

**Anàlisi citogenètica preimplantacional:
alteracions cromosòmiques numèriques i
estructurals**

Memòria presentada per Aïda Pujol Masana per a aspirar al grau de
Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de
doctorat de Biologia Cel·lular

Aïda Pujol Masana

Bellaterra, Març del 2005

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

CERTIFIQUEN:

Que Aïda Pujol Masana ha realitzat sota la seva direcció, a la Unitat de Biologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball que, per optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona en el programa de Doctorat de Biologia Cel·lular, presenta amb el títol següent:

Anàlisi citogenètica preimplantacional: alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals

Dra. Joaquina Navarro

Dr. Jordi Benet

Bellaterra, Març del 2005

AGRAÏMENTS

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

- Ministeri de Sanitat (FIS PI-020168)
- DURSI (2001 SGR-00104)
- Fundació Catalana Síndrome de Down / Marató de TV3 (1994-98)
- Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.

He estat beneficiària d'una beca predoctoral de formació de personal investigador, FI/FIAP, entre els anys 2000 i 2003, ambdós inclosos. Així mateix, se'm va concedir una borsa de viatge per a una estada a l'estranger associada a la beca FI/FIAP a l'any 2003 que em va permetre estar un mes al Centre de biologia reproductiva de la universitat lliure de parla flamenca de Brussel·les.

- Comissió de Política Lingüística de la UAB.

M'ha concedit un ajut per redactar tesis doctorals en català que ha permès que la redacció d'aquesta tesi hagi estat corregida pel gabinet de llengua catalana de la UAB.

També, el meu agraïment a les clíniques que han permès desenvolupar els nostres projectes:

- Institut Universitari Dexeus
- Clínica Eugin
- Hospital Clínic

Gràcies a Xavier Flotats per la impressió de la tesi.

Finalment, moltes gràcies a tots els que m'han fet costat durant aquest temps:

Pares
Gustau Carla
Edgar **Família** Paula
Àvia Avis
Oncles Max

Quima i Jordi
Imma Maria
Montse **UAB** Cristina G
Àngels N Jorge
Cristina H Jordi
Ignasi Esther
Rosanna Àngels R

Companys de despatx,
de FISH, de Vysis,
d'amics invisibles, de
calçotades...

***MOLTES
GRÀCIES !!!***

Mercè
Mario Oriol
Ma José **Eugin** Sara
Gerard Ariadna

Anna V
Irene Montse
Bego **Dexeus** Itziar
Ma José Fina
Anna B

i un llarg etc.

Marga Colla Màsters
...

ÍNDEX

1. Introducció	1
1.1. La fecunditat en l'espècie humana	2
1.2. Les aneuploïdies en l'espècie humana	3
1.3. Tècniques de reproducció assistida (TRA)	4
1.4. Diagnòstic genètic preimplantacional	8
1.5. Estudi citogenètic de l'oòcit: utilització del 1r corpuscle polar	11
1.6. Diagnòstic genètic preimplantacional analitzant el 1r corpuscle polar	14
1.7. Diagnòstic genètic preimplantacional en pacients portadors de translocacions	15
2. Objectius	20
3. Material i mètodes	22
3.1. Material i mètodes de l'objectiu 1	23
3.1.1. Material emprat per a l'adequació de l'anàlisi del 1r corpuscle polar	23
3.1.2. Material emprat en una sèrie d'oòcits control: estudi del 1r corpuscle polar i la metafase II de l'oòcit	23
3.1.3. Mètode de biòpsia del 1r corpuscle polar	24
3.1.4. Fixació de cèl·lules aïllades, 1r corpuscle polar i metafase II, anàlisi usant contrast de fases i tractament previ a la hibridació in situ fluorescent	28
3.1.5. Hibridació in situ fluorescent en extensions del 1r corpuscle polar i metafase II	29
3.2. Material i mètodes de l'objectiu 2	32
3.2.1. Pacients amb cariotip normal. Característiques i antecedents clínics	33
3.2.2. Pacients portadores de translocacions. Característiques i antecedents clínics	33
3.2.3. Mètode utilitzat per al diagnòstic genètic preimplantacional analitzant el 1r corpuscle polar	35
3.3. Material i mètodes de l'objectiu 3	39
3.3.1. Material objecte d'estudi	39
3.3.2. Mètode d'hibridació in situ fluorescent emprat	40
3.4. Material i mètodes de l'objectiu 4	41
3.4.1. Preparació d'un cultiu no sincronitzat de limfòcits estimulats i obtenció de cèl·lules de Sertoli	41

3.4.2. Mètode d'anàlisi: hibridació <i>in situ</i> fluorescent	42
4. Resultats	44
4.1. Anàlisi d'aneuploidies en una sèrie d'oòcits descartats de cicles de FIV	45
Article publicat: <i>Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. European Journal of Human Genetics</i> 2003; 11: 325-336	
	46
4.2. Anàlisi d'aneuploidies en la línia germinal femenina	47
4.2.1. Pacients amb cariotip normal	47
4.2.2. Pacients portadores de translocacions	50
Article publicat: <i>Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. Reproduction</i> 2003; 126: 701-711	
	53
4.3. Estudi d'aneuploidies en cèl·lules embrionàries de pacients portadores de translocacions recíproques	54
Article pendent de publicació: <i>The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers</i>	
	56
4.4. Estadi replicatiu de la cromatina en cèl·lules proliferants. Avaluació de la interpretació dels resultats de la tècnica d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent	57
Article publicat: <i>The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD. Cytogenetic and Genome Research</i> 2004; 105: 29-35	
	59
5. Discussió	60
5.1. Anàlisi d'aneuploidies en oòcits descartats de cicles de FIV	61
5.2. Anàlisi d'aneuploidies en la línia germinal femenina	64
5.2.1. Pacients amb cariotip normal	64
5.2.2. Pacients portadores de translocacions	66
5.3. Estudi d'aneuploidies en cèl·lules embrionàries de pacients portadores de translocacions recíproques	69
5.4. Estadi replicatiu de la cromatina en cèl·lules proliferants i errors en la interpretació dels resultats de la tècnica d'hibridació <i>in situ</i> fluorescent	73
6. Conclusions	76
7. Bibliografia	79

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La fecunditat en l'espècie humana

És ben sabut que la fecunditat, o capacitat que té una parella d'aconseguir un embaràs en un període de temps concret, disminueix a mesura que augmenta l'edat materna, i això succeeix tant en les parelles fèrtils com en les infèrtils. En la població general la fecunditat està al voltant del 20% (ESHRE Capri Workshop Group 2000), però la majoria de parelles que acudeixen als centres de reproducció assistida tenen una fecunditat inferior al 10% i les tècniques de reproducció assistida (TRA) augmenten la probabilitat d'aconseguir un embaràs. Si aquestes parelles se sotmeten a una inseminació artificial intrauterina, poden aconseguir una taxa d'embaràs del 20,9% si la pacient té menys de 30 anys, del 14% si té entre 30 i 34 anys, del 18,7% si té entre 35 i 39 anys i només d'un 8% si supera els 40 anys. Si les parelles decideixen realitzar un cicle de fecundació *in vitro* (FIV), la taxa d'embaràs per punció pot arribar al 57,5% en dones menors de 30 anys; en dones de 30-34 anys passa a ser del 51,5%, baixa al 39,1% als 35-39 anys i a partir d'aquí té una davallada important, que arriba al 17,4% als 40-44 anys i fins a un 5,6% si les pacients tenen o superen els 45 anys (dades de control intern sense publicar, Institut Dexeus 2002).

S'estima que un 75% de les dones que comencen a buscar el primer embaràs als 30 anys l'aconseguiran en un any. Aquest percentatge baixa al 66% en dones que comencen als 35 anys i al 44% en dones que ho fan als 40 anys (Leridon 2004). Això fa que la mitjana d'edat dels pacients que acudeixen als centres de reproducció assistida sigui força elevada. Segons la Societat Americana per a la Medicina de la Reproducció (ASRM) (American Society for Reproductive Medicine 1998), el 42,7% de les pacients sotmeses a cicles de FIV als Estats Units durant l'any 2000 tenien entre 35 i 40 anys. A Catalunya, el 38,7% de les pacients que es van sotmetre a un cicle de FIV convencional l'any 2001 tenien entre 35 i 39 anys (FIVCAT 2001).

Les modificacions en la capacitat de l'embrió per a implantar-se a l'úter matern poden ser determinants en la davallada de la fertilitat en augmentar l'edat materna. Alteracions en els senyals entre l'úter i l'embrió en estadi de blastocist poden impedir la implantació o fer-la fallar (Macklon et al. 2002). Alguns factors endometrials poden també contribuir negativament a l'establiment de l'embaràs; entre d'altres factors s'ha indicat: un baix reg

sanguini a l'úter; una inadequada proliferació endometrial, que provocaria una reducció en la receptivitat endometrial i fracàs en la implantació; un increment de les concentracions hormonals en l'úter, que provocaria possibles efectes deleteris (Meldrum 1993).

Una altra causa en la disminució de la fecunditat és la baixa capacitat funcional dels embrions que es produeixen, que és deguda, en part, a alteracions en les característiques dels oòcits dels quals provenen. Anomalies en el citoplasma de l'oòcit podrien afectar el desenvolupament embrionari; per exemple, anomalies en proteïnes citosòliques que regulen la progressió al llarg de la meiosi i la funció dels microtúbuls (Krey i Grifo 2001) o alteracions mitocondrials, que provocarien també una alteració en el fus i un augment en la concentració de superòxids (Bartmann et al. 2004). El factor que s'ha indicat com el més relevant que pot comprometre el potencial de desenvolupament dels oòcits és l'increment d'alteracions cromosòmiques numèriques, que acaba afectant el desenvolupament o la viabilitat dels embrions (Los et al. 2004).

1.2. Les aneuploïdies en l'espècie humana

Les alteracions cromosòmiques numèriques són aquelles en què està alterat el nombre de cromosomes, que en l'espècie humana és de 46 cromosomes (dotació diploide) en cèl·lules somàtiques i de 23 cromosomes (dotació haploide) en gàmetes. Dins d'aquest tipus d'anomalies es troben les alteracions del nombre de complements cromosòmics, que inclouen les triploïdies (el total de cromosomes que presenta la cèl·lula és de 69) i les tetraploïdies (el total de cromosomes és de 92). Aquest tipus d'alteracions són de letalitat primerenca, poden permetre la implantació i l'inici del desenvolupament embrionari però no s'han descrit nounats que la manifestin (Jacobs i Hassold 1995).

Un altre tipus d'anomalia numèrica, l'aneuploïdia, afecta el nombre de cromosomes de la dotació cromosòmica; per exemple, trisomia i monosomia són, respectivament, l'excés i el defecte d'un cromosoma respecte del parell de cromosomes homòlegs. L'aneuploïdia pot afectar tant cromosomes autosòmics com sexuals. La majoria de monosomies i trisomies autosòmiques no són viables i els embrions que les pateixen interrompen el seu desenvolupament durant l'embaràs o el període

perinatal; per això és freqüent diagnosticar-les en productes d'avortaments espontanis (Jacobs i Hassold 1995). Algunes aneuploïdies permeten que l'embaràs arribi a terme i el nounat sobrevisqui, però, si és així, pateix múltiples malformacions o problemes cognitius. En aquest grup es troben les alteracions que afecten els cromosomes sexuals. La síndrome de Turner (45, XO), que es detecta en un de cada 5.000 naixements, és l'única monosomia viable en l'espècie humana, la seva incidència en avortaments és del 7%, que corresponen al naixement únicament del 3% dels embrions portadors. Així mateix, la síndrome de Klinefelter (47, XXY) apareix en un de cada 1.000 nounats vius, que correspon al naixement del 55,3% dels embrions portadors. Hi ha algunes trisomies autosòmiques viables, com per exemple la trisomia 21 (síndrome de Down), que és la trisomia més comuna en humans i és l'única que permet el desenvolupament fins a una edat adulta; té una incidència d'un de cada 667 nounats, que correspon al naixement del 22,1% dels embrions portadors. La trisomia 18 (síndrome d'Edwards) apareix en un de cada 6.250 nounats, corresponents al naixement del 5,4% dels embrions portadors. Finalment, la trisomia 13 (síndrome de Patau) té una incidència d'un de cada 12.048 nounats, que corresponen al naixement del 2,8% dels embrions portadors. Les dues darreres síndromes tenen una mortalitat de més del 90% en els primers mesos de vida (Jacobs i Hassold 1995) (Solari 1996) (Egozcue et al. 2000). El risc de fetus trisòmics observat en embarassos clínicament reconeguts és de l'1,9% en dones d'entre 25 i 29 anys i augmenta fins a un 19,1% si la mare supera els 39 anys (Hassold i Chiu 1985).

1.3. Tècniques de reproducció assistida (TRA)

El desenvolupament i l'aplicació de les TRA, tant mitjançant la inseminació intrauterina com emprant la FIV convencional (Steptoe i Edwards 1978) o bé aplicant la microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) (Palermo et al. 1995), fan possible que parelles amb problemes d'esterilitat o infertilitat tinguin descendència.

El primer naixement descrit en mamífers fruit d'una fecundació *in vitro* va ser el d'un conill (Chang 1959). La primera persona nascuda al món com a conseqüència d'una FIV va ser Louise Brown, que va néixer al Regne Unit el 1978 gràcies al treball de l'equip de Robert Edwards (Steptoe i Edwards

1978), i el primer naixement a Espanya, el de Victòria Anna Sánchez Perea, va ser el 1984 a la Clínica Dexeus de Barcelona (Barri et al. 1984).

La metodologia emprada per a la FIV està actualment molt estandarditzada, les seves etapes principals es mostren a la figura 1 i es resumeixen a continuació. Mitjançant una punció fol·licular, s'obtenen els líquids fol·liculars que contenen els oòcits de la pacient prèviament sotmesa a una estimulació hormonal. Aquests oòcits estan acompanyats de les cèl·lules del cúmulus oòfor, anomenats en conjunt complexos cúmulus oòcit (CCO). Paral·lelament, es processa una mostra de semen per a seleccionar els espermatozoides mòbils i eliminar el plasma seminal. En la FIV convencional, es col·loquen dos o tres oòcits amb els espermatozoides (aproximadament 100.000) en una placa de cultiu que conté el medi de cultiu adequat, i es guarden a 37°C, 6% de CO₂ i 95% d'humiditat en una incubadora. En la FIV amb ICSI (FIV-ICSI), els oòcits s'alliberen de les cèl·lules del cúmulus, s'identifiquen i es classifiquen segons la seva maduresa, i els madurs, que estan en estadi de metafase II, s'inseminen d'un en un mitjançant ICSI i es posen a la incubadora. Tot això es realitza durant el que s'anomena *dia 0* (D+0). Entre 16 i 20 hores després de la inseminació (D+1), es valora si hi ha hagut fecundació per la presència dels dos pronuclis (2PN) resultants de la descondensació del material genètic masculí i femení, i s'observen també els dos corpuscles polars (CPs). L'oòcit fecundat s'anomena *zigot*. L'endemà (D+2) el zigot passa a ser un embrió d'unes quatre cèl·lules (anomenades *blastòmers*), el D+3 té entre sis i vuit cèl·lules, el D+4 l'embrió està en estadi de mòrula i les cèl·lules compacten i, finalment, el D+5 o D+6 les cèl·lules ja es diferencien i l'embrió passa a l'estadi de blastocist. Aquest és l'últim estadi en què es pot cultivar un embrió *in vitro*, ja que el blastocist en poques hores eclosiona (*hatching*), és a dir, surt de la coberta que l'envolta (zona pel·lúcida, ZP) i està a punt per a la implantació. El D+2 o D+3 és quan se sol realitzar la transferència d'un o dos embrions a l'úter matern, tot i que també es poden transferir embrions en estadi de blastocist.

