomia. En canvi, si es detecta menys intensitat en la mostra problema, s'associa a una pèrdua cromosòmica.

Tot i que aquesta tecnologia podria tenir un gran potencial d'aplicació (Handyside *et al.*, 2009), ara per ara, una de les limitacions més importants és la manca de precisió en el diagnòstic pel que fa als *loci* d'SNPs individuals. A més, les tècniques de WGA incrementen encara més el problema d'amplificació preferencial i fins i tot d'*allele drop out* (ADO) (manca d'amplificació d'un al·lel en concret) en el cas d'una cèl·lula aïllada. Això fa que molts dels *loci* es genotipin incorrectament. Per solucionar aquest problema, s'ha d'analitzar un elevat nombre de *loci* i fer-ne un processament estadístic per tal d'eliminar els que es genotipen erròniament.

Així doncs, la complexitat del *microarray* d'SNPs i de la seva anàlisi fa que el cost sigui molt elevat i que quedi limitat a una petita part dels pacients.

Hipòtesi i objectius

2. Hipòtesi i objectius

2.1. Hipòtesi

La transferència a l'úter matern d'embrions citogenèticament normals en la totalitat dels seus cromosomes, seleccionats mitjançant el PGD, ha de permetre incrementar la taxa d'implantació aconseguida amb els mètodes emprats fins ara. La millora en els resultats del PGD requereix implementar adequacions metodològiques.

2.2. Objectius

1. Desenvolupar una metodologia de CGH de temps reduït (CGH ràpida). Utilitzar, per a la seva posada a punt, fibroblasts de línies cel·lulars establertes (Coriel) amb alteracions cromosòmiques conegudes.
2. Adaptar i validar la metodologia de CGH ràpida desenvolupada per a l'anàlisi de blastòmers emprant embrions descartats en casos de PGS amb FISH (PGS-FISH).
3. Estudiar la citogenètica d'una sèrie d'embrions descartats en casos de PGS-FISH per edat materna avançada mitjançant la CGH ràpida i aprofundir així en els fenòmens d'aneuploidia i mosaïcisme.
4. Aplicar la metodologia de CGH ràpida desenvolupada a casos clínics candidats al PGS per diverses indicacions:
 - a) Edat materna avançada
 - b) Avortaments de repetició
 - c) Fallades repetides d'implantació
5. Comprovar la capacitat de la CGH ràpida per detectar el tipus de segregació cromosòmica en embrions de portadors de translocacions equilibrades.
6. Aplicar la CGH ràpida a casos clínics candidats al PGD per a translocacions cromosòmiques equilibrades:
 - a) Translocacions robertsonianes
 - b) Translocacions recíproques

Material i mètodes

3. Material i mètodes

3.1. Material i mètodes de l'objectiu 1

3.1.1. Procedència i aïllament de fibroblasts de línies cel·lulars

Per al desenvolupament de la CGH ràpida s'han utilitzat fibroblasts amb alteracions cromosòmiques conegudes com a cèl·lules problema. Aquests procedien de línies cel·lulars adquirides (Coriel). En total, s'han processat 32 cèl·lules de diferents línies. La relació de les línies emprades, el seu cariotip i el nombre de cèl·lules analitzades de cadascuna s'indiquen a la Taula 3.1.

Taula 3.1. Característiques de les línies cel·lulars emprades i nombre de cèl·lules analitzades de cadascuna.

Línies cel·lulars Coriel		
Referència	Cariotip	nº cèl·lules
GM03676	48,XY,+2,+21	6
GM03330	47,XY,+13	6
GM04435	48,XY,+16,+21	5
GM03623	48,XXX,+18	5
GM11115	47,XY,+9	5
GM03184	47,XY,+15	5

Els fibroblasts s'aïllen a partir de cultius cel·lulars confluents. El procés es realitza dins d'una cabina estèril de flux laminar (Telstar), sota control d'una lupa binocular (Leica) a 50 augments. Es prepara una placa de petri de plàstic (Falcon) amb diverses gotes de 50 µl de solució salina estèril (*phosphate buffered saline*, PBS; Invitrogen) complementada amb 0,1% de polivinil alcohol (PVA; Invitrogen), que evita l'adhesió de les cèl·lules al substrat. S'agafa una gota d'uns 50 µl de la suspensió cel·lular del cultiu i es disposa a la placa. Amb un capil·lar de plàstic de 170 µm de diàmetre (Cook) se n'aspira una petita quantitat i es fan rentats seqüencials en successives gotes de PBS-PVA per tal de diluir la concentració cel·lular fins que és possible aïllar un sol fibroblast. Llavors, cada cèl·lula es disposa en un tub Eppendorf estèril de 0,2 ml, on quedarà emmagatzemada a -80°C fins la seva utilització. Cada tub es retola amb una referència diferent de l'original, de manera que l'anàlisi es pugui fer a cegues.

Per poder detectar tant la trisomia X de la línia GM03623, com el gènere XY de les línies GM03676, GM0330, GM04435, GM11115 i GM03184, s'han emprat fibroblasts amb cariotip 46,XX com a cèl·lules control de la CGH. L'aïllament d'aquests fibroblasts control es porta a terme de la mateixa manera que s'ha descrit per als de les línies cel·lulars.

3.1.2. Hibridació genòmica comparada ràpida per a fibroblasts

El procediment seguit per a la lisi cel·lular, l'amplificació i el marcatge del DNA de cèl·lules úniques són els mateixos tant per a les cèl·lules problema com per a les control.

3.1.2.1. Lisi cel·lular

S'ha escollit la lisi enzimàtica amb proteïnasa K (Roche) com a mètode de lisi cel·lular. Es parteix d'una concentració inicial de proteïnasa K de 20 mg/ml, que es dilueix fins una concentració de treball de 125 µg/ml afegint 1 µl de la proteïnasa K comercial a 160 µl d'aigua estèril (Promega). Per a la preparació de la solució de lisi final també es necessita SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Sigma) a una concentració de treball de 17 µM, de manera que, partint de la solució comercial al 10%, es dilueix primer 1 µl en 100 µl d'aigua destil·lada i, després, 1 µl de la primera solució en 200 µl més d'aigua destil·lada. La solució de lisi final, que es prepara just al moment, s'obté mesclant 2 volums de la dilució de proteïnasa K amb 1 volum de la de l'SDS i es deixa a 4°C fins la seva utilització.

A cada tub de PCR amb una cèl·lula aïllada s'hi afegeixen 3 µl de solució de lisi i una gota d'oli mineral (Sigma) per evitar l'evaporació durant el procés i mantenir la mostra aïllada de qualsevol contaminant extern. Tot seguit, s'homogeneïtza la mescla en el vòrtex (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik), es centrifuga i es posa al termociclador (TGradient, Biometra) seguint el següent programa: 1 hora a 37°C per permetre l'activitat de la proteïnasa K, que digereix les proteïnes nuclears i allibera en el tub el DNA nuclear i mitocondrial, i 10 minuts a 95°C per desnaturalitzar l'enzim, evitant així que interfereixi en els posteriors cicles de PCR.

3.1.2.2. Amplificació del genoma de fibroblasts amb DOP-PCR

El mètode de DOP-PCR emprat des de fa temps pel nostre grup (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a), que requereix unes 5 hores, ha estat modificat adequadament per tal d'escurçar la seva durada fins a 3 hores i 40 minuts.

Els reactius emprats són els següents:

- Aigua estèril lliure d'activitat exonucleasa (Promega): 32 µl
- *Long PCR buffer* 10X (- MgSO₄) (Ambion): 5 µl
- Mescla de dNTPs per PCR (1C:1G:1A:1T) (2,5mM cadascun) (Ambion): 4 µl
- MgSO₄ 25 mM (Ambion): 3,5 µl
- Encebador per DOP-PCR 100 µM (Biomers): 1 µl
- Polimerasa *Super Taq Plus* (5 U/µl) (Ambion): 0,5 µl

La mescla dels reactius s'homogeneïtza amb l'ajuda del vòrtex i es centrifuga breument. Llavors s'afegeixen 46 µl d'aquesta mescla a cada tub que conté la cèl·lula lisada, de manera que s'obté un volum final de 50 µl (46 µl de la mescla de reactius + 1 µl de medi que conté la cèl·lula + 3 µl de tampó de lisi). També cal preparar un tub únicament amb mescla de reactius com a control negatiu.

Tots els tubs es posen al termociclador seguint el següent programa amb un nombre de cicles reduït respecte el protocol original (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a): 5 minuts a 95°C, 10 cicles d'1 minut a 95°C, 1,5 minuts a 30°C i 3 minuts a 68°C, amb una rampa de 5°C/s des de la temperatura d'*annealing* fins a la d'extensió; 20 cicles d'1 minut a 95°C, 1 minut a 62°C i 2,5 minuts a 68°C, amb un pas final d'extensió de 7 minuts a 68°C.

3.1.2.3. Electroforesi en gel d'agarosa

Per tal de comprovar la correcta amplificació del genoma cel·lular i l'absència de contaminació es realitza una electroforesi en gel d'agarosa (Biotools) concentrada a l'1,5%. Tant per al medi de dissolució com per al medi de la cubeta d'electroforesi s'utilitza TAE 1X (Qiagen). Es barregen 5 µl de mostra de DNA producte de la DOP-PCR amb 1 µl de tampó de càrrega (Invitrogen) i se'n carreguen 5 µl en cada pouet del gel. A més, s'utilitza un marcador de pes molecular de 100 parells de bases (pb) (Invitrogen) per poder identificar la mida dels fragments de DNA amplificats. L'electroforesi es realitza durant uns 30 minuts a 120 volts. Per poder visualitzar els fragments de DNA amplificats, el gel es tenyeix amb una solució aquosa de bromur d'etidi (Sigma) i s'empra un transil·luminador de llum ultraviolada (Vilber Lourmat). Els fragments de DNA cel·lular correctament amplificat, tant per a les cèl·lules control com per a les problema, corresponen a una pinzellada intensa d'una mida entre 300 i 2000 pb. En el cas del control negatiu la pinzellada té una mida d'entre 100 i 500 pb.

3.1.2.4. Marcatge fluorescent amb *nick-translation*

Després de l'amplificació del genoma cel·lular amb DOP-PCR i de la comprovació de l'amplificació en el gel d'agarosa, el producte resultant (45 µl) es pot dividir en dues parts i marcar-les, separatament, amb *nick-translation*. Així doncs, per tal de validar la metodologia de la CGH ràpida en fibroblasts, s'ha usat la meitat del producte de la DOP-PCR de les cèl·lules problema per fer una CGH ràpida i, l'altra meitat, per fer una CGH convencional (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a).

A partir d'aquest punt convé treballar amb llum tènue per evitar perdre la fluorescència. El DNA problema es marca amb fluorescència vermella, mentre que el DNA control es marca amb fluorescència verda, de manera que es preparen dues mescles diferents. Els reactius per a la *nick-translation* provenen de la casa comercial Abbott i són els següents:

- *Spectrum red-dUTP* (0,1 mM) o *spectrum green-dUTP* (0,2 mM): 2,5 µl
- *Nick-translation buffer* 10X: 5 µl
- Mescla de dNTPs (1dATP:1dCTP:1dGTP) (0,1 mM cadascun): 10 µl
- dTTP (0,1 mM): 5 µl
- Enzim (5 U/µl): 5 µl

En tubs Eppendorf nous es mesclen 27,5 µl del conjunt de reactius amb 22,5 µl de cada mostra per obtenir un volum final de 50 µl. La reacció es porta a terme en el termociclador durant 90 minuts a 15°C i s'atura a 70°C durant 10 minuts.

Per tal d'obtenir un DNA control més homogeni, s'amplifiquen tandes de 10-15 cèl·lules aïllades, es marquen individualment i el producte resultant de la *nick-translation* de cadascuna d'elles es mescla en un sol tub Eppendorf d'1,5 ml. Aquesta barreja es pot guardar a -20°C fins la seva utilització.

3.1.2.5. Precipitació conjunta de les sondes marcades

En aquest pas es mesclen els 50 µl de DNA problema (marcat en vermell) amb 50 µl de DNA control (marcat en verd) per confeccionar la sonda conjunta en proporció 1:1. A més, s'afegeixen 5 µl de Cot-1 DNA humana (1 µg/µl) (Abbott) que bloquejarà les regions repetitives del genoma (blocs d'heterocromatina, telòmers i centròmers). Per tal que precipiti el DNA serà necessària l'acció de 10'5 µl d'acetat sòdic 3M (10% del volum de DNA de la mescla) a pH= 5,5 en combinació amb 262,5 µl d'etanol 100% (2,5X volum de DNA de la mescla).

El procés té lloc a -80°C durant 1 hora i a continuació es centrifuga a 14000 rpm durant 30 minuts per tal d'obtenir el corresponent botó de DNA precipitat a cada tub. Seguidament, s'elimina el sobrenedant amb l'ajuda d'una pipeta i paper absorbent i es deixa que s'acabi d'assecar a temperatura ambient.

3.1.2.6. Hibridació competitiva

Les diferents sondes, confeccionades a partir de la mescla de cada DNA problema amb el DNA control, s'hibridaran en portaobjectes comercials (Abbott) que contenen tres gotes fixades de suspensió cel·lular d'un cultiu de limfòcits 46,XY amb un elevat nombre de metafases. Aquests portaobjectes es guarden a -20°C i, quan s'han d'utilitzar, el procés de descongelació permet visualitzar les gotes de material fixat. Les tres àrees amb cèl·lules es marquen, pel revers del portaobjectes, amb un llapis de diamant. En cada portaobjectes s'hi podran aplicar tres sondes diferents, és a dir, tres mostres diferents que, simultàniament, realitzaran la hibridació. Els cobreobjectes de cada zona es tallen a mida amb l'ajuda d'un regle i del llapis de diamant, procurant que quedin nets dels petits fragments de vidre que es formen en ser tallats.

A continuació, es procedeix a la deshidratació dels portaobjectes en una sèrie d'etanols de concentració ascendent, 70%, 85% i 100%, posant-los 2 minuts en cada solució, i després es deixen assecar a l'aire. Llavors, per tal de desnaturalitzar el DNA dels limfòcits, s'introdueixen els portaobjectes en una solució de formamida al 70% en *2X standard saline citrate* (SSC) durant 5 minuts a 73°C . Aquest pas es realitza en una cabina d'extracció de gasos (Cruma) per evitar que s'escampin els vapors de la formamida, que són altament tòxics. Seguidament, per evitar la renaturalització del DNA dels limfòcits, es tornen a passar els portaobjectes per una sèrie de solucions d'etanols a 4°C (70%, 85% i 100%), 1 minut en cadascuna, i es deixen assecar a l'aire.

L'últim pas de la preparació de les sondes consisteix a resuspendre el *pellet* obtingut per centrifugació en 8 μl de solució d'hibridació, que conté 50% de formamida desionitzada (Sigma) i 10% de dextrà sulfat (Sigma) en 2X SSC.

Per aconseguir la completa dissolució de la sonda en el medi, és important insistir en el pas de la homogeneïtzació amb un tractament de vòrtex. Aquest procediment es pot fer abans o després de la desnaturalització del DNA dels portaobjectes. Si es fa abans, les sondes es guarden a l'estufa a 37°C (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc) fins la seva utilització. Per a la desnaturalització, els tubs Eppendorf que contenen les sondes es posen en un bany a 73°C durant 10 minuts.

Finalment, es disposen 8 μl de sonda de la CGH ja preparada sobre cada àrea prèviament delimitada, es cobreix curosament amb un dels cobreobjectes tallat a mida i es segella tot el seu

contorn amb cola (Imedio removable). En aquest punt, les preparacions processades amb la CGH convencional es posen dins la cambra humida a 37°C i el període d'hibridació és de 72 hores. En canvi, en el procediment de la CGH ràpida, s'ha introduït un pas en què els portaobjectes són tractats durant 30 minuts en un microones a 75W (Optiquick compact, Moulinex), sobre una cubeta amb aigua destil·lada per mantenir les condicions d'humitat. Seguidament, els portaobjectes s'introdueixen en una cambra humida a 37°C. Per tal de reduir el temps d'hibridació, el procés es realitza en agitació rotatòria, utilitzant un agitador 1309-I CE (Lab-line Instruments). El període d'hibridació es redueix, llavors, fins a 12 hores.

Passat aquest temps, es retira amb cura la cola i els cobreobjectes i es fan dos rentats seguits del portaobjectes: primer amb 0,4X SSC/0,3% NP-40 durant 2 minuts a 73°C i, tot seguit, amb 2X SSC/0,1% NP-40 durant 2 minuts a temperatura ambient i en agitació. Llavors es deshidraten de nou en una sèrie d'etanols de concentració ascendent, 70%, 85% i 100%, posant-los 2 minuts en cada solució en agitació i, finalment, es deixen assecar a l'aire. Per visualitzar el DNA al microscopi, els portaobjectes es tenyeixen amb DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma) a una concentració de 125ng/ml amb vectashield (Vector Labs), que evita que la fluorescència s'esgoti ràpidament. Es cobreix amb un portaobjectes de 60x20 mm i, després d'un parell de minuts a 4°C, es procedeix a la seva observació en el microscopi de fluorescència.

3.1.2.7. Captura i anàlisi de metafases al microscopi de fluorescència

S'ha utilitzat un microscopi d'epifluorescència Nikon eclipse 90i equipat amb un programa informàtic d'anàlisi de la CGH (Isis de Metasystems).

Les metafases es busquen amb l'objectiu de 60X i es capturen amb el de 100X. Cal triar aquelles metafases que tinguin com a màxim dos entrecreuaments i que mostrin un bon senyal de fluorescència tant verda com vermella.

La captura es fa de manera seqüencial: primer es capta el senyal del DAPI, després el senyal verd i, finalment, el vermell. El programa informàtic integra els tres colors i en crea una imatge global. Cada imatge capturada es processa passant per filtres que potencien la fluorescència dels cromosomes i atenuen el soroll de fons en cas que n'hi hagi. Llavors es cariotipa cada metafase a partir de les bandes DAPI reverses, semblants a les bandes G. Per obtenir resultats de CGH fiables (tant per a la CGH convencional com per a la ràpida) cal capturar i cariotipar un mínim de 12 metafases de bona qualitat, és dir, un total de 24 cromosomes pel que fa a cadascun dels autosòmics i 12 pel que fa als sexuals.

El programa informàtic genera els perfils cromosòmics per a cadascun dels cromosomes d'acord amb la ràtio entre les fluorescències vermella i verda de cada cromosoma.

En aquest treball, a diferència d'estudis anteriors, el criteri escollit per a l'anàlisi dels perfils de CGH ràpida ha estat el "de la desviació estàndard" en lloc del "fix". Aquest es basa en la desviació estàndard intrínseca de la fluorescència de cada hibridació, amb els límits marcats per un interval de confiança del 99% (resultant de sumar tres cops aquesta desviació estàndard a la mitjana de la fluorescència de la mostra). D'aquesta manera, el resultat s'ajusta més a la qualitat de la hibridació obtinguda. Així, una regió cromosòmica es considera guanyada o perduda si el perfil de CGH travessa el límit de la desviació estàndard per la dreta o per l'esquerra, respectivament (Figura 3.1).

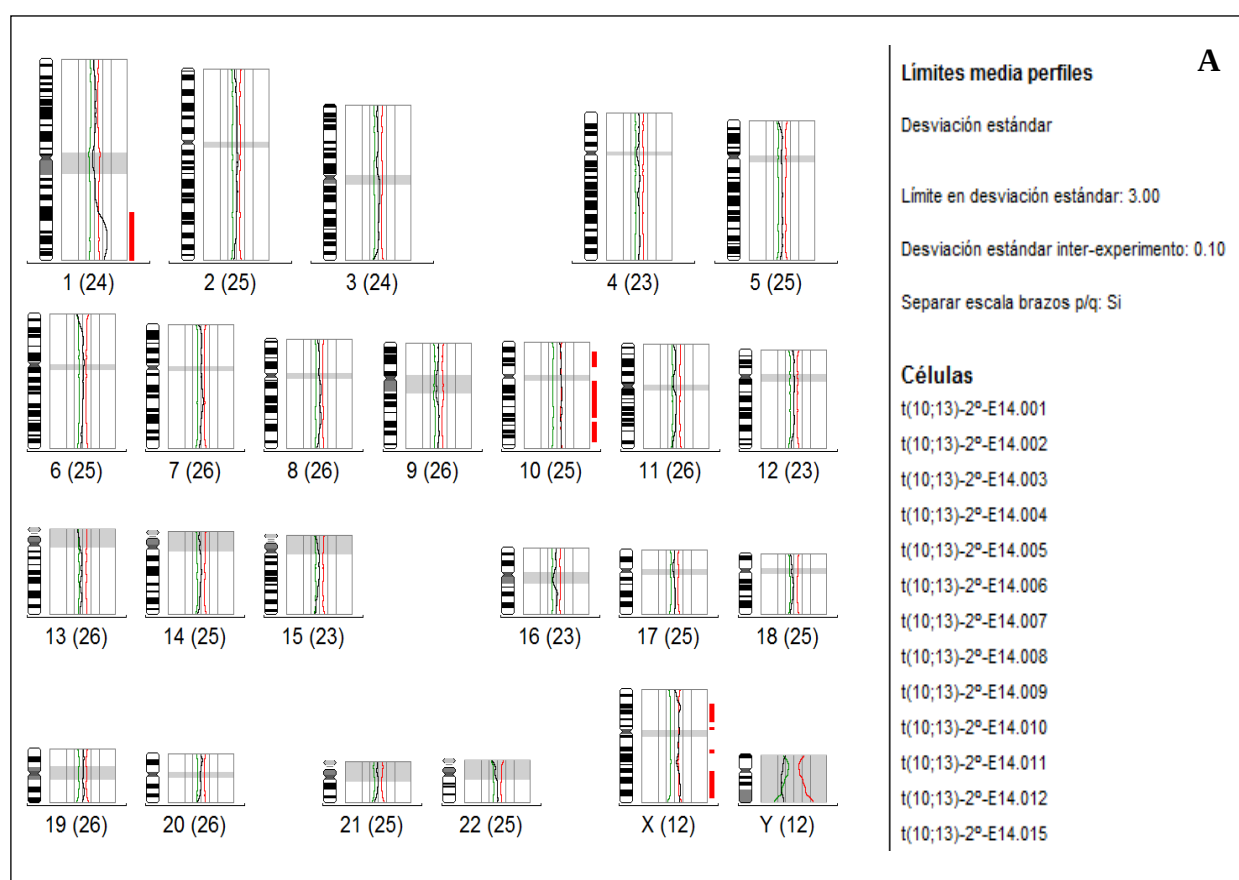


Figura 3.1. A) Imatge que apareix a la pantalla quan es fa l'anàlisi de la CGH. A la dreta es mostra el criteri d'anàlisi i el nombre de cèl·lules analitzades.

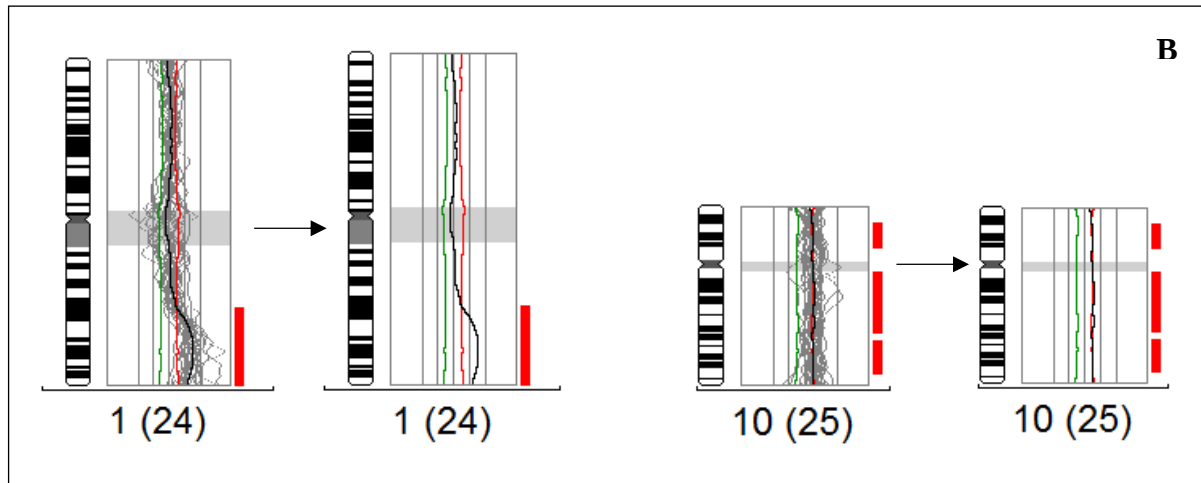


Figura 3.1. B) Detall de perfils de CGH per a un embrió que presenta un guany d'un fragment cromosòmic (+1q31-qter) i el guany d'un cromosoma sencer (+10). Es mostra el perfil mitjà per a un cromosoma concret (1 i 10 en aquest exemple) creat a partir dels perfils individuals obtinguts en cada cèl·lula analitzada (24 per al cromosoma 1 i 25 per al cromosoma 10). El conjunt de perfils individuals, a més, serveix per establir els límits a partir dels quals hi haurà guany o pèrdua cromosòmica.

3.2. Material i mètodes dels objectius 2 i 3

3.2.1. Procedència del material biològic de l'objectiu 2

Per a l'objectiu 2 s'han analitzat 48 blastòmers de 10 embrions en estadi de dia+4, descartats de casos de PGS emprant la FISH amb nou sondes per als cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, i Y. Els embrions procedien de sis parelles amb cariotip normal, sotmeses a PGS per indicacions de RM (n=1), factor masculí amb FISH alterada (n=1), RM + factor masculí amb FISH alterada (n=1), AMA (n=2) o factor masculí amb FISH alterada + AMA (n=1). L'edat de les pacients està compresa entre els 34 i els 50 anys, amb una mitjana de 41 anys.

Els embrions han estat cedits per pacients inclosos en programes de reproducció assistida de la Clínica Sagrada Família, l'Institut Valencià d'Infertilitat i l'Institut Marquès. Els Comitès d'Ètica d'aquests centres han autoritzat el projecte i els pacients han signat el corresponent document de Consentiment Informat en fer la donació.

3.2.2. Procedència del material biològic de l'objectiu 3

Per a l'objectiu 3 s'han analitzat 145 blastòmers de 22 embrions en estadi de dia+4, descartats de casos de PGS emprant la FISH amb nou sondes per als cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, i Y. Els embrions procedien de vuit parelles amb cariotip normal que s'havien sotmès al PGS a causa de l'AMA. L'edat de les pacients està compresa entre els 39 i els 46 anys, amb una mitjana de 42,4 anys.

Aquests embrions han estat cedits per pacients inclosos en programes de reproducció assistida i de PGS de l'Institut Marquès i del *Centro de Medicina Embrionaria*, on s'ha portat a terme l'anàlisi i la reanàlisi de la FISH. El Comitè d'Ètica d'aquests centres ha autoritzat el projecte i els pacients han signat el corresponent document de Consentiment Informat.

3.2.3. Aïllament dels blastòmers

Els embrions en estadi de dia+4 estan iniciant el procés de compactació. Així doncs, ha calgut utilitzar pronasa (Roche) per poder separar i individualitzar els blastòmers, ja que aquesta proteasa permet, a més de dissoldre la zona pel·lúcida de l'embrió, descompactar les cèl·lules mitjançant la destrucció de proteïnes d'adhesió cel·lular. S'ha utilitzat a una concentració de 3mg/ml, que s'aconsegueix diluint 0,1g d'aquesta en 33 ml de PBS 1X sense ions de calci ni magnesi.

La major part del procés es porta a terme a la cabina de flux laminar i sota control d'una lupa binocular a 50 augments. Per a cada embrió es prepara una placa de petri amb dues gotes de 50 µl de pronasa, cobertes amb oli mineral (Sigma) per tal d'evitar contaminacions externes. Llavors es carrega medi de la primera gota en un capil·lar de 170 µm de diàmetre i es col·loca l'embrió en la segona gota de pronasa. La placa es posa a l'estufa a 37°C durant 5 minuts per tal que actuï la proteasa. Durant aquest període, es prepara una nova placa amb unes vuit gotes de 50 µl de PBS complementat amb 0,1% de PVA per fer rentats. Seguidament, es treu la placa de l'estufa i es passa l'embrió a la primera gota de PBS. Aquí es pipeteja l'embrió si els blastòmers encara estan agregats fins aconseguir que es separin. Llavors es passen a la segona gota i, a partir d'aquí, s'agafen un a un i es van passant per les diverses gotes de rentat per tal d'eliminar les restes de pronasa i possibles fragments de l'embrió. Finalment, es transfereix un únic blastòmer a una gota neta i s'aspira amb medi per posar-lo, ja aïllat, en un tub Eppendorf estèril de 0,2 ml. Els tubs es retolen amb codis diferents dels subministrats pel centre, de manera que l'anàlisi es pugui fer a cegues.

En cas que es vulgui processar els blastòmers immediatament, es pot fer un pas de 15 minuts a -80°C , per tal d'accelerar el procés de lisi cel·lular. En cas contrari, es poden emmagatzemar a -80°C fins la seva utilització.

Per als objectius 2 i 3, la CGH s'ha aplicat emprant, com a cèl·lules control, limfòcits amb cariotip 46,XY per poder detectar més combinacions dels cromosomes sexuals i obtenir així un diagnòstic més complet. Aquests limfòcits procedeixen de la línia cel·lular GM07381 (Coriel). El seu aïllament es fa de la mateixa manera que s'ha descrit per als fibroblasts amb aneuploïdies.

3.2.4. Hibridació genòmica comparada ràpida per a blastòmers

El procediment emprat per a la CGH ràpida en el cas dels blastòmers és molt similar al descrit per als fibroblasts. Les diferències metodològiques es detallen a continuació:

1) L'amplificació del genoma amb DOP-PCR es fa amb el procediment descrit anteriorment pel nostre grup (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a), ja que la versió escurçada aplicada en el treball amb fibroblasts no produeix l'amplificació òptima del DNA dels blastòmers. Així doncs, el protocol seguit és el següent: 5 minuts a 94°C , 8 cicles de 30s a 95°C , 1,5 minuts a 30°C i 3 minuts a 68°C , amb una rampa de 5°C/s des de la temperatura d'*annealing* fins la d'extensió; 40 cicles d'1 minut a 95°C , 1 minut a 56°C i 3 minuts a 68°C , amb un pas final d'extensió de 8 minuts a 68°C . Amb aquest programa, la durada del protocol és de 5 hores.

2) En el gel d'agarosa els productes de DOP-PCR es visualitzen com pinzellades d'entre 300 i 2000 pb, amb tres bandes de 1650, 1250 i 600 pb, corresponents al DNA mitocondrial.

3.3. Material i mètodes de l'objectiu 4

3.3.1. Selecció de casos clínics

S'han seleccionat cinc casos en què el cribatge d'aneuploïdies amb la CGH ràpida podria ser beneficiós. S'han escollit parelles amb indicacions per al PGS representatives del conjunt global de factors que dificulten la reproducció humana. Les característiques de cada cas s'indiquen a la Taula 3.2.

Taula 3.2. Característiques dels casos clínics de PGS realitzats mitjançant la CGH ràpida.

Cas	Indicació	Edat materna	Antecedents
1	AMA	42	Un avortament espontani amb alteracions cromosòmiques.
2	AMA	41	2008: dos cicles IAC + 1er cicle de FIV sense èxit. 2009: 1er cicle de criotransferència sense èxit. 2on cicle de FIV sense èxit. 3er cicle de FIV amb PGS-FISH (8 sondes) produeix embaràs amb avortament (vesícula sense batec).
3	AMA+RM	37	Cinc avortaments espontanis en els dos anys previs.
4	RM	33	Dues gestacions bioquímiques, dues gestacions amb avortament de 1r trimestre. Un cicle FIV-PGD amb FISH (9 sondes + cromosoma 14) amb avortament de 1r trimestre. Un cicle de criotransferència sense gestació.
5	RIF	36	Dos embarassos espontanis ectòpics. Quatre cicles de FIV sense èxit.

Els casos 1, 3 i 4 s'han portat a terme en col·laboració amb la Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau i els casos 2 i 5, amb l'Institut Universitari Dexeus.

3.3.2. Procediment del PGS emprant la CGH ràpida

Per tal de garantir les millors condicions de viabilitat embrionària i l'esterilitat adequada per a l'estudi citogenètic mitjançant la CGH ràpida, cal una bona coordinació entre el centre amb el qual es realitza el cicle de FIV i el laboratori de PGD, sobretot pel que fa al procediment de la biòpsia i recollida dels blastòmers. L'organització temporal del procediment s'explica a continuació:

En primer lloc, s'estableix contacte amb les parelles candidates al PGS i se'ls explica en què consisteix el procediment de la CGH ràpida, informant-los sobre els avantatges i les limitacions de la tècnica. També se'ls recomana el diagnòstic prenatal en cas d'embaràs. A més, la parella signa un document de Consentiment Informat on certifica que ha estat informada sobre el procediment de PGS.

Un cop fets aquests tràmits, ja es pot començar el procés d'estimulació hormonal. Els protocols d'estimulació varien segons el centre i la pacient en concret, però, en general, consisteixen en una primera fase de dessensibilització hipotalàmica amb agonistes i/o antagonistes de la hormona alliberadora de gonadotropina (*gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) i una segona fase d'estimulació ovàrica amb una combinació d'hormona luteïnitzant (*luteinizing hormone*, LH) i d'hormona fol·liculostimulant (*follicle-stimulating hormone*, FSH), que són les

responsables del creixement i maduració dels fol·licles. Aquest procés d'estimulació dura entre 10 i 12 dies, període en el qual es fa un seguiment ecogràfic i es mesura el nivell d'estradiol (alliberat pels fol·licles), per tal d'avaluar el creixement fol·licular. Quan la mida dels fol·licles arriba als 18-20mm, s'injecta gonadotropina coriònica humana (*human chorionic gonadotropin*, HCG) i 36 hores després es procedeix a l'aspiració fol·licular.

El procediment de FIV comença, doncs, amb la punció fol·licular, moment en què s'extreuen els oòcits de la pacient. Els oòcits madurs o en estadi de MII obtinguts s'inseminen mitjançant la tècnica d'ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*). Aquest es considera el dia 0 (Figura 3.2).

El dia+1 s'avalua els signes de fecundació i la qualitat del zigot: presència o no de dos pronuclis (el masculí i el femení) amb nuclèols iguals o diferents i presència o no d'halo citoplasmàtic. Els oòcits no fecundats o els zigots amb un sol pronucli o més de dos pronuclis es descarten del cicle de FIV-PGS.

El dia+2 s'avalua la qualitat embrionària: nombre de cèl·lules i regularitat, presència de nuclis i percentatge de fragmentació. Un embrió òptim en aquest estadi presenta quatre cèl·lules regulars amb nucli i absència de fragmentació.

El dia+3, aproximadament a les 8:00h del matí, es realitza la biòpsia de blastòmer dels embrions evolutius, un cop se n'ha avaluat la qualitat morfològica i de desenvolupament. Un embrió òptim en aquest estadi presenta unes vuit cèl·lules regulars amb nucli i absència de fragmentació. Per fer la biòpsia, alguns centres utilitzen el mètode químic amb àcid de Tyrode i altres, el mètode físic emprant un làser (Saturn Laser R1) acoblat al microscopi amb micromanipulador (Nikon eclipse TE200). En el mètode químic s'utilitza una pipeta de biòpsia (Cook o Humagen) carregada amb àcid de Tyrode, amb la qual es dissol una petita part de la zona pel·lúcida de l'embrió. En el mètode físic, es selecciona el punt de la zona pel·lúcida que es vol eliminar i es fa d'un a dos pols de llum amb el làser, que produeix una petita perforació en l'àrea seleccionada. A partir d'aquí, en els dos mètodes s'utilitza una pipeta per aspirar un dels blastòmers de l'embrió. L'eficiència i la rapidesa amb què es fa la biòpsia és molt important tant per a l'evolució dels embrions com per a la qualitat de l'amplificació del DNA i el rendiment de la CGH. En cas que algun blastòmer es lisi, cal fer un canvi immediat de pipetes de biòpsia per evitar la contaminació amb DNA de la resta dels embrions que es biopsien.

Un cop biopsiat, el blastòmer es renta diverses vegades en una placa de petri amb gotes de 50 µl de PBS/0,1% PVA i es posa dins un tub Eppendorf de 0,2 ml. A més, s'aspira una petita quantitat de l'última gota de PBS que contenia el blastòmer i es diposita en un altre tub que servirà com a blanc i control de contaminació de cada mostra.

Aquest procés sempre es realitza dins una cabina de flux laminar per evitar possibles contaminacions externes. Els tubs es mantenen en gel durant el transport cap al laboratori on es realitza el protocol de la CGH ràpida descrit prèviament.

Quan s'arriba al laboratori, les mostres es posen al congelador de -80°C durant 15 minuts per ajudar el procés de lisi cel·lular. Seguidament, es fa la lisi cel·lular amb proteïnasa K, que té una duració d'1 hora i 10 minuts. Un cop lisades les cèl·lules, se n'amplifica el genoma amb DOP-PCR durant 5 hores. Immediatament, es realitza el marcatge amb *nick-translation* durant 1 hora i 42 minuts. És en aquest moment quan es fa l'electroforesi en gel d'agarosa per comprovar tant la correcta amplificació del DNA com l'absència de contaminació en els blancs.

Pel que fa a les cèl·lules control (limfòcits 46,XY), cal dir que es processen amb anterioritat al cas clínic, en tandes de 10-15 cèl·lules aïllades, i el seu DNA marcat individualment i després conjuntament homogeneïtzat es guarda al congelador a -20°C. Així, el dia del cas tan sols s'ha d'amplificar i marcar el DNA dels blastòmers biopsiats i es disminueix el nombre de tubs/mostres amb què es treballa. Per tant, en aquest punt, es descongela el DNA control amplificat i marcat i es distribueix en els diferents tubs en què es farà la precipitació conjunta amb el DNA problema. Aquest pas dura 1 hora a -80°C i 30 minuts de centrifugació.

En el cas 2 s'ha utilitzat un doble control: una meitat del producte de DOP-PCR es marca fluorescentment i es precipita conjuntament amb un DNA problema procedent de limfòcits 46,XY, mentre que l'altra meitat, després del marcatge, es precipita amb un DNA problema procedent de fibroblasts 46,XX. D'aquesta manera, s'evita no poder diagnosticar possibles trisomies X (tot i que es tracta d'un fenomen molt poc freqüent).

Després de la precipitació, es procedeix a la preparació dels portaobjectes i les sondes per a la hibridació, procés que acostuma a durar entre 30 minuts i una hora, depenent del nombre de mostres que es processin. Un cop muntades les hibridacions, els portaobjectes es posen al microones a 75W durant 30 minuts i, finalment, es deixen a la cambra humida a 37°C i en agitació durant 12 hores, que corresponen a la nit del dia+3.

El dia+4 es fan els rentats dels portaobjectes i es procedeix a la captura i anàlisi de les metafases. Amb un sistema de captura i dos sistemes d'anàlisi connectats entre sí, el nostre grup triga uns 30 minuts per diagnosticar cada blastòmer. D'aquesta manera, els resultats s'obtenen el dia+4 al matí o a la tarda, depenent del nombre d'embrions que s'hagin de diagnosticar, i es redacta un informe detallat on s'exposen els resultats obtinguts. Així doncs, la transferència dels embrions lliures d'alteracions cromosòmiques es pot realitzar el mateix dia+4 a la tarda o bé el dia+5. Són els responsables del centre de reproducció assistida qui suggereixen els embrions per transferir (un màxim de tres) entre els diagnosticats com a citogenèticament euploides en tots els

cromosomes, en base als criteris de morfologia i de qualitat embrionària, que en determinen també la viabilitat.

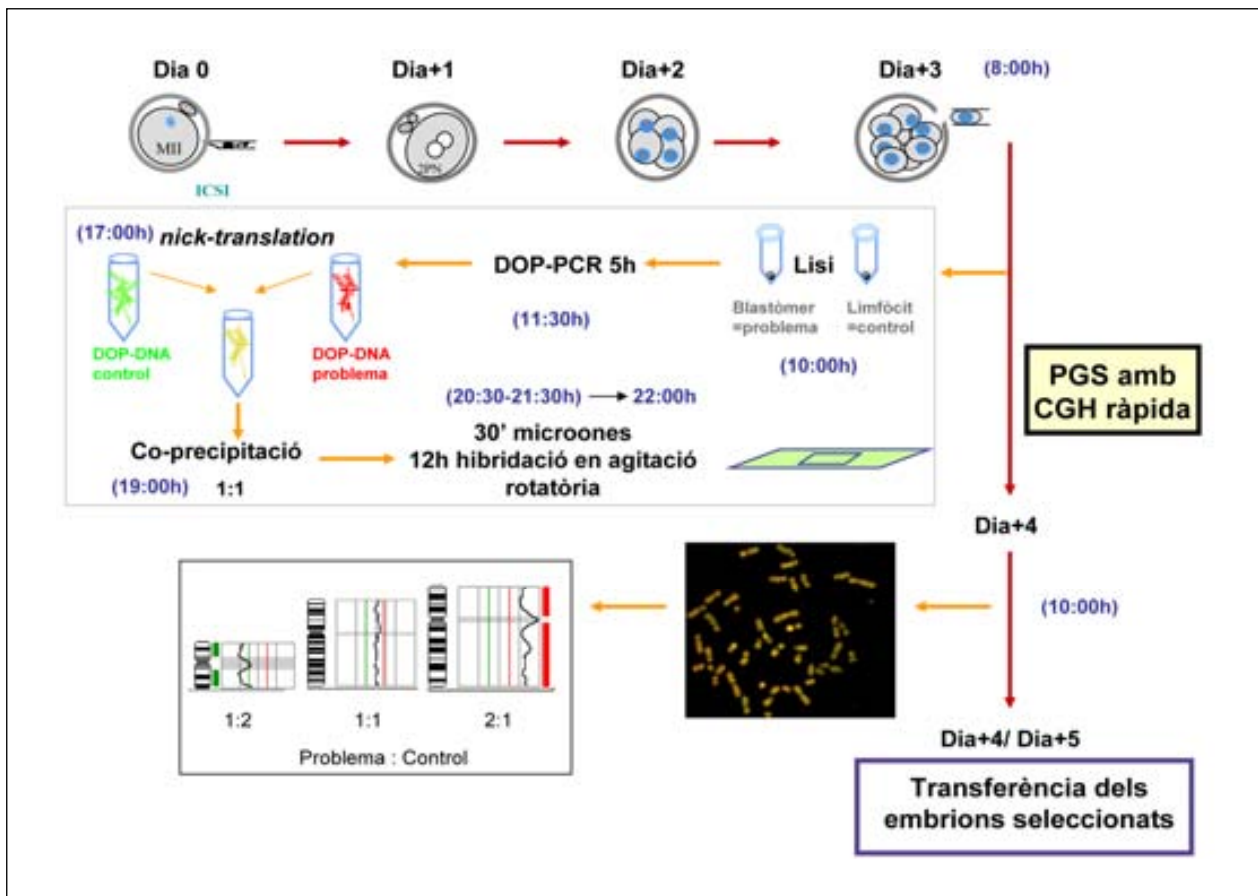


Figura 3.2. Esquema de les etapes següents per a l'aplicació de la CGH ràpida en els cicles de FIV-PGS.

3.4. Material i mètodes de l'objectiu 5

Per a l'objectiu 5 s'han analitzat amb la CGH ràpida 11 blastòmers aïllats de dos embrions d'una pacient amb cariotip 46,XX,t(2;5)(q21;q33). Aquests embrions havien estat descartats per la presència de desequilibris cromosòmics després d'un PGD amb FISH, emprant sondes específiques per identificar els cromosomes implicats en la translocació.

El material biològic ha estat cedit per una parella inclosa en el programa de reproducció assistida de la Clínica Sagrada Família. El Comitè d'Ètica d'aquest centre ha autoritzat el projecte i els pacients han signat el corresponent document de Consentiment Informat.

El procediment d'aïllament dels blastòmers i el seu processament mitjançant la CGH ràpida és el mateix que s'ha descrit en els apartats 3.2.3 i 3.2.4.

3.5. Material i mètodes de l'objectiu 6

3.5.1. Selecció de casos clínics

Per a la selecció de casos de translocacions candidats al PGD amb la CGH ràpida, cal tenir en compte que els fragments involucrats en la reorganització han de tenir una mida superior a la del límit de resolució de la CGH (10-20Mb). Amb aquest criteri, s'han triat tres casos de translocacions robertsonianes, tres casos de translocacions recíproques i un cas de cariotip complex integrat per dues translocacions, una de robertsoniana i una de recíproca. Les característiques de cada cas s'indiquen a la Taula 3.3.

Taula 3.3. Característiques dels casos de reorganitzacions cromosòmiques candidats al PGD mitjançant la CGH ràpida.

Cas	Cariotip	Edat materna	Paràmetres seminals	nº cicles	Tècnica PGD
A	45,XY,t(13;14)(q10;q10)	32	OA	2--1*	CGH ràpida
B	45,XX,t(13;14)(q10;q10)	40, 41	N	2	CGH ràpida
C	45,XY,t(14;21)(q10;q10)	34	OA	1	CGH ràpida
D	46,XX,t(10;13)(q23.2;q22)	29	N	2	CGH ràpida
E	46,XX,t(1;10)(p11-p11.2)	30	A	1	CGH ràpida
F	45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10)	32, 33,34	OA	3	1er cicle: FISH+CGH ràpida 2on i 3er cicles: CGH ràpida

OA= Oligoastenozoospermia; N= Normozoospermia; A= Astenozoospermia

*En el primer cicle es van congelar els embrions en estadi de 2 pronuclis (dia+1) i es van descongelar durant el segon cicle.

Els casos A, C i E s'han portat a terme en col·laboració amb la Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau i els casos B, D i F, amb la clínica Eugén. Els pacients han signat el corresponent document de Consentiment Informat.

3.5.2. Hibridació *in situ* fluorescent per al PGD de la doble translocació

En el cas del portador amb cariotip 46,XY,t(2;17)(q14.2;q23);t(14;21)(q10;q10), el fragment translocat del cromosoma 17 és de mida molt reduïda (~25 Mb); així doncs, tenint en compte el límit de resolució de la CGH (10-20Mb), el primer cicle de FIV-PGD s'ha realitzat emprant la FISH a més de la CGH ràpida, per tal d'assegurar la completa detecció de productes de segregació cromosòmica no equilibrats.

3.5.2.1. Fixació de blastòmers

La fixació dels blastòmers es fa amb el mètode del carnoy, sota control d'una lupa binocular a 50 augments. En primer lloc, es renta el blastòmer en una solució de PBS/0.1% PVA i es posa en un medi hipotònic de clorur potàssic (KCl) a una concentració de 5,592x10 mg/l. D'aquí s'aspira el blastòmer amb la mínima quantitat de medi possible i es diposita en el portaobjectes (*superfrost precleaned*, Cole-Parmer), en una regió prèviament delimitada amb un llapis de diamant. Llavors s'espera que gairebé s'hagi evaporat el medi i es deixa caure, des de certa distància, una gota de fixador carnoy (metanol:acètic; 3:1). Aquest procés es pot repetir diverses vegades, fins que s'hagin eliminat les restes de citoplasma i es visualitzi sota la lupa el nucli amb la cromatina fixada. Immediatament, es confirma en el microscopi de contrast de fase la posició i qualitat de l'extensió.

Es poden fixar diversos blastòmers (un màxim de sis) en un mateix portaobjectes, identificant-los primerament amb l'ajuda del llapis de diamant i, posteriorment, amb les coordenades corresponents.

3.5.2.2. Tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent. Posada a punt i protocol

Per poder detectar tots els productes de la segregació cromosòmica de les dues translocacions, ha calgut fer una complexa posada a punt del sistema de detecció. S'han provat diferents sondes disponibles al mercat, tant en limfòcits del portador com en blastòmers d'embrions descartats de centres de FIV, en diverses rondes d'hibridació. Finalment, s'ha optat per utilitzar sondes de la casa comercial Vysis en tres rondes d'hibridació, tal com s'indica a continuació:

Primera ronda:

- 14 LSI *dual color (spectrum red + spectrum green)*: 0,5 µl
- 21 LSI (*spectrum red*): 0,7 µl
- LSI/WGP *hybridization buffer*: 2,8 µl

Segona ronda:

- 17q Telvysion (*spectrum red*): 1,2 µl
- 17 CEP (*spectrum aqua*): 0,2 µl
- LSI/WGP *hybridization buffer*: 3,26 µl

Tercera ronda:

- 17 CEP (*spectrum aqua*): 0,4 µl
- 2 CEP (*spectrum orange*): 0,8 µl
- CEP *hybridization buffer*: 2,8 µl

El protocol de FISH emprat és el següent:

En primer lloc, els blastòmers fixats en el portaobjectes es deshidraten passant per una sèrie d'etanols de concentracions creixents (70%, 85% i 100%), 2 minuts en cadascuna, i es deixa assecar el portaobjectes a l'aire.

La desnaturalització de la sonda i el DNA dels portaobjectes es fa conjuntament. Es dipositen 2 µl de sonda sobre la mostra, es cobreix amb un cobreobjectes i es segella amb cola. Llavors es col·loca el portaobjectes al HYBrite™ (Vysis), on es manté una temperatura de 73°C durant 5 minuts. Seguidament, es trasllada el portaobjectes a una cambra humida a 37°C, on tindrà lloc el procés d'hibridació. En la primera ronda, aquest procés dura 14 hores, ja que es tracta de sondes locus específiques (14 LSI i 21 LSI). La segona ronda també té una durada de 14 hores, ja que una de les sondes és telomèrica i l'altra centromèrica (17q i 17 CEP). La tercera ronda és de 2 hores d'hibridació, ja que les dues sondes són centromèriques (17 CEP i 2 CEP).

Després de cada ronda d'hibridació es fan rentats del portaobjectes, 2 minuts en una solució de 0,4X SSC a 73°C i 1 minut en una altra solució de 2X SSC/0,1% NP40 a temperatura ambient. Llavors, es torna a deshidratar amb solucions d'etanol de concentració creixent (70%, 85% i 100%), posant-lo 2 minuts en cadascuna, i es deixa assecar a l'aire. Finalment, es posa DAPI (125 ng/ml) per poder visualitzar els nuclis en el microscopi de fluorescència.

La captura i processament de les imatges es fa amb el microscopi Nikon eclipse 90i equipat amb el programa informàtic Isis de Metasystems.

3.5.3. Procediment del PGD emprant la CGH ràpida

Com en els casos de PGS, inicialment es contacta amb les parelles candidates al PGD amb la CGH ràpida, se'ls informa sobre el procediment i es signa el corresponent document de Consentiment Informat.

Cal esmentar que amb aquesta metodologia no es requereix la posada a punt per a la detecció dels desequilibris generats com a conseqüència de la segregació dels cromosomes translocats, de manera que els cicles de FIV-PGD es poden programar immediatament després d'haver decidit fer el PGD mitjançant la CGH ràpida. De totes maneres, si es necessita aplicar també la FISH per completar el diagnòstic, com en el primer cicle de la parella amb la doble translocació (cas F), llavors sí que es requereix la posada a punt de la combinació de sondes de FISH, prèviament a l'inici del cicle de FIV (veure apartat precedent 3.5.2.2). Tan bon punt s'ha optimitzat el protocol, se n'envia un informe al centre de reproducció assistida per tal de poder començar el procés d'estimulació hormonal.

El procediment del PGD amb la CGH ràpida és el mateix que s'ha descrit per als casos de PGS en l'apartat 3.3.2.

3.5.4. Reanàlisi dels embrions descartats en els cicles de FIV-PGD amb CGH ràpida

Un cop finalitzat el cicle de FIV-PGD, en els casos en què és possible, els embrions descartats per presència d'alteracions cromosòmiques o bé per no haver fecundat o no ser evolutius es van a buscar al centre de reproducció el dia+4 o el dia+5, després de la transferència embrionària, i també s'analitzen amb la CGH ràpida. Es processen de la mateixa manera que s'ha explicat en l'apartat 3.2.3, tot i que, si el grau de compactació és ja molt avançat, o bé si es troben en l'estadi de blastocist, s'introdueixen sencers dins el tub de PCR i s'analitza l'embrió sencer. El resultat servirà per comprovar el diagnòstic dels blastòmers biopsiats o bé per completar el nombre d'embrions diagnosticats i obtenir més informació sobre la incidència de cada tipus de segregació cromosòmica de la translocació, en el cas dels embrions descartats abans de la biòpsia.

Resultats

4. Resultats

4.1. Resultats dels objectius 1 i 2

Article nº 1: Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application.

Mariona Rius, Albert Obradors, Gemma Daina, Juliana Cuzzi, Laura Marquès, Gloria Calderón, Esther Velilla, Olga Martínez-Passarell, Maria Oliver-Bonet, Jordi Benet, Joaquina Navarro.

Human Reproduction, 2010; 25(7):1824-35

Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application

M. Rius¹, A. Obradors^{1,2}, G. Daina¹, J. Cuzzi³, L. Marquès⁴,
G. Calderón⁵, E. Velilla^{6,7}, O. Martínez-Passarell⁸, M. Oliver-Bonet¹,
J. Benet¹, and J. Navarro^{1,*}

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain ²Clínica Eugén, 08029 Barcelona, Spain ³Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 São Paulo, Brazil ⁴Centre de Reproducció Assistida Clínica Sagrada Família, 08022 Barcelona, Spain ⁵Institut Valencià d'Infertilitat de Barcelona, 08017 Barcelona, Spain ⁶Institut Marquès, 08034 Barcelona, Spain ⁷Centro de Medicina Embrionaria, 08034 Barcelona, Spain ⁸Fundació Puigvert-Hospital Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain

*Correspondence address. Tel: +34-581-17-73; Fax: +34-581-10-25; E-mail: joaquima.navarro@uab.cat

Submitted on December 11, 2009; resubmitted on February 9, 2010; accepted on April 12, 2010

BACKGROUND: Comparative genomic hybridization (CGH) is a valuable alternative to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for pre-implantation genetic screening (PGS) because it allows full karyotype analysis. However, this approach requires the cryopreservation of biopsied embryos until results are available. The aim of this study is to reduce the hybridization period of CGH, in order to make this short-CGH technique suitable for PGS of Day-3 embryos, avoiding the cryopreservation step.

METHODS: Thirty-two fibroblasts from six aneuploid cell lines (Coriell) and 48 blastomeres from 10 Day-4 embryos, discarded after PGS by FISH with 9 probes (9-chr-FISH), were analysed by short-CGH. A reanalysis by the standard 72 h-CGH and FISH using telomeric probes was performed when no concordant results between short-CGH and FISH diagnosis were observed. The short-CGH was subsequently applied in a clinical case of advanced maternal age.

RESULTS: In 100% of the fibroblasts analysed, the characteristic aneuploidies of each cell line were detected by short-CGH. The results of the 48 blastomeres screened by short-CGH were supported by both 72 h-CGH results and FISH reanalysis. The chromosomes most frequently involved in aneuploidy were 22 and 16, but aneuploidies for the other chromosomes, excepting 1, 10 and 13, were also detected. Forty-one of the 94 aneuploid events observed (43.6%) corresponded to chromosomes which are not analysed by 9-chr-FISH.

CONCLUSIONS: We have performed a preliminary validation of the short-CGH technique, including one clinical case, suggesting this approach may be applied to Day-3 aneuploidy analysis, thereby avoiding embryo cryopreservation and perhaps helping to improve implantation rate after PGS.

Key words: preimplantation genetic screening / comparative genomic hybridization / fluorescence *in situ* hybridization / aneuploidy / blastomere

Introduction

Preimplantation genetic screening (PGS) is currently applied to evaluate the presence of aneuploidies in embryos of couples at risk of chromosome abnormalities, i.e. advanced maternal age (AMA), recurrent miscarriage (RM), recurrent IVF failure or severe male factor

(Donoso *et al.*, 2007). Nevertheless, the implantation rate after this procedure is about 14.3% (2433 positive heart beat/16 975 embryos transferred), according to the European Society of Human Reproduction and Embryology PGD Consortium data collection I–IX (Goossens *et al.*, 2009). The technique routinely used for PGS is fluorescence *in situ* hybridization (FISH), which is a fast and easy

method to perform. However, some studies have recently questioned the validity of PGS using FISH, as it has been observed that this analysis not only does not increase the implantation and delivery rate in women under the age of 36 years (Staessen *et al.*, 2008), but also causes a decrease in the clinical pregnancy rate in women of AMA (Hardarson *et al.*, 2008).

Although mosaicism has been reported to exist in preimplantational embryos, affecting the accuracy of PGS (Munne *et al.*, 1994; Bielanska *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005), another reason why the implantation rate is not improved by PGS using FISH is probably the fact that the whole set of chromosomes is not analysed and aneuploidies in chromosomes that are not screened could be hampering the implantation or development of transferred embryos. Comparative genomic hybridization (CGH) is a well-established procedure which allows for the study of all chromosomes simultaneously. It was first developed to examine genomic DNA from tumours (Kallioniemi *et al.*, 1992), and subsequently the protocol was adapted to the study of DNA from single cells (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999). The main advantage of CGH over FISH is that the whole chromosomal complement can be ascertained and this also allows for the detection of not only chromosomal imbalances generated by aberrant segregation but also structural imbalances of fragments larger than 10–20 Mb (Griffin *et al.*, 1998; Malmgren *et al.*, 2002). However, CGH is a rather labour-intensive technique and it takes ~4 days to obtain results. For this reason, two strategies have been developed to enable its application in PGD. The first strategy is the use of the first polar body (1PB) (Wells *et al.*, 2002; Sher *et al.*, 2007; Obradors *et al.*, 2008, 2009) or the first and second polar bodies (1PB and 2PB) (Fragouli *et al.*, 2009) as indirect indicators of the oocyte's chromosomal complement, in which case, only maternal contribution of first or first and second meiotic division, respectively, is determined and paternal meiotic and post-zygotic errors cannot be detected. In order to obtain a more complete analysis, a second strategy has been developed, based on the CGH analysis of one blastomere from Day-3 embryos (Wilton *et al.*, 2001; Voullaire *et al.*, 2002; Sher *et al.*, 2009) or of several cells removed from the trophectoderm at the blastocyst stage (Fragouli *et al.*, 2009; Schoolcraft *et al.*, 2009). Nevertheless, owing to the duration of CGH, these two approaches require the cryopreservation of the biopsied embryos and the transfer of those diagnosed as euploid in a subsequent cycle.

It is well known that slow cryopreservation method produces a decrease in the survival rate of frozen and thawed embryos after PGS (Joris *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2005). Moreover, this procedure leads to a 30–40% reduction in implantation potential (Joris *et al.*, 1999; Edgar *et al.*, 2000). Recently, the development of the vitrification procedure has improved the survival rate of thawed embryos (Mukaida *et al.*, 2003), especially at the blastocyst stage (Zhang *et al.*, 2009). Nevertheless, the most propitious situation for embryos, patients and the IVF laboratory would be to avoid the cryopreservation step altogether and to transfer fresh embryos selected after the application of a comprehensive analysis of all chromosomes, compatible with the timing of the IVF cycle.

Lately, array-CGH technology has emerged, allowing a faster, more comprehensive analysis of PBs and preimplantation embryos (Hu *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Le Caignec *et al.*, 2006). However, this procedure needs to be completely validated and, to date, its cost is far higher than the conventional CGH.

The aim of this work is to develop and validate a CGH variant conserving all advantages of the conventional CGH, including its cost, but avoiding the cryopreservation of the embryos. For this purpose, a considerable reduction in the time required for the protocol is needed. Lately, an approach to this objective has been designed, achieving a faster CGH protocol that allows for the aneuploidy screening of the whole chromosomal complement in 16 h using indirect labelling (Landwehr *et al.*, 2008). In the present work, a different approach has been taken, introducing some modifications in the earlier procedure developed by our group (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a), making the CGH methodology suitable for PGS of Day-3 embryos, without the need of cryopreservation.

Materials and Methods

Fibroblast and blastomere recovery

Thirty-two fibroblasts from six cell lines (Coriell) containing one or two different aneuploidies were processed. The specific karyotypes were: [47,XY,+13], [47,XY,+15], [48,XY,+16,+21], [48,XY,+2,+21], [47,XY,+9], [48,XXX,+18].

Forty-eight blastomeres from 10 Day-4 embryos, discarded after PGS by FISH with nine probes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y), were used in this study. The embryos were donated by six women with normal karyotype. The age range of patients was between 34 and 50 years, with an average age of 41 years. They were candidates for PGS because of the following indications: RM ($n = 1$), male factor with abnormal FISH ($n = 1$), RM + male factor with abnormal FISH ($n = 1$), AMA ($n = 2$) and male factor with abnormal FISH + AMA ($n = 1$). Embryos were obtained from the IVF laboratories of the *Clínica Sagrada Família, Institut Valencià d'Infertilitat* and *Institut Marquès*, Barcelona, Spain. The signature of corresponding Informed Consent was obtained from all families involved in the study and the work was approved by the respective Ethics Committees.

Isolation and lysis of fibroblasts and blastomeres

A drop of a highly diluted cell suspension from a confluent culture was placed on a small plate under a stereoscopic microscope and a single fibroblast was isolated using a 170- μ m denuding pipette (Cook Ireland Ltd). The fibroblast was washed in four phosphate-buffered saline (PBS)/0.1% polyvinyl alcohol (PVA) droplets and transferred to a PCR tube.

For the embryos, the zona pellucida was removed using Tyrode's acid or pronase (3 mg/ml) and blastomeres were isolated, washed and stored in the same way as fibroblasts. A minimum of two blastomeres were obtained from eight of the embryos and a single blastomere was obtained from two of the embryos.

Every PCR tube containing either one fibroblast or one blastomere was properly coded with a different number from the original, so that the CGH analysis was conducted blindly.

Although single fibroblasts from a female were used as reference in the fibroblast lines analyses, single lymphocytes from a male were used in the blastomeres experiments. Both fibroblasts and lymphocytes were obtained from confluent cultures and stored individually in PCR tubes.

Lysis of fibroblasts, blastomeres or lymphocytes were performed adding 1 μ l of sodium dodecyl sulphate (17 μ M) and 2 μ l of proteinase K (125 μ g/ml) to each sample, this was overlaid with light mineral oil, and the tubes were incubated at 37°C for 1 h, followed by 10 min at 95°C to inactivate proteinase K.

Whole genome amplification

Single cell DNA was amplified using degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) as previously described (Gutierrez-Mateo et al., 2004a) but in this case a shortened reaction, with fewer PCR cycles, was tested to reduce the processing time from 5 to 3 h 40 min: the sample was heated to 95°C for 5 min; 10 cycles of 95°C for 1 min, 30°C for 1.5 min and 68°C for 3 min; 20 cycles of 95°C for 1 min, 62°C for 1 min and 68°C for 2.5 min with a final extension step of 68°C for 7 min. The PCR programme was carried out in a Tgradient thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany) and electrophoresis on a 1.5% agarose gel was used to evaluate the correct DNA amplification (smear between 200 and 4000 bp) of each sample.

Labelling and precipitation of probes

Whole genome amplification products were fluorescently labelled by nick translation (Abbott) according to the manufacturer's instructions, with a step of 15°C for 1 h 30 min and another step of 70°C for 10 min. Test DNA (fibroblasts or blastomeres) was labelled with Spectrum Red-dUTP (Abbott), whereas reference DNA (fibroblasts or lymphocytes) was labelled with Spectrum Green-dUTP (Abbott). In order to obtain a homogeneous control DNA probe, different reference DNAs were mixed after their individual labelling.

After nick translation, reference and test DNA were mixed in equimolar proportions and ethanol precipitated with 10 µg of Cot-I-DNA (Abbott). The precipitation process took 1 h at -80°C and 30 min of centrifugation. The pellet was dried and dissolved in 8 µl of hybridization mixture (50% formamide, 2× standard saline citrate, 10% dextran sulphate, pH 7).

Comparative genomic hybridization

Hybridization was performed on normal male (46,XY) metaphase spreads (Abbott) with some modifications of a previous method (Gutierrez-Mateo et al., 2004a), including a microwave step and agitation of the slides during hybridization. Immediately after a 30-min exposure in a 75 W microwave (Optiquick Compact, Moulinex) in humid conditions, a reduction in the hybridization step, from 72 to 12 h, was achieved when the slides were kept in a moist chamber at 37°C with rotary agitation (65 rpm/min) for the whole incubation period, using a 1309-ICE rotator (Lab-line Instruments Inc.; USA).

Image capture and CGH analysis

The capture of metaphases was performed with a Nikon eclipse 90i epifluorescence microscope. An average of 12 metaphases per cell was captured and evaluated using Isis CGH software developed by MetaSystems. The ratio between red and green fluorescence is 1:1 when there is the same proportion of reference and test DNA. The thresholds used to diagnose losses and gains were 0.8 and 1.2, respectively. Deviations of the ratio within the threshold cut-off of 0.8 or 1.2 were also taken into account to evaluate the sensitivity of the technique.

Criterion of CGH analysis

It is important to mention that chromosomes that are potentially gained or lost artifactually, i.e. chromosomes 17, 19 and 22 (Moore et al., 1997; Voullaire et al., 2002; Gutierrez-Mateo et al., 2004a) were excluded from analysis when all three chromosomes were simultaneously gained or lost in the same cell; otherwise 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 analysing IPBs and their corresponding metaphase II (MII) using CGH and FISH, respectively, the CGH loss or gain profiles of the IPBs were indistinguishably

equivalent to losses or gains of either chromosome or chromatid in the MIIs (Gutierrez-Mateo et al., 2004b).

Validation of 12-h hybridization results

After whole genome amplification of single cell DNA, the product can be divided and labelled, obtaining two sets of nick translation products. We used one set to perform the 12 h hybridization and the other to validate the short-CGH results using the standard, 72 h-CGH.

Clinical application

The short-CGH was applied in a clinical case. A couple at risk of aneuploidy in the offspring owing to AMA (41 years old) was included in an IVF programme in collaboration with the *Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau* in Barcelona to perform the PGS. The patient underwent a routine ovulation induction procedure and eight mature oocytes were retrieved on Day 0. Seven out of the eight oocytes showed two pronuclei on Day + 1 after ICSI, indicating that they had been fertilized. Early in the morning of Day + 3, one blastomere was biopsied from each of the six embryos that reached the 6–8 cell stage in order to perform the short-CGH. Each blastomere was washed in PBS/0.1% PVA solution and was put into a labelled 0.2 ml PCR tube and kept at -20°C. The short-CGH protocol was applied. The process started on Day + 3, taking 1 h 10 min for the cellular lysis, 5 h for DOP-PCR, 1 h 40 min for nick translation, 1 h 30 min for DNA precipitation and 1 h for slide preparation. Sample manipulation at each step added 1 h to the global handling duration. Therefore, the whole protocol lasted ~11 h 20 min before the 12 h incubation period (during the night). The capture of metaphases and the CGH analysis were performed during the morning of Day + 4.

Results

Modifications in the standard CGH protocol

In isolated fibroblasts, the application of the shortened whole genome amplification procedure (3 h 40 min DOP-PCR) yielded an amount of DNA product similar to that obtained with the standard one (5 h DOP-PCR). Only 2 out of 32 fibroblasts failed to give any smear in the 1.5% agarose gel, so the amplification efficiency was 93.75%.

High-quality, homogeneous hybridizations were obtained when the short-CGH variant (12 h of hybridization) was applied to isolated fibroblasts using DNA probes obtained after 3 h 40 min DOP-PCR. Consequently, that led to reliable CGH profiles with very few deviations, showing the high sensitivity of the modified technique, which was similar to the one obtained using the standard, 72 h-CGH (Fig. 1).

The short-CGH allowed the detection of all the characteristic aneuploidies in each cell line in 100% of the single fibroblasts ($n = 30$) analysed. No other aneuploidies or imbalances were observed (Fig. 1; Table I).

After developing the short procedure for single fibroblasts it was tested for isolated blastomeres. All the methodological modifications were also validated in single blastomeres, except for the shortened whole genome amplification. The 3 h 40 min DOP-PCR was not as successful as in fibroblasts; for this reason, the 5 h DOP-PCR was kept for isolated blastomeres, as in the standard CGH procedure.

Agreement between short-CGH and FISH

The short-CGH procedure was applied in a total of 48 isolated blastomeres from 10 embryos, which were discarded after PGS by FISH

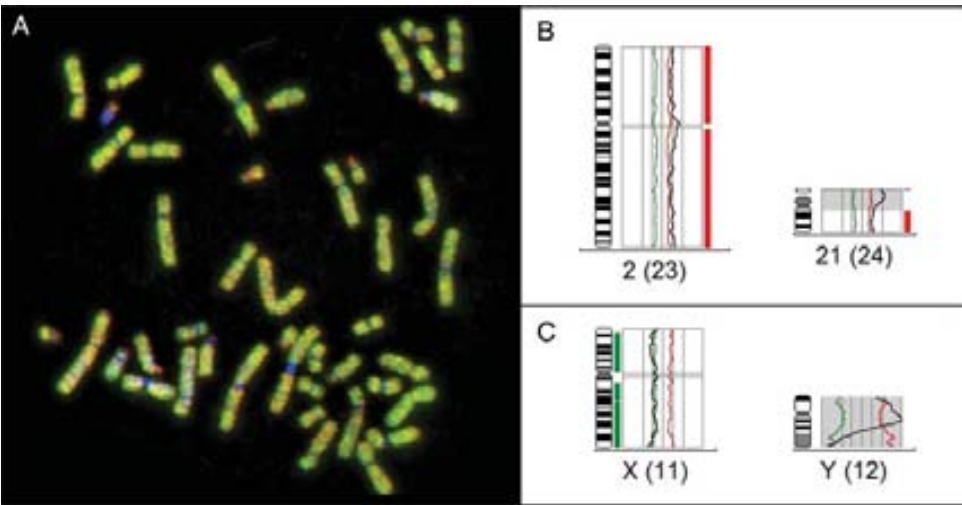


Figure 1 Short comparative genomic hybridization (short-CGH) testing DNA from a single fibroblast with the karyotype 48,XY,+2,+21. **(A)** Meta-phase showing high-quality hybridization, similar to the one obtained using the standard 72 h-CGH. **(B)** Chromosomal short-CGH profiles showing gains for chromosomes 2 and 21. **(C)** Determination of male gender in isolated fibroblasts, using as reference female single fibroblast DNA. Male gender is therefore observed as a loss of chromosome X and a gain of chromosome Y.