L'aplicació d'aquestes tècniques ha permès accedir a un material fonamental per a l'estudi de les aneuploïdies, gàmetes (oòcits i espermatozoides) i embrions en els estadis més primerencs del seu desenvolupament. Així

doncs, es poden analitzar tant oòcits com embrions que, per les seves característiques d'inviabilitat, han estat descartats dels cicles de FIV.

Dins el marc de les TRA, aplicant tècniques de citogenètica clàssica i molecular, s'ha estudiat la presència d'aneuploïdia en l'oòcit en relació amb l'edat materna i s'ha detectat un increment en l'índex d'aneuploidies en oòcits de dones d'edat avançada (Plachot et al. 1988) (Navot et al. 1991) (Angell et al. 1993) (Dyban et al. 1996) (Márquez et al. 1998) (Petit et al. 2000). S'han estimat freqüències d'oòcits aneuploides del 4,9%, 11,5% i 29,8% en grups de dones de 25 a 34 anys, de 35 a 39 anys i de 40 a 45 anys, respectivament (Dailey et al. 1996). També s'ha intentat seleccionar els embrions cromosòmicament normals mitjançant l'estudi acurat de la seva morfologia (Plachot et al. 1990) o cultivant-los fins a l'estadi de blastocist (Ménezo et al. 1992), però els resultats no han estat prou satisfactoris. Entre un 15% i un 66% dels embrions considerats morfològicament normals han resultat ser aneuploides (Harper et al. 1995) (Munné et al. 1995a) (Gianaroli et al. 2001) i, per altra banda, s'ha vist que només el 37% dels embrions que arriben a l'estadi de blastocist són cromosòmicament normals (Sandalinas et al. 2001).

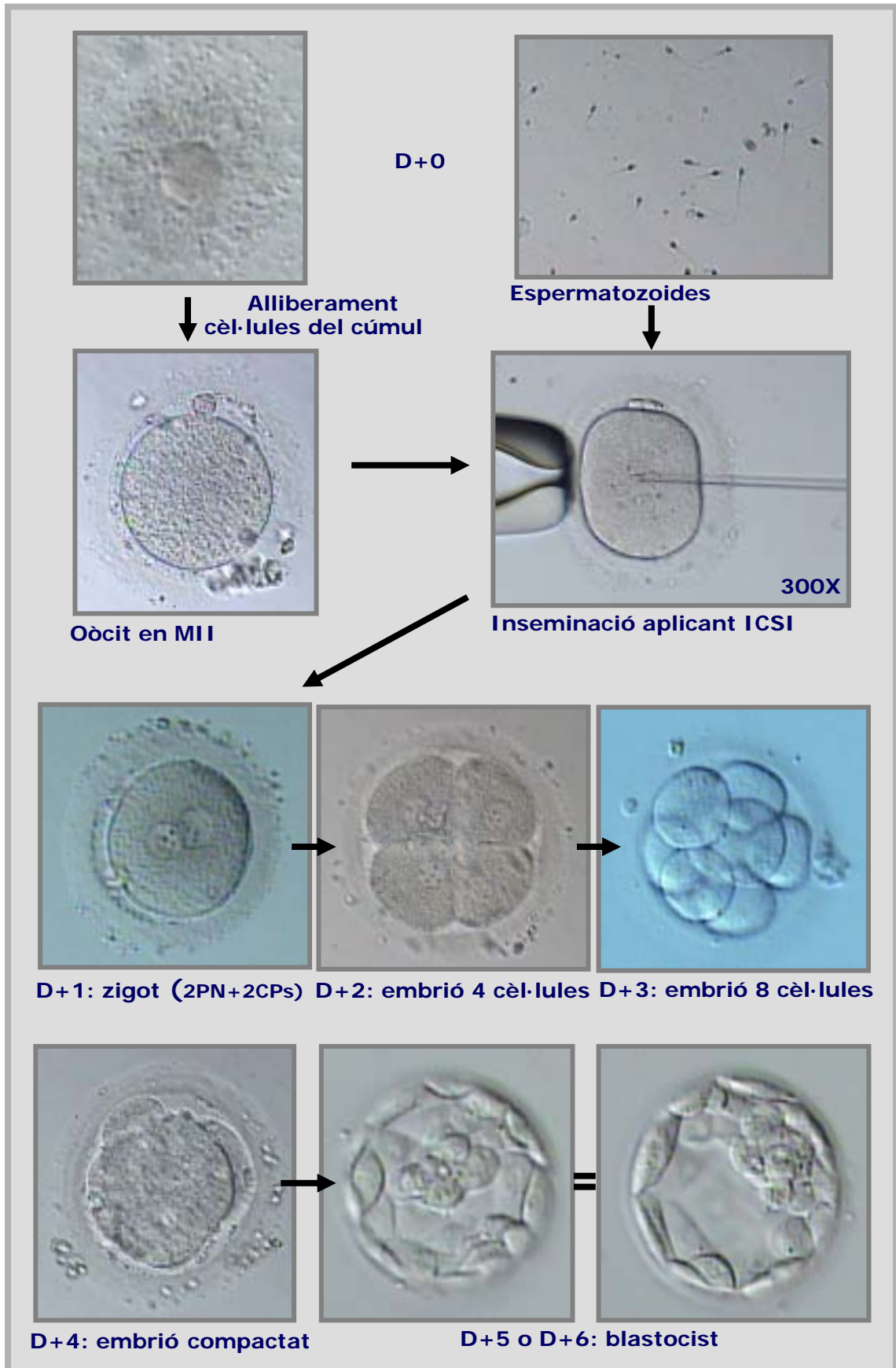


Figura 1: Etapes d'un cicle de FIV-ICSI des de D+0 fins a D+6

1.4. Diagnòstic genètic preimplantacional

L'evidència d'aneuploides en els embrions humans (Angell et al. 1983) va augmentar l'interès per a conèixer-ne la constitució cromosòmica. Aquest fet va portar com a conseqüència el desenvolupament del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) (Handyside et al. 1990). El DGP és una tècnica que s'ha de realitzar dins un cicle de FIV i que consisteix a biopsiar i posteriorment analitzar un o dos blastòmers quan l'embrió es troba en estadi de sis a vuit cèl·lules (D+3). El DGP ha estat aplicat, bàsicament, per a la detecció d'alteracions gèniques mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Handyside et al. 1990) o bé per detectar anomalies cromosòmiques mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (FISH) (Munné et al. 1993) o hibridació genòmica comparada (CGH) (Voullaire et al. 2000) (Wells i Delhanty 2000) (Wilton et al. 2003). Des de la seva aparició, el seu ús s'ha anat incrementant progressivament. Sermon et al. (2004) fan una àmplia revisió dels mètodes usats. Dades revisades l'any 2002 indiquen que, fins llavors, s'havien fet més de 4.000 cicles de FIV amb DGP que van donar lloc al naixement de més de 500 nadons, el seguiment dels quals avala la seguretat d'aquesta tècnica (Kuliev i Verlinsky 2002).

En estudiar els blastòmers d'un embrió, un dels problemes que sorgeix és l'alta incidència de mosaïcisme, entès com la presència de diferents línies cel·lulars en un mateix embrió. La incidència de mosaïcisme detectada en embrions preimplantacionals ha estat del 57% (Baart et al. 2004), 60% (Los et al. 2004) o del 70% (Bielanska et al. 2002). Pel que fa als cromosomes involucrats en una translocació, aquesta incidència ha estat del 73% (Iwarsson et al. 2000), 98% (Emiliani et al. 2003) o del 100% (Malmgren et al. 2002). Tot i així, el DGP analitzant blastòmers és, actualment, el mètode més utilitzat, ja que permet la valoració tant de les alteracions d'origen patern com matern i, a més a més, el blastòmer, ateses la seva mida i plasticitat, és una cèl·lula relativament fàcil de manipular. Segons les dades de la Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia (ESHRE) (Sermon et al. 2005), el 96% de cicles de DGP realitzats entre l'any 1997 i l'any 2001 va utilitzar l'anàlisi del blastòmer. Els blastòmers són cèl·lules proliferants i estan freqüentment en interfase. Per morfologia externa és impossible distingir si els blastòmers estan en G1,

S primerenca o tardana o G2. També poden estar en mitosi, però això també és molt difícil de saber atenent únicament la morfologia cel·lular.

Quan es fa l'anàlisi citogenètica aplicant FISH sobre nuclis de blastòmer, s'empren sondes de DNA puntuals marcades amb fluorocroms que emeten un senyal definit, com ara sondes centromèriques (CEP), locus específics (LSI) i telomèrics (Tel), però no sondes de "pintat cromosòmic" (WCP), ja que produeixen senyals difosos i sobreposats. El criteri de comptatge generalment acceptat és considerar que hi ha dos cromosomes quan els senyals puntuals de FISH estan separats, com a mínim, una distància equivalent a la que ocuparien dos senyals (Munné i Weier 1996).

Com que, en una mateixa cèl·lula, la replicació de les diverses regions cromosòmiques no es dona de manera sincrònica en tota la cromatina, una de les dificultats més grans és interpretar alguns senyals de FISH. Pot costar interpretar alguns senyals dobles corresponents al resultat de la replicació de la regió estudiada o bé corresponents a l'existència de dosi cromosòmica extra i que informa d'una alteració. Aquest motiu és, probablement, el causant de la majoria dels errors comesos en el diagnòstic per FISH. Per exemple, ¿la visualització de tres marques d'hibridació correspon a una trisomia o a una disomia amb una de les dues marques duplicades a causa de la replicació d'una regió cromosòmica? ¿Un senyal d'hibridació doble correspon a la presència dels dos homòlegs d'un cromosoma? ¿Senyals molt junts corresponen a monosomia amb duplicació de regió cromosòmica a causa de la seva replicació?

Tot i que l'estudi citogenètic de blastòmers s'està aplicant àmpliament per a la selecció d'embrions per transferir en cicles de FIV, el paper que fa aquesta dificultat d'interpretació dels senyals d'hibridació a l'hora de l'anàlisi citogenètica no ha estat fins al moment, i malgrat la seva importància, estudiat efectivament.

El desenvolupament progressiu del DGP usant FISH sobre blastòmers s'ha dirigit al cribatge d'aneuploïdies (anomenat *screening* d'aneuploïdies, SA) per a conèixer la incidència de les anomalies cromosòmiques més freqüents en nounats (X, Y, 13, 18 i 21) i també per a l'estudi d'aquells cromosomes que podrien ser causants de la baixa taxa d'implantació i l'alt índex d'avortaments molt freqüents en dones d'edat avançada. En embrions de vuit cèl·lules, s'ha trobat un increment significatiu de l'índex d'aneuploïdies

per als cromosomes X, Y, 13, 18 i 21 del 4% en dones de 25 a 34 anys al 37% en dones de 40 anys o més (Munné et al. 1995a). En alguns estudis s'han analitzat fins a nou cromosomes diferents (Munné et al. 1998b) (Munné et al. 1999) (Gianaroli et al. 1999), fet que ha comportat una certa millora en l'èxit de les TRA en determinats grups de pacients; s'ha detectat una disminució en els avortaments (Munné et al. 1999) (Gianaroli et al. 1999) i fins i tot un augment en la taxa d'implantació embrionària (Gianaroli et al. 1999), tot i que la taxa d'embarassos evolutius no s'ha modificat (Egozcue et al. 2002). L'edat de 37 anys (Munné 2002) (Munné et al. 2002) s'ha considerat l'edat de risc a partir de la qual s'aconsegueixen millores en les TRA, la taxa d'implantació augmenta i els avortaments disminueixen quan es realitza un DGP en què s'analitzen de vuit a nou cromosomes. També s'ha observat una disminució en la taxa d'avortaments quan l'estudi es fa a pacients amb avortaments de repetició.

Segons l'última recopilació de resultats de DGP per al cribatge d'aneuploidies (DGP-SA), la taxa d'embaràs per punció (detectada per batec cardíac positiu) és del 17,9% (Sermon et al. 2005). Els resultats varien segons la indicació; així, la taxa d'embaràs és del 13,7% en parelles amb diversos fracassos de FIV, del 16,5% en dones d'edat avançada i del 22% en casos d'avortaments recurrents. Estudis en embrions de dones d'edat i de dones amb fallades d'implantació recurrents mostren que el 41,3% són anòmals i, d'aquests, un 70,8% són aneuploides (Kahraman et al. 2000). En un estudi d'aneuploidies en parelles amb avortaments de repetició en què s'analitzen els cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X i Y, s'ha trobat que el 70,7% dels embrions presenten alteracions, mentre que en el grup control el percentatge és del 45,1% (Rubio et al. 2003). Aquests autors indiquen que el 33% dels embrions de dones de < 37 anys sotmeses a FIV són aneuploides per a algun dels cromosomes estudiats; el percentatge es dobla (66%) si les pacients tenen ≥ 37 anys i augmenta fins al 70% en dones amb avortaments de repetició. També s'indica que una mateixa pacient presenta un índex d'aneuploidies semblant en els diversos cicles de FIV amb DGP realitzats.

Segons una revisió recent (Braude et al. 2002), el DGP-SA és la raó més comuna per a la realització d'un DGP en embrions i ja se n'han fet més de 2.000 cicles, però l'èxit de la tècnica està fortament influenciat per l'edat

materna i la història reproductiva de la parella. Així mateix, s'ha apuntat que haver tingut un embaràs trisòmic implica un augment en el risc de tenir embrions aneuploides (Munné et al. 2004).

1.5. Estudi citogenètic de l'oòcit: utilització del 1r corpuscle polar

Nicolaidis i Petersen (1998), estudiant l'origen d'aneuploïdies, van posar de manifest que un 90% de les aneuploïdies en l'embrió són degudes a una no-disjunció en la primera divisió meiòtica materna. Aquest origen majoritàriament matern fa interessant plantejar l'estudi de les aneuploïdies en els gàmetes femenins, que, com en el cas dels embrions, només pot dur-se a terme dins el marc d'un tractament de FIV.