Table 1 Results of fibroblast lines analysis, using the short-CGH method.

Cell line code	No. cells	Karyotype	Short-CGH results
GM03676	5	48,XY,+2,+21	48,XY,+2,+21
GM03330	5	47,XY,+13	47,XY,+13
GM04435	5	48,XY,+16,+21	48,XY,+16,+21
GM03623	5	48,XXX,+18	48,XXX,+18
GM11115	5	47,XY,+9	47,XY,+9
GM03184	5	47,XY,+15	47,XY,+15

with nine chromosome probes (9-chr-FISH: 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y). Results are shown in Table II.

In all 48 blastomeres the standard 72 h-CGH and short-CGH gave the same results, so total agreement was found between the two approaches (Fig. 2).

According to the concordance between short-CGH and 9-chr-FISH results, blastomeres were classified in three categories: (i) 20 out of 48 blastomeres (41.6%) showed total agreement, as all aneuploidies found by FISH were confirmed by short-CGH (i.e. blastomeres 1.1, 4.1); (ii) 11 blastomeres (22.9%) showed partial agreement, as some abnormalities were concordant but there were other aneuploidies either not detected by FISH or not detected by short-CGH (i.e. blastomeres 1.7, 2.4) and (iii) 17 blastomeres (35.4%) showed discordant results between the two techniques (i.e. blastomeres 7.1, 8.1).

Reanalysis of blastomeres which had discordant results was performed by re-hybridization with telomeric FISH probes for particular chromosomes involved in the disagreement (blastomeres 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0), and the results were in total agreement with short-CGH results.

Aneuploidy detection by short-CGH

Although the first interpretation of FISH results had led to the conclusion that all discarded embryos were aneuploid, at least for the analysed blastomere (except for embryo 4, which was rejected for having stopped its development), out of the 48 blastomeres evaluated by short-CGH, 14 blastomeres (29.2%) belonging to three embryos did not present any aneuploidy and 34 blastomeres (70.8%) were aneuploid (Table II; Fig. 3). The chromosomes most frequently involved in aneuploidy were 22 and 16, but also aneuploidies for chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, X and Y were detected. Overall, we found 94 aneuploid events, 41 (43.6%) of them corresponding to chromosomes which are not analysed by 9-chr-FISH.

Mosaicism was found in five of the eight embryos that had more than one blastomere analysed (embryos 1, 2, 3, 5 and 9). Complementary aneuploidy events between two blastomeres of the same embryo were observed (blastomeres 1.5 and 1.6, blastomeres 3.1 and 3.2 and blastomeres 9.2 and 9.10). Moreover, the comprehensive analysis of embryo three showed a chaotic segregation (Table II).

Results of the first short-CGH clinical application

Five out of the six blastomeres obtained after Day-3 embryo biopsy produced optimal DOP-PCR products, showing a smear in the agarose gel between 200 and 4000 bp, with three extra bands of 1650, 1250 and 600 bp, corresponding to mitochondrial DNA amplification. The analysis of the short-CGHs showed aneuploidies in all five blastomeres, involving one to three chromosomes, particularly chromosome 18, which was aneuploid in three out of the five embryos (Table III; Fig. 4). Embryo 4, which produced suboptimal amplification product and, consequently, was not diagnosed, was not transferred owing to its poor developmental potential, according

Table II Summary of clinical data and comparison between Short-CGH and FISH results.

Patient	Age (years)	IVF indication	E.BI	Short-CGH results	FISH results (XY, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22)	Agreement Short-CGH/ FISH	FISH* reanalysis
A	34	RM	1.0	–	XY, –16, –22	–	–
			1.1	XY, –16, –22	–	T	
			1.2	XY, –16, –22	–	T	
			1.3	XY, –16, –22	–	T	
			1.4	XY, –16, –22	–	T	
			1.5	XY, +4, –16, –22	–	T	
			1.6	XY, –4, –16, –22	–	T	
			1.7	XXY, –16, –22	–	P	
			1.8	XY, –16, –22	–	T	
			1.9	XY, –16, –22	–	T	
			1.10	XY, –16, –22	–	T	
			1.11	XY, –16, –22	–	T	
B	43	RM+AF	2.0	–	XX, +15	–	–
			2.1	XX, +7, –9, –11, +15	–	T	
			2.2	XX, +7, –9, –11, +15	–	T	
			2.3	XX, +7, –9, –11, +15	–	T	
			2.4	XX,+7, –9, –11, +15, –18	–	P	
			3.0	–	XY, –16	–	–
			3.1	XXY,+2, +5, +6, –11, –12, –16, –17, –19, –21, –22	–	P	
			3.2	X0, –3, +8, +9p/–9q, –16, +19, +20, +21, +22	–	P	
			3.3	XY, –16	–	T	
			3.4	XY, –16	–	T	
C	42	AMA	4.0	–	XX	–	–
			4.1	XX, +12, +14	–	T	
D	42	AMA	5.0	–	XX, –13, –15, –16, –17, –22	–	XX, –22**
			5.1	XX, –2, –5, –20, –22	–	P	
			5.2	XX, –2, –5, –20, –22	–	P	
			5.3	XX, –2, –5, +16, –20, +21, –22	–	P	
			5.4	XX, –2, –5, –20, –22	–	P	
			6.0	–	XX, –15, –16, +22	–	XX, +22
			6.1	XX, +22	–	P	
			6.2	XX, +22	–	P	
			6.3	XX, +22	–	P	
			7.0	–	XY, +18	–	XY

F	50	AMA+AF	7.1	XY	—	D	
			7.2	XY	—	D	
			7.3	XY	—	D	
			7.4	XY	—	D	
			7.5	XY	—	D	
			8.0	—	XX, -16	—	XX
			8.1	XX	—	D	
			9.0	—	XY, +22	—	XY
			9.1	XY	—	D	
			9.2	XY, -2	—	D	
			9.3	XY	—	D	
			9.4	XY	—	D	
			9.5	XY	—	D	
			9.6	XY	—	D	
			9.7	XY, -22	—	D	
			9.8	XY	—	D	
			9.9	XY	—	D	
			9.10	XY, +2	—	D	
			9.11	XY	—	D	
			10.0	—	X0	—	—
			10.1	X0	—	T	
			10.2	X0	—	T	
			10.3	X0	—	T	
			10.4	X0	—	T	

*FISH reanalysis was carried out using telomeric probes for chromosomes involved in the discordant results between Short-CGH and FISH.

**It was not possible to re-hybridize the nucleus with telomeric probes for chromosomes 13 and 17.

E.BI, Embryo.Blastomere; RM, Recurrent miscarriage; AF, male factor with Abnormal FISH; AMA, Advanced Maternal Age. T, Total agreement; P, Partial agreement; D, Discordant.

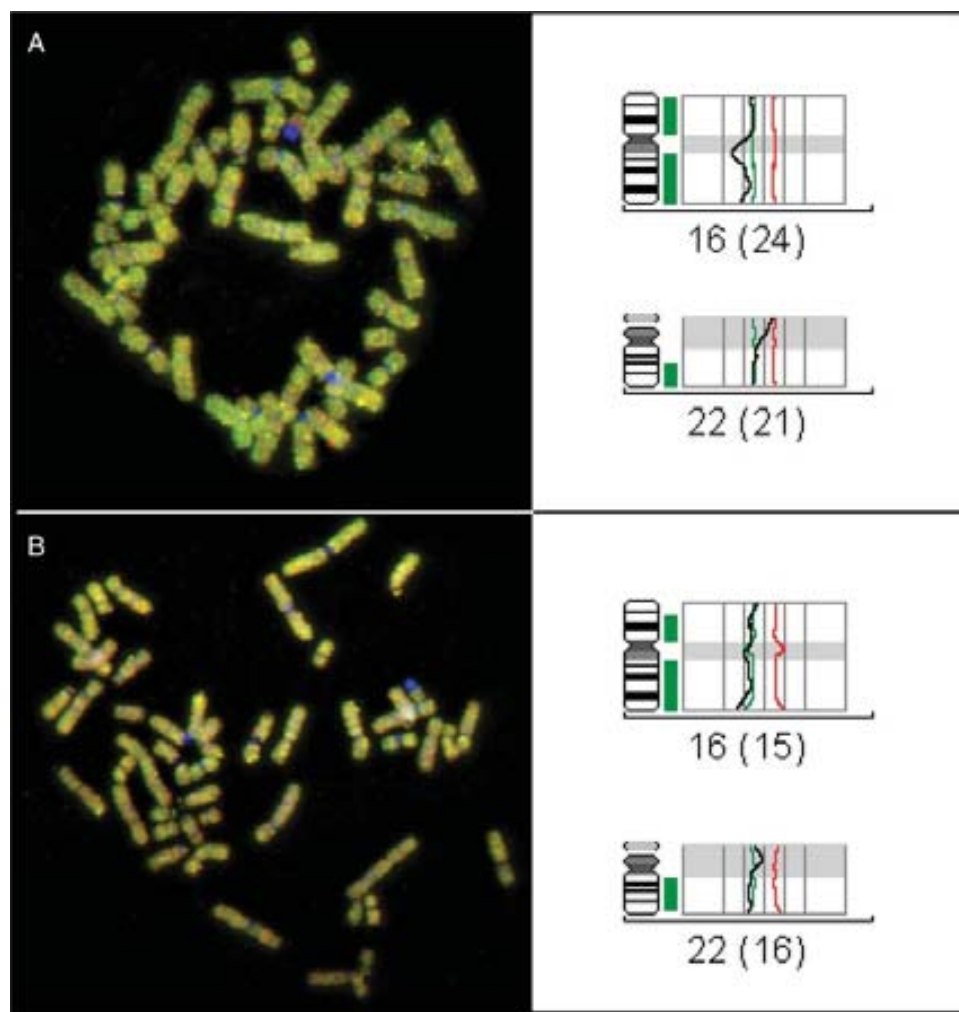


Figure 2 Comparison between short-CGH results (12 h of hybridization) and standard CGH results (72 h of hybridization) from the amplified product of blastomere 1.1. **(A)** Left: metaphase showing high-quality hybridization and low-background noise after applying the short-CGH procedure. Right: short-CGH profiles indicating losses for chromosomes 16 and 22. **(B)** Left: metaphase showing similar quality hybridization after applying the standard 72 h-CGH. Right: standard 72 h-CGH profiles indicating the same chromosome aneuploidies.

to the morphology criteria. Therefore, no embryo transfer was performed in this clinical case.

Discussion

Time-reduction of CGH protocol using fibroblasts

According to the results obtained in the present work, a short-CGH single cell analysis has been successfully developed. Some modifications in the procedure used by our group (Gutierrez-Mateo et al., 2004a), which had its basis in the previously published protocol (Wells et al., 1999), allowed us to develop a reliable, faster CGH protocol.

With a 100% success rate using the short-CGH procedure, all specific aneuploidies of the analysed fibroblasts, and exclusively them, were identified. In our hands, single fibroblast DNA

amplification product obtained when DOP-PCR was shortened to 3 h 40 min was similar to that obtained by the standard 5 h DOP-PCR protocol. Nonetheless, the key to success of the short protocol was the fact that the slides were kept in rotary agitation inside the humid chamber for the entire 12 h incubation, after having treated them in the microwave at 75 W for 30 min. Probably, rotary movement permits a better diffusion of probe molecules through complementary sequences of the denatured chromatin of lymphocyte metaphases in the slide, allowing for faster and more uniform hybridization. In fact, the introduction of agitation during the hybridization period had been previously published, also reducing the CGH procedure to 16 h and achieving very promising results (Landwehr et al., 2008). Moreover, the microwave treatment used in the hybridization step has been widely applied in different cell samples, getting very good results in faster FISH and increasing the sensitivity and specificity of signals (Multani et al., 1996; Bahce et al., 2000; Pujol et al., 2003; Weise et al., 2005; Kitayama et al., 2006).

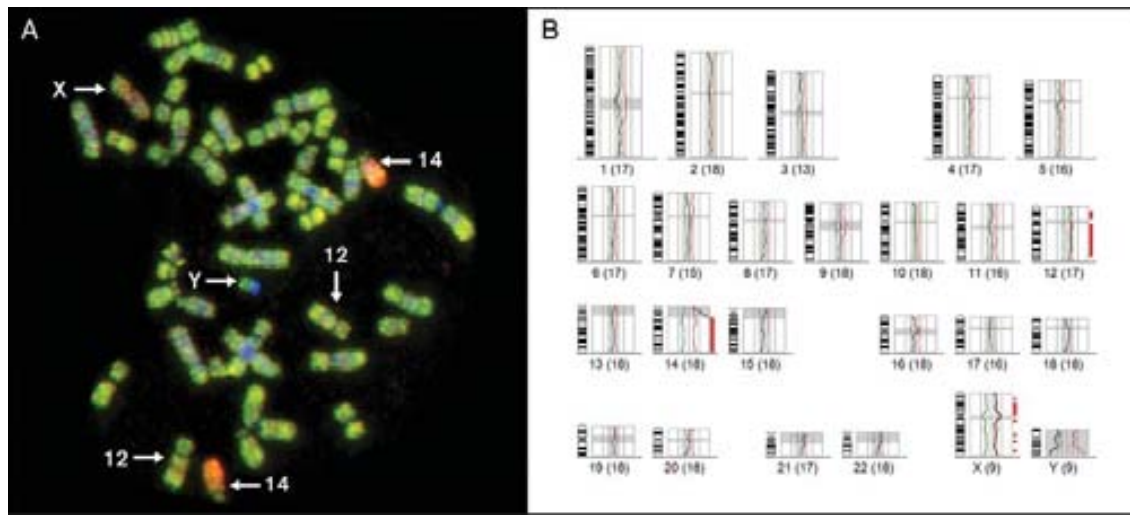


Figure 3 Short-CGH results from blastomere 4. I. **(A)** Metaphase showing gains for chromosomes 12 and 14. Using male single lymphocyte DNA as reference, the female gender can be ascertained in the metaphase, as chromosome X appears more reddish than the rest and chromosome Y appears more greenish. **(B)** Chromosomal short-CGH profiles indicating the karyotype 48,XX,+12,+14. Note that chromosome 14 shows a highly diverted profile, suggesting more than one extra chromosome 14 in the blastomere. In this case, female gender is observed as a gain of chromosome X and a loss of chromosome Y.

Table III Aneuploidy results of the first clinical application of short-CGH.

No. Embryo	Short-CGH results
3	45,XX,-18
5	45,XY,-13,-15,+16
6	45,XY,-18
7	46,XX,-3,+18
8	47,XY,+17

Determination of male gender in isolated fibroblasts from male cell lines was considered as an indicator of *in situ* hybridization quality. That is, 12 metaphases per case were captured and 24 chromosomes were analysed for each autosome, whereas only half of them were available for chromosomes X and Y. Thus, using fibroblast DNA from a female as reference, the loss of chromosome X and the gain of chromosome Y were detected analysing only 12 chromosomes for each sex chromosome. Therefore, it meant CGH was performed successfully and high-quality was achieved.

Similar, or in some cases better, hybridizations and better-defined CGH profiles were observed when the same CGH-DNA probe, obtained after 3 h 40 min DOP-PCR, was used in the short protocol (12 h of hybridization) versus the standard protocol (72 h of hybridization). It is possible that reduction of the hybridization period avoids non-specific unions, resulting in less background detected by the CGH software analysis. Combining this with the fact that microwave treatment and rotary movement improve process efficiency, short-CGH is consolidated as a reliable and faster procedure for aneuploidy analysis in fibroblasts.

Adaptation of short-CGH protocol to single blastomeres

Practically the same short-CGH procedure was appropriate for aneuploidy analysis of isolated blastomeres, except for the shortened whole genome amplification, as lower DNA amplification was detected in blastomeres versus fibroblasts when 3 h 40 min DOP-PCR was applied. Thus, according to the results, the short-CGH for blastomeres was improved using the 5 h DOP-PCR procedure. In this way, very good hybridization and highly discriminative CGH profiles were obtained. Even in blastomeres, the quality of results obtained with the short-CGH procedure was similar, or in some cases better, than that obtained with the standard CGH protocol (72 h of hybridization). Therefore, these results were as reliable for use in aneuploidy screening as the 72 h-CGH and 40 h-CGH results previously obtained by our group (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Obradors *et al.*, 2008, 2009).

Reliability of short-CGH analysis

In 41.6% (20/48 blastomeres) of the analysed blastomeres concordance was found when comparing short-CGH results with 9-chr-FISH. However, in six of them, the CGH procedure allowed for the detection of aneuploidies in chromosomes which were not analysed by FISH. Partial agreement was found in 22.9% (11/48) of the studied blastomeres, since either not all of the aneuploidies diagnosed by 9-chr-FISH were corroborated by short-CGH, or aneuploidies that could have been detected by 9-chr-FISH were observed in the CGH analysis. Finally, discordance between short-CGH and 9-chr-FISH was observed in 35.4% (17/48) of the blastomeres, as none of the diagnosed aneuploidies were corroborated by short-CGH. At that point, apart from a possible CGH error, originating from overamplification of some single cell genomic regions (which

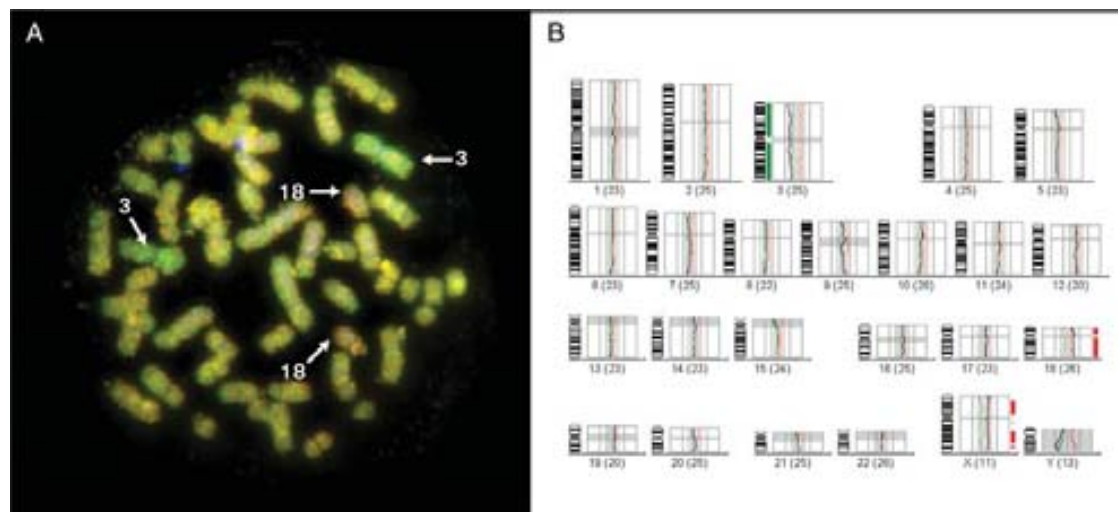


Figure 4 Example of short-CGH results from embryo 7 in the first clinical application. **(A)** Metaphase showing a loss of chromosome 3 and a gain of chromosome 18 in the analysed blastomere. **(B)** Chromosomal short-CGH profiles indicating the karyotype 46,XX,-3,+18. In this case, male single lymphocyte DNA was used as reference, therefore, female gender is observed as a gain of chromosome X and a loss of chromosome Y.

in fact were not observed when aneuploid fibroblasts were previously analysed), the following two considerations about those contradictory results could be discussed: mosaicism and/or FISH error. Mosaicism is a phenomenon that has been observed extensively in this work, as five of the eight embryos that had more than one blastomere analysed were mosaic, and it has been widely reported, affecting about 30% of the cleavage-stage embryos (Munne et al., 1994). On the other hand, the re-hybridization of discordant blastomeres with telomeric FISH probes revealed that discordance between the short-CGH and 9-chr-FISH results originated from FISH errors (Table II). In fact, it has been described that intrinsic FISH factors, such as chromosome overlapping or loss of micronuclei during fixation, may account for the diagnosis of false monosomies (Munne et al., 1996; Bahce et al., 2000) (i.e. blastomeres 5.0, 6.0 and 8.0). Otherwise, false trisomies (i.e. blastomeres 7.0 and 9.0) might be diagnosed as a result of split signals caused by the overlapping of similar fluorochromes (Munne et al., 1998). The mentioned FISH errors produced an incorrect diagnosis that led to the discarding of embryos 7 and 8 for being aneuploid while, subsequently, by short-CGH they were diagnosed as being euploid. For this reason, it is important to consider the value of short-CGH versus FISH and the need for caution in the diagnosis.

According to our results, if PGS of embryos included in this study had been performed using short-CGH, the diagnosis may have been more accurate. In fact, it has been described that FISH has partial screening potential, since analysing, in the best cases, 12 of the 23 total chromosome pairs, aneuploidies affecting the rest of the chromosomes remain undetected in >40% of cases (Bielanska et al., 2002). This is in agreement with results obtained in this study, as overall we found 94 aneuploid events, 41 (43.6%) of them corresponding to chromosomes which were not analysed by 9-chr-FISH.

Thus, the main source of error in a diagnosis by short-CGH would be embryo mosaicism, but contrary to what has been stated (Staessen et al., 2008), it does not imply that PGS success using CGH is similar to that using FISH. Although it is true that by analysing more

chromosomes it is possible to detect more aneuploidies that do not necessarily exist in the rest of the embryo, this is not a reason to reject a comprehensive and highly reliable analysis such as CGH. To date, the low implantation rate described after PGS (Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008; Staessen et al., 2008) has been observed in studies that used FISH as the screening method. Conversely, when PGS has been applied to the whole chromosome complement, even in couples with little chance of success, the implantation rate of transferred embryos has increased (Hellani et al., 2008). More extensive series of PGS, analysing the full karyotype in isolated blastomeres, are needed before this short-CGH approach is rejected or supported. But this is independent of the fact that mosaicism is one of the major causes of diagnostic errors and that it will never be entirely eliminated. In this way, this study is a preliminary validation of short-CGH results by 72 h-CGH and FISH reanalysis, which presents the short-CGH approach as a reliable technique to be applied in the aneuploidy analysis of blastomeres.

Having a comprehensive diagnosis and avoiding cryopreservation

To date, the only way to perform CGH in a PGD avoiding cryopreservation of biopsied embryos is by analysing the IPB of oocytes (Wells et al., 2002; Sher et al., 2007; Obradors et al., 2008, 2009, 2010). But, in this case, only maternal complement resulting from meiosis I is examined, whereas second meiotic division, paternal and post-zygotic aneuploidy remains undetected.

With all of the changes we introduced in the standard CGH protocol, it is now possible to apply this modified, short-CGH technique to comprehensive PGS of Day-3 blastomeres without cryopreserving the analysed embryos. On Day+3, the blastomere biopsy is carried out early in the morning and cell lysis, amplification by DOP-PCR, labelling by nick translation, DNA precipitation and slides preparation are carried out within 11 h 20 min on the same day. Hybridization takes

place in 12 h during the night and results are obtained on Day+4 in the morning. Although the duration of the whole protocol depends on the number of samples processed, having an adequate team of specialized technicians, PGS using short-CGH is completely applicable. In our hands, short-CGH analysis takes 30 min per cell using two intranet-connected systems of analysis, allowing for the embryo transfer on the same Day+4 in the afternoon or on Day+5, depending on the number of embryos to be analysed. Performing the transfer of embryos that have not been cryopreserved during the analysis could mean an increase of implantation rate and embryo survival. Actually, in a PGS requiring cryopreservation, after discarding one part of the embryos for being aneuploid and losing another part which does not survive the freezing and thawing process, the number of euploid embryos with the correct development that can be transferred is extremely reduced. Lately, the vitrification methodology has shown an increase of success after CGH-PGS (Fragouli *et al.*, 2009; Sher *et al.*, 2009). However, the most propitious situation would be to avoid the cryopreservation step: first, this would help to reduce embryo manipulation, second, it would prevent patients from having medical treatment in a subsequent cycle and third, the routine application of the short-CGH procedure would allow embryologists to remove the handicap of cryopreservation from the PGS cycle.

Recently, microarray technology has been focused on cytogenetic analysis, developing a more simplified and rapid method which allows for an automated analysis of results. Mainly, there are two approaches for this purpose: single nucleotide polymorphism array (SNP-array) and CGH-array. The SNP-array is based on the analysis of common polymorphic DNA sequences found throughout the genome, and it enables the detection of chromosome imbalance and genome wide linkage analysis (Handyside *et al.*, 2009; Vanneste *et al.*, 2009). The second one, CGH-array, has its basis in the standard CGH but, in this case, the test and reference DNA are hybridized to DNA probes fixed to a slide rather than metaphase chromosomes. Encouraging results using CGH-arrays have been obtained by several groups (Hu *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2004; Le Caignec *et al.*, 2006) and even two clinical applications have been successfully performed (Hellani *et al.*, 2008; Fishel *et al.*, 2009). However, although CGH-array is being extensively validated, further research is needed to improve its ability to distinguish between real and artifactual gains and losses in arrays with oligonucleotide probes, to overcome the lack of resolution of CGH-array using chromosome libraries or to solve the lack of accuracy of bacterial artificial chromosome-arrays (Wells *et al.*, 2008). Furthermore, to date, another essential limitation of CGH-array technology is the cost of the equipment required, which greatly exceeds that of standard CGH. Thus, our new short-CGH protocol seems to be one of the most appropriate techniques to use in PGS until the optimal combination of accuracy, speed and cost of array-CGH is established and widely applied.

In this work, short-CGH has been successfully applied in one clinical case, providing an accurate diagnosis of the analysed blastomeres. Although embryo transfer was not possible because of aneuploidies in all the screened embryos, this first application demonstrates the feasibility of using short-CGH in clinical PGS.

In conclusion, our preliminary results suggest that short-CGH is a reliable procedure for use in a comprehensive PGS of single blastomeres. This approach could also be applicable to PBs or blastocyst analysis, being faster than conventional CGH (and avoiding

cryopreservation in PB analysis) and cheaper than CGH-arrays. The short-CGH technique is a valuable alternative to FISH for predetermined chromosomes because it provides a complete aneuploidy screening of all chromosomes. In addition, if applied in Day-3 blastomeres, short-CGH results are obtained on Day+4, avoiding the cryopreservation of biopsied embryos.

Funding

FIS-ISCIII (PI 080012), *Grup de Suport a la Recerca. Generalitat de Catalunya* (2009SGRI 107) and *Càtedra de Recerca Eugén* funded this study. The first author has a predoctoral grant from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (AP2006-02211).

References

- Bahce M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M, Munne S. Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave hybridization, cell recycling and monocolour labelling of probes. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**:849–854.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002;**17**:413–419.
- Donoso P, Verpoest W, Papanikolaou EG, Liebaers I, Fatemi HM, Sermon K, Staessen C, Van der Elst J, Devroey P. Single embryo transfer in preimplantation genetic diagnosis cycles for women <36 years does not reduce delivery rate. *Hum Reprod* 2007;**22**:1021–1025.
- Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2000;**15**:175–179.
- Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A *et al.* Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril* 2010;**93**:1006.e7–1006.e10.
- Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB *et al.* Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2009; Jun 21 [Epub ahead of print].
- Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;**24**:1786–1810.
- Griffin DK, Sanoudou D, Adamski E, McGiffert C, O'Brien P, Wienberg J, Ferguson-Smith MA. Chromosome specific comparative genome hybridisation for determining the origin of intrachromosomal duplications. *J Med Genet* 1998;**35**:37–41.
- 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* 2004a;**19**:2118–2125.
- 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* 2004b;**19**:2859–2868.
- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara NA, Shaw MA, Griffin DK. Karyomapping: a Universal Method for Genome Wide

- Analysis of Genetic Disease based on Mapping Crossovers between Parental Haplotypes. *J Med Genet* 2009; Oct 25 [Epub ahead of print].
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, Reismer E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008;**23**:2806–2812.
- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-an euploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008; **17**:841–847.
- 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.
- Joris H, Van den Abbeel E, Vos AD, Van Steirteghem A. Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum Reprod* 1999;**14**:2833–2837.
- 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.
- Kitayama Y, Igarashi H, Kozu T, Nagura K, Ohashi Y, Sugimura H. Repeated fluorescence in situ hybridization by a microwave-enhanced protocol. *Pathol Int* 2006;**56**:490–493.
- Landwehr C, Montag M, van der Ven K, Weber RG. Rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnosis and its application to aneuploidy screening of human polar bodies. *Fertil Steril* 2008;**90**:488–496.
- 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.
- Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A, Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril* 2005;**84**:1395–1400.
- Malmgren H, Sahlen S, Inzunza J, Aho M, Rosenlund B, Fridstrom M, Hovatta O, Ahrlund-Richter L, Nordenskjold M, Blennow E. Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:502–510.
- 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.
- Moore DH 2nd, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW. A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997;**28**:183–190.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitricification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003;**18**:384–391.
- Multani AS, Hopwood VL, Pathak S. A modified fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. *Anticancer Res* 1996;**16**:3435–3437.
- Munne S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994;**51**:373–379.
- Munne S, Dailey T, Finkelstein M, Weier HU. Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1996;**13**:149–156.
- Munne S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert J, Gianaroli L. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998;**18**:1459–1466.
- Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, Benet J, Navarro J. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod* 2008;**23**:1949–1956.
- Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J, Navarro J. Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2009;**91**:933e931–937.
- Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutierrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Marquez C, Benet J, Navarro J. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril* 2010;**93**:675–679.
- 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.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2009; Nov 23 [Epub ahead of print].
- 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.
- Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Maassarani G, Tortoriello D, Brody S. Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril* 2009;**92**:1886–1894.
- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008;**23**:2818–2825.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;**15**:577–583.
- 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.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999; **19**:846–851.
- Weise A, Liehr T, Claussen U, Halbhuber KJ. Increased efficiency of fluorescence in situ hybridization (FISH) using the microwave. *J Histochem Cytochem* 2005;**53**:1301–1303.
- Wells D, Sherlock JK, Handside 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 M, Steuerwald N, Chu L, Weier U, Cohen J, Munne S. Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. In: Papp ZaR C (ed). *Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis*. Bologna, Italy: Medimond, 2004.

- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**:703–710.
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001;**345**:1537–1541.
- Zhang X, Trokoudes KM, Pavlides C. Vitrication of biopsied embryos at cleavage, morula and blastocyst stage. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:526–531.
- Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, Fang C, Ou JP, Li T, Zhang MF, Liang XY. Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos. *Hum Reprod* 2005;**20**:1615–1618.

4.2. Resultats de l'objectiu 3

Article nº 2: Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization.

Mariona Rius, Gemma Daina, Albert Obradors, Laia Ramos, Esther Velilla, Sílvia Fernández, Olga Martínez-Passarell, Jordi Benet, Joaquina Navarro.

Fertility and Sterility, 24 d'agost de 2010 [Epub ahead of print]

Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization

The short comparative genomic hybridization (short-CGH) method was used to perform a comprehensive cytogenetic study of isolated blastomeres from advanced maternal age embryos, discarded after fluorescent in situ hybridization (FISH) preimplantation genetic screening (PGS), detecting aneuploidies (38.5% of which corresponded to chromosomes not screened by 9-chromosome FISH), structural aberrations (31.8%), and mosaicism (77.3%). The short-CGH method was subsequently applied in one PGS, achieving a twin pregnancy. (Fertil Steril® 2010; ■:■–■. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: PGS, CGH, FISH, chromosome abnormality, mosaicism

Chromosomal abnormality increases with advanced maternal age (AMA), leading to a decrease in embryo implantation rate, an enhanced risk of miscarriage, or an enhanced risk of aneuploid offspring (1). For this reason, Preimplantation genetic screening (PGS) is widely applied in AMA cases to select euploid embryos

for transfer. The technique routinely used for PGS and subsequent investigations has been fluorescent in situ hybridization (FISH), with specific probes for five to nine chromosomes (2–4). With this method, it has been shown that 30%–65% of cleavage-stage embryos contain an aneuploidy in at least one cell (5–7). However, FISH can assess only a few chromosomes in interphase nuclei, so the information obtained may not always be representative of their real chromosomal status. The adaptation of comparative genomic hybridization (CGH) to single cells has allowed the study of the full karyotype of blastomeres, thus identifying the true level of aneuploidy in cleavage-stage embryos, which was then reported to affect 75% of them (8, 9).

Apart from meiotically derived aneuploidies, mostly associated with AMA, postzygotic errors produced during the first mitotic divisions are also very frequent in human embryos (7, 10, 11), leading to chromosomal mosaicism. The proportion of embryos that show mosaicism ranges from ~25% to >60% (12), and this has been observed in cleavage-stage embryos (7–9, 13) as well as in blastocysts (14–16).

The aim of the present investigation was to perform a comprehensive cytogenetic study by a short-CGH analysis of embryos from AMA patients which were discarded after FISH-PGS. Moreover, with the clinical application of short-CGH, an alternative to current PGS strategies is suggested which may be used to improve the implantation rate of transferred embryos.

A total of 157 blastomeres from 22 day 4 embryos were studied. These were discarded after FISH-PGS using 9-centromeric or LSI probes for chromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, and Y. The embryos were donated by eight couples who underwent PGS due to AMA (average age 42.4 years). The material was obtained from the Institut Marquès, and FISH analysis was carried out by the Centro de Medicina Embrionaria, both in Barcelona, Spain.

After blastomere isolation, the short-CGH protocol was performed as previously described (17), using single lymphocytes from a normal man as reference. An average of 12 metaphases/

Mariona Rius, M.Sc.^a
Gemma Daina, M.Sc.^a
Albert Obradors, Ph.D.^{a,b}
Laia Ramos, M.Sc.^a
Esther Velilla, Ph.D.^{c,d}
Sílvia Fernández, M.Sc.^{c,d}
Olga Martínez-Passarell, Ph.D.^e
Jordi Benet, Ph.D.^a
Joaquima Navarro, Ph.D.^a

^a *Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*

^b *Càtedra de Recerca Eugén-UAB, Barcelona, Spain*

^c *Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona, Spain*

^d *Institut Marquès, Barcelona, Spain*

^e *Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain*

Received April 13, 2010; revised June 22, 2010; accepted July 6, 2010.
M.R. has nothing to disclose. G.D. has nothing to disclose. A.O. has nothing to disclose. L.R. has nothing to disclose. E.V. has nothing to disclose. S.F. has nothing to disclose. O.M-P. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose. J.N. has nothing to disclose.

Supported by Fondo de Investigación Sanitaria- Instituto de Salud Carlos III (PI 080012), Grup de Suport a la Recerca. Generalitat de Catalunya (2009SGR1107), and Càtedra de Recerca Eugén. M.R. has a predoctoral grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (AP2006-02211).

Clinical trial registration number: FIS-ISCIII (PI 080012).

Reprint requests: Mariona Rius, M.Sc., or Joaquina Navarro, Ph.D., Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici M, Campus UAB, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Spain (FAX: 34-581-10-25; E-mail: joaquina.navarro@uab.cat, mariona.rius@uab.cat).

cell were captured, and the standard deviation criterion was used for the short-CGH analysis.

Subsequently, a 37-year-old patient (46,XX) who had experienced repeated miscarriages ($n = 5$) was included in an IVF program in the Fundació Puigvert (Barcelona) to perform a short-CGH PGS. The couple signed the corresponding informed consent, and the work was approved by the clinic's Ethics Committee. A routine superovulation procedure was performed, retrieving 14 mature oocytes on day 0. Ten of the 14 oocytes showed two pronuclei on day 1 after intracytoplasmic sperm injection. On day 3, early in the morning, one blastomere was biopsied from each of the nine embryos that had reached the 6–8-cell stage. The short-CGH process took 11 hours 20 minutes before the 12-hour incubation period. The CGH analysis was performed during day 4.

COMPREHENSIVE STUDY OF ANEUPLOID EMBRYOS DISCARDED AFTER 9-CHROMOSOME FISH-PGS

Successful single-cell DNA amplification was obtained from 145/157 blastomeres (92.4%), and all 145 samples gave informative short-CGH profiles, revealing that all 22 embryos presented chromosomal anomalies in at least one blastomere (Fig. 1A). Chromosome 16 was the most frequently involved in aneuploidy, followed by chromosomes 22, 15, 21, 18, 20, 19, 13, 6, XY, 3, 17, 4, 11, 14, 2, 8, 7, 5, 12, 1, and 9. Only chromosome 10 was not involved in aneuploidy. In agreement with our previously published work (17), 38.5% of the aneuploid events observed (153/397) could not have been detected if 9-chromosome FISH had been used, showing the principal advantage of CGH over FISH: its ability to assess the full karyotype. Additionally, CGH allows the analysis of the entire length of chromosomes, detecting partial loss/gain of chromosomal material larger than 10–20 Mb, whereas FISH tests one single locus/region. In the present study, 18 blastomeres belonging to seven of the 22 discarded embryos (31.8%) presented structural aberrations, affecting chromosomes 1, 2, 4, 9, 13, 18, 19, and 20. The most common was the gain/loss of an entire arm of the chromosome, but aberrations affecting only part of an arm and isochromosomes were also observed (Fig. 1). Correspondingly, a number of studies using conventional CGH, CGH array, or single nucleotide polymorphism (SNP) array, have also described the existence of chromosome breakage (8, 11, 17–19).

The blind short-CGH analysis of blastomeres 5.1–5.5 did not detect the X trisomy subsequently revealed by the FISH results. Therefore, single 46,XX fibroblasts were used as reference to reanalyze these blastomeres, and then the X trisomy was detected. A strategy to avoid a possible misdiagnosis of 47,XXX embryo in CGH-PGS could be the use of both 46,XY and 46,XX single cells as reference. However, this could increase considerably the hands-on time of the process and the CGH analysis. For this reason, another strategy could be to use 47,XXY reference cells. This would cause misdiagnosis only of 45,Y0 embryos, which are very rare and nonviable.

EMBRYO MOSAICISM

Of the 22 discarded embryos, only five (22.7%) presented uniform aneuploidy in all their blastomeres, indicating its meiotic origin. In this group, agreement between 9-chromosome FISH diagnosis and short-CGH analysis was evaluated: 4/5 (80%) showed total agreement (E#11, E#12, E#13, and E#15), and 1/5 (20%) showed partial agreement (E#10).

On the other hand, 17/22 embryos (77.3%) showed mosaicism, probably caused by postzygotic mitotic errors, although these also contained meiotic errors. Embryo mosaicism was classified into three categories: 4/17 (23.5%) were low-grade mosaics, with <50% of their cells being heterogeneous; 10/17 (58.8%) were middle-grade mosaics, with $\geq 50\%$ of their cells being heterogeneous, but at least two cells homogeneous; and 3/17 (17.7%) were chaotic mosaics, with each blastomere of the embryo being different from the rest (Fig. 1A).

Three mechanisms leading to aneuploid mosaicism have been proposed (1): 1) chromosome loss by anaphase lag; 2) chromosome duplication; and 3) postzygotic nondisjunction, resulting in reciprocal chromosome loss/gain in daughter cells. In the present study, with AMA patients (≥ 39 years old), 236 ($\sim 60\%$) of the 397 aneuploid events corresponded to meiotic errors. However, 161 ($\sim 40\%$) were from postzygotic origin, and of these, many reciprocal chromosome losses/gains between two blastomeres of the same embryo have been found, indicating they were caused by postzygotic mitotic nondisjunction. Interestingly, some authors also observed an increase of postzygotic nondisjunction errors in older women (20, 21), suggesting a possible age-related malfunctioning of the female mitosis apparatus at the early-cleavage stage of embryo development.

The high rate of mosaicism (77.3%) observed in this work may not exactly represent the real rate in the whole group of embryos undergoing FISH-PGS, because they had been previously discarded for being aneuploid. Nevertheless, mosaicism may represent a pitfall in PGS success. Similarly, we cannot ignore the possibility of technique-related errors as another cause of PGS misdiagnosis. For example, in this study, FISH errors that have been attributed to 20% of partial agreement with short-CGH in nonmosaic embryos may have also occurred in the diagnosis of mosaic ones. In fact, the error rate of FISH-PGS has been described as being 5%–7% (22, 23) using optimal methods.

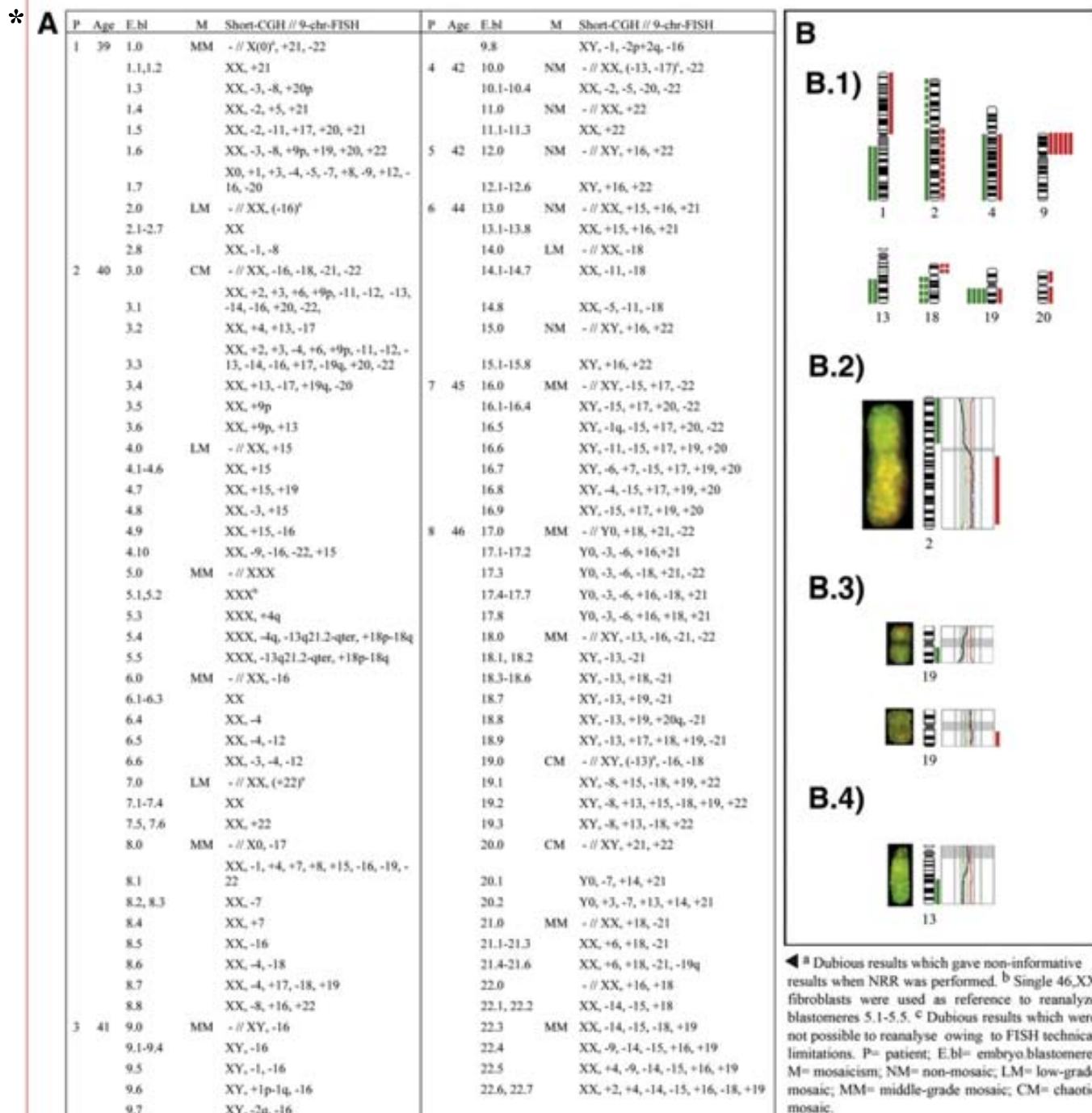
Despite the existence of mosaicism, which is inherent in the first stages of embryonic development, a strategy to increase PGS efficacy is the full-karyotype analysis. CGH is currently one of the most established techniques for this purpose. It has been applied in different cells (polar bodies, blastomeres, and trophoctoderm cells) by several groups (24–28). However, the procedure takes ~ 4 days until the diagnosis is obtained. Consequently, if CGH is performed on day 3 blastomeres or on several trophoctoderm cells, the cryopreservation of biopsied embryos is needed and the transfer of euploid-diagnosed ones must be carried out in a subsequent cycle.

To remove the cryopreservation step, the short-CGH approach previously described by our group (17) was used in the present short-CGH PGS. With the modified procedure, the diagnosis of day 3 blastomeres was obtained on day 4, allowing fresh embryo transfer. The short-CGH PGS results showed aneuploidies and/or structural aberrations in 5/9 blastomeres analyzed: E#5 [47,XX,+20], E#7 [45,XX,-13], E#8 [47,XXY,-4(q28-qter)], E#9 [45,XX,-4], and E#10 [46,XY,+9q]. Blastomeres from E#2, E#11, E#13, and E#14 were euploid. Embryos 11 and 13 were transferred, achieving a twin pregnancy. Embryos 2 and 14 were cryopreserved. At the time this paper was accepted for publication, the pregnancy was at the beginning of the third trimester.

The full-karyotype analysis avoiding cryopreservation can also be performed by the array-based strategies recently developed, i.e., CGH array (18, 29–31) or SNP array (11, 32), which provide

FIGURE 1

(A) Comparison between short comparative genomic hybridization (short-CGH) and fluorescent in situ hybridization results, and mosaicism level among the discarded embryos. (B) Structural abnormalities detected by short-CGH. (B.1) Ideograms with bars representing partial gains (red) and losses (green). Discontinuous bars indicate gain and loss in the same chromosome in cases of isochromosomes. The number of bars corresponds to the number of abnormalities observed for each chromosome among the 145 blastomeres analyzed. (B.2) Example of isochromosome 2, showing a loss of the p arm and a gain of the q arm in blastomere 9.8. (B.3) Example of loss and gain of the 19q arm in blastomeres 3.3 and 3.4, respectively. (B.4) Example of the partial loss of chromosome 13 (–13q21.2-qter) in blastomere 5.4.



Rius. Correspondence. Fertil Steril 2010.

*Veure taula ampliada a continuació de l'article

a high-resolution analysis. Nevertheless, array technology still requires some technical improvement, and nowadays the equipment and reagents required are more expensive than those used for conventional or short-CGH.

In conclusion, the present investigation demonstrated that the full-karyotype screening by short-CGH provides a more detailed

picture of the embryo's chromosomal constitution, detecting not only aneuploidies, but also structural aberrations. Therefore, short-CGH is a reliable alternative for whole-chromosome-complement PGS until the cost of array technology is reduced.

Acknowledgments: The authors thank Laia Uroz for helping in the image capturing process and Edmon de Haro for useful assistance with Figure 1.

REFERENCES

- Delhanty JD. Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:237–44.
- Munne S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005;84:331–5.
- Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993;8:2185–91.
- Staessen C, Platteau P, van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. 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;19:2849–58.
- Benadiva CA, Kligman I, Munne S. Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age. *Fertil Steril* 1996;66:248–55.
- Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J, Ahrlund-Richter L, Sjöblom P, Lundkvist O, et al. A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum Genet* 1999;104:376–82.
- Munne S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994;51:373–9.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106:210–7.
- 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.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002;17:413–9.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577–83.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33–41.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997;99:755–60.
- Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M, et al. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2004;19:316–24.
- Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998;13:3151–5.
- Ruangvutitert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn* 2000;20:552–60.
- Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marqués L, Calderón G, et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening. First clinical application. *Hum Reprod* 2010; May 19 [Epub ahead of print].
- Hellani A, Abu-Amro K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008;17:841–7.
- 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;27:1214–8.
- Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S, Geyer J, Craft I, Harper JC. Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod* 2005;20:129–37.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 2002;4:223–32.
- Colls P, Escudero T, Czekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using “no result rescue”. *Fertil Steril* 2007;88:53–61.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007;87:534–41.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2009.
- 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.
- 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.
- Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J, et al. Outcome of twin babies free of von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2009;91:933.e1–7.
- Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M, Maassarani G, Tortoriello D, Brody S. Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril* 2009;92:1886–94.
- Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril* 2010;93(3):1006.e7–10.
- Le Caignec C, Spits C, Sermon K, de Rycke M, Thienpont B, Debrock S, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e68.
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:703–10.
- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara NA, Shaw MA, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2009.

P	Age	E.bl	M	Short-CGH // 9-chr-FISH	P	Age	E.bl	M	Short-CGH // 9-chr-FISH
1	39	1.0	MM	- // X(0) ^a , +21, -22			9.8		XY, -1, -2p+2q, -16
		1.1,1.2		XX, +21	4	42	10.0	NM	- // XX, (-13, -17) ^c , -22
		1.3		XX, -3, -8, +20p			10.1-10.4		XX, -2, -5, -20, -22
		1.4		XX, -2, +5, +21			11.0	NM	- // XX, +22
		1.5		XX, -2, -11, +17, +20, +21	5	42	11.1-11.3		XX, +22
		1.6		XX, -3, -8, +9p, +19, +20, +22			12.0	NM	- // XY, +16, +22
				X0, +1, +3, -4, -5, -7, +8, -9, +12, -16, -20			12.1-12.6		XY, +16, +22
		1.7	LM	- // XX, (-16) ^a	6	44	13.0	NM	- // XX, +15, +16, +21
		2.0		XX			13.1-13.8		XX, +15, +16, +21
		2.1-2.7		XX, -1, -8			14.0	LM	- // XX, -18
2	40	3.0	CM	- // XX, -16, -18, -21, -22			14.1-14.7		XX, -11, -18
				XX, +2, +3, +6, +9p, -11, -12, -13, -14, -16, +20, -22,			14.8		XX, -5, -11, -18
		3.1		XX, +4, +13, -17			15.0	NM	- // XY, +16, +22
		3.2		XX, +2, +3, -4, +6, +9p, -11, -12, -13, -14, -16, +17, -19q, +20, -22			15.1-15.8		XY, +16, +22
		3.3		XX, +13, -17, +19q, -20	7	45	16.0	MM	- // XY, -15, +17, -22
		3.4	LM	XX, +9p			16.1-16.4		XY, -15, +17, +20, -22
		3.5		XX, +9p, +13			16.5		XY, -1q, -15, +17, +20, -22
		3.6		- // XX, +15			16.6		XY, -11, -15, +17, +19, +20
		4.0		XX, +15			16.7		XY, -6, +7, -15, +17, +19, +20
		4.1-4.6		XX, +15, +19			16.8		XY, -4, -15, +17, +19, +20
		4.7		XX, -3, +15			16.9		XY, -15, +17, +19, +20
		4.8		XX, +15, -16	8	46	17.0	MM	- // Y0, +18, +21, -22
		4.9		XX, -9, -16, -22, +15			17.1-17.2		Y0, -3, -6, +16, +21
		4.10		XX, -9, -16, -22, +15			17.3		Y0, -3, -6, -18, +21, -22
		5.0	MM	- // XXXX			17.4-17.7		Y0, -3, -6, +16, -18, +21
		5.1,5.2		XXX ^b			17.8		Y0, -3, -6, +16, +18, +21
		5.3		XXX, +4q			18.0	MM	- // XY, -13, -16, -21, -22
		5.4		XXX, -4q, -13q21.2-qter, +18p-18q			18.1, 18.2		XY, -13, -21
		5.5		XXX, -13q21.2-qter, +18p-18q			18.3-18.6		XY, -13, +18, -21
		6.0	MM	- // XX, -16			18.7		XY, -13, +19, -21
		6.1-6.3		XX			18.8		XY, -13, +19, +20q, -21
		6.4		XX, -4			18.9		XY, -13, +17, +18, +19, -21
		6.5		XX, -4, -12			19.0	CM	- // XY, (-13) ^a , -16, -18
		6.6		XX, -3, -4, -12			19.1		XY, -8, +15, -18, +19, +22
		7.0	LM	- // XX, (+22) ^a			19.2		XY, -8, +13, +15, -18, +19, +22
		7.1-7.4		XX			19.3		XY, -8, +13, -18, +22
		7.5, 7.6		XX, +22			20.0	CM	- // XY, +21, +22
		8.0		- // X0, -17			20.1		Y0, -7, +14, +21
		8.1		XX, -1, +4, +7, +8, +15, -16, -19, -22			20.2		Y0, +3, -7, +13, +14, +21
		8.2, 8.3		XX, -7			21.0	MM	- // XX, +18, -21
		8.4		XX, +7			21.1-21.3		XX, +6, +18, -21
		8.5		XX, -16			21.4-21.6		XX, +6, +18, -21, -19q
		8.6		XX, -4, -18			22.0	MM	- // XX, +16, +18
		8.7		XX, -4, +17, -18, +19			22.1, 22.2		XX, -14, -15, +18
		8.8		XX, -8, +16, +22			22.3		XX, -14, -15, -18, +19
3	41	9.0	MM	- // XY, -16			22.4		XX, -9, -14, -15, +16, +19
		9.1-9.4		XY, -16			22.5		XX, +4, -9, -14, -15, +16, +19
		9.5		XY, -1, -16			22.6, 22.7		XX, +2, +4, -14, -15, +16, -18, +19
		9.6		XY, +1p-1q, -16					
		9.7		XY, -2q, -16					

^a Dubious results which gave non-informative results when NRR was performed. ^b Single 46,XX fibroblasts were used as reference to reanalyze blastomeres 5.1-5.5. ^c Dubious results which were not possible to reanalyse owing to FISH technical limitations. P= patient; E.bl= embryo.blastomere; M= mosaicism; NM= non-mosaic; LM= low-grade mosaic; MM= middle-grade mosaic; CM= chaotic mosaic.

4.3. Resultats de l'objectiu 4

Aplicació clínica de la CGH ràpida en casos d'edat materna avançada, avortaments de repetició i fallades repetides d'implantació.

Resultats pendents de publicar

4.3. Resultats de l'aplicació clínica de la CGH ràpida en casos d'edat materna avançada, avortaments de repetició i fallades repetides d'implantació

Com s'ha esmentat en l'apartat 3.3.1 de la secció de material i mètodes, per a aquest objectiu s'han realitzat cinc casos clínics, amb indicació d'edat materna avançada (AMA) per al PGS en dos dels casos, AMA i avortaments de repetició (RM) en un tercer cas, RM en el quart cas i fallades repetides d'implantació (RIF) en el cinquè cas. A continuació s'exposen els resultats dels casos i es resumeixen a la Taula 4.3.1.

4.3.1. Casos 1 i 2. Indicació: edat materna avançada

Cas 1:

Els resultats d'aquest cas s'han inclòs en el primer article presentat (veure apartat 4.1).

Cas 2:

Amb una edat materna de 41 anys, la parella ja havia fet dos cicles d'inseminació artificial de cònjuge (IAC), dos cicles de FIV sense èxit i un tercer cicle de FIV amb PGS, emprant la FISH per a vuit cromosomes, que va aconseguir l'embaràs després de la transferència embrionària, però que, finalment, va acabar en avortament. Els paràmetres seminals de morfologia i mobilitat dels espermatozoides eren normals.

En el cicle de FIV-PGS emprant la CGH ràpida es van obtenir 16 oòcits, dels quals 14 eren madurs i es van inseminar mitjançant ICSI. El dia+1 es van detectar 13 zigots, dels quals 10 van evolucionar correctament fins l'estadi de 6-8 cèl·lules (dia+3) i es van biopsiar amb èxit. Tots els blastòmers obtinguts es van poder diagnosticar amb la CGH ràpida: un va resultar ser euploide i en els nou restants s'hi van detectar aneuploïdies; a més, en un d'aquests nou també es va detectar una alteració cromosòmica estructural (veure Taula 4.3.1). L'embrió diagnosticat com a euploide (nº 6) es va transferir i va donar lloc a un embaràs, que actualment es troba en el tercer trimestre de gestació. El resultat de l'amniocentesi va confirmar el diagnòstic obtingut en el PGS amb la CGH ràpida.

En aquest cas, per a l'anàlisi de la CGH, es van utilitzar dos controls: la meitat del producte de DNA amplificat de cada blastòmer es va marcar i co-precipitar amb DNA de cèl·lules 46,XY i, l'altra meitat, amb el de cèl·lules 46,XX. Primer es va fer l'anàlisi de tots els blastòmers comparant-los amb el control 46,XY i, llavors, els embrions diagnosticats com a 46,XX es van reanalitzar comparant-los amb el control 46,XX per confirmar que es tractava d'una disomia del cromosoma X (sexe femení de l'embrió) i no d'una trisomia (síndrome Triple X) (Figura 4.3.1).

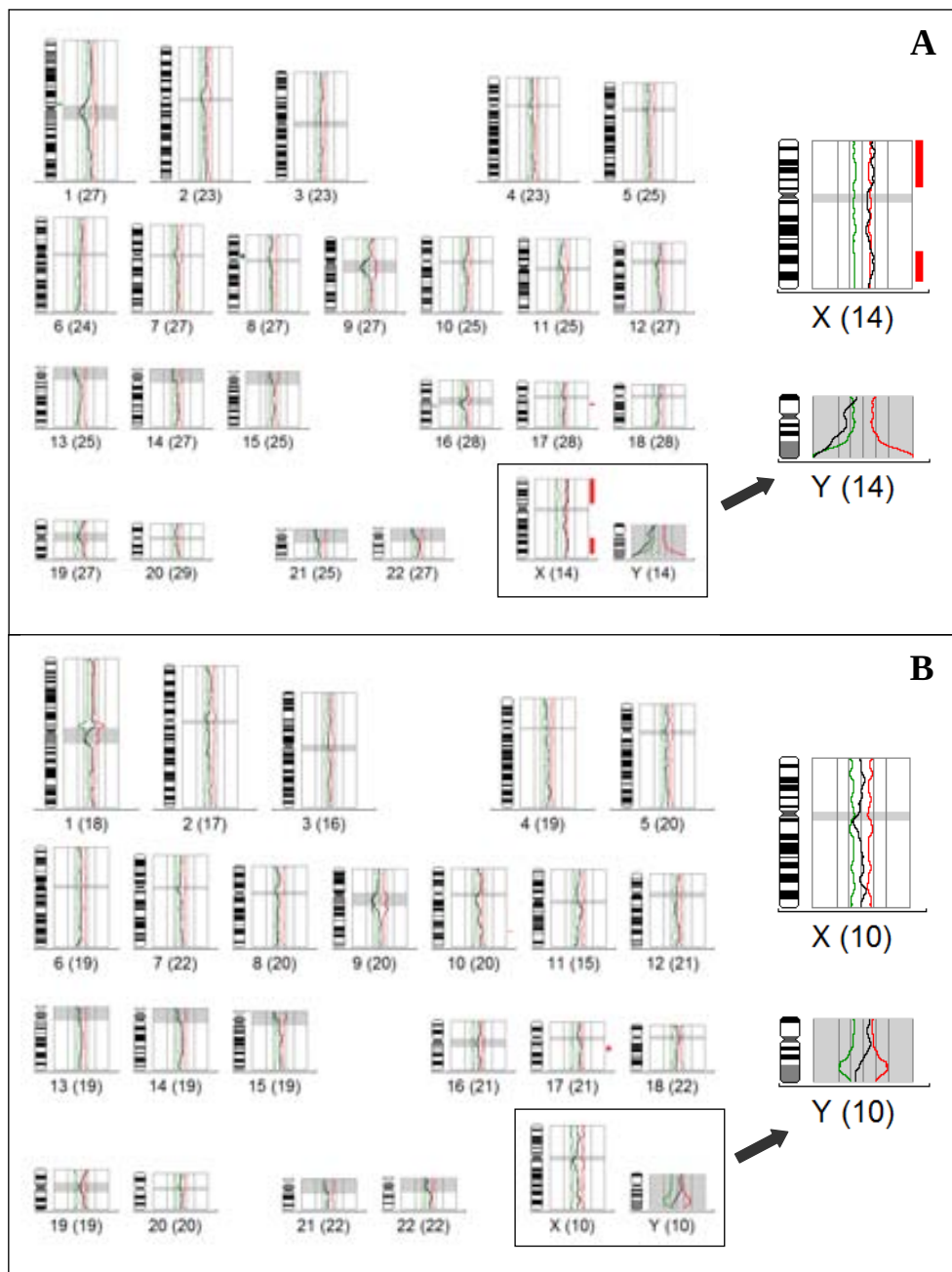


Figura 4.3.1. Resultats de l'anàlisi de la CGH del DNA de l'embrió nº 6 del cas 2, hibridat competitivament amb el DNA d'una cèl·lula control 46,XY (A) i amb el d'una cèl·lula control 46,XX (B). En els detalls ampliat es pot observar la detecció del gènere XX com un guany del cromosoma X i una pèrdua de l'Y (A) o bé com una dotació normal diploide del cromosoma X (B).

4.3.2. Casos 3 i 4. Indicació: avortaments de repetició

Cas 3:

Els resultats d'aquest cas s'han inclòs en el segon article presentat (veure apartat 4.2). Tot i que l'edat materna era de 37 anys i, per tant, pot ser considerat com un cas d'AMA, el factor més important era el dels avortaments de repetició, ja que la parella n'havia patit cinc en els dos anys previs al tractament.

Cas 4:

En aquest cas, la parella havia tingut prèviament dues gestacions bioquímiques i dues gestacions amb avortament. Després es va realitzar un cicle de FIV-PGS amb FISH, amb sondes pels cromosomes 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y, que va produir embaràs amb avortament de primer trimestre. L'edat materna era de 33 anys i els paràmetres seminals eren normals.

En el cicle de FIV-PGS emprant la CGH ràpida es van obtenir set oòcits, dels quals cinc eren madurs i es van inseminar mitjançant ICSI. El dia+1 es van detectar quatre zigots. El dia+3 es van biopsiar tres embrions de baixa qualitat: el nº 1 tenia sis cèl·lules, el nº 4 en tenia set i el nº 5 en tenia cinc; tots tres presentaven fragmentació elevada. Els resultats de la CGH ràpida van revelar alteracions cromosòmiques estructurals i/o numèriques en dos dels embrions (nº 1 i nº 4), mentre que el blastòmer de l'embrió nº 5 presentava euploidia (veure Taula 4.3.1). Aquest últim es va transferir, però no es va aconseguir embaràs.

4.3.3. Cas 5. Indicació: fallades repetides d'implantació

La pacient d'aquest cas, de 36 anys, havia patit dos embarassos espontanis ectòpics i havia fet quatre cicles de FIV sense èxit.

En el cicle de FIV-PGS amb la CGH ràpida es van obtenir 10 oòcits, dels quals nou eren madurs. La inseminació dels MII es va fer mitjançant ICSI i, el dia+1, es van detectar vuit zigots. D'aquests, set van evolucionar correctament fins l'estadi de 6-8 cèl·lules i el dia+3 es van biopsiar. Es van obtenir resultats de la CGH ràpida de tots els blastòmers biopsiats: sis presentaven alteracions cromosòmiques numèriques i/o estructurals i un era totalment euploide (nº 4). Aquest últim es va transferir, però no es va aconseguir embaràs.

4.3.6. Resultats globals

Agrupant tots els casos realitzats, inclosos els publicats en els articles nº 1 i nº 2, dels 60 oòcits obtinguts per punció fol·licular, 50 eren madurs i es van inseminar mitjançant ICSI, amb una taxa de fecundació del 84% (42/50). El dia+3, es va biopsiar amb èxit un blastòmer de cadascun dels 35 embrions que presentava evolució morfològica adequada (83,3%) per poder fer-ne l'anàlisi citogenètica completa amb la CGH ràpida.

Es van obtenir resultats de la CGH ràpida de 34 dels 35 blastòmers analitzats, és a dir, l'èxit de diagnòstic és del 97,1%. El blastòmer del qual no es va obtenir resultat (que pertanyia a l'embrió nº 4 del cas 1), ja va evidenciar, en el gel d'agarosa, que l'amplificació del DNA era deficient, amb una pinzellada més tènue i amb les bandes de DNA mitocondrials més intenses.

Els perfils de la CGH d'aquests blastòmers van mostrar euploidia en set dels 34 embrions diagnosticats (20,6%), mentre que 27 presentaven errors cromosòmics (79,4%). En total, es van detectar 46 alteracions cromosòmiques, sis (13%) de tipus estructural i 40 (87%) de tipus numèric (aneuploidies).

Les alteracions estructurals es van trobar en els cromosomes 4, 6, 9, 17 i 18, amb afectació de fragments cromosòmics de part d'un braç (+6p11-pter de l'embrió nº 12, cas 2; -4q28-qter de l'embrió nº 8, cas 3), un braç sencer (+9q de l'embrió nº 10, cas 3 (Figura 4.3.2); -17p de l'embrió nº 3 i -18p de l'embrió nº 5, cas 5) o bé dels dos braços d'un cromosoma (isocromosoma 9q de l'embrió nº 4, cas 4). La mida dels fragments guanyats o perduts es troba entre 22 i 93 Mb aproximadament, que és superior al límit de resolució de la CGH (10-20 Mb).

Pel que fa a les aneuploidies, els cromosomes més freqüentment involucrats van ser, en primer lloc, el 13 i el 15; en segon lloc, la parella X/Y; en tercer lloc, el 16, el 18 i el 19; en quart lloc, el 3, el 8, el 9, el 20, i el 22 i, en darrer lloc, el 2, el 4, el 5, el 6, el 14, el 17 i el 21. Així doncs, es van trobar alteracions numèriques en tots els cromosomes excepte l'1, el 7, el 10, l'11 i el 12 (Figura 4.3.3). En aquest sentit, de les 40 aneuploidies, 24 (60%) afectaven cromosomes que normalment s'analitzen amb la FISH de nou sondes (per als cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) i 16 (40%) afectaven altres cromosomes que habitualment no s'analitzen quan s'aplica la FISH.

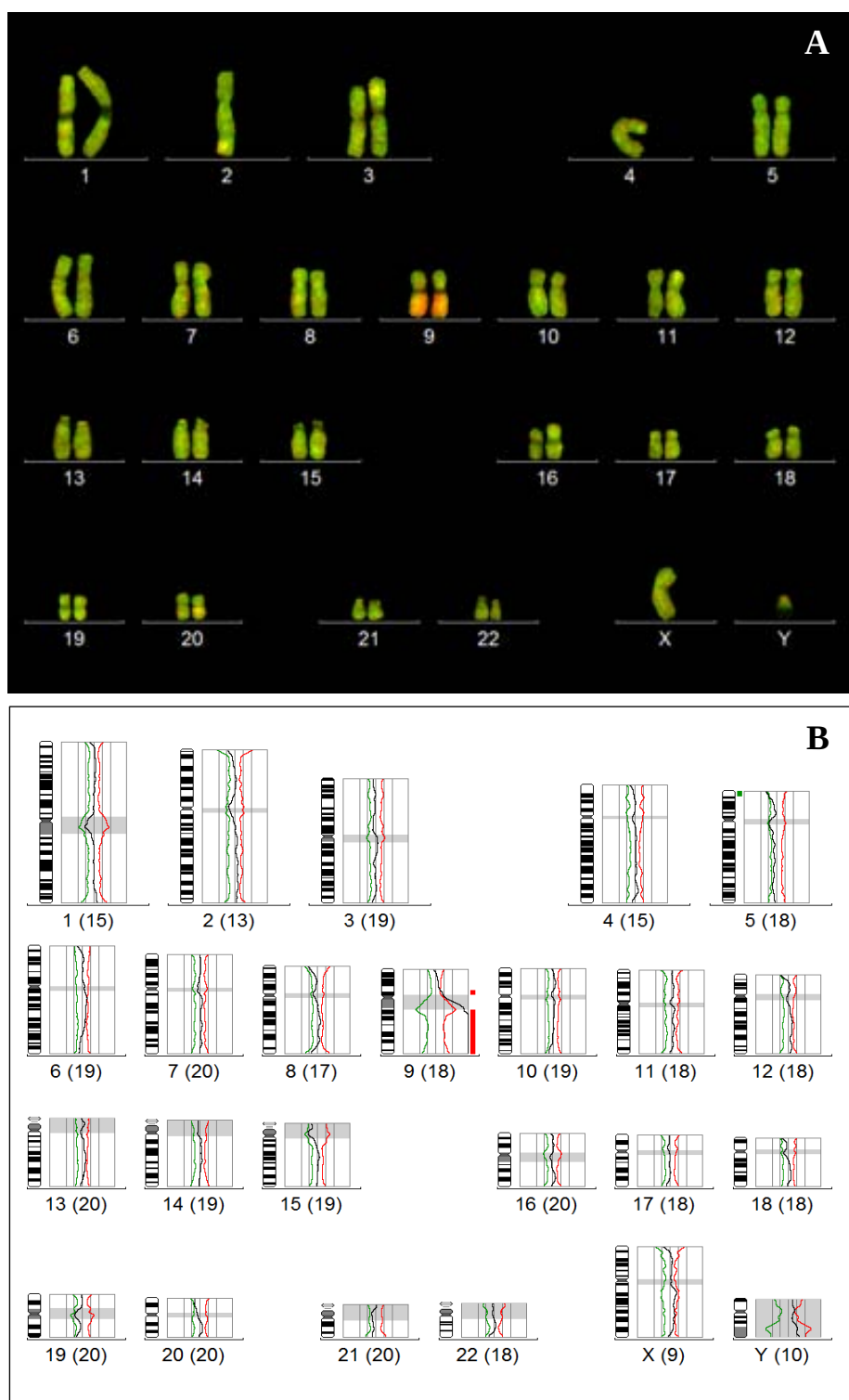


Figura 4.3.2. Exemple d'una alteració cromosòmica estructural que involucra un braç sencer del cromosoma 9. Resultats de l'anàlisi de la CGH de l'embrió n° 10 del cas 3. A) S'observa el guany del braç q del cromosoma 9, amb una hibridació predominant del DNA marcat amb fluorocrom vermell. B) El perfil corresponent es mostra desviat cap a la dreta i apareix la barra vermella de guany cromosòmic.