Característiques particulars de la gametogènesi femenina permeten fer una anàlisi citogenètica d'oòcits madurs sense condicionar la seva capacitat de fecundació.

La gametogènesi femenina (figura 2) comença a l'etapa embrionària, al segon mes de gestació, mitjançant la proliferació mitòtica de les oogònies. Cada oogònia conté 23 parells de cromosomes homòlegs amb dues cromàtides cada un. Del tercer al novè mes d'embaràs, aquestes cèl·lules inicien la primera divisió meiòtica (meiosi I) i passen a ser oòcits primaris. Quan un oòcit primari arriba al final de la profase I, a l'etapa que s'anomena *dictiotè*, la meiosi s'atura. S'anomena *oòcit en estadi de vesícula germinal* (VG) l'oòcit primari aturat en dictiotè que ha acabat el creixement i que presenta un nuclèol estructurat a causa de l'alt índex de transcripció que té (figura 3).

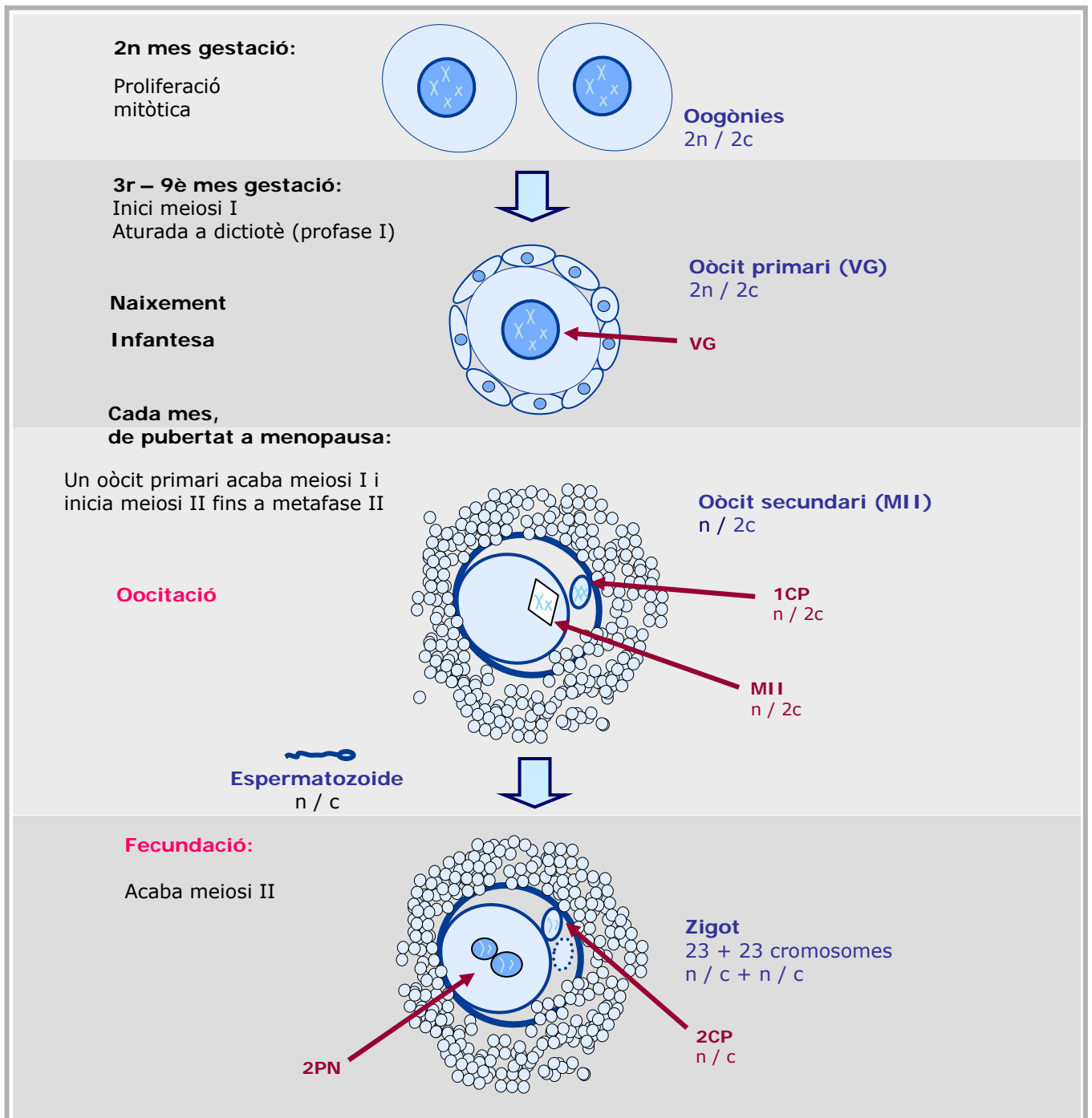
La meiosi es reprèn a partir de l'adolescència, quan s'inicia un cicle d'oocitació, moment en què l'oòcit primari progressa en la meiosi I, passa l'estadi de metafase I (figura 3) i entra a la segona divisió meiòtica (meiosi II). En aquesta divisió es redueix a la meitat la dotació cromosòmica, és a dir, dels 23 parells de cromosomes homòlegs, cada un amb dues cromàtides, la meitat (23 cromosomes amb dues cromàtides) és segregada a una cèl·lula que té capacitat reproductiva i l'altra meitat és segregada en el 1r corpuscle polar (1CP), cèl·lula sense funció reproductiva. Ambdues cèl·lules queden englobades dins la zona pel·lúcida i constitueixen l'oòcit secundari. En aquest punt, la meiosi torna a aturar-se i l'oòcit secundari resta en l'estadi de metafase II (MII) (figura 3). Anomenarem *MIII* a la

cèl·lula amb capacitat reproductiva que forma l'òocit secundari. És, doncs, en aquest estadi en què l'òocit secundari és expulsat del fol·licle en l'oocitació. La meiosi no es tornarà a reprendre a menys que hi hagi fecundació. Quan hi ha fecundació es produeix la segregació de la dotació cromosòmica de la MII de l'òocit secundari (23 cromosomes amb dues cromàtides). La meitat de la dotació (23 cromosomes amb una cromàtide) és segregada al 2n corpuscle polar (2CP), que serà extrudit. L'altra meitat de la dotació és retinguda per la cèl·lula amb capacitat reproductiva i, amb la generació dels 2PN corresponents a les dotacions haploides femenina i masculina, es forma el zigot (figura 1). Els dos CP acabaran degenerant durant el desenvolupament embrionari primerenc.

A causa d'aquestes característiques de l'oogènesi, en el moment de l'oocitació coexisteixen dues cèl·lules germinals germanes, la MII de l'òocit secundari i el 1CP, de característiques morfològiques molt diferents però que tenen dotacions cromosòmiques complementàries (figura 2).

L'anàlisi citogenètica de les MII i els seus corresponents 1CPs permet aprofundir en la incidència d'aneuploidies en la línia germinal femenina i en possibles mecanismes que les generen.

A més a més, és aquesta complementarietat entre ambdues dotacions cromosòmiques el que permet realitzar una caracterització indirecta del complement cromosòmic de la MII de l'òocit secundari a través de l'anàlisi del complement cromosòmic del corresponent 1CP (Verlinsky et al. 1990). Així, òocits indirectament identificats com a normals o els embrions que se'n deriven poden ser seleccionats i transferits en un cicle de FIV.



2n: 23 parells de cromosomes; n: 23 cromosomes

2c: 2 cromàtides per cromosoma; c: 1 cromàtide per cromosoma

Figura 2: Etapes de la gametogènesi femenina (oogènesi)

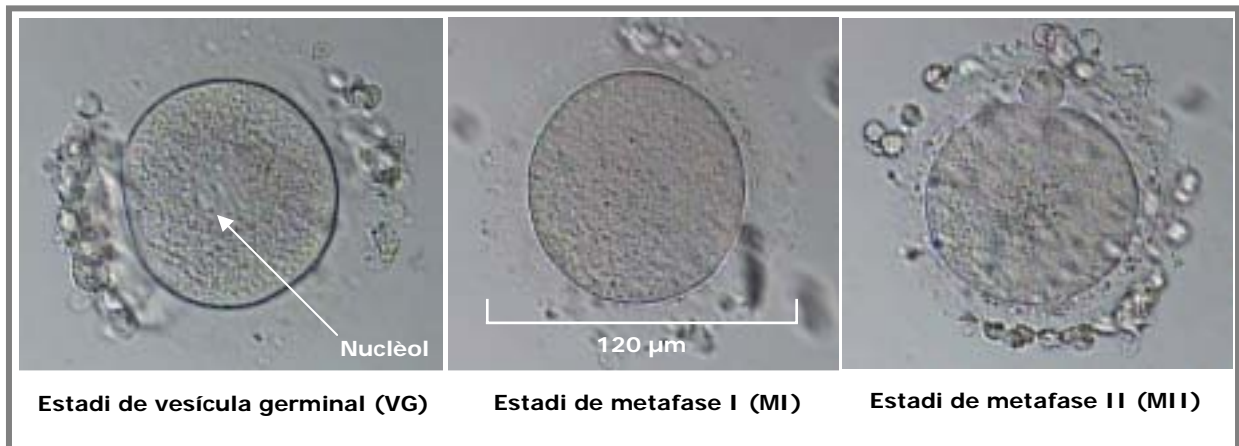


Figura 3: Oòcits en els diferents estadis de maduració vistos al microscopi invertit aproximadament a 300X (objectiu de 40X)

1.6. Diagnòstic genètic preimplantacional analitzant el 1r corpuscle polar

Tot això ha donat lloc al desenvolupament d'una variant del DGP en què el que s'analitza és el 1CP (DGP-1CP). Aquesta variant únicament s'aplica en casos en què l'alteració cromosòmica o gènica tingui un origen matern. Existeixen diversos avantatges en la realització d'un DGP-1CP. Com que el 1CP es troba en estadi de MII, se'n poden obtenir extensions cromosòmiques adequades per a la seva anàlisi posterior mitjançant FISH aplicant tot tipus de sondes cromosòmiques fluorescents, no únicament les puntuals: CEP, LSI i Tel, sinó també les WCP, que permeten identificar, en portadores de translocacions, complements cromosòmics normals, equilibrats i desequilibrats (Coonen et al. 2000) (Durban et al. 2001).

Per altra banda, el 1CP pot ser biopsiat immediatament després de la realització de la punció fol·licular en què s'obtenen els oòcits i això permet disposar del temps suficient per a l'aplicació de diverses rondes de FISH. Precisament, el fet de poder fer l'anàlisi abans de la fusió dels pronúclis masculí i femení permet considerar aquest mètode com a preconcepcional i, per això, és utilitzat en països com Alemanya o Suïssa, on la legislació impedeix l'anàlisi de cèl·lules embrionàries (Montag 2004). En casos en què la parella té algun tipus d'objecció moral a la selecció d'embrions, es pot biopsiar i analitzar el 1CP abans d'inseminar els oòcits (Munné et al. 2000). A més a més, analitzant el 1CP no existeix el problema del mosaïcisme.

El DGP-1CP s'ha aplicat a pacients portadores d'alteracions gèniques utilitzant la tècnica de PCR (Strom et al. 1990). La FISH també s'ha utilitzat en realitzar DGP-1CP per a l'anàlisi d'alteracions cromosòmiques estructurals (Munné et al. 1998c) (Durban et al. 2001) i en pacients amb un alt risc de tenir descendència amb alteracions cromosòmiques numèriques, bàsicament a causa de l'edat materna avançada (Verlinsky et al. 1995) (Munné et al. 1995b). S'ha aplicat el DGP-1CP mitjançant FISH per a l'anàlisi d'aneuploidies de fins a cinc cromosomes diferents (Munné et al. 2000) (Petit et al. 2002) (Kuliev et al. 2003) (Montag 2004). L'anàlisi del 1CP també s'ha fet en combinació amb l'anàlisi del 2CP (Verlinsky et al. 1995) (Dyban et al. 1996) (Kuliev i Verlinsky 2004) per a poder detectar tant les alteracions originades en la meiosi I com les generades a la meiosi II. Més recentment, s'ha realitzat DGP-1CP utilitzant una adaptació de la CGH en una pacient d'edat avançada (Wells et al. 2002). Per altra banda, s'estan assajant noves tècniques per a l'anàlisi d'oòcits i 1CPs com ara la *primed in situ* (PRINS) multicolor ultraràpida (Pellestor et al. 2004a), la utilització de sondes de tipus PNA (*peptid nucleic acid*) (Paulasova et al. 2004) (Pellestor et al. 2004b) o la FISH amb pintat de 24 colors, ja sigui M-FISH (*multi-fluorochrome karyotyping*) (Clyde et al. 2001) o SKY (*spectral karyotyping*) (Márquez et al. 1998), per a la seva futura aplicació en el DGP-1CP.

La detecció d'oòcits anòmals a través de l'anàlisi del 1CP és, doncs, una opció vàlida per a evitar la transferència a l'úter matern d'embrions procedents d'oòcits aneuploides, reduir la taxa d'avortament, millorar la implantació i així contribuir a augmentar l'índex d'embarassos en determinats grups de pacients, com ara les pacients d'edat reproductiva avançada i les portadores de reorganitzacions cromosòmiques.

1.7. Diagnòstic genètic preimplantacional en pacients portadors de translocacions

Les alteracions cromosòmiques de tipus estructural són aquelles que es produeixen per trencament cromosòmic, reordenació i fusió dels fragments generats que alteren l'estructura cromosòmica i donen lloc a translocacions, inversions, delecions, duplicacions o isocromosomes. Les alteracions cromosòmiques estructurals poden ser viables i no provocar alteracions

fenotípiques si la reordenació dels fragments no afecta la funció de gens importants de les cèl·lules. En aquest cas, pel que fa a les translocacions, es diu que la persona és portadora d'una translocació equilibrada i per això no ha de tenir cap tret fenotípic que ho denoti. Les translocacions equilibrades es donen en el 0,2% dels nounats, però aquesta freqüència augmenta al 0,6% en parelles infèrtils, al 3,2% en parelles amb fallades de cicles de FIV i fins al 9,2% en parelles fèrtils que han patit tres o més avortaments de primer trimestre (Stern et al. 1999). D'un 2% a un 3,2% dels homes que requereixen ICSI són portadors de translocacions equilibrades (Testart et al. 1996).

La translocació robertsoniana (fusió dels braços q de dos cromosomes acrocèntrics: 13, 14, 15, 21 i 22, per la zona del centròmer) (figura 4) és una forma molt comuna de reorganització cromosòmica i es dona en un de cada 900 nascuts. Si la translocació és equilibrada, no es produeixen efectes fenotípics.