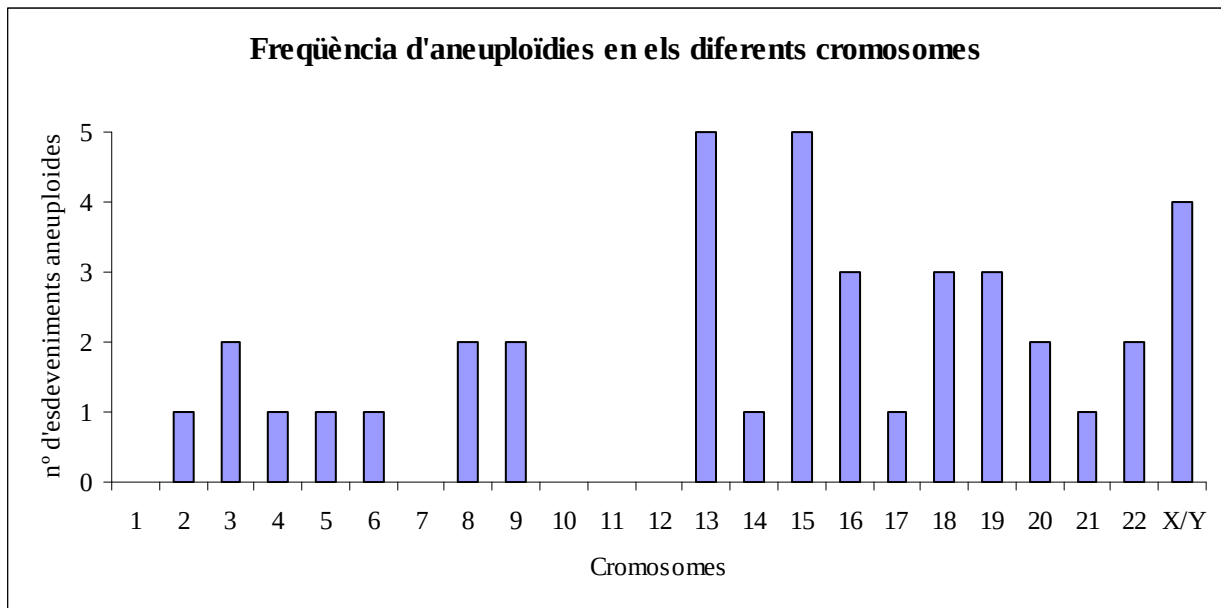


Figura 4.3.3. Incidència i distribució de les aneuploidies trobades en els cinc casos de PGS emprant la CGH ràpida.

En el conjunt dels cinc casos de PGS amb CGH ràpida, set embrions es van diagnosticar com a euploides en tots els cromosomes; dos d'ells es van criopreservar i cinc es van transferir. D'aquests cinc embrions transferits, tres (60%) van produir embaràs; és a dir, que la taxa d'implantació global és del 60%.

Taula 4.3.1. Resultats dels cicles de FIV-PGS emprant la CGH ràpida

Pacient	Indicació PGS	Edat m	COCs	MII	Fecundats	Biopsiats	Diagnosticats	Embrí	Aneuploïdies	Alteracions estructurals	Sexe	Trasferit	Congelat	Embaràs
1	AMA	42	9	8	7	6	5	3 4 5 6 7 8	-18 ND -13,-15,+16 -18 -3,+18 +17	ND	XX ND XY XY XX XY			
2	AMA	41	16	14	13	10	10	1 2 3 4 5 6 8 11 12 14	+21 +16 -9,+19 -9,+22 +8,+13,-15,-22 +16 -15 +20 +6,-15,+19		XY XY XY XX XX XX XX XX XX XX			Sí
3	RM+AMA	37	18	14	10	9	9	2 5 7 8 9 10 11 13 14	+20 -13 +Y -4	-4q28-qter +9q	XX XX XX XY XY XY XX XX XX XX		Sí	
4	RM	33	7	5	4	3	3	1 4 5	-X/Y +19	-9p/+9q	X0 XX XX			No
5	RIF	36	10	9	8	7	7	1 3 4 5 6 8 9	-2 -3,+5,-14 -17p -18p -X -13 -X/Y, -8,+13,-15		XY XY XX XX Y0 XY X0	Sí		No

COCs= complexos oòcit-cumulus; Edat_m= edat materna; ND= no diagnosticat

4.4. Resultats dels objectius 5 i 6

Article nº 3: Reliability of short comparative genomic hybridization for the detection of unbalanced chromosome segregations in PGD of translocations.

Mariona Rius, Albert Obradors, Gemma Daina, Laia Ramos, Aïda Pujol, Olga Martínez-Passarell, Laura Marquès, Maria Oliver-Bonet, Jordi Benet, Joaquina Navarro.

(Pendent de revisar)

Reliability of short comparative genomic hybridization for PGD of translocations

Mariona Rius,^{1*} Albert Obradors,^{2,3} Gemma Daina,¹ Laia Ramos,¹ Aïda Pujol,³ Olga Martínez-Passarell,⁴ Laura Marquès,⁵ Maria Oliver-Bonet,⁶ Jordi Benet,^{1,2} Joaquina Navarro.^{1,2}**

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Spain.

²Càtedra de Recerca Eugin-UAB

³Clínica Eugin, Barcelona, 08029, Spain

⁴Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau, Barcelona, 08025, Spain.

⁵Centre de Reproducció Assistida Clínica Sagrada Família, Barcelona, 08022, Spain.

⁶Hospital Universitari Son Dureta, Palma de Mallorca, 07014, Spain.

*Corresponding authors:

Joaquina Navarro, joaquina.navarro@uab.cat

Mariona Rius, mariona.rius@uab.cat

"This paper is dedicated to the memory of Prof. Josep Egozcue Cuixart, the pioneer of Cytogenetics of Human Reproductive Biology in Spain, an excellent teacher and a good friend."

Abstract

Carriers of balanced chromosomal translocations are at risk for infertility, pregnancy loss or birth of affected offspring due to the production of unbalanced gametes. For this reason, preimplantation genetic diagnosis (PGD) by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) has been widely applied in order to select normal/balanced embryos for transfer. However, using FISH, only the chromosomes involved in the reorganization, or few more chromosomes are analyzed and the PGD outcome is not as encouraging as expected. The objective of this work was to use short comparative genomic hybridization (short-CGH) in the PGD for couples with balanced translocations to detect not only partial chromosome errors resulting from the unbalanced segregations, but also other chromosome errors.

After using short-CGH in the reanalysis of two unbalanced embryos, discarded from a PGD for a reciprocal translocation carrier, the same approach was applied in the PGD for three Robertsonian translocation carriers, two reciprocal translocation carriers and a double translocation carrier.

The short-CGH technique detected structural errors resulting from the meiotic segregation of the chromosomes involved in the translocations and other abnormalities affecting all chromosome groups. Alternate segregation was the most frequently detected among Robertsonian translocation cases, while unbalanced chromosome segregations were predominantly found in reciprocal translocation cases. Aneuploidy and structural chromosome errors were more frequently found in Robertsonian than in reciprocal translocation carriers.

In conclusion, this comprehensive chromosomal screening is a reliable approach for PGD of translocations, as it is capable of detecting partial chromosome errors resulting from unbalanced segregations simultaneously to the screening of all chromosomes, and may help to improve the results after PGD for translocation carriers.

Introduction

Carriers of balanced chromosomal translocations are at risk for infertility, pregnancy loss or birth of affected offspring due to the production of unbalanced gametes. The two types of balanced chromosomal translocations, Robertsonian and reciprocal, have a completely different molecular basis and, therefore, different genetic behavior.

Robertsonian translocations occur when two achrocentric chromosomes, more frequently non-homologous, join through the fusion of their centromeres, resulting in a single derivative chromosome. In humans, their prevalence in the general population is of 1.23/1000¹, the most common being the translocation between chromosomes 13 and 14. During meiosis I, at the pachytene stage, the derivative chromosome pairs its arms with the homologous q arms of the corresponding normal chromosomes, forming a trivalent figure. After anaphase I, four segregation types can be observed: one alternate and two adjacent modes resulting from a 2:1 segregation, and the 3:1 segregation. Out of the 16 possible gametes generated, only the four produced by the 2:1 alternate type can be cytogenetically normal (2) or balanced (2), while the eight resulting from the 2:1 adjacent and the four resulting from the 3:0 segregation will produce monosomic/disomic and nullisomic/trisomic gametes, respectively. However, a predominance of normal/balanced gametes has been observed in male Robertsonian translocation carriers, ranging from 60% to 96.6%².

Reciprocal translocations occur when two non-homologous chromosomes exchange terminal fragments, producing two derivative chromosomes. These are the most frequent structural aberrations in the general population, with an incidence of 0.092%³. During meiosis I, at pachytene, both derivative chromosomes pair their exchanged fragments with the homologous regions of the corresponding normal chromosomes, forming a quadrivalent figure. After anaphase I, these chromosomes can segregate through eight different types: three resulting from a 2:2 segregation (alternate, adjacent-1 or adjacent-2), four resulting from a 3:1 segregation and one resulting from a 4:0 segregation. Out of the 32 possible gametes generated, only the four produced by the 2:2 alternate type can be cytogenetically normal (2) or balanced (2), while the rest will produce partial or whole chromosome abnormalities, meaning that reciprocal translocation carriers have a poor chance of conceiving a healthy baby. Nevertheless, there is consensus about the fact that each reciprocal translocation has a specific pattern of segregation which mainly depends on the chromosomes involved in the reorganization, the breakpoints and the length of the interstitial segments of the quadrivalent^{4,5}.

In order to select normal or balanced embryos for transfer, preimplantation genetic diagnosis (PGD) has been widely applied to translocation carriers, achieving a 16% pregnancy rate (embryos showing positive heart beat / transferred embryos) for Robertsonian translocations and 13% for reciprocal translocations ⁶. The technique most routinely used for this purpose is fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with specific probes (fluorescently labeled) for the chromosomes involved in the reorganization, allowing the distinction between normal and derivative chromosomes.

But, apart from chromosome errors directly related to the type of segregation, it has been postulated that the trivalent/quadrivalent conformation could have an influence on meiotic synapsis and disjunction of other bivalents, causing aneuploidy in chromosomes not involved in the translocation. This phenomenon has been named interchromosomal effect (ICE) ^{7,8}. While the existence of an ICE in Robertsonian translocation carriers has been characterized ⁸⁻¹⁰, in reciprocal translocation carriers this seems to also depend on the chromosomes involved in the translocation and the type of quadrivalent formed ⁵. On that basis, to improve the implantation rate of the transferred embryos after PGD of translocations, aneuploidy screening simultaneous to the PGD of translocations has been recommended ^{9,10}. However, using the conventional FISH analysis, only a few additional chromosomes can be ascertained in a limited number of hybridization rounds. Therefore, a comprehensive cytogenetic analysis of not only the chromosomes involved in the rearrangement, but also the whole chromosome complement by short-CGH would be very useful ^{11,12}.

The aim of this work is to demonstrate the reliability of a more complete PGD approach for balanced translocation carriers, in which chromosome errors related to the meiotic translocation segregation and other structural chromosomal abnormalities and aneuploidies can be identified.

Material and methods

Short-CGH analysis of isolated blastomeres from discarded embryos of a 46,XX,t(2;5)(q21;q33) carrier

The ability of short-CGH to detect partial chromosome losses or gains was tested previous to its application in PGD for balanced chromosome translocation carriers. For this purpose, the procedure was applied in isolated blastomeres from two discarded embryos of a 46,XX,t(2;5)(q21;q33) carrier, after FISH-PGD determined these were not transferable (owing to FISH signals not being concordant with alternate segregation). The patients accepted the reanalysis of the discarded embryos by short-CGH.

The *zona pellucida* of each embryo was removed using pronase (3mg/ml) (Roche) for 5 min at 37°C. Then, the aggregated blastomeres were rapidly separated and washed by pipetting with a 170-µm denuding pipette (Cook Ireland, Ltd.) in different phosphate buffered saline (PBS)/0.1% polyvinyl alcohol (PVA) droplets. After that, each blastomere was transferred to a PCR tube and the short-CGH procedure was applied as described above ¹¹.

Clinical cases of balanced chromosome translocations

Short-CGH was applied in 10 IVF-PGD cycles from six balanced chromosome translocation carriers. The particular karyotype, maternal age and basic seminal characteristics of each case are included in Table 2.

Cases A-C corresponded to Robertsonian translocation carriers: A) 45,XY,t(13;14)(q10;q10) (two pooled IVF cycles through cryopreservation of the embryos from the first cycle at the two pronuclei (2PN) stage); B) 45,XX,t(13;14)(q10;q10) (two consecutive IVF-PGD cycles); C) 45,XY,t(14;21)(q10;q10) (one IVF-PGD cycle). Two cases corresponded to reciprocal translocations carriers: D) 46,XX,t(10;13)(q23.2;q22) (two consecutive IVF-PGD cycles); E) 46,XX,t(1;10)(p11;p11.2) (one IVF-PGD cycle). Finally, one case corresponded to a double-translocation carrier: F) 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10) (three consecutive IVF-PGD cycles).

In all cases, a single blastomere per embryo was analyzed by the short-CGH approach, except for the first IVF-PGD cycle of case F, in which two blastomeres were analyzed simultaneously, one by FISH and the other by short-CGH.

The IVF-PGD cycles were performed in collaboration with the *Fundació Puigvert-Hospital de Sant Pau* and the *Clínica Eugén*, both in Barcelona, Spain. All patients signed the corresponding informed consent and the PGDs were approved by each clinic's Ethics Committee.

Cytogenetic work-up

All translocations were confirmed through karyotyping by G-banded metaphase chromosome analysis of cultured peripheral blood lymphocytes from the carriers.

For the FISH analysis performed in Case F, preliminary testing of multiple probes was carried out in metaphase and interphase nuclei of peripheral blood lymphocytes from the reorganizations carrier. Subsequently, the chosen combination of probes was tested in isolated blastomeres from discarded embryos. The final combination of probes, all of them from Abbott Molecular, USA, was as follows: a locus-specific indicator (LSI) 14 (spectrum red and spectrum green) and a LSI 21 (spectrum red) were applied in a first round of FISH; a Tel 17 (spectrum red) and a CEP 17 (spectrum aqua) were used in a second round and a CEP 17 (spectrum aqua) and a CEP 2 (spectrum orange) in a third round.

IVF procedure, embryo biopsy and blastomere spreading

The six patients underwent routine superovulation procedures for the IVF cycles. On day 0 ICSI was performed to inseminate the mature oocytes retrieved and the presence of 2PN was evaluated on day+1 to assess their fertilization. On day+3, early in the morning, one blastomere was biopsied from each of the embryos that had reached the 6-8-cell stage in cases A-E. In the first IVF-PGD cycle from case F, two blastomeres were biopsied, while in the subsequent cycles only one blastomere was biopsied. Two different biopsy methods, using Tyrode's acid or laser, were used depending on the IVF center. For short-CGH analysis, each blastomere was washed in various PBS/0.1% PVA solution drops and it was put into a labeled 0.2 ml PCR tube in sterile conditions. For FISH analysis, the biopsied blastomeres were firstly washed in PBS/0.1% PVA solution and then transferred to a KCl hypotonic solution (5.592×10^{-3} g/l). Subsequently, each blastomere, with a minimal amount of medium, was placed on a slide (the four blastomeres available for FISH analysis were spread sequentially in the same slide with proper identification), where Carnoy solution (methanol:acetic acid, 3:1) was added to complete the fixation procedure. All of the process was performed under a stereomicroscope (Leica).

PGD procedure by short-CGH

For this approach, the biopsied blastomeres were the test sample, whereas single lymphocytes (46,XY) were used as reference. The protocol used was the one previously described by our group^{11,12}. Briefly, after cell lysis, single cell DNA from blastomeres and from lymphocytes were amplified by DOP-PCR, labeled by nick translation and co-hybridized to normal male (46,XY) metaphase spreads (Abbott Molecular; USA). Immediately after a 30-min exposure in a

75W microwave (Optiquick Compact, Moulinex) in humid conditions, slides were treated in a moist chamber at 37°C for 12h in rotary agitation (65 rpm/min) using a 1309-1CE rotator (Lab-line Instruments, Inc; USA). A minimum of 12 metaphases per cell-case were captured and analyzed using the Isis CGH software developed by Metasystems. The diagnostic criterion was based on the intrinsic “standard deviation” of each sample’s hybridization (with a confidence interval of three times the standard deviation). A chromosomal region was considered as being gained or lost if the average ratio profile crossed the standard deviation limit. All of the short-CGH process was carried out on day+3 and results were obtained on day+4. Therefore, embryo transfer could be performed on day+4 in the afternoon or on day+5 in the morning.

PGD procedure by FISH

The slide containing the four fixed blastomeres was firstly ethanol dehydrated (70%, 85% and 100%, 1 min in each) and then air dried. Target material and probes were co-denatured at 73°C for 5 min using a HYBrite™ (Abbott Molecular; USA) and then hybridized at 37°C in humid conditions for 14h in the first and second FISH rounds and for 2h in the third FISH round. After each round the slide was washed in 0.4X standard saline citrate (SSC) at 73°C for 2 min, 2XSSC/0.1NP40 at r.t. for 30 sec and ethanol dehydrated (70%, 85% and 100%, 1 min in each). Finally, DAPI solution (125 ng/ml) was added to visualize the nuclei under the epifluorescence microscope (Nikon eclipse 90i). FISH results were obtained between day+3 and day+4.

Analysis of discarded material from cases A, B, C and D

Available discarded material from cases A, B, C and D was also analyzed by short-CGH. When it was possible, blastomeres were disaggregated and processed separately. But, in most cases, as they were compacted or at the blastocyst stage, the entire embryos were processed after removing the *zona pellucida* using Tyrode’s acid.

Results

Ability of short-CGH to detect partial chromosome losses or gains of unbalanced discarded embryos from a 46,XX,t(2;5)(q21;q33) carrier

Embryos 2 and 4, discarded after FISH-PGD for having unbalanced chromosome complements, were analyzed by short-CGH (Table 1). In all of the six blastomeres from embryo 2, the short-CGH approach successfully detected a partial loss and gain of chromosomes 2 and 5, respectively, compatible with the 2:2 adjacent-2 segregation type and the presence of a derivative chromosome 5. These results were not in agreement with the FISH-PGD, which showed fluorescent signals in the binucleated blastomere analyzed that did not correspond to any of the theoretically expected segregation types. The short-CGH analysis of the five blastomeres from embryo 4 showed mosaicism, while FISH-PGD had detected a loss of chromosome 5, compatible with a 3:1 segregation in the fixed blastomere.

Results from the IVF-PGD cases in carriers of balanced translocations

Overall, a total of 150 cumulus oocyte complexes (COCs) were obtained from the clinical cases included in this work. Of them, 115 were at the MII oocyte stage and were inseminated by ICSI, achieving a 77.4% fertilization rate (89/115). Of the 89 zygotes, 91% (81/89) reached the 6-8-cell stage and were successfully biopsied (100%) (Table 2). Correct amplification was obtained for 76 cells, yielding a 93.8% (76/81) short-CGH diagnosis rate. Cytogenetic results from the processed blastomeres are shown in Tables 3, 4 and 5.

Case A: 45,XY,t(13;14)(q10;q10)

All of the 12 biopsied embryos presented short-CGH profiles for chromosomes involved in the reorganization that were compatible with the existence of normal or balanced chromosomes, resulting from a 2:1 alternate segregation. However, nine of the 12 biopsied embryos presented other chromosome numerical and/or structural abnormalities. Aneuploidies were found in chromosomes from groups B, C, D, E, G and sex chromosomes. Structural errors were found in chromosomes from groups A, B, C and D, affecting from part of an arm (i.e., -2p15-pter from embryo 8) to 75% of the chromosome (i.e., +7pter-q31.3 from embryo 8). An isochromosome 9 (-9p/+q) was also found in embryo 8 (Table 3).

Three embryos (25%) were diagnosed as being euploid and two of them were transferred on day+5, but no pregnancy was achieved. The third euploid embryo was cryopreserved and has not been transferred yet.

Embryos 5 and 206, which were discarded for having stopped their development at the 2-cell stage, were subsequently analyzed by short-CGH. The profiles obtained were compatible with normal or balanced chromosome complements, resulting from a 2:1 alternate segregation and without other chromosomal abnormalities.

Case B: 45,XX,t(13;14)(q10;q10)

Summarizing the results from the two IVF-PGD cycles, two of the 16 biopsied embryos presented a 2:1 adjacent segregation, while 14 showed short-CGH profiles compatible with normal or balanced chromosomes. However, 14 of the 16 embryos had other numerical and/or structural abnormalities. Aneuploidy affected chromosomes from all groups. Structural errors were found in chromosomes from groups A, C, D and F, involving from part of an arm (i.e., +15q21.3-q25 of embryos 5 and 6 from B.1) to >50% of the chromosome (i.e., -8pter-q21.3 of embryo 3 from B.1) (Table 3). While in the first IVF-PGD cycle all of the embryos had chromosomal abnormalities, in the second IVF-PGD cycle there were two embryos (embryos 2 and 9) with normal or balanced chromosomes and free from other chromosomal abnormalities. Embryo 2 was discarded for having stopped its development at the 4-cell stage, and embryo 9, which was considered to be of good quality, was transferred on day+4, achieving an ongoing pregnancy (with an initial β -HCG of 490 IU/l).

Short-CGH profiles were obtained from the discarded embryos 2, 6, 7, 8 and 10. The results of embryos 2 and 10 confirmed the short-CGH diagnosis. Embryos 6 and 7 presented some of the aneuploidies observed during the clinical case, indicating the existence of mosaicism. Finally, the reanalysis of embryo 8 showed the occurrence of a 2:1 adjacent segregation involving the gain of chromosome 14. The discordance observed in the blastomere diagnosed during the short-CGH-PGD was attributed to the presence of mosaicism, as that blastomere presented a high level of aneuploidy.

Case C: 45,XY,t(14;21)(q10;q10)

The four biopsied embryos presented short-CGH profiles compatible with normal or balanced chromosomes, resulting from a 2:1 alternate segregation. However, all of them showed aneuploidy involving chromosomes not related to the translocation (from groups A, B, C, D, G and chromosome Y) and, besides, two of them also had structural chromosome aberrations (from groups A, B, C, E and F), affecting part of an arm (i.e., +7q31.1-q36 from embryo 2) or an entire arm (i.e., -1q from embryo 4). For this reason, none of the embryos was available for transfer (Table 3).

Embryo 1, which was discarded for having stopped its development at the 2-cell stage, was subsequently analyzed by short-CGH. Its two blastomeres displayed CGH profiles compatible with normal or balanced chromosome complements, resulting from a 2:1 alternate segregation (46,XY).

The embryos discarded after the short-CGH-PGD were also reanalyzed using the same method. Embryos 2 and 3 showed mosaicism among their blastomeres and embryos 4 and 5, in which each one was processed as a whole embryo, also presented chromosomal abnormalities.

Case D: 46,XX,t(10;13) (q23.2;q22)

Summarizing the results from the two IVF-PGD cycles, seven of the 18 embryos diagnosed showed short-CGH profiles that were concordant with normal or balanced chromosomes, resulting from a 2:2 alternate segregation. The 11 remaining embryos displayed unbalanced chromosome complements (four resulting from a 2:2 adjacent-1 segregation, three resulting from a 2:2 adjacent-2 segregation and four resulting from a 3:1 segregation) (Table 4) (Figure 1).

Moreover, six out of the 18 embryos presented aneuploidies or structural chromosomal aberrations involving chromosomes not related to the rearrangement. Aneuploidies were found in chromosomes from all groups (A-G and X/Y) and structural errors were found in chromosomes from groups A and C, affecting part of an arm (i.e., +1q31.3-qter from embryo 14).

The only totally euploid embryo, which was considered to be of good quality, was transferred on day+5 in the first IVF-PGD cycle, but no pregnancy was achieved. In the second IVF-PGD cycle, three good-quality embryos were transferable; two of them were transferred on day+5 with some embryo transfer-procedure complications and no pregnancy was achieved. The third euploid-diagnosed embryo was cryopreserved and has not been transferred yet.

The reanalysis of three available embryos (embryos 5, 8 and 18), discarded by the short-CGH-PGD, confirmed the results obtained during the clinical case.

Case E: 46,XX,t(1;10)(p11;p11.2)

Of the 12 biopsied embryos, 10 produced correct DNA amplification products that yielded the following short-CGH results: seven presented unbalanced chromosome segregations for chromosomes involved in the reorganization (three resulting from a 3:1 segregation, three resulting from a 2:2 adjacent-2 segregation and one resulting from a 2:2 adjacent-1 segregation); three embryos displayed short-CGH profiles compatible with normal or balanced translocation segregation, but only one of them (embryo 5) was free from other chromosome errors (Table 4).

Apart from chromosome errors related to the reorganization segregation, three embryos presented other aneuploidies, involving chromosomes from groups B, G and X/Y, and three embryos presented structural errors in chromosomes from groups A, B, C and X/Y, affecting part of an arm (i.e., +12cen-q21.1 from embryo 12) or an entire arm (-Xq from embryo 7).

Embryo 5 was transferred on day+5, although morphological characteristics were not optimal (being at the morula stage with fragmentation). At the time of writing, the β -HCG results were not yet available.

Case F: 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10)

In the first IVF-PGD cycle, both short-CGH and FISH approaches were performed to ensure the complete detection of imbalances involving the 17q fragment (~ 25Mb) from derivative chromosomes 2 and 17. However, as short-CGH was capable of detecting those imbalances, the second and third IVF-PGD cycles were performed using only the short-CGH approach.

Globally, the most frequent segregation type for the t(2;17) was the 2:2 alternate (7 of 15 embryos), followed by 3:1 (4 of 15 embryos), 2:2 adjacent-1 (3 of 15 embryos) and, finally, by the 2:2 adjacent-2 (1 of 15 embryos). For the t(14;21), the 2:1 alternate segregation was more often found (10 of 16 embryos) than the 2:1 adjacent one (6 of 16 embryos) (Table 5).

Additionally, 10 embryos presented aneuploidies affecting chromosomes from all groups except D, and four of them also had structural errors consisting of a gain/loss of an entire arm of chromosomes from groups C, E or F.

Taking into account the two translocations together, from the 16 embryos diagnosed, four displayed CGH profiles compatible with normal or balanced chromosomes involved in both reorganizations. However, three of them presented aneuploidies affecting other chromosomes. Only embryo 5 from the third IVF-PGD cycle was completely euploid; this was transferred on day+4, as it was considered to be of good quality, and pregnancy was achieved (with an initial β -HCG of 900 IU/l).

Discussion

Methodological considerations

This work demonstrates, with specific examples, that short-CGH is a valuable approach for PGD of Robertsonian and reciprocal translocations. This methodology has many advantages compared to the current FISH strategies, especially in reciprocal translocations. Firstly, with short-CGH, there is no cytogenetic work-up for the detection of all translocation meiotic segregation modes, as this is capable of detecting partial chromosome gains/losses, provided that the translocated fragments are larger than its resolution limit (10-20 Mb). Moreover, while a FISH probes set is usually specific for a particular reciprocal translocation, the same CGH method can be applied to any different reciprocal translocation. Secondly, it has been suggested that concurrent diagnosis of chromosome segregation and aneuploidy may improve the pregnancy rate of the selected embryos^{13,10}. With short-CGH, the full karyotype can be ascertained simultaneously to translocation diagnosis in a single approach while, using FISH, various rounds of hybridization must be performed to analyze a limited number of the other chromosomes, with the inherent risk of nuclei deterioration. Furthermore, the short-CGH technique does not require nucleus fixation, avoiding possible material losses due to the spreading process. Finally, another advantage of short-CGH is that it allows the analysis of the entire length of chromosomes, adding robustness to the diagnosis, as compared with FISH, which only tests one single locus/region.

Ability of short-CGH to detect partial chromosomal abnormalities

Previous to its clinical application, the ability of short-CGH to detect partial chromosome errors was proved by analyzing two FISH-PGD discarded embryos from a 46,XX,t(2;5)(q21;q33) carrier. This procedure successfully identified chromosome imbalances of ~100 Mb resulting from a 2:2 adjacent-2 segregation in all of the blastomeres from embryo 2. The discordance between short-CGH and FISH results could be due to the fact that the fixed blastomere was binucleate. In embryo 4, mosaicism and both numerical and structural chromosomal abnormalities were detected, perhaps accounting for the discordance between short-CGH and FISH results.

Although the ability of short-CGH to detect ~100 Mb chromosome imbalances was seen, in the first IVF-PGD cycle for the 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10) carrier, the FISH procedure was also applied, owing to the small size of the translocated telomeric 17q fragment (~25 Mb). Nevertheless, the short-CGH results showed that even this ~25-Mb fragment was

appreciable. Therefore, the FISH procedure was not used in the subsequent IVF-PGD cycles, thus avoiding the two-cell biopsy for the diagnosis of each embryo.

Translocation segregation proportions

In the group of Robertsonian translocations (cases A, B, C and the Robertsonian translocation from case F), the most frequent segregation type was the 2:1 alternate, as overall 43 out of the 51 embryos analyzed (84.3%) presented this mode, while eight embryos (15.7%) (two from case B and six from case F) showed a 2:1 adjacent segregation. In fact, this is in agreement with the results obtained in studies on meiotic segregation in male Robertsonian translocation carriers, where the frequency of the alternate segregation type varied from 60% to 96.6%, for the adjacent it was 2.7-36.6% and for the 3:1 it was 0.08-8.97%². A possible explanation for this phenomenon could be the proposed intervention of meiotic checkpoints, which would eliminate aberrant germ cells by apoptosis, causing a reduction of spermatogenesis¹⁴. This is seen in the male Robertsonian translocation carriers of this work (cases A, C and F), which presented oligoasthenozoospermia. Moreover, in populations of infertile males 0.8% were carriers of a Robertsonian translocation³, while in the general population this is up to nine times lower. In females, checkpoints have been described to be less stringent¹⁵, and this could be the reason why, excluding the double-translocation male carrier (case F), the two embryos with a 2:1 adjacent segregation were diagnosed in both IVF-PGD cycles from case B, in which the carrier of the Robertsonian translocation was the female partner.

As for reciprocal translocations (cases D, E and the reciprocal translocation from case F), it is known that the frequency of the different types of segregation depends on the specific translocation itself¹⁶⁻¹⁸. In case D, 38.9% of the embryos presented a 2:2 alternate segregation, while 61.2% showed unbalanced segregations, the 2:2 adjacent-1 and the 3:1 being the most frequent types (22.2% and 22.2%, respectively), followed by the 2:2 adjacent-2 (16.7%). In case E, 30% of the embryos were normal or balanced for the reciprocal translocation, while 70% were unbalanced. The 2:2 alternate (30%), 2:2 adjacent-2 (30%) and 3:1 (30%) types were equally represented, while the 2:2 adjacent-1 type presented a lower frequency (10%). The reciprocal translocation from case F showed the following pattern: the most frequent segregation type was the 2:2 alternate (46.7% of the embryos), followed by 3:1 (26.7%), 2:2 adjacent-1 (20%) and 2:2 adjacent-2 (6.7%). It has been described that the frequency of the alternate segregation type ranges from 20% to 50% and is similar in male and female carriers¹⁹. However, the frequency of 3:1 and 2:2 adjacent-2 may be different between the genders^{20,21}. In case D, the translocation carrier was the female partner and the 3:1 and 2:2 adjacent-1 segregations were more frequently

found than the 2:2 adjacent-2 segregation, which is in agreement with previous reports^{20,18}. However, in case E, where the translocation carrier was also the female partner, the 2:2 adjacent-1 segregation was less frequent than the 3:1 and 2:2 adjacent-2 segregations. In case F, where the translocation carrier was the male partner, the 3:1 segregation was also more frequently found than the 2:2 adjacent-1, which is not in agreement with the predominance of 2:2 adjacent-1 segregations found for male translocation carriers in the study of Lledó *et al.*, 2010.

Evaluating the two translocations from case F together, the theoretical probability of producing normal or balanced gametes is very low, as only 1/32 gametes would be free from unbalanced segregations for both reciprocal translocation (4/32 gametes would be normal or balanced) and Robertsonian translocation (4/16 gametes would be normal or balanced). Interestingly, four out of the 16 (25%) embryos analyzed during the three IVF-PGD cycles were normal or balanced for the two translocations, although only one of them (embryo 5 from the third IVF-PGD cycle) was free from other chromosome errors. This embryo was transferred, producing an ongoing pregnancy (now being in the first trimester).

Abnormalities in chromosomes non-related to the translocations

Apart from chromosome errors directly related to the meiotic translocations segregations, abnormalities in other chromosomes were also observed. In Robertsonian translocation cases (A, B and C), 26 out of the 35 embryos analyzed (74.3%) presented aneuploidies from all chromosome groups, groups E and G being the most affected, and followed by groups C, X/Y, D and F, B and, finally, by group A. This high proportion of chromosomal abnormalities could be explained by the hypothesized interchromosomal effect (ICE)^{7,8}. The influence of the open trivalent figure has been suggested as being responsible for this ICE, as this could generate instability in the rest of the bivalents²², causing the observed multiple aneuploidies. In case B, however, the advanced maternal age of the female carrier (40-41 years) could also be responsible for the high incidence of aneuploidy among the analyzed embryos.

On the other hand, seven of the 28 embryos analyzed (25%) from the reciprocal translocation cases (D and E) showed aneuploidy also affecting all chromosome groups, being predominantly found in group X/Y, followed by group C, by groups A, B, D, G and, finally, by E and F.

Although there are few cases in this work, the aneuploidy rate found for reciprocal translocations is lower than that of Robertsonian translocations, and this could be explained by the chromosomes' behaviour during meiosis I. The quadrivalent formed in reciprocal translocations could be more stable than the trivalent formed in Robertsonian translocations, as a complete

pairing of all chromosome regions is achieved in most cases. Therefore, the influence of this figure in the segregation of the other chromosomes could be lower.

Aneuploidy has also been observed in 10 of the 16 embryos (62.5%) from case F (cycles 1, 2 and 3). The presence of the trivalent figure or both trivalent and quadrivalent figures could be responsible for the production of those chromosome errors.

Either way, the existence of ICE is controversial. While some studies give support to this phenomenon in Robertsonian translocations^{8,23,24}, as well as in reciprocal translocations²⁵⁻²⁷, others have not detected its presence²⁸⁻³¹. Moreover, other authors suggest that the aneuploidy found in translocation carriers is more possibly due to the presence of abnormal spermiograms than to the translocation influence^{32,33}. Our study suggests that ICE could be more related to Robertsonian translocations than to reciprocal translocations, while the proportion of imbalances resulting from the translocation's segregations could be higher in reciprocal translocations than in Robertsonian translocations, as was introduced before⁸.

Apart from aneuploidies, structural chromosome errors have also been observed in Robertsonian translocations (found in 16 of the 35 embryos analyzed; 45.7%), reciprocal translocations (5/28; 17.9%) and the double translocation (4/16; 25%) cases. These were found for all chromosome groups except G, affecting from part of an arm to ~75% of the chromosome.

Actually, the existence of structural errors was observed in our two previous reports using short-CGH for the analysis of blastomeres from day+3 embryos^{11,12}, as well as in other studies using conventional CGH, CGH-array or SNP-array on cleavage-stage embryos³⁴⁻³⁷. It is important to point out that in previous CGH studies on 1CP and/or MII oocytes, the presence of structural errors had not been found³⁸⁻⁴⁰, or had been found in a very low proportion⁴¹, suggesting this is a phenomenon mostly associated with cleavage-stage embryos. Thus, it could be argued that partial chromosome gains/losses preferentially have a paternal origin, with some evidence of the existence of *de novo* structural errors in spermatozoa^{42,43}, or that these are a result of the chromosomal instability inherent to the cleavage stage of embryos³⁷.

Clinical considerations about short-CGH

In this work, we demonstrate that the full-karyotype screening through short-CGH is a valuable alternative to FISH for PGD of translocations. Evaluating all Robertsonian translocation cases (A, B.1, B.2 and C) together, 30 of the 32 embryos analyzed (93.8%) showed a 2:1 alternate segregation, but only five of them (5/30; 16.7%) were diagnosed as being totally euploid by short-CGH. Of the 25 remaining embryos, 13 were discarded due to the presence of aneuploidies, one for having a partial chromosome aberration and 11 for the presence of both

numerical and structural chromosomal abnormalities. Conversely, if the PGD had been carried out by FISH with specific probes for chromosomes involved in the rearrangement, 25 embryos would have been incorrectly diagnosed as transferable (25/32; 78.1%). But, if apart from chromosomes involved in the translocation, chromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y had also been analyzed by FISH, the number of embryos incorrectly diagnosed as transferable would have decreased to three (3/32; 9.4%). As for reciprocal translocation cases (D.1, D.2 and E), 10 of the 28 embryos analyzed (35.7%) showed a 2:2 alternate segregation, but only five of them (5/10; 50%) were diagnosed as being totally euploid by short-CGH. Of the five remaining embryos, four were discarded for having aneuploidies and one due to the presence of a partial chromosome aberration. In these cases, the current strategy used in PGD, that is, FISH with specific probes for chromosomes involved in the reorganization, would have been incorrectly diagnosed four of the 28 embryos (14.3%) as transferable. Finally, considering the three IVF-PGD cycles for the double-translocation carrier (cases F.1, F.2 and F.3) together, four of the 16 embryos analyzed (25%) showed alternate segregation for both reciprocal and Robertsonian translocations, but only one was completely euploid. Using FISH with specific probes for chromosomes involved in the reorganizations, three of the 16 embryos (18.8%) would have been incorrectly diagnosed as transferable.

These data point out that short-CGH is more accurate than FISH for PGD of translocations, especially for Robertsonian translocation carriers, in which the presence of aneuploidies and structural errors is very high.

Moreover, the short-CGH variant ¹¹ applied in the 10 IVF-PGD cycles permits specialists to obtain the diagnosis during the IVF cycle, avoiding the cryopreservation step required when conventional CGH is carried out. The short-CGH process starts on day+3, early in the morning, with the embryo biopsies. Cell lysis, amplification, labeling of probes and precipitation are performed on the same day+3 and hybridization takes place during the night for 12 hours. On day+4 results are obtained and the transfer of fresh, selected embryos can be realized on day+4 in the afternoon or on day+5. Removing the cryopreservation step from the IVF cycle may decrease the time necessary to achieve pregnancy and even increase the implantation rate of euploid-diagnosed embryos.

In this work, the short-CGH-PGD achieved a pregnancy in an extremely challenging case, which is the couple with a carrier of two different translocations (case F). To our knowledge, this is the first time that a pregnancy has been obtained from a carrier of such a complex reorganization.

Also, a pregnancy was achieved in case B.2, with a 41-year-old female carrier of a t(13;14). At the time of writing, β -HCG results for the transferred embryo of case E were not yet available.

As for the remaining IVF-PGD cycles that reached embryo transfer but without achieving pregnancy, it is known that other multiple factors, including morphological embryo quality, endometrial receptivity or the embryo transfer procedure, contribute to pregnancy achievement⁴⁴. But applying a comprehensive screening method for the PGD of translocations may overcome one of the pitfalls of PGD using FISH, which is the transfer of embryos containing errors in chromosomes not analyzed that may impede their implantation.

The recent emergence of CGH-array^{45,46,36} shows a new way for PGD, including its application to translocation cases, as it provides a high-resolution molecular cytogenetic analysis. Notwithstanding, some technical improvement is still required and nowadays the cost of the reagents and the equipment needed greatly exceeds that of standard CGH⁴⁷.

In conclusion, short-CGH is a valuable approach for the PGD of Robertsonian and reciprocal translocations, as this allows the detection of chromosome imbalances related to translocations and full-karyotype screening in a single process. Moreover, this short-CGH variant avoids the cryopreservation of biopsied embryos. Clinical trials with a large number of cases should now be carried out to confirm the hypothesis stated here, which suggests that comprehensive chromosomal screening through short-CGH may improve the implantation rate in PGD of Robertsonian and reciprocal translocation carriers.

Acknowledgements: The authors would like to thank Josep Obradors, PhD., Ricard Vidal, PhD., and Ana Polo, MD., gynaecologists who informed the families about our comprehensive PGD by short-CGH, Mercè Durban, PhD., and M José Zamora, MsC., embryologists who worked in some of the cases included in this work and Javier del Rey, PhD., and Magda Giralt, PhD., research support technicians who helped us in the image capturing process and the CGH analysis of the cases included in this work.

Funding: FIS-ISCIII (PI 080012), *Grup de Suport a la Recerca, Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107) and *Càtedra de Recerca Eugin-UAB* funded this study. The first author has a predoctoral grant from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (AP2006-02211).

Tables and figures

Table 1. Short-CGH results of discarded material from a FISH-PGD for a 46,XX,t(2;5)(q21;q33) carrier

Short-CGH results					FISH results		
Bl	Segregation	Other aneuploidies	Other structural errors	Sex_c	LSI 2 (p24)	LSI 5 (p15)	Tel 5q
2.0*	?	-	-	-	0	4	3
2.1-2.6	2:2 adjacent-2 (der 5)			XY			
4.0	3:1	-	-	-	2	1	1
4.1-4.2	2:2 alternate	-X/Y,-6,-22		X0			
4.3	2:2 alternate	-2,+13,+14,-18		XY			
4.4	2:2 alternate		+9q	XY			
4.5	2:2 alternate	-X/Y,+13		X0			

Bl= blastomere

Sex_c= sex chromosomes

* This blastomere had two nuclei analyzed by FISH.

Table 2. Global data from the 10 IVF/ Short-CGH-PGD cycles

Patient	Karyotype	M_age	Seminal characteristics	COCs	MII	Fert	Biop	Diag
A	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	32	oligoasthenozoospermia	12+12	7+10	5+9	4+8	12
B.1	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	40	normozoospermia	13	13	11	8	8
B.2		41		10	9	8	8	8
C	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	34	oligoasthenozoospermia	6	5	5	4	4
D.1	46XX, t(10;13) (q23.2;q22)	29	normozoospermia	13	9	7	6	6
D.2				19	19	13	13	12
E	46,XX,t(1;10)(p11-p11.2)	30	asthenozoospermia	31	14	12	12	10
F.1	46XY, t(2;17)(q14.2;q23) / t(14;21)(q10;q10)	32	oligoasthenozoospermia	10	9	4	4	4
F.2		33		13	11	9	8	6
F.3		34		11	9	6	6	6

M_age= maternal age

COCs= cumulus oocyte complexes

MII= mature oocytes at meiosis II stage

Fert= fertilized

Biop= biopsied

Diag= diagnosed

Table 3. Short-CGH-PGD results from Robertsonian translocation carriers

Patient	E.bl	Segregation	Other aneuploidies	Other structural errors	Sex_c	T	F	P
A t(13;14)(XY)	1	alternate		+1q	XX			
	2	alternate	+8		XX			
	3	alternate			XX	Yes		No
	4	alternate			XX		Yes	
	6	alternate			XY	Yes		No
	7	alternate	-21		XY			
	8	alternate	-21	+1q,+2pter-p15,-3q,-4p, -6p,+7pter-q31.3,-9p/+q, -10q,-11p11.2-qter, -12q22-qter,+16q	XX			
	10	alternate	-18		XX			
	201	alternate	-22	-18p	XX			
	202	alternate	+X/Y, -15	+8q13-q23	XXY			
	204	alternate	+4,+8,-22		XX			
	207	alternate	+X/Y,+4,-7,-16,-17,-18		XXY			
Discarded E	5	alternate			XX			
	206	alternate			XY			
B.1 t(13;14)(XX)	1	alternate	+17,+19,-21	+15q21.1-q24	XY			
	2	alternate	+X/Y,+4,+16,+19		XXY			
	3	adjacent (+13)	+17,+19,-22	+2pter-p16,-8pter-q21.1, +15q23-qter	XX			
	5	alternate	+17,+19,-22	+15q21.3-q25	XY			
	6	alternate	+17,+19,-22	+15q21.3-q25	XY			
	9	alternate	+15		XX			
	11	alternate	-15		XX			
	13	alternate	-16,+17,-21	+19p,-20p	XY			
B.2	2	alternate			XX	No*		
	4	alternate	+18	-7p	XY			
	5	alternate	-X/Y,-20		X0			
	6	alternate	+X/Y,-9,+18,-21		XXY			
	7	alternate	+8,+15,+20		XX			
	8	adjacent (+13/-14)	-X/Y,+4,-7,-11,-12, (+13/-14),-21	+6q,+8q	X0			
	9	alternate			XY	Yes		
	10	alternate	-X/Y,+2,+15,-18	+9p	X0			
Discarded E	2.1	alternate			XX			
	5	ND						
	6	alternate	-9,+18,-21		XY			
	7	alternate	+15		XX			
	8	adjacent (+14)	-11,+19		XX			
	10	alternate	-X/Y,+2,+15,-18		X0			
C t(14;21)(XY)	2	alternate	+Y,+5,-8,+11,+13,-22	-3q,+4q,+7q31.1-q36,- 10q,+12q,-17p,+18q,+20q	XXY			
	3	alternate	-22		XY			
	4	alternate	+Y,-22	-1q	XXY			
	5	alternate	+2		XX			
Discarded E	1.1	alternate			XY			
	1.2	alternate			XY			
	2.1	alternate	-X,-3,-8,-10,+11,+12, +13,-15,+18	+1q,+4q,-5p/+5q,+6q12 -q24,-17p,-20p	Y0			

2.2	alternate	+X/Y,-1,+3,-5,+6,+7, +9,-13,+15,+18	-2pter-q21.3,+4q,-17q	XXY
3.1	?	-14	+1p,-7p,+16q	XY
3.2	alternate			XY
4	alternate	-1,+2,+5,-7,-8		XY
5	alternate	+17	-1q,+16p,+19p	XX

E= Embryo; E.bl= Embryo.blastomere; Sex_c= sex chromosomes; T= Transferred; F= Frozen; P= Pregnancy

* Embryo 2 from case B.2 was discarded for having stopped its development at the 4-cell stage.

Table 4. Short-CGH-PGD results from reciprocal translocation carriers

Patient	E	Segregation	Other aneuploidies	Other structural errors	Sex_c	T	F	P
D.1 t(10;13)(XX)	1	2:2 adjacent-1 (der13)			XY			
	2	2:2 adjacent-2 (der13)			XY			
	3	2:2 alternate			XX	Yes		No
	4	2:2 alternate		-10qtel	XY			
	6	3:1 (-13)	+X/Y,+1,+3,-5,+6,+7, +12,-14,+15,+18,-20		XXY			
	8	3:1 (-13)			XY			
D.2	2	2:2 alternate			XY		Yes	
	3	2:2 alternate			XY	Yes		No
	4	2:2 alternate			XX	Yes		No
	5	2:2 adjacent-1 (der13)			XX			
	7	3:1 (-10)			XY			
	8	2:2 adjacent-1 (der10)			XX			
	9	2:2 alternate	-X/Y		X0			
	10	2:2 alternate	-22		XY			
	12	ND						
	14	3:1 (+10)		+1q31.3-qter	XX			
	16	2:2 adjacent-2 (der13)			XY			
	17	2:2 adjacent-1 (der13)	-X/Y		X0			
Discarded E	18	2:2 adjacent-2 (der10)			XX			
	5	2:2 adjacent-1 (der13)			XX			
	8	2:2 adjacent-1 (der10)			XX			
E t(1;10) (XX)	18	2:2 adjacent-2 (der10)			XX			
	1	ND						
	2	alternate	-X/Y		X0			
	3	ND						
	4	2:2 adjacent-2 (der10)		-3p	XY			
	5	alternate			XX	Yes		?
	6	3:1 (-10)			XY			
	7	3:1 (der10,1,10)		-Xq	XX			
	9	3:1 (der1)			XY			
	10	2:2 adjacent-2 (der1)	-X/Y		X0			
	11	2:2 adjacent-1 (der1)			XY			
	12	2:2 adjacent-2 (der10)		+4q,+12cen-q21.1	XY			
	13	alternate	+4,-22		XX			

E= Embryo; Sex_c= sex chromosomes; T= Transferred; F= Frozen; P= Pregnancy; ND= non-diagnosed

Table 5. Short-CGH-PGD results from the 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q11;q11) carrier

Case	E	Segregation		FISH results	Short-CGH results					T	P
		t(2;17)	t(14;21)		T_im	Aneuploidies	Structural errors	Sex chr			
F.1	3	2:2 adjacent-1	alternate	no blastomere	der2	-16			XY		
	4	discordant	adjacent	2,der2;17, 2x14,21	-21				XX		
	7	2:2 adjacent-1	alternate	2x2,17, der17; 2x(14,21)	der17				XX		
	8	3:1	alternate	14,17,21*	-2	-7,-10,-16	+12q		XX		
F.2	1	2:2 alternate	alternate			+19			XX		
	3	ND	ND		ND						
	4	2:2 alternate	adjacent		-21				XY		
	5	3:1	alternate		+2	-X/Y,+6,-8,-9, +16,+18,+20,+22			X0		
	7	ND	ND		ND						
	8	3:1	adjacent		+14,+17	+1,+15,+19			XY		
	9	3:1	adjacent		+17,-21				XX		
	10	2:2 alternate	adjacent		+21	+X/Y			XXY		
F.3	1	2:2 adjacent-1	alternate		der 17	-9	+19q		XY		
	2	2:2 alternate	adjacent		-21				XX		
	3	2:2 alternate	alternate			-18			XX		
	5	2:2 alternate	alternate						XX	Yes	Yes
	6	2:2 alternate	alternate			-X/Y ,-20	-9q, +16q		X0		
	7	2:2 adjacent-2	alternate			-X/Y,-16,-20	+6p,-8p, -18p		X0		

* The spread material consisted of three chromatin fragments.

E= Embryo; T_im= imbalances related to the translocation; Sex chr = sex chromosomes; T= transferred; P= pregnancy; ND= non-diagnosed.

Figure and footnote

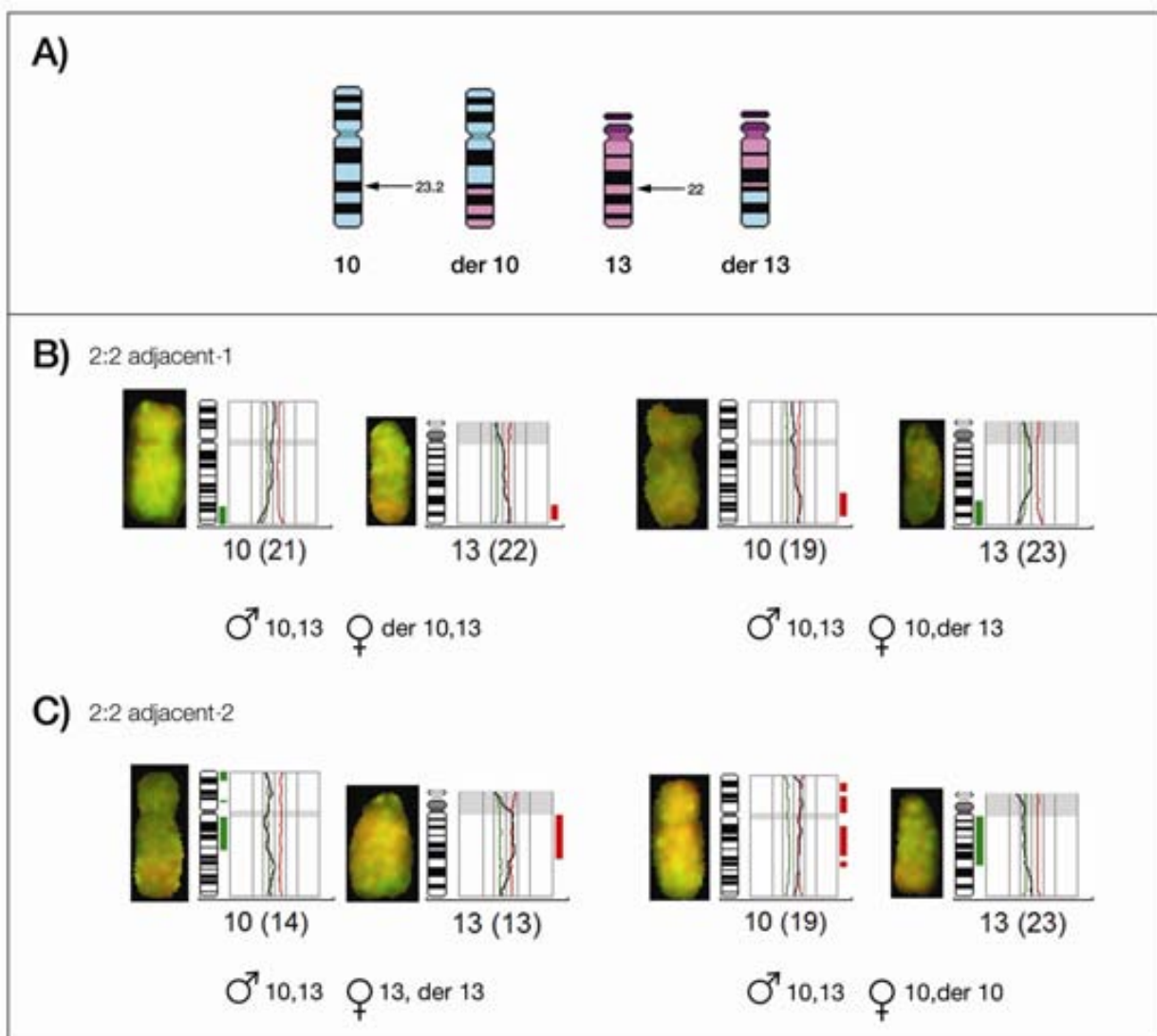


Figure 1. Structural errors of chromosomes involved in the t(10;13)(q23.2;q22) detected by the short-CGH-PGD.

a) Ideograms showing the breakpoints of chromosomes 10 and 13 from the 46,XX,t(10;13)(q23.2;q22) carrier and the derivative chromosomes produced.

b) Products of a 2:2 adjacent-1 chromosome segregation. Left: CGH-profiles showing partial loss/gain of chromosomes 10 and 13, respectively, compatible with the presence of the derivative chromosome 10 and the normal chromosome 13 in embryo 8 from case D.2. Right: CGH-profiles showing partial gain/loss of chromosomes 10 and 13, respectively, compatible with the presence of the derivative chromosome 13 and the normal chromosome 10 in embryo 5 from case D.2. **c)** Products of a 2:2 adjacent-2 chromosome segregation. Left: CGH-profiles showing partial loss/gain of chromosomes 10 and 13, respectively, compatible with the presence of the derivative chromosome 13 and the normal chromosome 13 in embryo 2 from case D.1. Right: CGH-profiles showing partial gain/loss of chromosomes 10 and 13, respectively, compatible with the presence of the derivative chromosome 10 and the normal chromosome 10 in embryo 18 from case D.2.

References

1. Nielsen, J. and Wohler, M. (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet.* 87, 81-83.
2. Roux, C., Tripogney, C., Morel, F., Joanne, C., Fellmann, F., Clavequin, M. C. and Bresson, J. L. (2005). Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res.* 111, 291-296.
3. De Braekeleer, M. and Dao, T. N. (1991). Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 6, 245-250.
4. Scriven, P. N., Handyside, A. H. and Ogilvie, C. M. (1998). Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 18, 1437-1449.
5. Benet, J., Oliver-Bonet, M., Cifuentes, P., Templado, C. and Navarro, J. (2005). Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* 111, 281-290.
6. Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Traeger-Synodinos, J., Van Rij, M. and Harper, J. C. (2009). ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod.* 24, 1786-1810.
7. Lejeune, J. (1963). Autosomal Disorders. *Pediatrics.* 32, 326-337.
8. Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Munne, S., Balicchia, B., Escudero, T. and Crippa, A. (2002). Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod.* 17, 3201-3207.
9. Pujol, A., Durban, M., Benet, J., Boiso, I., Calafell, J. M., Egozcue, J. and Navarro, J. (2003). Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction.* 126, 701-711.
10. Pujol, A., Benet, J., Staessen, C., Van Assche, E., Campillo, M., Egozcue, J. and Navarro, J. (2006). The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduction.* 131, 1025-1035.
11. Rius, M., Obradors, A., Daina, G., Cuzzi, J., Marques, L., Calderon, G., Velilla, E., Martinez-Passarell, O., Oliver-Bonet, M., Benet, J., *et al.* (2010a). Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod.* 25, 1824-1835.

12. Rius, M., Daina, G., Obradors, A., Ramos, L., Velilla, E., Fernandez, S., Martinez-Passarell, O., Benet, J. and Navarro, J. (2010b). Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*. [Epub ahead of print].
13. Kuliev, A. and Verlinsky, Y. (2002). Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*. 5, 294-299.
14. Roeder, G. S. and Bailis, J. M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet*. 16, 395-403.
15. LeMaire-Adkins, R., Radke, K. and Hunt, P. A. (1997). Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol*. 139, 1611-1619.
16. Martin, R. H. and Hulten, M. (1993). Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. *Hereditas*. 118, 165-175.
17. Escudero, T., Abdelhadi, I., Sandalinas, M. and Munne, S. (2003). Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril*. 79 Suppl 3, 1528-1534.
18. Lledo, B., Ortiz, J. A., Morales, R., Ten, J., de la Fuente, P. E., Garcia-Ochoa, C. and Bernabeu, R. (2010). The paternal effect of chromosome translocation carriers observed from meiotic segregation in embryos. *Hum Reprod*. 25, 1843-1848.
19. Munne, S. (2005). Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. *Cytogenet Genome Res*. 111, 305-309.
20. Mackie Ogilvie, C. and Scriven, P. N. (2002). Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *Eur J Hum Genet*. 10, 801-806.
21. Lim, C. K., Cho, J. W., Song, I. O., Kang, I. S., Yoon, Y. D. and Jun, J. H. (2008). Estimation of chromosomal imbalances in preimplantation embryos from preimplantation genetic diagnosis cycles of reciprocal translocations with or without acrocentric chromosomes. *Fertil Steril*. 90, 2144-2151.
22. Navarro, J., Vidal, F., Benet, J., Templado, C., Marina, S. and Egozcue, J. (1991). XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod*. 6, 376-381.
23. Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. and Vidal, F. (2004). Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod*. 19, 1345-1351.

24. Anton, E., Blanco, J. and Vidal, F. (2010). Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *J Hum Genet.* 55, 541-545.
25. Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Carrera, M., Egozcue, J. and Benet, J. (2002). Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod.* 8, 958-963.
26. Rives, N., Jarnot, M., Mousset-Simeon, N., Joly, G. and Mace, B. (2003). Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet.* 48, 535-540.
27. Anton, E., Vidal, F., Egozcue, J. and Blanco, J. (2004). Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online.* 9, 637-644.
28. Martini, E., von Bergh, A. R., Coonen, E., de Die-Smulders, C. E., Hopman, A. H., Ramaekers, F. C. and Geraedts, J. P. (1998). Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet.* 102, 157-165.
29. Estop, A. M., Cieply, K., Munne, S., Surti, U., Wakim, A. and Feingold, E. (2000). Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet.* 106, 517-524.
30. Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Codina-Pascual, M., Abad, C., Guitart, M., Egozcue, J. and Benet, J. (2004). From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod.* 19, 2515-2522.
31. Munne, S., Escudero, T., Fischer, J., Chen, S., Hill, J., Stelling, J. R. and Estop, A. (2005c). Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online.* 10, 363-369.
32. Pellestor, F., Imbert, I., Andreo, B. and Lefort, G. (2001). Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod.* 16, 1155-1164.
33. Douet-Guilbert, N., Bris, M. J., Amice, V., Marchetti, C., Delobel, B., Amice, J., Braekeleer, M. D. and Morel, F. (2005). Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl.* 28, 372-379.

34. 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.
35. Voullaire, L., Slater, H., Williamson, R. and Wilton, L. (2000). Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet.* 106, 210-217.
36. 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.
37. Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., *et al.* (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med.* 15, 577-583.
38. Gutierrez-Mateo, C., Wells, D., Benet, J., Sanchez-Garcia, J. F., Bermudez, M. G., Belil, I., Egozcue, J., Munne, S. and Navarro, J. (2004a). Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod.* 19, 2118-2125.
39. Gutierrez-Mateo, C., Benet, J., Wells, D., Colls, P., Bermudez, M. G., Sanchez-Garcia, J. F., Egozcue, J., Navarro, J. and Munne, S. (2004b). Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod.* 19, 2859-2868.
40. Obradors, A., Rius, M., Cuzzi, J., Daina, G., Gutierrez-Mateo, C., Pujol, A., Marina, F., Marquez, C., Benet, J. and Navarro, J. (2010). Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril.* 93, 675-679.
41. Fragouli, E., Katz-Jaffe, M., Alfarawati, S., Stevens, J., Colls, P., Goodall, N. N., Tormasi, S., Gutierrez-Mateo, C., Prates, R., Schoolcraft, W. B., *et al.* (2009). Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril.* 94, 875-887.
42. Estop, A. M., Marquez, C., Munne, S., Navarro, J., Cieply, K., Van Kirk, V., Martorell, M. R., Benet, J. and Templado, C. (1995). An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet.* 56, 452-460.
43. Templado, C., Bosch, M. and Benet, J. (2005). Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res.* 111, 199-205.

44. Donoso, P., Staessen, C., Fauser, B. C. and Devroey, P. (2007). Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum Reprod Update*. 13, 15-25.
45. 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.
46. 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.
47. Harper, J. C. and Harton, G. (2010). The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril*. 94, 1173-1177.

Discussió

5. Discussió

5.1. Posada a punt de la CGH ràpida en fibroblasts aïllats de línies cel·lulars amb alteracions cromosòmiques conegudes

S'ha desenvolupat una variant de la metodologia de CGH, basada en el protocol descrit per (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a), però amb modificacions que han permès escurçar el període d'hibridació de 40-72 hores a 12 hores.

Durant la posada a punt, s'ha provat d'escurçar cadascun dels passos del procés, introduint, finalment, només aquells canvis que han permès reduir la durada global del protocol i, alhora, mantenir la qualitat del marcatge necessària per obtenir perfils de CGH fiables.

Emprant aquesta variant, la CGH ràpida, s'han detectat, amb un 100% d'èxit, totes les aneuploidies específiques i conegudes de les línies comercials dels 30 fibroblasts analitzats. A més, s'ha constatat que el procediment desenvolupat no genera falsos positius, de manera que s'observen exclusivament les alteracions realment presents i no d'altres.

El primer canvi introduït ha estat en el pas de l'amplificació del genoma cel·lular. En el cas dels fibroblasts aïllats, la DOP-PCR s'ha aconseguit escurçar de 5 hores a 3 hores i 40 minuts, principalment reduint el nombre de cicles de la PCR. Malgrat aquesta reducció, el producte de DNA amplificat és, tal i com s'evidencia en les pinzellades de fragments de DNA visualitzades en el gel d'agarosa, similar al que s'obté amb el protocol estàndard de 5 hores de durada.

Tot i així, els canvis realment claus per poder escurçar el temps del protocol s'han fet en el pas de la hibridació competitiva dels DNAs: el tractament de les preparacions en el microones a 75W durant 30 minuts i, sobretot, l'agitació rotatòria durant tot el període d'hibridació, que es redueix fins a 12 hores. En aquest sentit, el moviment rotatori permet una difusió més eficaç dels fragments de DNA de la sonda sobre les seqüències complementàries de la cromatina desnaturalitzada de les metafases de limfòcits, fet que afavoreix el procés d'hibridació i fa que el marcatge fluorescent sigui, tot i la reducció del temps de la hibridació, molt uniforme (article nº 1). De fet, l'agitació del portaobjectes durant el període d'hibridació ja s'havia utilitzat prèviament per escurçar la durada de la CGH (Landwehr *et al.*, 2008), emprant un protocol de detecció indirecte diferent del descrit en el present treball. A més, el tractament de microones també s'havia aplicat àmpliament a diferents tipus de mostres, en les quals s'aconseguien

reaccions de FISH més ràpides i amb un augment de la sensibilitat i especificitat dels senyals (Multani *et al.*, 1996; Bahce *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2003a; Weise *et al.*, 2005; Kitayama *et al.*, 2006).

Per avaluar la qualitat de les hibridacions, s'ha considerat com indicador de bona qualitat la determinació del gènere masculí en les CGHs de fibroblasts aïllats de línies cel·lulars masculines (totes, excepte la línia GM03623, amb cariotip 48,XXX,+18). Emprant DNA de fibroblasts 46,XX com a control, el gènere masculí es detecta com una pèrdua del cromosoma X i un guany del cromosoma Y. Mentre que per als cromosomes autosòmics (1-22) hi ha dues còpies cromosòmiques de cadascun d'ells en cada metafase capturada, per als cromosomes sexuals només hi ha una còpia de cada (X o Y). És a dir, que capturant 12 metafases per cas, s'analitzen 24 cromosomes per cada autosoma, mentre que per als cromosomes X i Y només se n'analitzen la meitat (12 cromosomes X i 12 cromosomes Y). El fet que analitzant tan sols 12 cromosomes (en el cas dels sexuals) es detecti correctament la pèrdua de l'X i el guany de l'Y és indicatiu de la bona qualitat de la hibridació, tot i la reducció del temps d'hibridació.

En comparar la qualitat de les hibridacions obtingudes aplicant la CGH ràpida (12 hores d'hibridació) amb la de les obtingudes amb CGH convencional (72 hores d'hibridació) emprant el mateix producte de DOP-PCR, s'ha vist que en el primer cas la qualitat era similar o, en alguns casos, millor que la de les hibridacions realitzades durant 72 hores, amb perfils de CGH més ben definits. L'explicació d'aquesta observació podria trobar-se en el fet que la reducció del període d'hibridació evita unions no específiques, disminuint així el soroll de fons detectat pel programa d'anàlisi de la CGH. A més, el tractament de microones i l'agitació rotatòria durant la hibridació ajudarien a incrementar l'eficiència del procés.

5.2. La CGH ràpida per a l'anàlisi de blastòmers aïllats

5.2.1. Adaptació del protocol de CGH ràpida per a blastòmers aïllats

El protocol de CGH ràpida aplicat al cribatge d'aneuploidies en blastòmers és pràcticament el mateix que el descrit per als fibroblasts. La principal diferència ha estat que per als blastòmers aïllats s'ha hagut de mantenir la durada original de la DOP-PCR de 5 hores, ja que la reducció a 3 hores 40 minuts, vàlida per als fibroblasts, produïa una amplificació no òptima del DNA dels

blastòmers aïllats. La diferent eficiència d'amplificació s'ha atribuït al fet que es tracta de tipus cel·lulars diferents.

Un cop establert el protocol d'amplificació idoni per a blastòmers, les hibridacions obtingudes han estat de bona qualitat i han generat perfils de CGH altament discriminatoris. Fins i tot en els blastòmers, la qualitat dels resultats obtinguts amb el protocol escurçat (12 hores d'hibridació) ha estat similar o superior a l'obtinguda amb el protocol estàndard (72 hores d'hibridació), quan s'han aplicat en el mateix producte de DOP-PCR les dues variants de CGH.

Finalment, s'ha avaluat el criteri d'anàlisi dels resultats de CGH ràpida (entre els disponibles en el programa informàtic Isis de Metasystems), tant en la posada a punt de la metodologia amb fibroblasts com en l'adaptació per a blastòmers. El criteri més comunament emprat en els treballs de CGH amb 72 hores d'hibridació és el "criteri fix". Amb aquest mètode, els llindars que determinen els punts a partir dels quals hi ha guany o pèrdua cromosòmica són fixos i independents de la qualitat de la mostra. En canvi, amb el "criteri de la desviació estàndard" els límits estan determinats per un interval de confiança (del 99% en aquest treball), de manera que el sistema és més sensible a la qualitat de la hibridació. Tot i que els dos criteris han permès detectar les alteracions cromosòmiques dels fibroblasts i dels blastòmers, el "criteri de la desviació estàndard" ha permès visualitzar amb més claredat els resultats, especialment en el cas dels blastòmers. Per tant, aquest mètode s'ha establert com a criteri d'anàlisi preferent en la CGH ràpida.

5.2.2. Validació i fiabilitat de l'anàlisi de blastòmers d'embrions descartats en casos de PGS-FISH mitjançant CGH ràpida

Per avaluar la fiabilitat de l'anàlisi de la CGH ràpida, els resultats d'aquest procediment aplicat a 48 blastòmers aïllats s'han comparat amb els de la CGH de 72 hores d'hibridació i amb els de la FISH de nou sondes (FISH-9-cr). En el primer cas, els resultats han estat totalment concordants i, com ja s'ha esmentat, la qualitat de la hibridació de 12 hores ha estat similar o superior a la de 72 hores. En el segon cas, s'ha establert la concordança en tres categories: total, parcial i discordant. El 41,6% dels blastòmers analitzats presentaven concordança total entre els resultats de la CGH ràpida i els de la FISH-9-cr; tot i així, en sis casos, la CGH ràpida va permetre la detecció d'aneuploidies en cromosomes que no s'analitzen amb la FISH-9-cr. En el 22,9% del blastòmers, la concordança era parcial, ja que no totes les aneuploidies diagnosticades amb la FISH-9-cr es van corroborar amb la CGH o bé es van detectar aneuploidies en l'anàlisi de CGH

que es podien haver diagnosticat amb la FISH-9-cr. Finalment, es va observar discordança entre els resultats de la CGH ràpida i la FISH-9-cr en el 35,4% dels blastòmers, ja que cap de les aneuploïdies diagnosticades va ser corroborada amb la CGH ràpida.