Els portadors de translocacions robertsonianes equilibrades, com a conseqüència dels diferents tipus de segregació cromosòmica, sovint produeixen gàmetes desequilibrats i això comporta un risc reproductiu. La majoria de fetus portadors d'una translocació robertsonianes desequilibrada no sobreviuen i produeixen avortaments de primer trimestre, però, segons els cromosomes implicats, poden permetre el desenvolupament fins al naixement. Aquest seria el cas de les translocacions robertsonianes més freqüents, que són: la $t(13;14)(q10;q10)$, que es dona en un 75% dels portadors, i la $t(14;21)(q10;q10)$, que es dona en el 10% dels portadors (Miller i Therman 2001). De pares portadors d'aquestes translocacions poden néixer nadons portadors de trisomies 13 (síndrome de Patau) i 21 (síndrome de Down). Una mare portadora de $t(14;21)(q10;q10)$ té un risc del 10% de tenir un fill amb síndrome de Down, i un pare portador té un risc de l'1% al 3%.

Pares amb un fill afecte de trisomia 21 tenen un risc del 10% al 30% de tenir un altre fill afectat (Scriven et al. 2001) (Braude et al. 2002).

La translocació recíproca (intercanvi de dos segments cromosòmics, normalment terminals, entre els dos cromosomes no homòlegs) (figura 4) és la forma més comuna d'alteració cromosòmica i es dona amb una freqüència d'un de cada 500 nascuts (Hook i Hamerton 1977). Si és

equilibrada, no té implicacions fenotípiques ja que no se solen donar guanys ni pèrdues de gens. Les manifestacions patològiques poden aparèixer només si els punts de trencament afecten la funció de gens importants. Com a conseqüència dels tipus diferents de segregació dels cromosomes implicats en la translocació, les cèl·lules germinals portadores d'una translocació recíproca poden generar 32 tipus de gàmetes i només dos són cromosòmicament normals (Scriven et al. 1998).

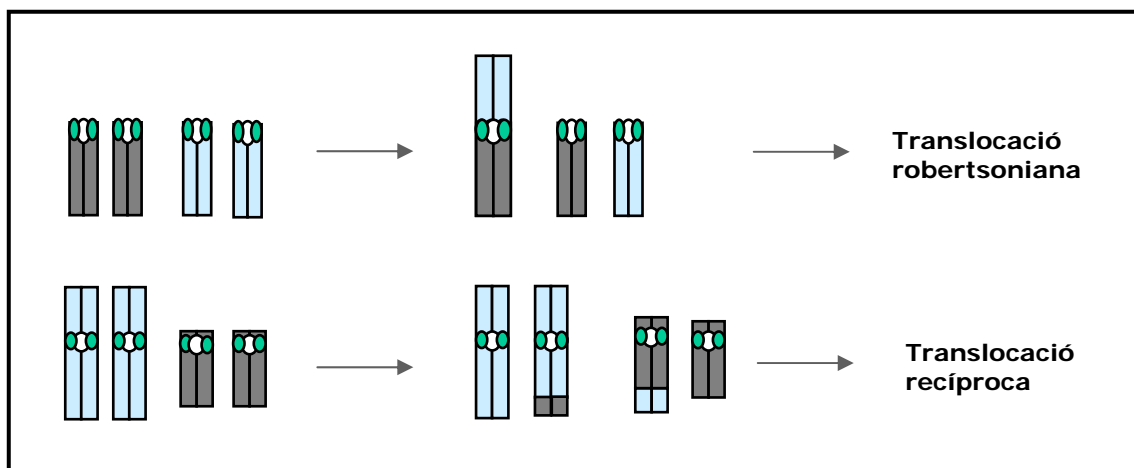


Figura 4: Esquema de les reorganitzacions cromosòmiques que es donen en les translocacions robertsonianes i recíproques

La producció de tants possibles tipus de gàmetes cromosòmicament desequilibrats en una freqüència tan alta fa que els portadors de translocacions recíproques pateixin freqüentment avortaments espontanis, tinguin serioses dificultats per a aconseguir descendència fenotípicament normal i tinguin un alt risc de generar descendència afectada d'un fenotip patològic.

El risc reproductiu específic de cada translocació recíproca depèn dels cromosomes involucrats en la translocació, dels punts de trencament i del nombre i la posició dels quiasmes (Ford i Clegg 1969). Per a un home portador d'una translocació recíproca equilibrada, les freqüències dels diferents tipus de segregació són molt variables i depenen de la translocació específica; el rang per a la segregació alternant és del 20% al 60% (Morel et al. 2004).

Per tots els punts esmentats, els pacients portadors de translocacions són un col·lectiu idoni per a l'aplicació del DGP per a seleccionar embrions

normals i equilibrats. S'han aplicat diferents estratègies de FISH utilitzant sondes CEP, Tel o LSI per a la detecció dels cromosomes derivatius tant en translocacions recíproques com robertsonianes (Conn et al. 1998) (Munné et al. 1998a) (Pierce et al. 1998) (Van Assche et al. 1999).

També s'ha descrit com a mètode efectiu l'obtenció de cromosomes metafàsics de blastòmers resultants de la fusió de blastòmers humans amb zigots de ratolí. Aquesta tècnica s'ha aplicat conjuntament amb la FISH usant sondes WCP per a identificar els embrions cromosòmicament anòmals (Verlinsky i Evsikov 1999). Willadsen et al. (1999) van aconseguir condensar fins a l'estadi de metafase el material nuclear de blastòmers humans fusionant-los amb oòcits bovins criopreservats per induir l'estadi de metafase al nucli del blastòmer, la qual cosa va facilitar la seva anàlisi posterior usant FISH. Un altre mètode descrit per a seleccionar embrions normals o equilibrats ha estat el cultiu dels embrions fins a l'estadi de blastocist i la selecció sota criteris morfològics (Ménezo et al. 1997). Però altres estudis (Verlinsky i Evsikov 1999) (Evsikov et al. 2000) han suggerit que la presència de translocacions desequilibrades no limita l'habilitat de l'embrió per a assolir l'estadi de blastocist *in vitro*, per la qual cosa aquest mètode no sembla adequat per a la selecció d'embrions cromosòmicament normals o equilibrats.

Els resultats de DGP-1CP en pacients portadores de translocacions robertsonianes i recíproques han estat revisats per Durban et al. (2001). Aquests autors proposen realitzar la inseminació dels oòcits mitjançant ICSI just abans de fer la biòpsia del 1CP, cosa que permet aconseguir taxes de fecundació comparables a les obtingudes en els cicles de FIV-ICSI sense DGP. A més a més, el protocol proposat permet, si cal, analitzar un o dos blastòmers en aquells embrions en què no s'hagi pogut obtenir un diagnòstic a través del 1CP o bé quan es detecta una alteració cromosòmica que es pot corregir durant la segona divisió meiòtica.

En els casos en què s'aplica el DGP, la inseminació sempre es realitza mitjançant ICSI, ja que això evita una possible polipenetració dels espermatozoides i, com que és puntual en el temps, sincronitza l'evolució del conjunt de zigots i embrions obtinguts.

Kuliev i Verlinsky (2002) han suggerit que en aquest tipus de pacients el DGP ha d'incloure l'anàlisi de la segregació i també de les aneuploidies, ja

que actualment hi ha proves que la presència de la translocació constituïria un factor de risc per a l'aparició d'aneuploidies de cromosomes no implicats en la translocació.

La presència d'aneuploidies afectant cromosomes diferents dels implicats en la translocació seria un dels motius pels quals és freqüent que, tot i transferir embrions amb bona morfologia després d'un DGP en què s'analitza només la segregació dels cromosomes de la translocació, no s'aconsegueixi un embaràs. Així, Findikli (2003) observa que els portadors de translocacions tenen un alt risc de produir embrions amb un bloqueig o amb un alentiment en el desenvolupament i, per tant, tenen un augment del risc de patir fallades en cicles de FIV, que s'atribueix no només a la producció de gàmetes desequilibrats pels cromosomes implicats en la translocació, sinó també a la presència d'alteracions en altres cromosomes.

En aplicar DGP en portadors de translocacions i fer el cribatge d'aneuploidies per als cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, 1, 15, X i Y després d'analitzar els cromosomes implicats en la translocació, Gianaroli et al. (2002) suggereixen que en translocacions robertsonianes es donen efectes intercromosòmics (EIC), és a dir, la presència de la translocació afecta la segregació meiótica de cromosomes no implicats en la reorganització, fet que suposa un risc addicional de gestacions anòmales.

Sembla recomanable, doncs, que, en realitzar un DGP en parelles portadores, s'analitzin els cromosomes implicats i, a més a més, també altres cromosomes no implicats en la translocació (Gianaroli et al. 2002) (Kuliev i Verlinsky 2002).

Com que fins ara la taxa d'embaràs per punció aconseguida en DGP realitzats en parelles amb translocacions és força baixa tant per a les translocacions recíproques (12,2%) com per les robertsonianes (19,2%) (Sermon et al. 2005), és molt interessant valorar quina contribució poden tenir les aneuploidies de cromosomes no implicats en ambdós tipus de translocacions.

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és estudiar la incidència d'aneuploïdia en la línia germinal femenina i en la primera etapa del procés reproductiu. Per a la consecució d'aquest objectiu, hem plantejat els objectius concrets següents:

- 1.** Desenvolupar un mètode seqüencial de múltiple FISH per analitzar, en extensions de 1CPs i les corresponents metafases II de l'oòcit (MII), els nou cromosomes més àmpliament implicats en avortaments i fallades d'implantació (1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X). Realitzar un estudi seriat de parelles 1CP - MII d'oòcits descartats de cicles de FIV per tal de validar la tècnica tot valorant-ne la complementarietat.
- 2.** Analitzar la incidència d'aneuploïdia en oòcits de dones amb cariotip normal (dones d'edat avançada) i en dones portadores de translocacions, de les quals també s'analitzen els cromosomes implicats en la reorganització.
- 3.** Estudiar la incidència d'aneuploïdia en embrions de parelles un dels membres de les quals és portador d'una translocació recíproca.
- 4.** Validar la interpretació del resultat de la FISH en l'anàlisi d'aneuploïdia en cèl·lules proliferants.

3. MATERIAL I MÈTODES

Per a assolir els objectius plantejats, el treball s'ha realitzat en els apartats que s'exposen a la secció de resultats. Tot seguit es detalla el material i les metodologies emprats per a cada un d'aquests apartats.

3.1. Material i mètodes de l'objectiu 1

3.1.1. Material emprat per a l'adequació de l'anàlisi del 1r corpuscle polar

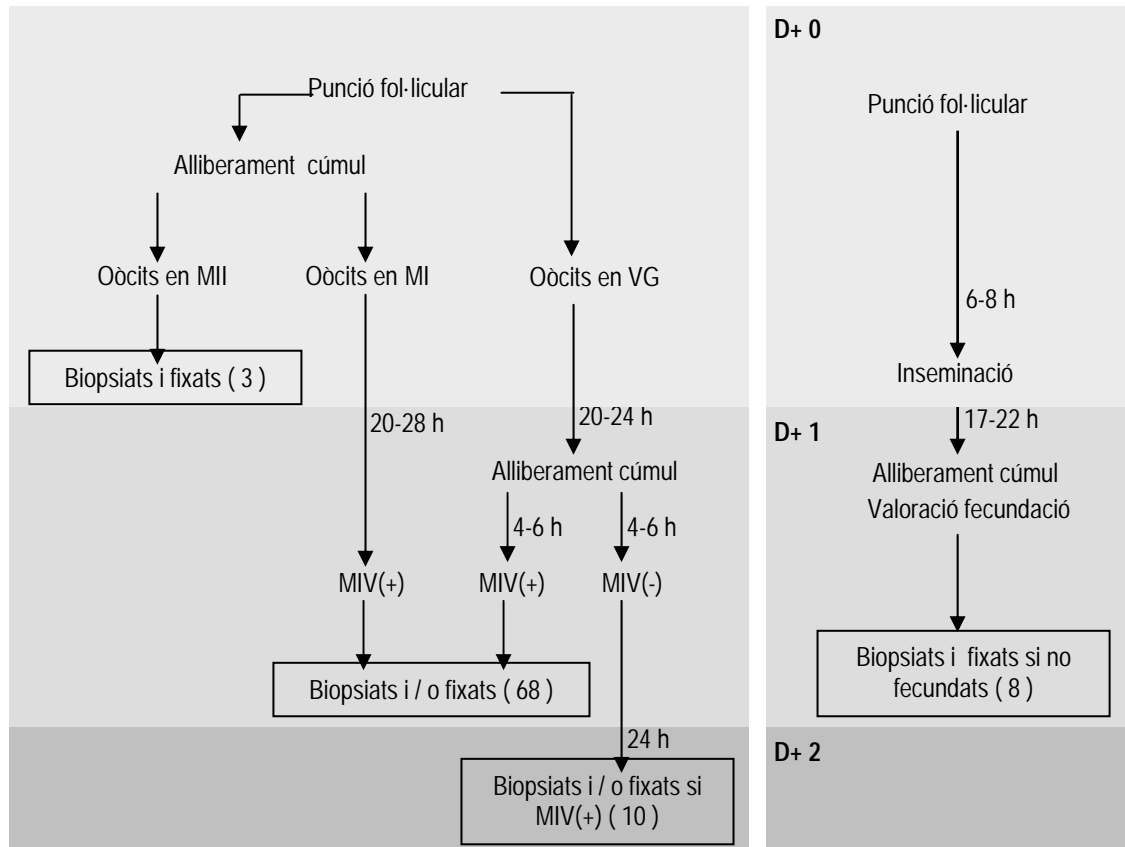
Per a disposar d'òocits humans descartats de cicles de FIV, necessaris per a la posada a punt del cribatge d'aneuploidies (SA) mitjançant la tècnica de FISH analitzant nou cromosomes en 1CP, es va demanar la col·laboració als següents centres de reproducció assistida: Hospital Clínic, Institut Universitari Dexeus i Clínica Eugin de Barcelona. Sota l'aprovació dels respectius comitès ètics, es van aconseguir 163 òocits en MII, dels quals 13 eren madurats *in vivo*, 138 madurats *in vitro* (MIV) i 12 eren no fecundats descartats de cicles FIV.

Amb els centres, es va optimitzar el mètode de biòpsia mecànica (Hospital Clínic i Clínica Eugin) i el mètode de biòpsia amb sistema làser (Institut Dexeus). També es va ajustar la coordinació necessària entre la realització de la biòpsia i la fixació del 1CP, en els quals participa el centre de FIV, i l'anàlisi citogenètica de les extensions cromosòmiques, que es realitza a la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.2. Material emprat en una sèrie d'òocits control: estudi del 1r corpuscle polar i la metafase II de l'òocit

En aquest apartat s'ha inclòs l'anàlisi d'extensions de 1CP o parelles 1CP-MII de 89 òocits descartats de cicles de FIV de 60 pacients d'edats compreses entre 18 i 45 anys, amb una mitjana d'edat de 33,7 anys. S'han estudiat tres òocits madurats *in vivo*, 78 de madurats *in vitro* (MIV) i vuit de no fecundats. Els òocits madurats *in vivo* procedien d'una pacient de la qual es van recuperar, el dia de la punció fol·licular, un nombre molt elevat d'òocits i que no va voler que s'inseminessin tots per evitar al màxim la congelació d'embrions. Els òocits MIV estaven en fase de vesícula germinal (VG) o bé de metafase I (MI) (figura 3) el dia de la punció fol·licular i, per tant, no eren útils per a inseminar, ja que la inseminació de MIV no és recomanable a causa de la baixa taxa de fecundació i divisió embrionària que s'assoleix (Strassburger et al. 2004). Aquests òocits es van deixar en

cultiu 24 o 48 hores, aproximadament, i es van incloure en l'estudi en assolir l'estadi de MII (figura 3). Dels 78 oòcits MIV, 68 van estar 24 hores en cultiu i 10 hi van estar 48 hores (figura 5). Els oòcits no fecundats havien estat tots sotmesos a una FIV convencional.



Entre parèntesis s'indica el nombre d'oòcits de cada tipus.

MIV (+): oòcits que han madurat *in vitro*.

MIV (-): oòcits que, malgrat haver estat cultivats *in vitro*, no han madurat fins a l'estadi de MII.

Figura 5: Esquema del procés de maduració *in vitro* dels oòcits utilitzats

3.1.3. Mètode de biòpsia del 1r corpuscle polar

En 73 oòcits s'ha realitzat una separació del 1CP i 16 oòcits s'han fixat sencers sense cap manipulació del 1CP. En tres dels 73 oòcits s'ha emprat una solució enzimàtica (tripsina a 30 mg/ml en PBS; Sigma; Espanya) per a dissoldre la zona pel·lúcida, i en els 70 oòcits restants s'ha biopsiat el 1CP per tècniques de micromanipulació.

Per a la biòpsia del 1CP, els oòcits es col·loquen cada un en una gota de medi de cultiu tamponat de 50 µl (per exemple, MOPS; Vitrolife; Göteborg) cobertes amb oli mineral. Amb l'ajut d'un micromanipulador acoblat a un

microscopi invertit (Nikon Eclipse TE 200 o Olympus IX70) equipat amb òptica de Nomarsky, es fa un tall d'entre 5 μm i 20 μm de diàmetre a la zona pel·lúcida de l'oòcit utilitzant un mètode mecànic (PZD: *partial zona dissection*) (figura 6) o bé un forat d'uns 20 μm amb l'ajut d'un làser (1,48 μm díode làser; Fertilase; Medical Technologies; Montreux; Suïssa) (figura 7). En 69 dels 70 oòcits es va aplicar el sistema làser. La biòpsia o recuperació del 1CP es fa utilitzant micropipetes fetes a mà o bé comercials (per exemple, K-EBPH-2535-5; Cook; Espanya) de 25 μm a 30 μm de diàmetre extern polides i angulades, suficientment amples per no danyar morfològicament la cèl·lula que es vol biopsiar. S'accedeix a l'espai perivitel·lí (EPV) de l'oòcit amb la micropipeta i el 1CP extret es col·loca a l'extrem oposat de la gota de medi per a evitar qualsevol risc per a l'oòcit durant la manipulació del 1CP i, tot seguit, es fixa.

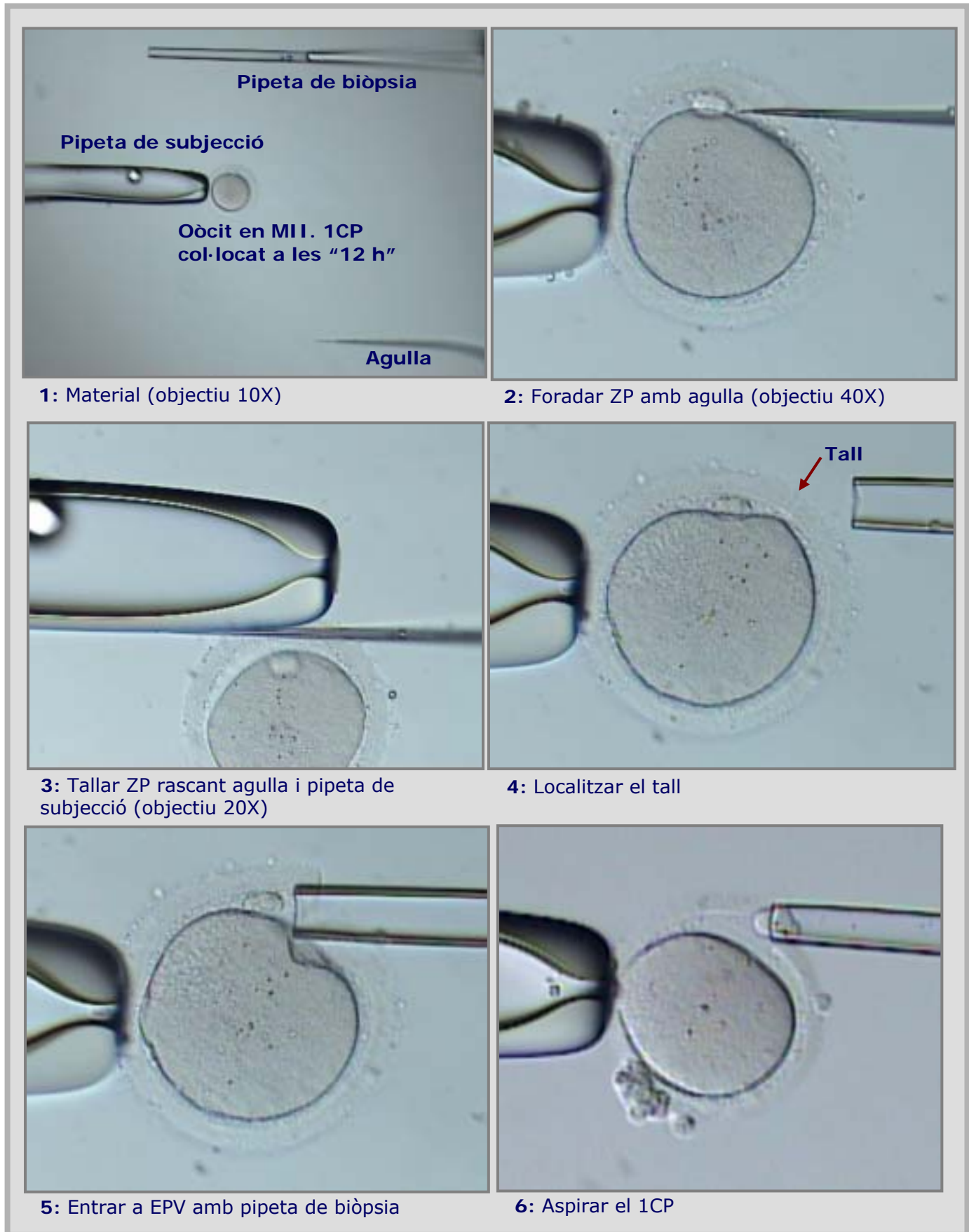


Figura 6: Passos per a realitzar una biòpsia de 1CP usant PZD

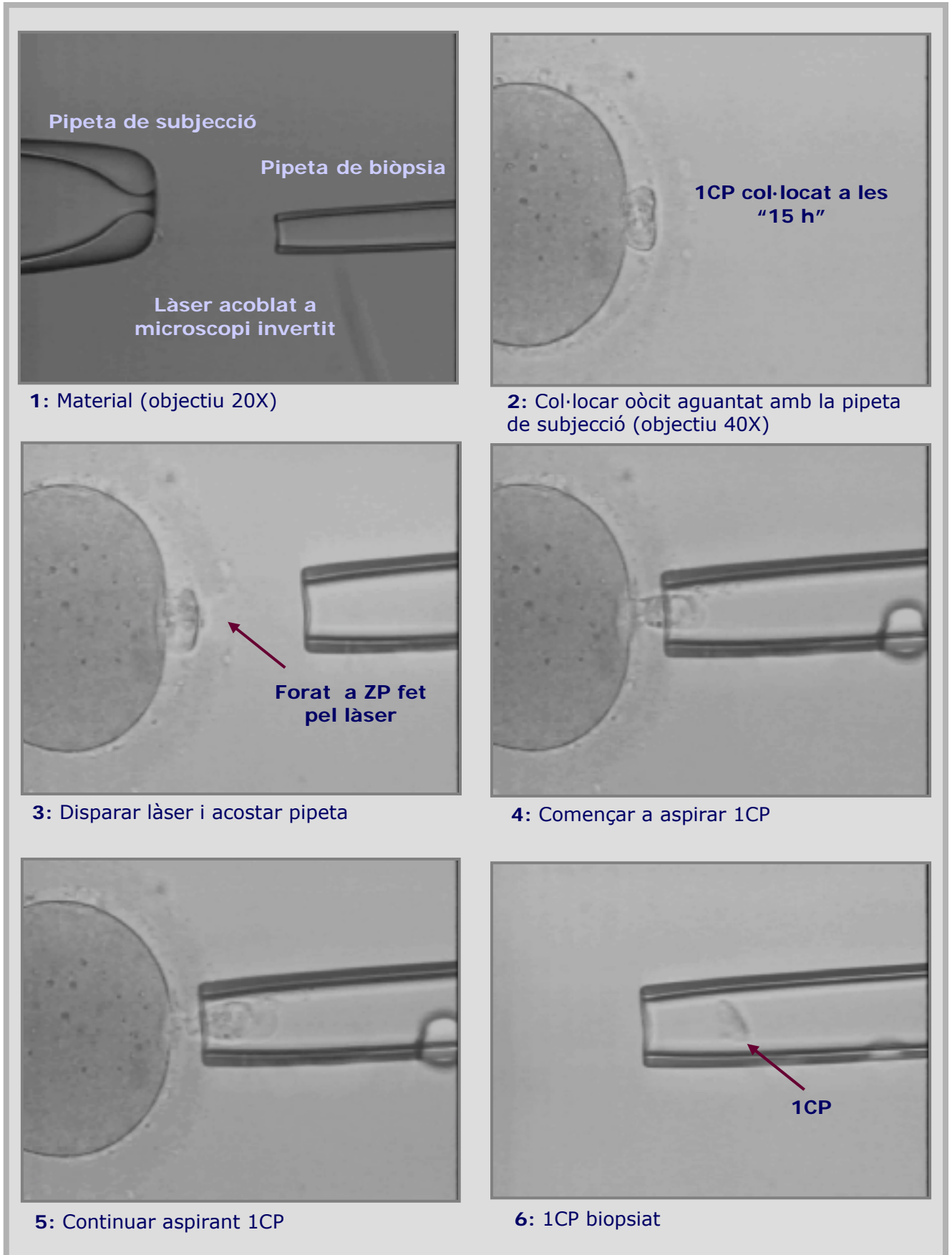


Figura 7: Passos per a realitzar una biòpsia de 1CP usant làser

3.1.4. Fixació de cèl·lules aïllades, 1r corpuscle polar i metafase II, anàlisi usant contrast de fases i tractament previ a la hibridació in situ fluorescent

La fixació del 1CP es realitza sobre portaobjectes i seguint una modificació de la tècnica descrita per Durban et al. (1998, 2001), que consisteix, breument, en el següent: s'utilitzen portaobjectes desengreixats amb èter-etanol i recoberts amb una solució de trimetoxisilà. Sempre sota control estereomicroscòpic, es col·loca el 1CP en una solució hipotònica de citrat sòdic al 0,5% durant 4 min i tot seguit es diposita sobre una zona marcada del portaobjectes juntament amb una petita quantitat d'hipotònic. Quan la gota d'hipotònic on és el 1CP comença a evaporar-se, s'agafen uns 20 µl de fixador (metanol o etanol: àcid acètic, a proporció 1:1) amb una pipeta automàtica i es posa la punta de la pipeta tocant el portaobjectes, aproximadament a mig centímetre del lateral de la gota d'hipotònic. Molt lentament es va deixant anar el fixador creant un flux de fixador cap al 1CP que desplaça la gota d'hipotònic sense que la cèl·lula es mogui, de manera que el 1CP quedi fixat a la zona del porta on l'havíem deixat i que ja està marcada. Les MII es fixen seguint la tècnica descrita per Tarkowski (Tarkowski 1966) però utilitzant com a fixador metanol: àcid acètic a proporció 1:1, i com a medi hipotònic, citrat sòdic al 0,5% durant 4 min.

Les extensions cromosòmiques de les cèl·lules fixades s'observen a contrast de fases al microscopi (Olimpus BX60; Olympus Optical Co.; Hamburg; Alemanya) (figura 8) i es capturen amb una càmera d'alta sensibilitat (Roger Scientific; Photometrics; Tucson; Arizona; EUA) i un ordinador Power Macintosh G3 equipat amb el programa Quips Lab Manager (Vysis; Nova York; EUA), amb el qual també s'emmagatzemen. Tot seguit, si l'extensió cel·lular té restes de membrana o citoplasma, se sotmet a un tractament enzimàtic controlat amb pepsina 50 µg/ml en HCl 10 mM (preparada a partir de pepsina 100 mg/ml, Sigma; Espanya), de 0,5 a 3 min i a 37°C.

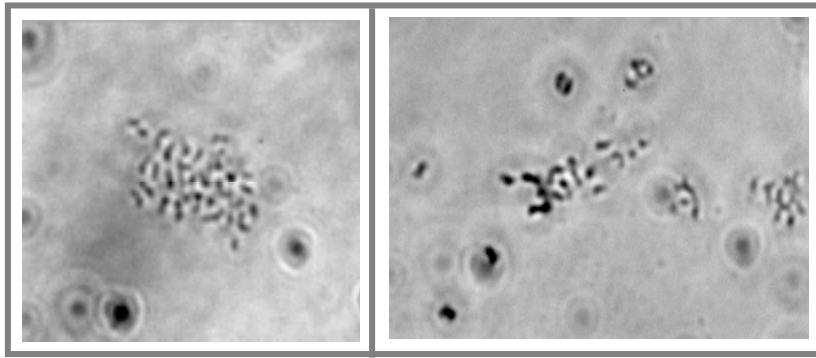


Figura 8: Extensions cromosòmiques de 1CP vistes a contrast de fases a 1600X (objectiu de 40X)
S'observa l'estadi de cromosomes en MII en què es troben

Després del tractament enzimàtic els portaobjectes s'esbandeixen amb aigua destil·lada a temperatura ambient i es deixen assecar a l'aire abans d'aplicar-los una gota de fixador Carnoy (metanol: àcid acètic, 3:1).