Com a explicació per a aquests resultats contradictoris, a part d'un possible error de CGH ràpida produït per una amplificació preferencial de regions genòmiques de cèl·lula aïllada (fet que no s'ha observat en l'anàlisi de fibroblasts aïllats de línies cel·lulars aneuploides), es poden tenir en compte dues consideracions: l'existència de mosaïcisme i/o la d'errors de FISH. En aquest treball, cinc dels vuit embrions que tenien més d'un blastòmer analitzat eren mosaics, és a dir, es va observar més d'una línia cel·lular, euploide o aneuploide, entre els diferents blastòmers d'un mateix embrió. Això podria justificar la manca de concordança en els resultats, ja que el blastòmer diagnosticat amb la FISH-9-cr podria tenir una dotació cromosòmica diferent de la de la resta de blastòmers analitzats amb la CGH ràpida.

D'altra banda, la reanàlisi, rehibridant amb sondes de FISH telomèriques els blastòmers amb resultats discordants entre la FISH-9-cr i la CGH ràpida, va revelar que la manca de concordança havia estat deguda a errors de FISH en la primera anàlisi. De fet, s'ha descrit que factors intrínsecs de la FISH, com la superposició de cromosomes o bé la pèrdua de micronuclis durant la fixació, podrien ser els responsables del diagnòstic de falses monosomies (Munne *et al.*, 1996; Bahce *et al.*, 2000); per contra, senyals repicats o bé senyals dobles originats per fluorocroms similars, que no són bloquejats correctament pels filtres de fluorescència, podrien causar un fals diagnòstic de trisomies (Munne *et al.*, 1998). Errors de FISH d'aquest tipus han estat identificats com a responsables del diagnòstic incorrecte d'aneuploïdia que va comportar descartar els embrions nº 7 i nº 8, (article nº 1), quan, posteriorment, l'anàlisi amb CGH ràpida va revelar que eren euploides en tots els seus blastòmers. És, per tant, important valorar la fiabilitat del diagnòstic de la CGH ràpida *versus* la de la FISH-9-cr i la necessitat de precaució en el diagnòstic. De fet, la utilització de la FISH en el PGS ha estat recentment qüestionada. Alguns estudis han posat en evidència que aquest mètode no permet incrementar la taxa d'implantació en dones de menys de 36 anys (Staessen *et al.*, 2008); altres autors fins i tot han descrit que el PGS emprant la FISH en pacients d'AMA, no només no augmenta la taxa d'implantació dels embrions transferits, sinó que en causa una disminució (Staessen *et al.*, 2004; Mastenbroek *et al.*, 2007; Hardarson *et al.*, 2008).

En aquest sentit, a més, cal tenir en compte el potencial de detecció de cada tècnica. Segons els resultats obtinguts en aquest treball, si el PGS dels embrions s'hagués realitzat amb la CGH ràpida, el diagnòstic hagués estat més acurat. De fet, la FISH només pot analitzar, en el millor dels casos, 13 cromosomes dels 24 totals (1-22, X i Y), de manera que les aneuploïdies que

afecten altres cromosomes romanen sense detectar-se en més del 40% dels casos (Bielanska *et al.*, 2002). Aquesta proporció també s'ha trobat en la nostra sèrie de blastòmers descartats, en què, dels 94 esdeveniments aneuploides detectats, 41 (43,6%) corresponien a cromosomes que no s'analitzen normalment amb la FISH-9-cr.

Així doncs, el present treball ha posat de manifest que la metodologia de la CGH ràpida és altament fiable, tant en fibroblasts com en blastòmers, i permet una anàlisi cromosòmica molt més completa que la que s'obté amb la FISH-9-cr.

5.3. Estudi citogenètic complet d'embrions descartats en casos de PGS-FISH per a edat materna avançada

S'ha portat a terme l'anàlisi citogenètica amb CGH ràpida de 145 blastòmers provinents de 22 embrions descartats per presència d'aneuploïdies en PGS emprant la FISH-9-cr (article nº 2). La indicació per al PGS en tots els casos era l'edat materna avançada, sense l'existència de cap altre factor conegut que predisposés a l'aneuploïdia.

5.3.1. Tipus d'alteracions cromosòmiques detectades

En l'anàlisi dels 22 embrions, la CGH ràpida ha detectat anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals.

Pel que fa a les numèriques, se n'ha trobat en tots els cromosomes excepte el 10. Així doncs, el 38,5% de les aneuploïdies observades (153/397) no s'haurien pogut detectar amb la FISH-9-cr. Aquesta proporció és similar a l'obtinguda en la sèrie de blastòmers analitzada en la posada a punt de la tècnica de CGH ràpida, en què el 43,6% dels errors observats afectaven cromosomes no analitzats amb la FISH-9-cr.

Pel que fa a la detecció d'alteracions cromosòmiques estructurals, cal esmentar que, a diferència de la FISH, la CGH permet analitzar la totalitat del cromosoma en la seva longitud, de manera que es poden identificar guanys o pèrdues parcials de material amb un límit de resolució de 10-20 Mb (Griffin *et al.*, 1998; Malmgren *et al.*, 2002). En aquesta sèrie, el 31,8% dels embrions analitzats presentava alteracions estructurals que afectaven els cromosomes 1, 2, 4, 9, 13, 18, 19 i 20. L'alteració més freqüent ha estat la pèrdua o guany d'un braç sencer, però també s'han observat anomalies que afectaven la part terminal d'un braç (p.e., -13q21.2-qter en l'embrió nº 5)

o, fins i tot, isocromosomes (p.e., +1p/-1q o -2q/+2q en l'embrió nº 9, +18p/-18q en l'embrió nº 5) (veure taula A inclosa en la figura 1 de l'article nº 2).

La presència d'errors cromosòmics estructurals en embrions ha estat descrita també en altres estudis de CGH i *array*-CGH (Wells *et al.*, 1999; Voullaire *et al.*, 2000; Hellani *et al.*, 2008). En canvi, en estudis previs de CGH aplicada a 1CP i/o oòcits en estadi de MII no s'havia trobat aquest tipus d'alteració (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b; Obradors *et al.*, 2010), o s'havia trobat en una proporció molt baixa (Fragouli *et al.*, 2009). Així doncs, aquest fenomen podria tenir un origen predominantment masculí. De fet, estudis citogenètics d'espermatozoides han permès detectar una incidència considerable d'alteracions estructurals en els gàmetes masculins (Estop *et al.*, 1995; Templado *et al.*, 2005).

D'altra banda, recentment s'ha publicat un estudi focalitzat en aquest tipus d'alteració (Vanneste *et al.*, 2009) en embrions de bona qualitat (descartats després de selecció de sexe per malalties lligades al cromosoma X en pacients de ≤ 35 anys). Emprant *microarrays* de CGH amb BACs i *microarrays* d'SNPs, es van detectar alteracions estructurals en el 70% dels embrions analitzats. D'aquestes alteracions, el 40% corresponia a guanys o pèrdues de braços sencers, mentre que el 55% corresponia a desequilibris de segments terminals dels cromosomes (delecions, duplicacions o amplificacions). Els autors proposen l'existència d'una inestabilitat cromosòmica inherent als primers estadis de divisió embrionària com a responsable de les alteracions trobades. Així, les anomalies de braços sencers, també observades en el nostre treball, podrien produir-se per trencament cromosòmic (*chromosome breakage*), seguit d'una segregació incorrecta dels fragments originats, o de la formació d'isocromosomes i(p) o i(q), també detectats en el nostre estudi.

Pel que fa als desequilibris de segments terminals, amb la CGH convencional només s'han pogut detectar aquelles alteracions que impliquen fragments de mida més gran que 10-20 Mb, mentre amb l'*array*-CGH, de resolució més elevada (2-10 Mb), pot detectar alteracions de mida més petita.

Finalment, la presència de desequilibris cromosòmics estructurals també podria estar relacionada amb l'estadi de replicació de la cèl·lula. Atès que en les primeres etapes del desenvolupament embrionari la proliferació cel·lular és molt elevada, el cicle cel·lular comprèn bàsicament les fases de síntesi (S) i mitosi (M). En aquest sentit, si el blastòmer analitzat es trobés en la fase S, els guanys o pèrdues parcials de cromosomes observats podrien correspondre a regions cromosòmiques ja replicades o encara pendents de replicar, segons si es tractés de fragments de

replicació més primerenca o més tardana, respectivament. En aquest cas, no es tractaria d'alteracions reals, sinó generades com a conseqüència del fet que la replicació de la cromatina no és sincrònica per a tot el material genètic.

En aquesta sèrie d'AMA, l'anàlisi a cegues de la CGH ràpida no va detectar la trisomia del cromosoma X present en els cinc blastòmers de l'embrió nº 5 (article nº 2). Això va ser degut a la utilització de cèl·lules control 46,XY, que són les emprades rutinàriament quan la CGH s'aplica a embrions. De fet, la trisomia del cromosoma X és l'única alteració viable dels cromosomes sexuals que no es pot detectar emprant un control XY i constitueix una de les limitacions inherents a la CGH. Una possible estratègia per superar aquesta limitació és fer una doble anàlisi utilitzant dos DNAs controls; és a dir, co-precipitar la meitat del producte de DOP-PCR problema amb un DNA 46,XY i l'altra meitat amb un DNA 46,XX, com s'ha fet en el cas 2 de PGS (veure apartat 4.3). Tot i que d'aquesta manera es pot solucionar el problema del diagnòstic, la durada global del procediment metodològic i de l'anàlisi es veu força incrementada. Així doncs, una altra estratègia que es pot seguir és emprar cèl·lules control 47,XXY. En aquest cas, no es podrien detectar complements cromosòmics 45,Y0, però la seva incidència teòrica esperada és molt menor i, a més, els embrions amb aquestes característiques són inviàbles.

5.3.2. Edat materna i mosaïcisme

Dels 22 embrions descartats per PGS-FISH i posteriorment analitzats amb la CGH ràpida en aquesta sèrie, només el 22,7% presentava aneuploïdia completament uniforme, és a dir, que tots els blastòmers tenien les mateixes alteracions cromosòmiques. Tractant-se d'embrions procedents de dones d'AMA, aquestes alteracions podrien haver estat originades majoritàriament en la meiosi I materna. En canvi, en el 77,3% restant dels embrions, tot i que part de l'aneuploïdia era uniforme, també s'hi va observar mosaïcisme, probablement causat per errors de segregació mitòtica postzigòtica.

S'han descrit tres mecanismes a través dels quals es pot generar mosaïcisme cromosòmic (Delhanty, 2005): a) pèrdua d'un cromosoma per retard en l'anafase (*anaphase lag*), b) duplicació cromosòmica i c) separació anòmala de cromàtides germanes durant la mitosi, que resulta en una pèrdua o guany cromosòmic recíproc en les cèl·lules filles. Aparentment, no sembla que hi hagi una associació directa entre edat materna i mosaïcisme, tot i que alguns

autors han observat un increment d'errors cromosòmics postzigòtics en dones d'edat avançada, especialment dels produïts per una separació anòmala de cromàtides germanes (Munne *et al.*, 2002; Daphnis *et al.*, 2005). En el nostre estudi, el 60% (236/397) de les aneuploïdies trobades corresponia a errors cromosòmics meiòtics, mentre que el 40% (161/397) tenia un origen postzigòtic. A més, dins dels errors postzigòtics, s'han observat molts guanys i pèrdues cromosòmiques recíproques entre dos blastòmers del mateix embrió (fenomen detectat en sis dels 22 embrions analitzats, (27,3%)), que podrien haver estat causats per una separació anòmala de les cromàtides germanes en la mitosi. Per tant, tot i que globalment hi ha una major incidència d'aneuploïdia meiòtica, com es podria esperar a causa de l'edat materna avançada de les pacients (≥ 39 anys), l'elevada presència d'errors cromosòmics postzigòtics és destacable. Aquest fet dóna suport a la hipòtesi postulada per Munné *et al.* (2002), en la qual els autors apunten que un possible mal funcionament de l'aparell mitòtic femení relacionat amb l'edat podria causar la separació anòmala de cromàtides germanes en les primeres divisions mitòtiques de l'embrió.

D'altra banda, cal dir que l'elevada taxa de mosaïcisme trobada en aquest treball (77,3%) podria no representar exactament la taxa global de mosaïcisme dels embrions de dones d'AMA, ja que s'han analitzat només embrions aneuploides, descartats després del PGD mitjançant la FISH-9-cr. Tot i que la proporció de mosaïcisme sigui, en el conjunt global d'embrions que es diagnostiquen, menor que l'observada en aquest grup d'embrions analitzats, és evident que aquest fenomen és un dels majors entrebancs que ha d'afrontar el PGS. Alguns autors recomanen analitzar dos blastòmers de cada embrió que s'ha de diagnosticar, per tal de poder contrastar els resultats i determinar si existeix o no mosaïcisme (Van de Velde *et al.*, 2000; Baart *et al.*, 2006). Però, d'aquesta manera, tampoc és té la certesa de detectar totes les possibles línies cel·lulars de l'embrió i, en canvi, es produeix una agressió major. De fet, estudis recents han posat de manifest que la biòpsia de dos blastòmers compromet de manera significativa el futur desenvolupament de l'embrió manipulat, reduint la capacitat d'arribar a l'estadi de blastocist i mostrant una qualitat morfològica inferior (De Vos *et al.*, 2009; Goossens *et al.*, 2009).

5.4. Cribatge d'aneuploïdies amb CGH ràpida: aplicació clínica

Un cop posada a punt la metodologia de la CGH ràpida i avaluat els seu rendiment en l'estudi d'embrions descartats, s'ha procedit a la seva aplicació en casos clínics candidats al PGS per risc d'aneuploïdies.

Habitualment, el PGS es realitza analitzant amb FISH un màxim de nou cromosomes predeterminats. Amb aquest mètode, la taxa d'implantació aconseguida fins ara, segons l'última recopilació de PGS feta per l'ESHRE PGD Consortium (Goossens *et al.*, 2009), és del 14,3% (embrions que mostren batec cardíac positiu/embrions transferits). Tot i que s'analitzen els cromosomes que més freqüentment s'han trobat involucrats en l'aneuploïdia present en avortaments (per ordre: 22, 16, 21 i 15) (Munne *et al.*, 2004) i els que són responsables de síndromes viables (13, 18, 21, X i Y), no es poden detectar aneuploïdies d'altres cromosomes que impedeixen la implantació dels embrions transferits.

Amb el PGS emprant la CGH ràpida s'aconsegueix un estudi citogenètic complet dels embrions que s'analitzen. Això normalment implica una reducció en el nombre d'embrions transferibles, però aquests tenen major potencial d'implantació.

D'altra banda, l'estudi de tots els cromosomes en el PGS permet aprofundir en el coneixement de l'aneuploïdia, particularment dels embrions de pacients amb problemes de reproducció.

5.4.1. Consideracions metodològiques sobre l'aplicació clínica de la CGH ràpida

Pel que fa a l'aplicació clínica de la CGH ràpida, el procediment es porta a terme durant el cicle de FIV. Un cop biopsiats els blastòmers a primera hora del matí del dia+3, es fa la lisi, l'amplificació i marcatge del DNA cel·lular i la co-precipitació amb un DNA control en un procés global que dura unes 11 hores. El període d'hibridació del DNA marcat amb el de les metafases de limfòcits és tan sols de 12 hores i, per tant, transcorre durant la nit. D'aquesta manera, el dia+4 ja es poden capturar les metafases i fer l'anàlisi per aconseguir els resultats finals. En el nostre laboratori, es triga uns 30 minuts per diagnosticar cada blastòmer, ja que s'utilitza un microscopi amb dos sistemes d'anàlisi connectats entre sí. D'aquesta manera, depenent del nombre d'embrions per analitzar, l'informe final del diagnòstic s'acostuma a donar

al migdia o bé a la tarda del dia+4. La transferència dels embrions seleccionats es pot fer el mateix dia+4 o bé el dia+5 al matí.

La transferència dels embrions seleccionats en el mateix cicle de FIV, després d'un PGS en embrions de 6-8 cèl·lules, és el tret més avantatjós de la CGH ràpida respecte la CGH convencional. La CGH convencional requereix 40-72h d'hibridació i, per tant, no és possible obtenir el diagnòstic durant el cicle de FIV. Això fa que els embrions s'hagin de criopreservar i la transferència dels diagnosticats com a euploides s'hagi de fer en un cicle posterior addicional, un cop descongelats i sempre que mantinguin la seva viabilitat.

S'ha demostrat que la viabilitat i el potencial d'implantació dels embrions queden força reduïts després del procés de congelació i descongelació (Joris *et al.*, 1999; Edgar *et al.*, 2000). És a dir, que a més del cribatge citogenètic i morfològic, els embrions també passen per un cribatge de supervivència al procés de criopreservació; per tant, el nombre final d'embrions transferibles minva encara més. Cal dir, però, que les tècniques de vitrificació incorporades recentment en els centres de FIV estan augmentant considerablement l'èxit del PGS amb CGH (Fragouli *et al.*, 2009; Sher *et al.*, 2009). De totes maneres, el fet d'haver d'esperar un altre cicle per fer la transferència embrionària suposa un trastorn per a les pacients, tant pel temps d'espera que això implica com per haver-se de medicar novament per preparar l'endometri. Finalment, en un sentit més tècnic, la criopreservació incrementa la manipulació dels embrions dins el cicle de FIV-PGD i suposa un pas afegit, previ a la transferència embrionària, dins el procediment de FIV. Així doncs, la utilització de la CGH ràpida aporta diversos avantatges respecte la CGH convencional.

5.4.2. Èxit del diagnòstic amb la CGH ràpida

Englobant els cinc casos de PGS inclosos en aquest treball, s'han processat 35 embrions evolutius mitjançant la CGH ràpida (veure taula 4.3.1). Aquests embrions representen el 83,3% dels zigots generats (35 embrions evolutius de 42 zigots amb 2PN ben caracteritzats) amb una taxa de fecundació del 84% (42 zigots de 50 oòcits MII inseminats mitjançant ICSI).

L'èxit del diagnòstic amb la CGH ràpida ha estat del 97,1%, percentatge lleugerament superior al 93% descrit amb la CGH convencional (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a). D'altra banda, tot i que es tracta d'un estudi amb un nombre baix d'embrions analitzats, aquesta xifra també supera

el 92% d'èxit del diagnòstic del PGS amb FISH documentat en el recull I-IX de l'ESHRE PGD Consortium (Goossens *et al.*, 2009). De fet, se sap que l'èxit de la FISH depèn en gran part de la cura que es tingui en tots els passos del procés, sobretot pel que fa a la fixació dels blastòmers biopsiats i al grau d'expertesa en la interpretació dels resultats. Per això, quan s'empren tècniques de FISH, les taxes de no diagnòstic poden arribar a ser del 20% (Mastenbroek *et al.*, 2007).

Una de les raons per les quals la taxa de diagnòstic és superior en el PGS amb CGH ràpida és el fet que aquesta tècnica no requereix la fixació de la cèl·lula, de manera que, un cop biopsiats, els blastòmers només s'han d'introduir dins el tub de PCR per poder començar el procediment. Els punts més crítics del PGS amb CGH ràpida són el procediment de lisi i amplificació del DNA de cèl·lula aïllada i, paral·lelament, el risc de contaminació externa i els sistemes per detectar-la.

Dels 34 embrions diagnosticats en els cinc casos de PGS, set no presentaven cap alteració cromosòmica; això situa la taxa d'euploïdia en el 20,6%. En canvi, les dades globals recopilades per l'ESHRE PGD Consortium (I-IX) indiquen que el 36% dels embrions diagnosticats mitjançant PGS amb FISH són transferibles (Goossens *et al.*, 2009). El nostre resultat és similar a l'obtingut en estudis previs de CGH convencional en blastòmers (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000) i indica que, quan s'analitzen tots els cromosomes, la incidència d'aneuploïdia en embrions (79,4% en el nostre treball, 75% en el conjunt dels altres dos estudis) és força més elevada que la descrita quan s'empra la FISH de cinc a nou sondes per al PGS. En aquests estudis amb FISH, la taxa d'aneuploïdia és similar a la descrita en les revisions de l'ESHRE PGD Consortium (I-IX) i se situa entre el 30 i el 65% (Munne *et al.*, 1994; Benadiva *et al.*, 1996; Iwarsson *et al.*, 1999).

5.4.3. Tipus d'alteracions cromosòmiques detectades amb la CGH ràpida

En el present treball, s'han observat aneuploïdies gairebé en tots els cromosomes (veure apartat 4.3 Taula 1). Coincidint amb estudis previs en oòcits (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b), els cromosomes 15 i X es troben dins el grup de cromosomes més freqüentment alterats, mentre que l'11 i el 12 no s'han trobat involucrats en l'aneuploïdia. De totes maneres, tant les dades obtingudes en aquesta sèrie de casos de PGS com les obtingudes en treballs precedents del nostre grup aplicats a l'estudi d'1CP i MII d'oòcits humans (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b; Obradors *et al.*, 2010), posen de manifest que els errors cromosòmics poden afectar qualsevol dels 24 cromosomes analitzats. Concretament,

24 dels 40 esdeveniments aneuploides trobats en aquest estudi corresponien a cromosomes que normalment no s'analitzen amb la FISH de nou sondes (per als cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y). Per tant, si s'hagués utilitzat la FISH-9-cr en el PGS, el 40% de les aneuploïdies haurien quedat sense diagnosticar.

Però a més d'errors que afecten el cromosoma sencer, amb la CGH ràpida també s'han pogut detectar alteracions parcials de cromosomes, com en l'estudi previ d'embrions d'AMA descartats (veure apartat 5.3.1). En aquests casos de PGS, sis dels 46 errors observats en total (13%) corresponien a alteracions estructurals, que afectaven els cromosomes 4, 6, 9, 17 i 18. Aquest tipus d'alteració tampoc es podria detectar, en molts casos, amb la FISH, ja que hauria de coincidir la zona on hibrida la sonda fluorescent amb el fragment guanyat o perdut. Per tant, tenint en compte els errors estructurals i les aneuploïdies observades, en aquest treball el PGS amb FISH no hauria estat capaç de diagnosticar completament 15 dels 34 embrions analitzats (44,1%) i, el que és més alarmant, nou dels 34 embrions (26,5%) s'haurien diagnosticat erròniament com a euploides. Els nostres resultats demostren, doncs, la importància de poder detectar errors en tot el complement cromosòmic, tant numèrics com estructurals.

5.4.4. Implicació de l'aneuploïdia en els problemes de fertilitat associats a AMA, RM i RIF

La raó per la qual es recomana el PGS en pacients d'AMA i en pacients amb RM és l'elevada incidència d'aneuploïdia observada en oòcits i embrions de les primeres (Angell *et al.*, 1993; Munne *et al.*, 1995; Pellestor *et al.*, 2003) i en embrions de les segones (Rubio *et al.*, 2003). A més, s'han trobat alteracions cromosòmiques en el 50-70% dels fetus avortats durant el primer trimestre d'embaràs (Hassold *et al.*, 1980; Boue *et al.*, 1985).

En els dos casos d'AMA inclosos en aquest treball (veure apartat 4.3, Taula 1, casos 1 i 2), s'ha confirmat una elevada incidència d'aneuploïdia en els embrions analitzats (100% i 90%, respectivament). En el cas 1, tots els embrions van ser diagnosticats com a aneuploides, fet que va evitar la transferència d'embrions que no haguessin implantat. En el cas 2, només un dels embrions va resultar ser euploide, es va transferir i es va aconseguir embaràs (que actualment es troba ja en el tercer trimestre de gestació).

És important destacar que si el PGS del cas 2 s'hagués fet amb FISH-9-cr, dos dels embrions aneuploides (nº 3 i nº 12) s'haurien diagnosticat incorrectament com a euploides, amb el conseqüent risc de transferir-los i no aconseguir implantació o acabar en avortament. Això

podria explicar el fet que les taxes d'implantació i d'avortament descrites en el recull de dades IX de l'ESHRE PGD Consortium per a pacients d'AMA siguin del 13,1% i del 18,9%, respectivament (Goossens *et al.*, 2009).

En els casos de PGS amb CGH ràpida per RM (veure apartat 4.3, Taula 1, casos 3 i 4), la incidència d'aneuploidia no ha estat tan elevada (44,4% i 66,7% respectivament), tot i que l'edat materna del cas 3 era de 37 anys. En aquest cas, quatre dels nou embrions es van diagnosticar com a euploides i els dos transferits van implantar, produint un embaràs que ha donat lloc al naixement de dos nadons sans. Si el PGS s'hagués fet amb la FISH s'haurien diagnosticat incorrectament com a euploides tres embrions, i s'hauria indicat una taxa d'euploidia molt superior a la real.

En el cas 4 només hi havia tres embrions disponibles per a l'anàlisi de la CGH ràpida i, tot i que un es va transferir després de ser diagnosticat com a euploide, no hi va haver embaràs. Amb la FISH, novament, s'hauria diagnosticat com a euploide un embrió amb alteracions detectades en l'anàlisi de la CGH ràpida.

En aquest sentit, segons les dades del IXè recull de l'ESHRE PGD Consortium (Goossens *et al.*, 2009), la taxa d'implantació obtinguda en casos de PGS per RM és del 18,4% i, a més, la taxa d'avortament dels embrions que implanten és del 20,4%. Com és d'esperar, els resultats empitjoren si la indicació per al PGS és la combinació d'AMA amb RM, amb taxes d'implantació i embaràs de l'11,5% i 25%, respectivament. Per tant, amb els resultats dels dos casos de RM inclosos en aquest treball, es posa de manifest que el PGS amb CGH ràpida és millor que la FISH com a eina diagnòstica, ja que l'anàlisi citogenètica és molt més completa.

D'altra banda, cal també tenir en compte que existeixen diversos factors responsables dels avortaments reiterats, com ara problemes immunològics o endometrials (Quenby *et al.*, 2002; Sauer *et al.*, 2010). De fet, no es pot assumir que les alteracions cromosòmiques en siguin l'única causa, ja que s'han trobat freqüències de cariotips anòmals semblants en avortaments esporàdics (63-76%) i en RM (40-60%) (Hassold *et al.*, 1980; Stern *et al.*, 1996; Ogasawara *et al.*, 2000; Stephenson *et al.*, 2002).

Pel que fa als casos amb fallades repetides d'implantació, el cribatge d'aneuploidies pot ser també adequat per millorar la selecció dels embrions que s'han de transferir. Tot i que hi pot haver altres causes de no implantació, com alteracions endometrials o uterines, o problemes relacionats amb el procediment de la transferència, es creu que la presència d'alteracions cromosòmiques numèriques podria ser-ne també responsable (Donoso *et al.*, 2007).

Hi ha diversos estudis que revelen una elevada taxa d'aneuploïdia en dones joves amb RIF (Kahraman *et al.*, 2000; Pehlivan *et al.*, 2003) i s'ha observat una correlació entre el nombre de fallades de FIV i la presència d'alteracions cromosòmiques numèriques, del 50% amb tres cicles i del 67% amb més de cinc cicles (Gianaroli *et al.*, 1997). En el cas presentat de RIF (veure apartat 4.3, Taula 1, cas 5), només un dels set embrions analitzats es va diagnosticar com a euploide, de manera que la incidència d'aneuploïdia en els embrions d'aquesta pacient de 36 anys era molt elevada (85,7%). De totes maneres, l'embrió euploide transferit no va implantar. Tot i que es tracta d'un sol cas i no es pot generalitzar, aquest resultat concorda amb el d'altres estudis que no han trobat millores en la taxa d'implantació després del PGS (Gianaroli *et al.*, 1999; Werlin *et al.*, 2003). Per tant, la fallada implantatòria es podria atribuir a altres causes no cromosòmiques. Amb la CGH, a més, s'han detectat diverses alteracions en cromosomes que no s'haurien detectat amb la FISH, senzillament perquè no s'analitzen, fet que podria explicar, en part, l'escàs èxit del PGS amb FISH per RIF descrit en el recull de dades I-IX de l'ESHRE PGD Consortium (14,1% d'implantació) (Goossens *et al.*, 2009).

Finalment, tenint en compte els resultats dels cinc casos de PGS amb CGH ràpida inclosos en aquest treball, la taxa d'implantació obtinguda és del 60%, ja que tres dels cinc embrions transferits han generat gestacions que ja han arribat a terme o que estan en curs. Aquesta xifra és quatre vegades superior a la descrita en l'última recopilació de l'ESHRE PGD Consortium (14,3%). Òbviament, com que es tracta d'un nombre de casos molt reduït, no es poden extreure encara conclusions definitives sobre l'èxit de la CGH ràpida en el PGS. Els resultats preliminars, però, semblen indicar que l'aplicació d'un mètode de cribatge de tots els cromosomes podria ser altament beneficiós a l'hora de seleccionar embrions euploides per transferir. A més, el fet d'evitar la criopreservació dels embrions biopsiats, com requereix el PGS en dia+3 amb CGH convencional, pot ajudar a mantenir la qualitat i viabilitat dels embrions seleccionats.

5.5. Estudi citogenètic complet dels embrions de portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades mitjançant el PGD amb CGH ràpida

5.5.1. Consideracions metodològiques sobre l'aplicació de la CGH ràpida en el PGD per a translocacions

Tenint en compte el límit de resolució de la CGH, 10-20 Mb (Griffin *et al.*, 1998; Malmgren *et al.*, 2002), l'aplicació d'aquesta tècnica al PGD podria estendre's també al diagnòstic d'alteracions estructurals de fragments de mida superior a 10-20Mb derivades de segregacions cromosòmiques desequilibrades en casos de translocacions.

En aquest treball (article nº 3), s'ha evidenciat que la CGH ràpida permet fer un estudi citogenètic complet dels embrions de portadors de translocacions equilibrades, ja que permet detectar tant els productes desequilibrats resultants de les segregacions com altres alteracions de cromosomes no implicats en la translocació. A més, aquesta estratègia suposa diversos avantatges respecte l'actual PGD per a translocacions emprant la FISH, sobretot en el cas de les translocacions recíproques. En primer lloc, amb la FISH es necessita fer una posada a punt de cada cas per tal de triar la combinació de sondes idònia per a la detecció de totes les segregacions cromosòmiques possibles. Aquest procés pot ser més o menys llarg depenent dels cromosomes involucrats en cada translocació i els punts de trencament, i sovint una combinació de sondes només és útil per a un cas concret. Assumint que la CGH ràpida pot detectar guanys o pèrdues de material cromosòmic a partir de 10-20 Mb, aquesta tècnica es pot utilitzar per al PGD de qualsevol translocació recíproca sense haver de fer cap posada a punt; sempre i quan els fragments translocats siguin més grans que el límit de resolució de la CGH.

En segon lloc, s'ha suggerit que el diagnòstic de les segregacions cromosòmiques desequilibrades simultani al cribatge d'aneuploidies podria incrementar la taxa d'implantació dels embrions seleccionats (Kuliev i Verlinsky, 2002; Pujol *et al.*, 2006). Emprant la FISH en el PGD, però, s'haurien de fer diverses rondes d'hibridació per poder analitzar la segregació de la translocació i un nombre limitat dels altres cromosomes, amb el risc inherent del deteriorament del nucli. Amb la CGH ràpida, en canvi, l'estudi de tot el complement cromosòmic i el diagnòstic de la segregació de la translocació es fan simultàniament en una sola anàlisi. A més,

aquesta tècnica no requereix la fixació del nucli, evitant així les possibles pèrdues de material degudes a aquest procés.

Finalment, una altra de les característiques de la CGH ràpida és que permet l'anàlisi dels cromosomes en tota la seva llargada, fet que proporciona més robustesa al diagnòstic, comparant-lo amb el de la FISH, en què les sondes només detecten *loci* o regions específics. Òbviament, això també fa que es puguin detectar alteracions estructurals en altres cromosomes no implicats en la translocació.

5.5.2. Detecció d'alteracions cromosòmiques parcials mitjançant CGH ràpida en embrions descartats d'una portadora 46,XX,t(2;5)(q21;q33) i en el PGD per al portador 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10)

Prèviament a l'aplicació de la CGH ràpida en el PGD per a translocacions calia provar la seva capacitat de detectar alteracions cromosòmiques parcials degudes a reorganitzacions cromosòmiques. Això es va fer evident amb l'anàlisi d'embrions descartats d'un PGD amb FISH per a una portadora 46,XX,t(2;5)(q21;q33). Mentre que el fragment translocat del cromosoma 2 era d'unes 115 Mb, implicant la meitat del braç 2q, el fragment translocat del cromosoma 5 era de 34 Mb, aproximadament una sisena part del braç 5q, longitud molt propera al límit de resolució de la CGH (10-20 Mb). Amb l'anàlisi de CGH, però, es van observar desequilibris cromosòmics resultants de la segregació 2:2 adjacent-2 de manera homogènia per a tots els blastòmers de l'embrió nº 2, que implica guanys i pèrdues de la part no translocada del cromosoma, és a dir, d'unes 128 Mb per al cromosoma 2 i d'unes 147 Mb per al cromosoma 5. Els resultats no concordants amb els obtinguts amb la FISH es podrien explicar pel fet que el blastòmer 2.0 fos binucleat. En l'embrió nº 4 es va detectar mosaïcisme i alteracions tant numèriques com estructurals d'altres cromosomes, fet que podria justificar la discordança amb el resultat de la FISH.

Malgrat que amb l'anàlisi dels embrions descartats s'hagués demostrat que la CGH ràpida era capaç de detectar desequilibris de fragments d'unes 100 Mb derivats de segregacions desequilibrades, en el primer cicle de FIV-PGD per al portador de la doble translocació 45,XY,t(2;17)(q14.2;q23); t(14;21)(q10;q10) (cas F) es va emprar la FISH combinada amb la CGH ràpida. Així, atès que el fragment translocat del cromosoma 17 era molt petit i telomèric (~25 Mb), es pretenia garantir la completa detecció de desequilibris d'una mida encara més propera al límit de resolució de la CGH ràpida. Els resultats d'aquest primer cicle, però, van

mostrar que la CGH ràpida és capaç de detectar fins i tot desequilibris d'aquesta mida. Per tant, en els següents cicles d'aquest cas de DGP ja no es va utilitzar la FISH, evitant així biopsiar dues cèl·lules de cada embrió.

5.5.3. Proporcions de les segregacions cromosòmiques de les translocacions

En el grup de les translocacions robertsonianes (casos A, B, C i la del cas F), la segregació cromosòmica més freqüent ha estat la 2:1 alternant, observada en 43 dels 51 embrions analitzats (84,3%), mentre que vuit dels embrions (15,7%) (dos embrions del cas B i sis del cas F) presentaven la segregació 2:1 adjacent.