La majoria de preparacions cel·lulars s'han congelat a -20°C fins al moment de l'aplicació de la tècnica de FISH.

3.1.5. Hibridació in situ fluorescent en extensions del 1r corpuscle polar i metafase II

Per a poder hibridar les preparacions cel·lulars emmagatzemades, un cop tretes del congelador, es deixen a temperatura ambient uns 5 min i es deshidraten en solucions creixents d'etanol (70%, 80% i 95%, 2 min a cada una).

Prèviament a l'aplicació de la FISH, les preparacions es refixen amb solucions de PBS / 50 mM MgCl_2 (4 min), 3% formaldehid / PBS / 50 mM MgCl_2 (8 min) i PBS (4 min) i es deshidraten en banys successius d'etanol a concentracions creixents. Tot seguit es tenyeixen amb 4, 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI II; Vysis; Nova York) diluït a $\frac{1}{4}$ amb Antifade (Vectashield; Burlingame; California; EUA), es queda a una concentració final de 33 ng/ml (DAPI II $\frac{1}{4}$) i s'observen al microscopi de fluorescència. Les imatges es capturen per a disposar de la imatge corresponent a la morfologia del 1CP amb DAPI, prèvia a la realització de la FISH. Els cromosomes del 1CP es distingeixen dels de la MII perquè solen tenir la cromatina més desorganitzada (figura 9).

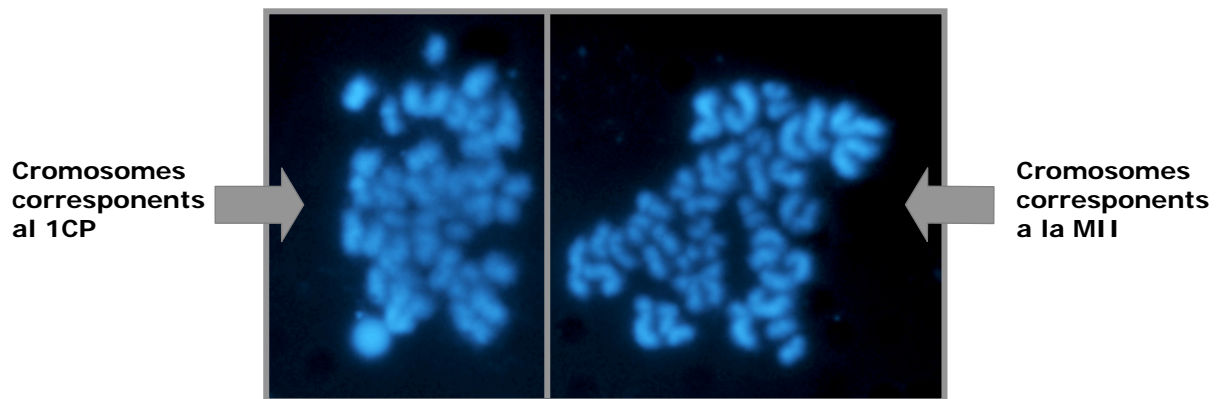


Figura 9: Extensió cromosòmica d'un 1CP i de la corresponent MII tenyits amb DAPI
Imatges vistes a 4000X (objectiu de 100X)

A continuació s'elimina el DAPI amb dos banys successius de 0,1% Tween 20 / 2 x SSC (0,15 M NaCl / 0,015 M citrat de Na) en agitació, deshidratació amb etanols (4 min a cada bany), assecatge a l'aire i després assecatge en una placa calefactada (Hybrite; Vysis; Nova York) a 45°C 4 min. Tot seguit, se sotmet els nuclis cel·lulars fixats a dues rondes de FISH utilitzant diferents combinacions de sondes. En la primera ronda, s'analitzen els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 amb sondes marcades, respectivament, amb els fluorocroms SpectrumRed, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGreen i SpectrumGold (MultiVysionPB Probe Panel; Vysis; Nova York) (taula 1). S'apliquen 0,5 µl de la solució d'hibridació a cada portaobjectes on hi ha el material cromosòmic fixat i es cobreix amb un cobreobjectes de 6 mm x 6 mm. Tot seguit se segellen els portes amb cola i es col·loquen a la placa calefactora a 72-73°C per a realitzar una codesnaturalització del DNA nuclear i de les sondes. A continuació es dipositen els portaobjectes en una cambra humida a 37°C tota la nit.

Taula 1: Sondes utilitzades en l'anàlisi d'aneuploidies.

S'indica el tipus de sonda, la regió cromosòmica marcada i els fluorocroms

Tipus de sonda	Regió cromosòmica	Fluorocrom
CEP 1	1p11 – q11, locus D1Z5	SpectrumOrange
LSI 13	13q14	SpectrumRed
CEP 15	15p11.2, locus D15Z1	SpectrumGreen
CEP 16	16q12.1 – q13, locus D16Z3	SpectrumAqua
CEP 17	17p11.1 – q11.1, locus D17Z1	SpectrumOrange i SpectrumGreen
CEP 18	18p11.1 – q11.1, locus D18Z1	SpectrumBlue
LSI 21	21q22.13 – q22.2	SpectrumGreen
LSI 22	22q11.2	SpectrumGold
CEP X	Xp11.1 – q11.1, locus DXZ1	SpectrumAqua

Després de la hibridació, els portes es netegen en banys de 50% formamida (3 x 7 min); 2 x SSC (7 min) i 0,1% Tween 20 / 2 x SSC (5 min) en agitació i a 45°C, o bé en un bany de 0,4 x SSC (2 min) a 72°C i un bany de 0,1% Tween 20 / 2 x SSC (1 min) en agitació i a temperatura ambient; es deshidraten en solucions d'etanol a concentracions creixents. Seguidament es munten les preparacions amb 8 µl de solució Antifade o bé de DAPI II ¼ (Vysis; Nova York).

La visualització es fa en un microscopi d'epifluorescència Olympus BX 60 (Olympus Optical Co.; Hamburg; Alemanya) equipat amb la càmera mencionada i filtres per als fluorocroms utilitzats i acoblat a un ordinador Power Macintosh G3 amb *software* per Smartcapture (Digital Scientific Cambridge; Regne Unit) i IPLab (Scanalytics Inc.; Vysis; EUA), que permeten la captura de les imatges i l'anàlisi. El cromosoma 13 presenta marcatge fluorescent de color vermell, el 16 blau turquesa, el 18 blau fosc, el 21 verd i el 22 groc.

Tot seguit, es renten els portaobjectes de la manera descrita anteriorment: 0,1% Tween 20 / 2 x SSC (2 x 5 min) i deshidratació. A continuació es fa la segona ronda de FISH usant una mescla de sondes per als cromosomes X, 1, 15 i 17 marcades, respectivament, amb els fluorocroms SpectrumAqua, SpectrumOrange, SpectrumGreen i SpectrumOrange/SpectrumGreen

(Vysis; Nova York) (taula 1). Les sondes es mesclen en tubs d'Eppendorf, se centrifuguen a 600 g durant uns segons, s'homogeneïtzen al vòrtex i se centrifuguen de nou. La mescla es fa en les proporcions següents: 3 µl de la mescla de sondes (0,6 µl de cada una) i 7 µl d'amortidor d'hibridació per cada 10 µl totals de barreja preparats. S'apliquen 0,5 µl de la barreja per porta i s'usa el mateix protocol que a la primera ronda excepte que, després de la hibridació, sempre es contratenyeix amb 8 µl de DAPI II ¼ (Vysis; Nova York). Es fa la visualització, captura i anàlisi de les imatges de la manera descrita anteriorment.

El cromosoma 1 presenta marcatge fluorescent de color vermell, el 15 verd, el 17 s'observa groc per addició de marcatge vermell i verd i l'X el presenta blau turquesa.

A la figura 10 està resumit el procés descrit per a l'anàlisi d'òcits descartats de cicles de FIV.

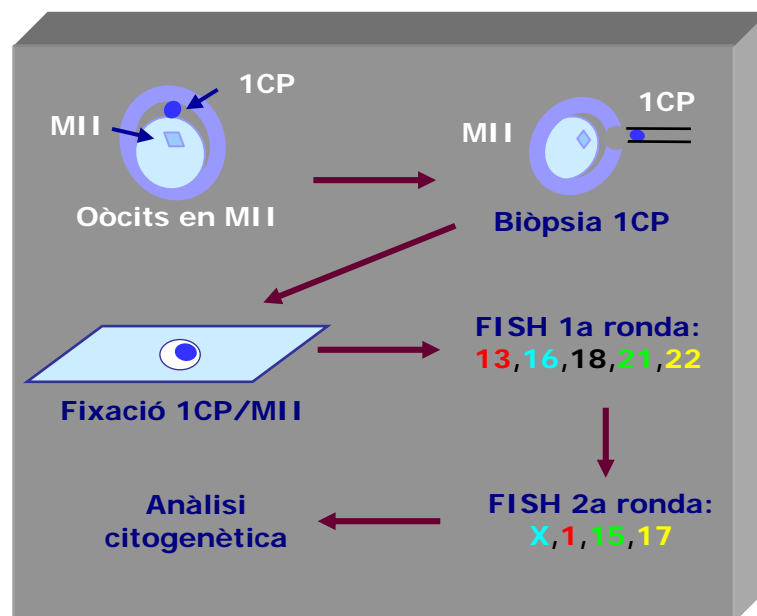


Figura 10: Esquema del protocol utilitzat per al criatge d'aneuploidies en 1CP d'òcits descartats de cicles de FIV

3.2. Material i mètodes de l'objectiu 2

Per a realitzar el criatge d'aneuploidies en línia germinal femenina, s'ha aplicat el diagnòstic genètic preimplantacional utilitzant 1CP (DGP-1CP) a cinc pacients candidates: dues pacients amb cariotip normal (PA 1 i PA 2) sotmeses a SA per edat avançada i tres pacients portadores de

translocacions (PT 1, PT 2 i PT 3) sotmeses a SA pel risc d'aneuploïdies a causa de la presència d'una translocació.

3.2.1. Pacients amb cariotip normal. Característiques i antecedents clínics

S'han realitzat dos DGP-1CP per SA en col·laboració amb dos centres de reproducció assistida. Les pacients a les quals s'ha fet l'estudi de 1CP tenien els historials clínics següents:

La primera pacient (PA 1) tenia 41 anys. El seminograma del seu marit mostrava una astenozoospermia. La parella, afectada d'infertilitat secundària, tenia un fill de cinc anys. S'havien sotmès a quatre cicles de FIV-ICSI i a una criotransferència amb embrions congelats resultants del tercer cicle. En tots els cicles s'havien transferit embrions però no s'havia aconseguit gestació. En el darrer cicle s'havia realitzat un DGP-SA analitzant blastòmers per als cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X i Y. S'havien obtingut sis embrions anòmals, un de no diagnosticat i dos embrions normals que es van transferir sense aconseguir gestació.

La segona pacient (PA 2) tenia 38 anys i era portadora d'anticossos pel VIH. La mostra de semen del seu marit era normal. S'havia sotmès a quatre cicles d'inseminació intrauterina sense èxit i també havia realitzat quatre cicles de FIV en els quals, tot i realitzar transferència d'embrions, tampoc no s'havia aconseguit embaràs.

3.2.2. Pacients portadores de translocacions: característiques i antecedents clínics

S'han realitzat tres DGP-1CP per a l'anàlisi de translocacions i aneuploïdies en col·laboració amb dos centres de reproducció assistida. En tots els casos s'han estudiat els cromosomes implicats en la reorganització i també els cromosomes 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21 i 22.

La primera pacient (PT 1) tenia 34 anys i era portadora d'una translocació recíproca $t(8;13)(q24.1;q22)$. El seu marit tenia cariotip normal (46, XY) i els resultats del seminograma també eren normals. L'existència de la translocació es va detectar en realitzar-li un cariotip inclòs dins l'estudi per esterilitat. La parella del seu germà havia tingut un avortament espontani però no s'havia realitzat l'estudi del cariotip.

La segona pacient (PT 2) tenia 39 anys i era portadora d'una translocació robertsoniana $t(13;14)(q10;q10)$. El seu marit tenia cariotip normal (46,XY)

i el seminograma mostrava una astenozoospermia moderada. La parella havia tingut cinc avortaments de primer trimestre durant els últims nou anys. Tres dels avortaments havien estat espontanis, el darrer després de realitzar un DGP-1CP amb estudi exclusiu dels cromosomes implicats en la translocació, i dos dels avortaments havien estat terapèutics després de control ecogràfic. En un dels avortaments l'anàlisi de vellositats corials va evidenciar una trisomia 13 amb un cariotip 46, XY, -14, +Rob(13;14). En el DGP-1CP mencionat anteriorment, s'havien obtingut 18 CCO, s'havien analitzat 14 oòcits i s'havien biopsiat correctament 12 1CPs. Vuit dels 1CPs s'havien fixat i analitzat per FISH, cosa que havia permès el seu diagnòstic, i, en els altres sis, s'havia realitzat la biòpsia i l'anàlisi d'un blastòmer. Un oòcit havia resultat normal, dos equilibrats, cinc desequilibrats i quatre no s'havien diagnosticat. S'havien fecundat deu oòcits i transferit tres embrions. Es va aconseguir un embaràs amb batec cardíac positiu, però es va produir l'avortament esmentat al cap de set setmanes de gestació.

La tercera pacient (PT 3) tenia 36 anys i era portadora d'una translocació robertsoniana t(13;14)(q10;q10). El seminograma del seu marit, de cariotip normal (46,XY), mostrava una oligozoospermia lleugera i astenozoospermia moderada. La parella havia tingut cinc avortaments espontanis i havia realitzat quatre DGP analitzant blastòmer i un DGP-1CP. En els casos de blastòmer, s'havien pogut transferir dos embrions en el segon cicle, però no s'havia aconseguit embaràs; en el quart cicle, s'havia transferit un embrió però la pacient va avortar espontàniament. En el DGP-1CP esmentat, en el qual s'havia realitzat l'anàlisi exclusiva dels cromosomes implicats en la translocació, s'havien obtingut 26 CCO dels quals es van poder analitzar 12 oòcits; els 14 oòcits restants eren immadurs en estadi de VG, i no es van analitzar. Dels 12 oòcits madurs s'havien biopsiat correctament 11 1CPs. Deu 1CPs s'havien fixat amb èxit i vuit es van analitzar i diagnosticar mitjançant FISH. També es va fer la biòpsia i l'anàlisi de la segregació en un blastòmer de quatre embrions procedents d'oòcits en els quals el 1CP estava fragmentat o s'havia perdut. Es van obtenir quatre embrions normals o equilibrats per a la translocació, se'n van poder transferir tres i el resultat de l'anàlisi de la β -hCG va ser positiu, però ecogràficament es va observar un sac embrionari buit.

3.2.3. Mètode utilitzat per al diagnòstic genètic preimplantacional analitzant el 1r corpuscle polar

Com s'ha mencionat anteriorment, el DGP-1CP es porta a terme durant la realització d'un cicle de FIV.

El dia en què es realitza la punció fol·licular (D+0) és el dia en què es biopsien i fixen els 1CPs i s'inicia l'anàlisi. Com a màxim dues hores després de la punció fol·licular, i utilitzant un protocol descrit per Durban et al. (2001), cada oòcit s'identifica amb un número que conservarà al llarg de tot el procés d'anàlisi i diagnòstic i es realitza la inseminació dels oòcits obtinguts en estadi de MII mitjançant ICSI. Immediatament després de l'ICSI, el 1CP es biopsia tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1.3. Un cop s'ha biopsiat el 1CP, es fixa seguint el protocol descrit a l'apartat 3.1.4. Immediatament després de la biòpsia, però, l'oòcit es guarda a la incubadora a 37°C, 6% de CO₂ i 95% d'humitat en el medi de cultiu per a embrions utilitzat, per exemple G1 (Vitrolife). Un cop biopsiats i fixats tots els 1CPs, se'n fa l'anàlisi mitjançant FISH.

El protocol de FISH utilitzat per a l'anàlisi d'aquestes extensions és idèntic al descrit a l'apartat 3.1.5; només varia, en funció de la indicació del DGP-1CP, el tipus de sondes utilitzades. Si la indicació és l'edat avançada de la pacient, es realitza l'SA per als nou cromosomes descrit a l'apartat 3.1.5 utilitzant dues rondes de FISH. Si la pacient és portadora d'una alteració estructural, s'analitzen els cromosomes implicats en la reorganització i també es fa l'SA; això suposa la realització de dues a quatre rondes de FISH sobre les mateixes extensions cel·lulars. Prèviament a la realització del DGP-1CP en portadores de reorganitzacions, s'aplica la tècnica de FISH amb les sondes seleccionades per a l'anàlisi de cada reorganització a extensions cromosòmiques de limfòcits de les pacients per a provar les sondes i reconfirmar la reorganització. Sempre s'analitzen algunes extensions de 1CP disponibles amb les sondes seleccionades per a avaluar el seu comportament en aquest tipus de material cromosòmic.

El resultat final de l'anàlisi s'obté en D+2 o D+3; per tant, el dia de la transferència embrionària no cal que s'alteri a causa de la realització del DGP-1CP.

En el cas que algun oòcit quedés sense diagnosticar perquè el 1CP estigués fragmentat, s'hagués perdut durant el procés de biòpsia o anàlisi o bé el

resultat indiqués la presència d'alguna alteració que podria ser arreglada pel mateix oòcit durant la segona part de la meiosi, es pot fer l'anàlisi d'un blastòmer de l'embrió resultant a D+3. Aquesta anàlisi es fa amb temps suficient per a obtenir els resultats i realitzar la transferència embrionària en D+4 o bé en estadi de blastocist (D+5 o D+6).

La figura 11 resumeix el protocol utilitzat per a la inseminació dels oòcits i biòpsia i hibridació dels 1CPs a temps per a la transferència dels embrions derivats que siguin euploides. S'indica la possibilitat de fer l'anàlisi dels embrions en cas que sigui necessari.

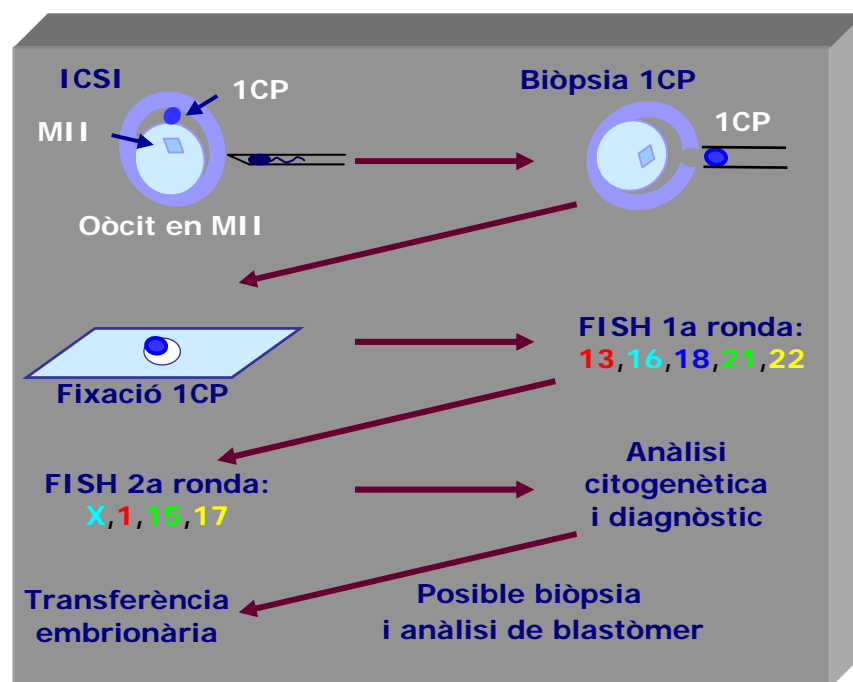


Figura 11: Protocol utilitzat en el DGP-1CP

La figura 12 mostra l'evolució d'un embrió biopsiat en D+3. L'oòcit del qual prové també s'havia biopsiat en D+0 per a analitzar el 1CP.

Les figures 13 i 14 mostren imatges obtingudes en aplicar FISH sobre 1CP i sobre blastòmer utilitzant les sondes esmentades (taula 1, apartat 3.1.5.). Només se senyalen amb fletxes aquells cromosomes que estan alterats i aquells que, a les imatges, costen més d'identificar.



Figura 12: Evolució d'un embrió biopsiat a D+3. El 1CP de l'òcit del qual prové també va ser biopsiat a D+0

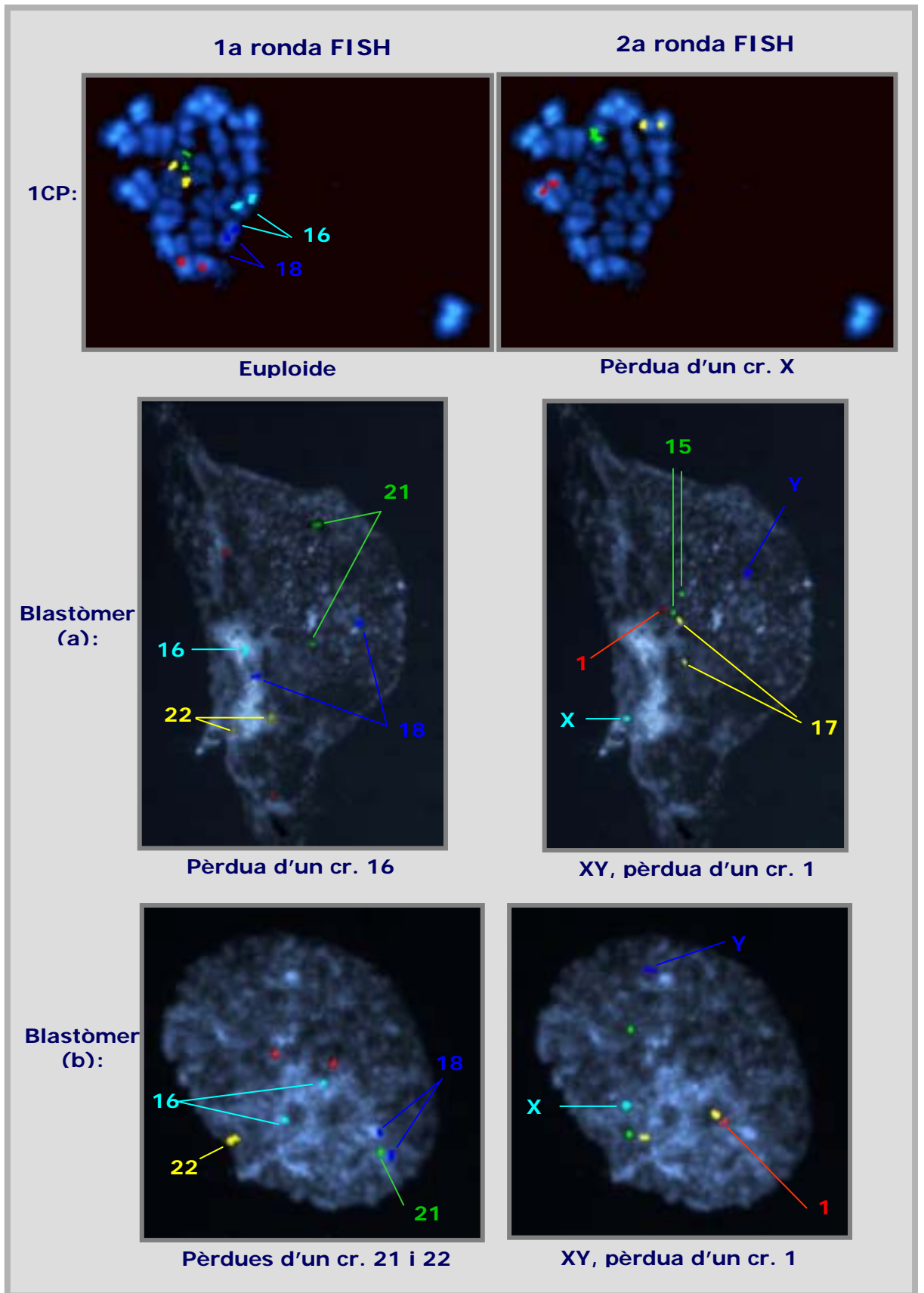


Figura 13: Anàlisi seqüencial mitjançant FISH del 1CP i de dos blastòmers de l'embrió. Detecció de mosaïcisme

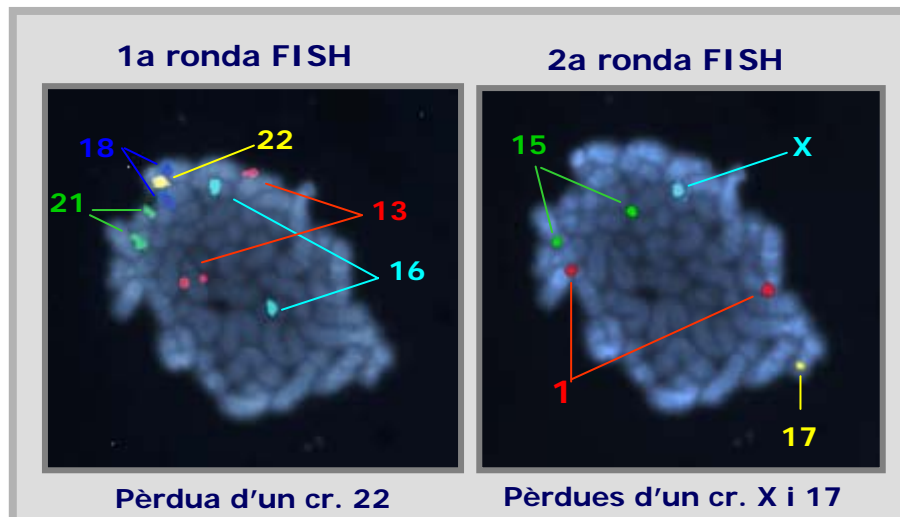


Figura 14: Anàlisi seqüencial mitjançant FISH d'un blastòmer

3.3. Material i mètodes de l'objectiu 3

L'estudi d'aneuploidies en cèl·lules embrionàries de pacients portadores de translocacions recíproques s'ha dut a terme en col·laboració amb el Centre for Reproductive Medicine (CRG), Academic Hospital of the Dutch-speaking Free University of Brussels, on s'ha fet la part experimental.

El motiu de l'estudi ha estat realitzar l'SA per a cinc cromosomes a blastòmers d'embrions de pacients portadors i portadores de translocacions recíproques que ja havien estat fixats i analitzats en cicles de FIV amb DGP per a l'estudi dels cromosomes implicats en la translocació.

3.3.1. Material objecte d'estudi

Per a la realització de l'estudi s'han seleccionat 13 pacients, vuit dones i cinc homes, portadors de diferents translocacions. S'han triat 18 dels DGP realitzats en què no s'havia aconseguit embaràs. La mitjana d'edat de les dones del grup estudiat era, en el moment en què es van realitzar els DGP, de 33,8 anys (de 24 a 41 anys).

S'han reanalitzat dos blastòmers en 126 embrions, 76 de procedents de dones portadores i 50 d'homes portadors, usant sondes CEP i LSI (MultiVysionPB; Vysis; Nova York; EUA) per als cromosomes implicats en les alteracions autosòmiques més freqüents (cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22). Els blastòmers triats per a la reanàlisi, durant el DGP per a l'estudi de la segregació dels cromosomes implicats en la translocació, s'havien biopsiat en D+3. La biòpsia s'havia fet utilitzant un sistema de làser (1,48 µm làser d'infrarojos sense contacte; Fertilase; Octax; Herbron; Alemanya).

Per a foradar la ZP, s'havien realitzat de dos o tres polsos de 7 ms (De Vos et al. 2003) i s'havien aspirat dos blastòmers de cada embrió utilitzant una micropipeta de 30 µm de diàmetre intern. Els blastòmers s'havien fixat seguint el mètode emprat al centre de Brussel·les (Coonen et al. 1994) i s'havien analitzat amb sondes CEP, LSI i Tel per als cromosomes implicats en les translocacions. Un cop acabat el cicle de FIV amb DGP, els portaobjectes que contenen els blastòmers fixats i hibridats s'havien emmagatzemat a -20°C.

3.3.2. Mètode d' hibridació in situ fluorescent emprat

S'han analitzat les aneuploidies per als cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 en blastòmers que ja s'havien sotmès a una o, en algun cas, a dues rondes de FISH per a la detecció dels cromosomes implicats en translocacions recíproques.