Aquests resultats concorden amb els obtinguts en estudis de segregació meiótica en homes portadors de translocacions robertsonianes, en què la freqüència del tipus 2:1 alternant varia des del 60 al 96,6%, la del tipus 2:1 adjacent es troba entre el 2,7 i el 36,6% i la del tipus 3:1 és del 0,8-8,9% (Roux *et al.*, 2005). Una possible explicació del predomini de la segregació 2:1 alternant és la proposada existència d'un punt de control meiótic, on es podrien eliminar les cèl·lules germinals amb segregacions aberrants per apoptosi, fet que causaria una reducció de l'espermatogènesi (Roeder i Bailis, 2000). A aquesta hipòtesi s'hi adequa el fet que els tres homes portadors de translocacions robertsonianes d'aquest treball (casos A, C i F) presentaven oligozoospermia. A més, en estudis de poblacions d'homes infèrtils, es va trobar que el 0,8% presentava aquest tipus de translocació (De Braekeleer i Dao, 1991), mentre que en la població general la freqüència és nou vegades inferior. Excloent el cas de la doble translocació (F), els dos únics embrions amb segregació 2:1 adjacent de les translocacions robertsonianes han estat diagnosticats en el cas B, en què la portadora de la translocació era la dona; aquest fet donaria suport a la idea que el punt de control meiótic és menys estricte en dones que en homes (LeMaire-Adkins *et al.*, 1997).

Pel que fa al grup de les translocacions recíproques (casos D, E i la del cas F), és ben sabut que la freqüència dels diferents tipus de segregació depèn específicament de cada translocació, és a dir, dels cromosomes involucrats, de la mida dels fragments intercanviats i de la dels segments intersticials del quadrivalent (Martin i Hulten, 1993; Escudero *et al.*, 2003; Benet *et al.*, 2005; Lledo *et al.*, 2010). Sumant els dos cicles del cas D, el 38,9% dels embrions presentava segregació 2:2 alternant, mentre que el 61,2% presentava segregacions desequilibrades, essent el 2:2 adjacent-1 (22,2%) i el 3:1 (22,2%) els tipus més freqüents, seguits del 2:2 adjacent-2 (16,7%).

En el cas E, el 30% dels embrions van resultar ser normals o equilibrats per als cromosomes implicats en la translocació, mentre que el 70% eren desequilibrats. Els tipus de segregació 2:2 alternant (30%), 2:2 adjacent-2 (30%) i 3:1 (30%) van trobar-se en la mateixa proporció, mentre que el tipus 2:2 adjacent-1 (10%) va presentar una freqüència menor.

El patró de segregació dels tres cicles agrupats del cas F va ser el següent: la segregació més freqüent va ser la 2:2 alternant (46,7%), seguida de la 3:1 (26,7%), la 2:2 adjacent-1 (20%) i la 2:2 adjacent-2 (6,7%).

En els tres casos de translocacions recíproques (D, E i la del cas F), la freqüència del tipus de segregació 2:2 alternant es troba dins del rang observat en la bibliografia, entre el 20 i el 50%, que es creu semblant en portadors homes i dones (Munne, 2005). D'altra banda, sembla que les freqüències dels tipus 3:1 i 2:2 adjacent-2 podrien ser diferents segons el gènere del portador (Mackie Ogilvie i Scriven, 2002; Lim *et al.*, 2008). En el cas D, la portadora de la translocació era la dona i els tipus de segregació desequilibrada 3:1 i 2:2 adjacent-1 han estat igualment més freqüents que el de la 2:2 adjacent-2, observació en concordança amb altres publicacions (Mackie Ogilvie i Scriven, 2002; Lledo *et al.*, 2010). En canvi, en el cas E, en què la portadora també era la dona, el tipus de segregació 2:2 adjacent-1 es va trobar en menor proporció que els de les segregacions 2:2 adjacent-2 i 3:1. En el cas F, en què el portador era l'home, el tipus de segregació 3:1 ha estat lleugerament més representat que el de la 2:2 adjacent-1. En aquest cas, les freqüències observades tampoc es corresponen amb les descrites per Lledó *et al.* (2010), ja que en el seu estudi el tipus de segregació 2:2 adjacent-1 és més freqüent que el de la 3:1 en homes.

En el cas F, valorant conjuntament la segregació de les dues translocacions (sense tenir en compte possibles recombinacions), la probabilitat teòrica de produir gàmetes normals o equilibrats és molt baixa, ja que només un de cada 32 gàmetes generats podria tenir un complement sense cap alteració cromosòmica lligada a la translocació recíproca (4/32 gàmetes serien normals o equilibrats) o a la robertsoniana (4/16 gàmetes serien normals o equilibrats). Curiosament, quatre dels 16 embrions analitzats en els tres cicles (25%) van ser diagnosticats com a normals o equilibrats per a les dues translocacions, però només un, pertanyent al tercer cicle de FIV-PGD, era totalment euploide. Aquest embrió va ser transferit i va produir un embaràs, que actualment es troba en el primer trimestre de gestació.

5.5.4. Anomalies dels cromosomes no implicats en les translocacions

En aquest treball, a part de les alteracions dels cromosomes implicats en les translocacions, s'han detectat anomalies en altres cromosomes. En portadors de translocacions, s'ha suggerit que l'elevada incidència d'aneuploidia en els altres cromosomes pot estar lligada a l'existència d'un efecte intercromosòmic (ICE) (Lejeune, 1963; Gianaroli *et al.*, 2002).

En les translocacions robertsonianes (casos A, B i C), s'han observat aneuploidies en el 74,3% dels embrions analitzats (26/35), que podien afectar qualsevol dels grups cromosòmics, essent majoritàriament afectats els grups E i G, seguits dels C, X/Y, D i F, B i, per últim, del grup A.

La possible influència de la figura oberta del trivalent ha estat assenyalada com a responsable de l'ICE, ja que podria generar inestabilitat en la resta de bivalents (Navarro *et al.*, 1991) i causar les múltiples aneuploidies observades. En el cas B, però, cal tenir en compte també que l'edat materna era de 40-41 anys, de manera que les aneuploidies observades podrien ser degudes, a més, a l'AMA.

En les translocacions recíproques (casos D i E) s'han detectat aneuploidies en el 25% dels embrions diagnosticats (7/28), que afectaven també tots els grups cromosòmics, essent el grup més freqüentment implicat l'X/Y, seguit del grup C, dels grups A, B, D i G i, finalment, dels E i F. Tot i la limitació del nombre de casos, aquest percentatge és bastant inferior al trobat en les translocacions robertsonianes i podria explicar-se pel comportament dels cromosomes translocats durant la meiosi I. El quadrivalent format en les translocacions recíproques pot ser força més estable que el trivalent format en les robertsonianes, ja que, depenent dels fragments i dels cromosomes implicats, pot tenir un aparellament més complet de totes les regions cromosòmiques homòlogues (Oliver-Bonet *et al.*, 2002). Per tant, l'efecte d'aquesta figura en la segregació d'altres cromosomes no involucrats en la translocació podria ser menor.

En els tres cicles de FIV-PGD de la doble translocació (cas F), s'han detectat també aneuploidies en el 62,5% dels embrions analitzats (10/16). La seva presència pot ser atribuïda a l'existència del trivalent o a la d'ambdues figures, trivalent i quadrivalent, que podria afavorir la producció d'aneuploidies.

L'existència de l'ICE és un tema controvertit en la bibliografia. Mentre que alguns estudis donen suport a aquest fenomen tant en translocacions robertsonianes (Gianaroli *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2004a; Anton *et al.*, 2010) com en recíproques (Oliver-Bonet *et al.*, 2002; Rives *et al.*, 2003; Anton *et al.*, 2004b), altres no han detectat la seva existència (Martini *et al.*, 1998; Estop *et al.*, 2000; Oliver-Bonet *et al.*, 2004; Munne *et al.*, 2005c). Alguns autors han suggerit que les alteracions trobades en portadors de translocacions són més degudes a la presència de seminogrames alterats, que a la translocació en si (Pellestor *et al.*, 2001; Douet-Guilbert *et al.*, 2005).

Pel que es desprèn del nostre estudi, es podria assumir que l'ICE estaria més associat a les translocacions robertsonianes que no pas a les recíproques, mentre que la proporció de desequilibris lligats a segregacions dels cromosomes implicats en la reorganització seria més elevada en les translocacions recíproques que en les robertsonianes, coincidint amb els treballs anteriors (Gianaroli *et al.*, 2002).

El present treball ha evidenciat, a més de les aneuploïdies esmentades anteriorment, l'existència d'alteracions estructurals en cromosomes no involucrats en les translocacions, que afectaven tots els grups cromosòmics excepte el G, i involucraven des de part d'un braç fins aproximadament el 75% del cromosoma. Aquestes alteracions s'han observat en ambdós tipus de translocacions, tot i que la incidència sembla ser força diferent. Mentre que en els casos de translocacions robertsonianes la presència d'errors cromosòmics parcials ha estat del 45,7% (observats en 16 dels 35 embrions analitzats), en els casos de translocacions recíproques, ha estat del 17,9% (5/28). En el cas de la doble translocació, el 25% dels embrions analitzats (3/16) presentava alteracions cromosòmiques estructurals.

L'existència d'errors cromosòmics estructurals, doncs, s'ha demostrat en els diversos treballs realitzats amb la CGH ràpida, tant en els embrions descartats com en els embrions de casos de PGS i de PGD per a translocacions. La discussió detallada sobre el seu possible origen i la seva naturalesa s'ha desenvolupat en l'apartat 5.3.1.

5.5.5. Importància de la CGH ràpida en els resultats dels casos de FIV-PGD per a portadors de translocacions cromosòmiques

En els cicles de translocacions robertsonianes (A, B.1, B.2 i C), 30 dels 32 (93,8%) embrions analitzats presentaven el tipus de segregació 2:1 alternant, però només cinc d'ells (5/30; 16,7%) van ser diagnosticats com a totalment euploides amb la CGH ràpida. Dels 25 embrions restants,

13 es van descartar per presència d'aneuploïdies, un per presència d'una alteració estructural i 11 per presència d'alteracions cromosòmiques, tant numèriques com estructurals. En canvi, si el PGD s'hagués fet mitjançant la FISH amb sondes específiques per als cromosomes implicats en la translocació, 30 embrions s'haguessin diagnosticat com a transferibles, cinc correctament i 25 incorrectament (78,1%; 25/32). D'altra banda, si a més dels cromosomes translocats també s'haguessin analitzat amb la FISH els cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y, el nombre d'embrions transferibles hagués disminuït fins a vuit, cinc diagnosticats correctament i tres (9,4%; 3/32) incorrectament.

En els cicles de translocacions recíproques (D.1, D.2 i E), 10 dels 28 (35,7%) embrions analitzats presentaven la segregació 2:2 alternant, però només cinc d'ells (50%; 5/10) van ser diagnosticats com a totalment euploides amb la CGH ràpida. Dels cinc embrions restants, quatre es van descartar per presència d'aneuploïdies i un per presència d'una alteració estructural. En aquests casos, l'estratègia majoritàriament emprada en el PGD, és a dir, la FISH amb sondes específiques per als cromosomes implicats en la translocació, hauria diagnosticat nou embrions com a transferibles, cinc correctament i quatre incorrectament (14,3%; 4/28).

Finalment, agrupant els tres cicles de la doble translocació (cas F), quatre dels 16 embrions analitzats (25%) van presentar segregacions alternants per a les dues translocacions, però només un va ser diagnosticat com a completament euploide mitjançant la CGH. Amb la FISH, emprant sondes per als cromosomes involucrats en les dues translocacions, s'haurien diagnosticat incorrectament com a transferibles els altres tres embrions amb segregació alternant per a les dues translocacions (18,8%).

Aquests resultats demostren que, també per al PGD, la CGH ràpida és una estratègia molt més acurada que la FISH, especialment en els casos de translocacions robertsonianes, en què la presència d'aneuploïdies i alteracions cromosòmiques estructurals és molt elevada.

En aquest treball (article nº 3) es presenten, per primera vegada, resultats d'un PGD emprant la CGH ràpida per a un cas complex d'un portador de dues translocacions (cas F), en què, a més, s'ha aconseguit un embaràs. També s'ha obtingut un embaràs en el cas de la portadora de la t(13;14) de 41 anys (cas B.2). D'altra banda, en el moment de redactar el present estudi, encara no s'ha fet la mesura de la β -HCG en la pacient portadora de la t(1;10) (cas E).

Pel que fa a la resta de cicles de FIV-PGD en què s'ha arribat a la transferència d'embrions diagnosticats com a euploides que no han produït embaràs, se sap que, a part de la constitució cromosòmica, intervenen altres factors en el procés d'implantació, com per exemple la qualitat de la morfologia embrionària, la receptivitat endometrial o bé el procediment de transferència en si (Donoso *et al.*, 2007).

El que apunta el nostre estudi, però, és que l'aplicació d'una anàlisi cromosòmica completa, mitjançant la CGH ràpida, en el PGD per a translocacions és una eina que permetrà superar una de les màximes limitacions actuals del PGD emprant la FISH, com és la transferència d'embrions amb errors en cromosomes no analitzats que poden impedir la seva implantació.

5.6. Perspectives de futur de la CGH ràpida

En l'actualitat, la necessitat d'analitzar tot el complement cromosòmic per poder fer un diagnòstic acurat és ja una realitat. En aquest context la CGH ràpida és una bona alternativa a l'actual PGD. Com s'ha vist, es tracta d'una tècnica molt completa, ja que no només permet detectar alteracions numèriques de tots els cromosomes, sinó que també pot identificar alteracions estructurals (amb un límit de resolució de 10-20 Mb). D'altra banda, a diferència de la CGH convencional, no requereix la criopreservació dels embrions analitzats, de manera que es maximitza la seva capacitat per implantar. Així doncs, sembla l'opció idònia per al diagnòstic. En tractar-se d'una tècnica complexa, però, la seva aplicació clínica requereix un equip especialitzat i ben coordinat, sobretot pel que fa a l'anàlisi dels resultats.

Paral·lelament al desenvolupament de la CGH ràpida, està prenent força la tecnologia de l'*array*-CGH (Hu *et al.*, 2004; Le Caignec *et al.*, 2006; Hellani *et al.*, 2008; Vanneste *et al.*, 2009). El fet que la resolució d'aquesta tècnica sigui més elevada que la de la CGH (ràpida o convencional) i que el procediment sigui igual o més ràpid fa d'aquesta tècnica una opció atractiva per ser aplicada al PGD. Tanmateix, la metodologia i el sistema d'interpretació dels resultats encara s'estan acabant de validar (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2010; Harper i Harton, 2010). A més, el cost de la infraestructura i els reactius requerits per poder portar a terme tot el procediment és encara molt elevat si es compara amb el de la CGH.

Una altra metodologia prometedora és la dels *microarrays* amb SNPs (Handyside *et al.*, 2009), que permet no només determinar el nombre de còpies de tots els cromosomes, sinó també caracteritzar el genotip de la cèl·lula analitzada. Per tant, tot i trobar-se encara en una fase força preliminar, aquesta tecnologia podria ser utilitzada per a l'estudi citogenètic i molecular de manera simultània en una mateixa cèl·lula. De totes maneres, la necessitat d'analitzar el DNA patern i matern o, en alguns casos, també de parents propers a la parella per tal de poder fer l'anàlisi de lligament en els embrions, suposa una despesa elevada que cal afegir a l'important cost econòmic que ja té aquesta tècnica.

En conclusió, mentre els mètodes basats en la tecnologia dels *microarrays* continuïn pendents de validar i el seu cost sigui tan elevat, la utilització de la CGH ràpida en el diagnòstic pot ser una bona estratègia per incrementar l'èxit del PGD.

Conclusions

6. Conclusions

1. S'ha desenvolupat i validat la metodologia de la CGH ràpida, en què el temps d'hibridació s'ha escurçat de 40-72 hores a 12 hores. Aquesta metodologia permet obtenir resultats amb una qualitat similar o, en alguns casos, superior a l'aconseguida amb la CGH convencional.
2. La validació de la metodologia de la CGH ràpida en blastòmers d'embrions descartats per PGS emprant la FISH-9-cr ha posat de manifest que la manca de concordança entre els resultats de la CGH ràpida i els de la FISH-9-cr es deu, principalment, a l'existència de mosaïcisme, però també a errors de la FISH.
3. Amb la metodologia de la CGH ràpida desenvolupada, es poden analitzar simultàniament tots els cromosomes de la cèl·lula. Així, en blastòmers d'embrions descartats per PGS amb FISH-9-cr i també en els casos de PGS, entre el 38,5 i el 43,6% de les aneuploïdies detectades no haurien estat diagnosticades amb la FISH-9-cr.
4. En embrions descartats d'AMA, mentre que el 60% de les aneuploïdies detectades és d'origen meiótic, com és d'esperar per l'edat de les pacients (≥ 39 anys), el 40% és d'origen postzigòtic, és a dir, generat per errors en la segregació mitòtica de les primeres divisions embrionàries.
5. L'elevada taxa de mosaïcisme (77,3%) trobada en embrions descartats d'AMA, corrobora que aquest fenomen és un dels principals obstacles del PGS.
6. Amb la CGH ràpida no només es detecten aneuploïdies, sinó també alteracions estructurals, amb un límit de resolució de 10-20 Mb. Aquest tipus d'alteració s'ha observat en el 10-31,8% dels embrions descartats pel PGS amb FISH i en el 17,6% dels embrions dels casos de PGS presentats, fet que indica que es tracta d'un fenomen comú i no menyspreable.
7. La reducció del temps d'hibridació de la CGH permet l'aplicació d'aquesta tècnica en el PGD de blastòmers en dia+3, fet que fa possible obtenir els resultats el dia+4. D'aquesta manera, s'evita la criopreservació dels embrions biopsiats i els seleccionats com a euploides es poden transferir, en fresc, en el mateix cicle de FIV.

8. La taxa d'implantació obtinguda en el PGS amb CGH ràpida, tot i tractar-se d'un nombre reduït de casos, és del 60%, és a dir, quatre vegades superior a la descrita en la recopilació I-IX de l'ESHRE PGD Consortium (14,3%). Per tant, l'aplicació d'aquesta metodologia en el PGS pot ajudar a augmentar la taxa d'implantació dels embrions seleccionats i transferits.
9. La CGH ràpida ha estat capaç de detectar alteracions cromosòmiques estructurals, amb un límit de resolució de 10-20 Mb, derivades de segregacions desequilibrades en embrions de portadors de translocacions equilibrades.
10. Per primera vegada, l'aplicació de la CGH ràpida en el PGD per a un portador d'una doble translocació ha permès seleccionar embrions normals o equilibrats per a les dues translocacions i ha aconseguit la transferència d'un embrió euploide que ha produït un embaràs.
11. La proporció d'embrions amb desequilibris derivats de la segregació dels cromosomes implicats en una reorganització és superior en les translocacions recíproques (60,5%) respecte les robertsonianes (15,7%). En canvi, l'efecte intercromosòmic sembla ser més rellevant en les robertsonianes (74,3%) que en les recíproques (25%).
12. La proporció d'embrions amb desequilibris deguts a alteracions estructurals no relacionades amb la reorganització sembla ser més rellevant en les translocacions robertsonianes (45,7%) que en les recíproques (17,9%).
13. La CGH ràpida apareix com una eina molt útil en el PGD per a translocacions robertsonianes i recíproques, ja que, a més de la detecció d'alteracions cromosòmiques estructurals derivades de la segregació del trivalent o del quadrivalent, permet diagnosticar altres alteracions, tant numèriques com estructurals, en qualsevol dels cromosomes del complement. A més, l'obtenció dels resultats citogenètics el dia+4 possibilita la transferència dels embrions seleccionats dins el mateix cicle de FIV, fet que evita la seva criopreservació.

Bibliografia

7. Bibliografia

A

- Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA i Studd JW (1993) Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod*; 8:1512-1517.
- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T i Munne S (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online*; 6:226-231.
- Angell RR, Xian J i Keith J (1993) Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod*; 8:1047-1054.
- Angell R (1997) First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet*; 61:23-32.
- Anton E, Blanco J, Egozcue J i Vidal F (2004a) Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum Reprod*; 19:1345-1351.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J i Blanco J (2004b) Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online*; 9:637-644.
- Anton E, Blanco J i Vidal F (2010) Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *J Hum Genet*; 55:541-545.

B

- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC i Van Opstal D (2006) Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod*; 21:223-233.
- Bahce M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M i Munne S (2000) Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave hybridization, cell recycling and monocolour labelling of probes. *Mol Hum Reprod*; 6:849-854.
- Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, Amit A i Ben-Yosef D (2009) Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril*; 92:890-896.

- Bartmann AK, Romao GS, Ramos Eda S i Ferriani RA (2004) Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *J Assist Reprod Genet*; 21:79-83.
- Benadiva CA, Kligman I i Munne S (1996) Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age. *Fertil Steril*; 66:248-255.
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C i Navarro J (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res*; 111:281-290.
- Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL i Venturini PL (1998) Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod*; 13:3406-3413.
- Bielanska M, Tan SL i Ao A (2002) Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod*; 17:413-419.
- Boue A, Boue J i Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet*; 14:1-57.

C

- Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R i Vicari E (2003) Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online*; 6:310-317.
- Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M, Evers JL i Geraedts JP (2004) Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*; 19:316-324.
- Cozzi J, Conn CM, Harper J, Winston RM, Rindl M, Farndon PA i Delhanty JD (1999) A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. *Hum Genet*; 104:23-28.

D

- Dailey T, Dale B, Cohen J i Munne S (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am J Hum Genet*; 59:176-184.
- Daphnis DD, Delhanty JD, Jerkovic S, Geyer J, Craft I i Harper JC (2005) Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Hum Reprod*; 20:129-137.

- De Braekeleer M i Dao TN (1991) Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*; 6:245-250.
- De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P, Liebaers I i Van de Velde H (2009) Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod*; 24:2988-2996.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH i Winston RM (1997) Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet*; 99:755-760.
- Delhanty JD (2005) Mechanisms of aneuploidy induction in human oogenesis and early embryogenesis. *Cytogenet Genome Res*; 111:237-244.
- DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D i DeCherney AH (2008) Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*; 90:1049-1054.
- Donoso P, Staessen C, Fauser BC i Devroey P (2007) Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. *Hum Reprod Update*; 13:15-25.
- Douet-Guilbert N, Bris MJ, Amice V, Marchetti C, Delobel B, Amice J, Braekeleer MD i Morel F (2005) Interchromosomal effect in sperm of males with translocations: report of 6 cases and review of the literature. *Int J Androl*; 28:372-379.

E

- Edgar DH, Bourne H, Speirs AL i McBain JC (2000) A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod*; 15:175-179.
- ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod*; 17:233-246.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M i Munne S (2003) Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril*; 79 Suppl 3:1528-1534.
- Estop AM, Marquez C, Munne S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J i Templado C (1995) An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet*; 56:452-460.

Estop AM, Cieply K, Munne S, Surti U, Wakim A i Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet*; 106:517-524.

Evsikov S i Verlinsky Y (1998) Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod*; 13:3151-3155.

F

Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A *et al.* (2010) Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril*; 93:1006 e1007-1006 e1010.

Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, Faed MJ i Delhanty JD (2006) 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.

Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB i Wells D (2008) Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod*; 23:2596-2608.

Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB *et al.* (2009) Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril*; 94:875-887.

G

Gianaroli L, Magli MC, Munne S, Fiorentino A, Montanaro N i Ferraretti AP (1997) Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod*; 12:1762-1767.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP i Munne S (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril*; 72:837-844.

- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S, Balicchia B, Escudero T i Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod*; 17:3201-3207.
- Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, Van Steirteghem A, Bertrand C, Liebaers I, Devroey P *et al.* (2008) Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*; 23:481-492.
- Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M i Harper JC (2009) ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod*; 24:1786-1810.
- Griffin DK, Sanoudou D, Adamski E, McGiffert C, O'Brien P, Wienberg J i Ferguson-Smith MA (1998) Chromosome specific comparative genome hybridisation for determining the origin of intrachromosomal duplications. *J Med Genet*; 35:37-41.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, Egozcue J, Munne S i Navarro J (2004a) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod*; 19:2118-2125.
- Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J i Munne S (2004b) 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, Gadea L, Benet J, Wells D, Munne S i Navarro J (2005) Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report. *Hum Reprod*; 20:1256-1260.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D i Munne S (2010) Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*; [Epub ahead of print].

H

- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K i Winston RM (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*; 344:768-770.

- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA i Griffin DK (2009) Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet*; 47:651-658.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, Reismer E, Borg K, Wikland M i 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.
- Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C, Muntjewerff N, Repping S, SenGupta S, Scriven PN *et al.* (2006) ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod*; 21:3-21.
- Harper JC i Harton G (2010) The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril*; 94:1173-1177.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA i Jacobs PA (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*; 44:151-178.
- Hassold TJ i Jacobs PA (1984) Trisomy in man. *Annu Rev Genet*; 18:69-97.
- Hassold T, Hall H i Hunt P (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*; 16 Spec No. 2:R203-208.
- Hellani A, Abu-Amro K, Azouri J i El-Akoum S (2008) Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online*; 17:841-847.
- Hu DG, Webb G i Hussey N (2004) Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*; 10:283-289.
- Hunt P, LeMaire R, Embury P, Sheean L i Mroz K (1995) Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. *Hum Mol Genet*; 4:2007-2012.

I

- Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J, Ahrlund-Richter L, Sjoblom P, Lundkvist O, Simberg N, Nordenskjold M i Blennow E (1999) A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum Genet*; 104:376-382.

J

- Jacobs PA (1992) The chromosome complement of human gametes. *Oxf Rev Reprod Biol*; 14:47-72.
- Jacobs PA i Hassold TJ (1995) The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet*; 33:101-133.
- Joris H, Van den Abbeel E, Vos AD i Van Steirteghem A (1999) Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Hum Reprod*; 14:2833-2837.
- Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakisn K, Cengiz G i Donmez E (2000) Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod*; 15:2003-2007.

K

- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F i Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*; 258:818-821.
- Kitayama Y, Igarashi H, Kozu T, Nagura K, Ohashi Y i Sugimura H (2006) Repeated fluorescence in situ hybridization by a microwave-enhanced protocol. *Pathol Int*; 56:490-493.
- Krey LC i Grifo JA (2001) Poor embryo quality: The answer lies (mostly) in the egg. *Fertil Steril*; 75:466-468.
- Kuliev A i Verlinsky Y (2002) Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*; 5:294-299.

L

- Lamb NE i Hassold TJ (2004) Nondisjunction--a view from ringside. *N Engl J Med*; 351:1931-1934.
- Landwehr C, Montag M, van der Ven K i Weber RG (2008) Rapid comparative genomic hybridization protocol for prenatal diagnosis and its application to aneuploidy screening of human polar bodies. *Fertil Steril*; 90:488-496.

- 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.* (2006) Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res*; 34:e68.
- Lejeune J (1963) Autosomal Disorders. *Pediatrics*; 32:326-337.
- LeMaire-Adkins R, Radke K i Hunt PA (1997) Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol*; 139:1611-1619.
- Leridon H (2004) Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod*; 19:1548-1553.
- Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A i Hill DL (2005) Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril*; 84:1395-1400.
- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E i Laird S (2002) Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update*; 8:463-481.
- Lim CK, Cho JW, Song IO, Kang IS, Yoon YD i Jun JH (2008) Estimation of chromosomal imbalances in preimplantation embryos from preimplantation genetic diagnosis cycles of reciprocal translocations with or without acrocentric chromosomes. *Fertil Steril*; 90:2144-2151.
- Liu J, Tsai YL, Zheng XZ, Yazigi RA, Baramki TA, Compton G i Katz E (1998) Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod*; 4:972-977.
- Lledo B, Ortiz JA, Morales R, Ten J, de la Fuente PE, Garcia-Ochoa C i Bernabeu R (2010) The paternal effect of chromosome translocation carriers observed from meiotic segregation in embryos. *Hum Reprod*; 25:1843-1848.

M

- Mackie Ogilvie C i Scriven PN (2002) Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *Eur J Hum Genet*; 10:801-806.
- Macklon NS, Geraedts JP i Fauser BC (2002) Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*; 8:333-343.
- Malmgren H, Sahlen S, Inzunza J, Aho M, Rosenlund B, Fridstrom M, Hovatta O, Ahrlund-Richter L, Nordenskjold M i Blennow E (2002) Single cell CGH analysis reveals a high

- degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Mol Hum Reprod*; 8:502-510.
- Martin RH i Hulten M (1993) Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. *Hereditas*; 118:165-175.
- Martini E, von Bergh AR, Coonen E, de Die-Smulders CE, Hopman AH, Ramaekers FC i Geraedts JP (1998) Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet*; 102:157-165.
- 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.* (2007) In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*; 357:9-17.
- McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA i Jansen RP (2005) Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril*; 84:1628-1636.
- Meldrum DR (1993) Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil Steril*; 59:1-5.
- Miller E i Therman E (2001) Human chromosomes. Springer-Verlag, New York; 4rth ed:199.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M i Takahashi K (2003) Vitricification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod*; 18:384-391.
- Multani AS, Hopwood VL i Pathak S (1996) A modified fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. *Anticancer Res*; 16:3435-3437.
- Munne S, Weier HU, Grifo J i Cohen J (1994) Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod*; 51:373-379.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J i Cohen J (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*; 64:382-391.
- Munne S i Weier HU (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, Dailey T, Finkelstein M i Weier HU (1996) Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet*; 13:149-156.

- Munne S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert J i Gianaroli L (1998) Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*; 18:1459-1466.
- Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Marquez C, Sable D, Ferraretti AP *et al.* (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod*; 14:2191-2199.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C i Cohen J (2002) Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online*; 4:223-232.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J i Sable D (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online*; 7:91-97.
- Munne S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M i Cohen J (2004) Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online*; 8:81-90.
- Munne S (2005) Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. *Cytogenet Genome Res*; 111:305-309.
- Munne S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL *et al.* (2005a) Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*; 84:331-335.
- Munne S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, Garrisi J i Cohen J (2005b) Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril*; 84:1328-1334.
- Munne S, Escudero T, Fischer J, Chen S, Hill J, Stelling JR i Estop A (2005c) Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online*; 10:363-369.

N

- Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S i Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Hum Reprod*; 6:376-381.

Nicolaidis P i Petersen MB (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 i 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 i 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.

Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutierrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Marquez C, Benet J i Navarro J (2010) Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril*; 93:675-679.

Ogasawara M, Aoki K, Okada S i Suzumori K (2000) Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*; 73:300-304.

Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J i Benet J (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod*; 8:958-963.

Oliver-Bonet M, Navarro J, Codina-Pascual M, Abad C, Guitart M, Egozcue J i Benet J (2004) From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum Reprod*; 19:2515-2522.

Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E i Martin RH (2005) Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod*; 20:683-688.

P

Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C i Pellicer A (2003) Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online*; 6:232-237.

- Pellestor F, Imbert I, Andreo B i Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod*; 16:1155-1164.
- Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C i Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet*; 112:195-203.
- Pellestor F, Anahory T i Hamamah S (2005) Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res*; 111:206-212.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Minguez Y, Gimenez C, Egozcue J, Remohi J i Simon C (1999) In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril*; 71:1033-1039.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J i Gray J (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85:9138-9142.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I i Devroey P (2004) Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod*; 19:1570-1574.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I i Devroey P (2006) Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening? *Reprod Biomed Online*; 12:334-339.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J i Navarro J (2003a) 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.
- Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J i Navarro J (2003b) Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction*; 126:701-711.
- Pujol A, Benet J, Staessen C, Van Assche E, Campillo M, Egozcue J i Navarro J (2006) The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduction*; 131:1025-1035.

Q

Quenby S, Vince G, Farquharson R i Aplin J (2002) Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod*; 17:1959-1963.

R

Rives N, Jarnot M, Mousset-Simeon N, Joly G i Mace B (2003) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of chromosome segregation and interchromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9,10)(q11;p11.1) carrier. *J Hum Genet*; 48:535-540.

Roeder GS i Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet*; 16:395-403.

Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC i Bresson JL (2005) Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res*; 111:291-296.

Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH i Harper JC (2000) FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn*; 20:552-560.

Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J i Pellicer A (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod*; 18:182-188.

Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P, Remohi J, Simon C i Pellicer A (2005) FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online*; 11:497-506.

S

Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J i Munne S (2001) Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod*; 16:1954-1958.

Sauer MV, Paulson RJ i Lobo RA (1996) Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older. *Hum Reprod*; 11:2540-2543.

- Sauer R, Roussev R, Jeyendran RS i Coulam CB (2010) Prevalence of antiphospholipid antibodies among women experiencing unexplained infertility and recurrent implantation failure. *Fertil Steril*; 93:2441-2443.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG i Wells D (2010) Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril*; 94:1700-1706.
- Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, Baltaci V, Kotze D i 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.
- Sher G, Keskindepe L, Keskindepe M, Maassarani G, Tortoriello D i Brody S (2009) Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril*; 92:1886-1894.
- Short RV (1978) When a conception fails to become a pregnancy. *Ciba Found Symp*; 377-394.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I i 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 i 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.
- Stephenson MD, Awartani KA i Robinson WP (2002) Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*; 17:446-451.
- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L i Baker HW (1999) Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod*; 14:2097-2101.
- Stern JJ, Dorfmann AD, Gutierrez-Najar AJ, Cerrillo M i Coulam CB (1996) Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*; 65:250-253.

T

- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA i Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*; 13:718-725.
- Templado C, Bosch M i Benet J (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res*; 111:199-205.

V

- Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, Lissens W, Vandervorst M, Van Ranst H, Liebaers I *et al.* (2000) Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*; 20:1030-1037.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F *et al.* (2009) Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med*; 15:577-583.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline 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 i 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, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J *et al.* (2001) Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Mol Cell Endocrinol*; 183 Suppl 1:S47-49.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H i Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn*; 19:846-851.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R i Wilton L (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet*; 106:210-217.

W

- Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B (1986) Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. *Perinatal Genetics: diagnosis and treatment*. In: Porter L, Willey A (eds), Academic press, New York; 133-148.
- Weise A, Liehr T, Claussen U i Halbhuber KJ (2005) Increased efficiency of fluorescence in situ hybridization (FISH) using the microwave. *J Histochem Cytochem*; 53:1301-1303.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH i Delhanty JD (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res*; 27:1214-1218.
- Wells D i Delhanty JD (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*; 6:1055-1062.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD i 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, Bermudez M, Steuerwald N, Chu L, Weier U, Cohen J i Munne S (2004) Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. In Papp ZaR, C (ed) *Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis*, Medimond, Bologna, Italy.
- Wells D, Alfarawati S i Fragouli E (2008) Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod*; 14:703-710.
- Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marelllo E, Hill D i Munne S (2003) Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*; 80:467-468.
- Wilton L (2005) Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update*; 11:33-41.

Z

- Zhang X, Trokoudes KM i Pavlides C (2009) Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula and blastocyst stage. *Reprod Biomed Online*; 19:526-531.
- Zheng WT, Zhuang GL, Zhou CQ, Fang C, Ou JP, Li T, Zhang MF i Liang XY (2005) Comparison of the survival of human biopsied embryos after cryopreservation with four different methods using non-transferable embryos. *Hum Reprod*; 20:1615-1618.