El protocol de FISH emprat en l'anàlisi d'aneuploidies ha estat el mateix que l'utilitzat per a l'anàlisi dels cromosomes de les translocacions (Staessen et al. 1999). En primer lloc es deixen descongelar, a temperatura ambient, els portaobjectes que contenen les preparacions cel·lulars. Tot seguit es retira acuradament el cobreobjectes i es fa un rentatge de 5 min a temperatura ambient en 1 x PBS en agitació per a netejar les restes d'oli. A continuació s'eliminen la sondes aplicades en la o les rondes de FISH anteriors posant els portaobjectes en un bany de 0,0625 x SSC durant 7 min a 75°C; aquesta temperatura també permet la desnaturalització del DNA dels blastòmers fixats. Seguidament, es fa una deshidratació a concentracions creixents d'etanol (70%, 90%, 100% i, de nou, 100%) a -18°C, 60 segons a cada una i es deixen assecar a l'aire. Mentrestant, es desnaturalitza la sonda col·locant-la en un tub d'Eppendorf de 0,5 ml durant 5 min en un bany a 75°C. Quan els portaobjectes estan secs, s'apliquen 0,2 µl de sonda (MultiVysionPB; Vysis) a cada un i es cobreixen amb cobreobjectes circulars de 4 mm de diàmetre. Se segellen amb cola i es posen a hibridar tota la nit en una cambra humida a 37°C.

L'endemà es fan els rentatges posthibridació: es realitza un rentatge de 2 min a 73°C amb 0,4 x SSC i un rentatge de 60 segons a temperatura ambient amb 2 x SSC / 0,1% NP 40. Es deixen assecar a l'aire i els portaobjectes es monten amb 15 µl de DAPI II ¼ i un cobreobjectes de 24 x 60 mm.

La visualització i anàlisi es fan amb un microscopi Zeiss equipat amb una càmera d'alta sensibilitat (Roger Scientific; Photometrics; Tucson; Arizona; EUA) i amb filtres per als fluorocroms utilitzats i connectat a un ordinador Power Macintosh G3 amb *software* per a Smartcapture (Digital Scientific Cambridge; Regne Unit).

Per a comptar i interpretar les marques produïdes per les sondes de FISH s'ha utilitzat el criteri basat en el descrit per Munné i Weier (1996), en què es considera que dues marques del mateix fluorocrom corresponen a dos cromosomes homòlegs quan estan separades per una distància superior a la que ocuparien dues marques (figura 15).

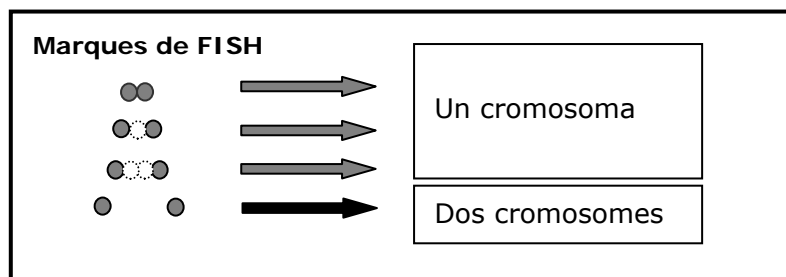


Figura 15: Diagrama del criteri de comptatge i interpretació de les marques de FISH

3.4. Material i mètodes de l'objectiu 4

En aquest apartat s'utilitzen limfòcits estimulats com a model de cèl·lules proliferants i cèl·lules de Sertoli com a model de cèl·lules no proliferants per a veure les diferències obtingudes en les marques de les sondes emprades en la FISH.

3.4.1. Preparació d'un cultiu no sincronitzat de limfòcits estimulats i obtenció de cèl·lules de Sertoli

Per a realitzar l'estudi, s'han obtingut limfòcits d'un cultiu no sincronitzat i sense antimetabòlic procedent d'un donant de sang de 18 anys d'edat. Les cèl·lules s'han cultivat utilitzant els mètodes estàndard. Per altra banda, s'han obtingut cèl·lules de Sertoli de biòpsies testiculars tractades de la mateixa manera que per a obtenir cromosomes meiòtics (Chandley et al. 1994). Els dos tipus de cèl·lules s'han fixat amb Carnoy (metanol: àcid acètic, 3:1) i les extensions s'han realitzat en portaobjectes desengreixats.

3.4.2. Mètode d'anàlisi: hibridació in situ fluorescent

Per a eliminar les restes citoplasmàtiques de les cèl·lules ja fixades i esteses, se sotmeten a un tractament enzimàtic de 3 a 10 min usant pepsina 50 µg/ml en HCl 10mM (preparada a partir de pepsina 100 mg/ml, Sigma; Espanya) a 37°C, esbandint a temperatura ambient amb aigua destil·lada i deixant assecar a l'aire. Seguidament, s'aplica una gota de fixador Carnoy.

Per a disposar d'informació per a diferents regions cromosòmiques en diferents moments de la fase S del cicle cel·lular, s'han escollit diferents tipus de sondes. Una CEP per al cromosoma 17 (marcada amb SpectrumOrange i SpectrumGreen), una LSI per al cromosoma 13 (marcada amb SpectrumGreen) i una Tel per al cromosoma 14 per als limfòcits i Tel per al cromosoma 19 per a les cèl·lules de Sertoli (ambdues marcades amb SpectrumOrange) (Vysis; Nova York) (taula 2). S'ha realitzat un protocol estàndard de FISH amb una incubació durant tota la nit a 37°C.

Taula 2: Sondes utilitzades. S'indica el tipus de sonda, la regió cromosòmica marcada i els fluorocroms

Tipus de sonda	Regió cromosòmica	Fluorocrom
LSI 13	13q14	SpectrumGreen
Tel 14	160 kb a zona terminal del braç q	SpectrumOrange
CEP 17	17p11.1 – q11.1, locus D17Z1	Spectrum Orange + SpectrumGreen
Tel 19	150 kb a zona terminal del braç q	SpectrumOrange

S'han classificat els senyals d'hibridació de 200 nuclis interfàsics de cada tipus cel·lular segons les distàncies que els separen (figura 16). S'ha utilitzat un microscopi de fluorescència equipat amb un filtre triple que permet la visualització, a la vegada, dels tres colors emesos per les sondes (groc per la CEP 17, verd per la LSI 13 i vermell pels Tel 14 i 19).

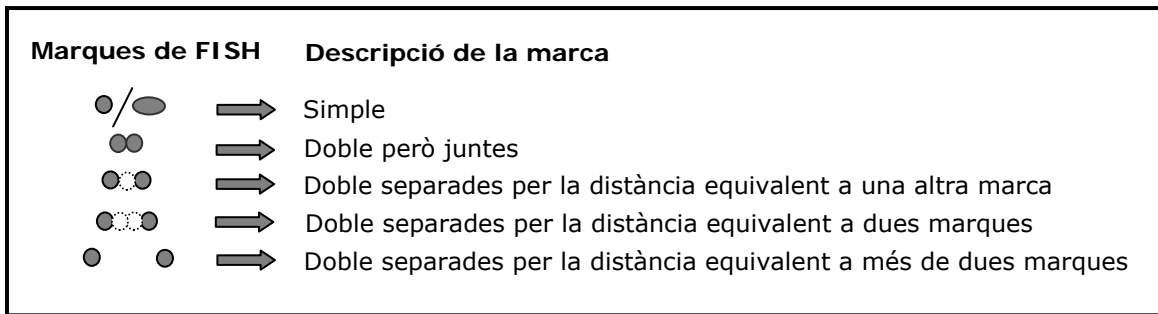


Figura 16: Diagrama de la classificació de les marques de FISH

Un cop comptades i classificades les marques obtingudes en la FISH (figures 3 i 4, art. 4), s’ha utilitzat el criteri de classificació que es representa a la figura 17 per a extrapolar el nombre de cromosomes present en cada nucli cel·lular hibridat.

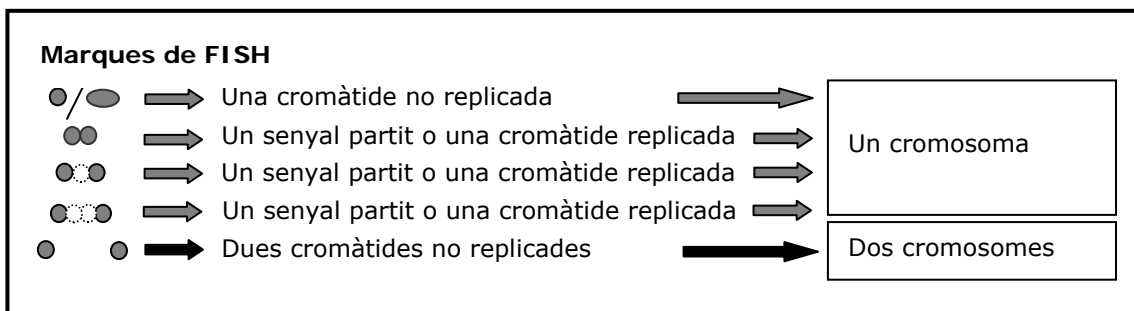


Figura 17: Diagrama del criteri d’interpretació de les marques de FISH

Aplicant aquest criteri d’interpretació, les cèl·lules amb monosomia, trisomia o tetrasomia per més d’un cromosoma s’ha considerat que presentaven resultats artefactuals. Per altra banda, aquelles cèl·lules en què algun dels cromosomes analitzats no presenta cap marca, s’ha considerat que tenien fallades de FISH.

4. RESULTATS

4.1. Anàlisi d'aneuploidies en una sèrie d'oòcits descartats de cicles de FIV

Els resultats que es resumeixen a continuació han donat lloc al següent article (art. 1, pàgina 46):

Autors: Aïda Pujol, Irene Boiso, Jordi Benet, Anna Veiga, Mercè Durban, Mercedes Campillo, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies*

Revista: *European Journal of Human Genetics* 2003; 11: 325-336

S'han aplicat dues rondes de FISH per a la detecció dels cromosomes 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X en 89 1CPs procedents d'oòcits descartats de cicles de FIV. Les imatges corresponents a alguns dels 1CPs analitzats es mostren la figura 2, art. 1.

En 54 d'aquests 1CPs, també s'ha analitzat la corresponent MII de l'oòcit per a analitzar la complementarietat 1CP-MII. En els 35 1CPs restants, l'anàlisi només s'ha realitzat en el 1CP (taula 1, art. 1).

S'ha estimat que, analitzant els 23 cromosomes, un oòcit tindria un risc d'aneuploidia del 57,2%. El rang de segregació anòmala per a cada cromosoma analitzat va del 0,52% a l'1,70%, amb una mitjana del 0,89% (taula 3, art. 1).

Els cromosomes o cromàtides absents en els 1CPs s'han trobat de forma complementària a la MII en un 74,2% dels casos i, per tant, només el 25,8% d'aquestes absències serien artefactuals.

S'han trobat tant alteracions de cromàtide (44,2%) com de cromosoma (55,8%). S'ha observat predivisió de cromàtides en tots els cromosomes analitzats; aquest fenomen es produeix amb més freqüència en el 1CP que en la MII ($p < 0,0001$) (taula 4, art. 1). S'ha obtingut una freqüència d'aneuploidies global del 47,5% (taula 5, art. 1).

En nou de les 35 pacients (25,7%) a qui s'ha estudiat el 1CP i la MII s'han observat guanys de cromosomes no concordants que s'haurien originat durant l'oogènesi primerenca d'una oogònia trisòmica (taula 7, art. 1).

No s'ha observat correlació entre el nombre d'alteracions i l'edat de les pacients incloses en l'estudi.

Article núm.1

Autors: Aïda Pujol, Irene Boiso, Jordi Benet, Anna Veiga,
Mercè Durban, Mercedes Campillo, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies
and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies*

Revista: *European Journal of Human Genetics* 2003; 11: 325-336

4.2. Anàlisi d'aneuploïdies en la línia germinal femenina

4.2.1. Pacients amb cariotip normal

S'ha aplicat el DGP-1CP amb SA per a nou cromosomes a dues pacients.

Primera pacient (PA 1): 42 anys.

S'han obtingut 11 oòcits dels quals tots els 1CPs s'han analitzat (taula 3). Set han estat aneuploides (63,6%) i quatre euploides (36,4%), encara que en un el cromosoma 16 no s'ha diagnosticat. S'han transferit dos embrions però no s'ha aconseguit embaràs. A la figura 18 hi ha les extensions cromosòmiques d'alguns dels 1CPs analitzats vistes a contrast de fases i un cop aplicada la FISH.

Segona pacient (PA 2): 38 anys.

S'han obtingut vuit oòcits dels quals un era degenerat. S'han fixat i analitzat set 1CPs. En quatre s'han observat aneuploïdies (57,1%) i tres han resultat euploides (42,9%), tot i que en un els cromosomes 15 i 16 no s'han diagnosticat. Dels oòcits normals, només un ha fecundat però no ha evolucionat. A la figura 19 hi ha les extensions cromosòmiques d'alguns dels 1CPs analitzats vistes a contrast de fases i un cop aplicada la FISH.

Taula 3: Resultats finals del cribatge d'aneuploïdies en les cèl·lules estudiades

PA 1: Cèl·lula	1CPs analitzats	Euploides	Aneuploides	Cromosomes no diagnosticats	O / EB analitzat	Concordança	Resultats ICSI i transferència
1	Sí	1, 13, 16, 17, 18, 22, X	+ cr 21, - cr 15	-	Sí / No	C	No fecundat
2	Sí	1, 13, 15, 17, 18, 21, X	+ cr 22, - ct 16	-	No / Sí *	NC	Fecundat
3	Sí	1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	-	-	No / No	-	Fecundat / T
4	Sí	17, 18, 21	- cr 16, - cr 22	1, 13, 15, X	No / Sí *	NC	3PN
5	Sí	13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	- cr 1	-	No / No	-	Lisat
6	Sí	1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	-	-	No / No	-	No fecundat
7	Sí	1, 15, 17, 22, X	+ cr 13, + ct 21, - ct 16	18	No / No	-	Lisat
8	Sí	1, 13, 15, 17, 18, 21, 22, X	-	16	Sí / No	C	No fecundat
9	Sí	1, 13, 17, 18, 22, X	+ ct 15, - ct 16, - ct 21	-	No / No	-	Lisat
10	Sí	1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	-	-	No / No	-	Fecundat / T
11	Sí	1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, X	+ ct 22	-	No / No	-	Lisat
PA 2:							
1	Sí	1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	-	-	Sí / No	C	Lisat
2	Sí	13, 15, 16, 17, 21, 22, X	- ct 1, - ct 18	-	Sí / No	C	No fecundat
3	Sí	1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	-	-	No / No	-	Fecundat
4	Sí	13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	+ ct 1 **	1, 13	Sí / No	C	No fecundat
5	Sí	1, 13, 17, 18, 21, 22, X	-	15, 16	No / No	-	MIV
6	Sí	16, 18, 21, 22, X	+ ct 13	1, 15, 17	Sí / No	C	Lisat biòpsia
7	Sí	13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X	+ cr 1	-	No / No	-	MIV. No ICSI

O: oòcit; EB: embrió; C: concordança (resultats concordants amb els obtinguts analitzant 1CP); NC: no concordança; T: transferit; MIV: madurat *in vitro*

*: L'anàlisi de l'embrió mostra presència de mosaïcisme

** : Alteració identificada en confirmar el diagnòstic en analitzar l'oòcit no fecundat

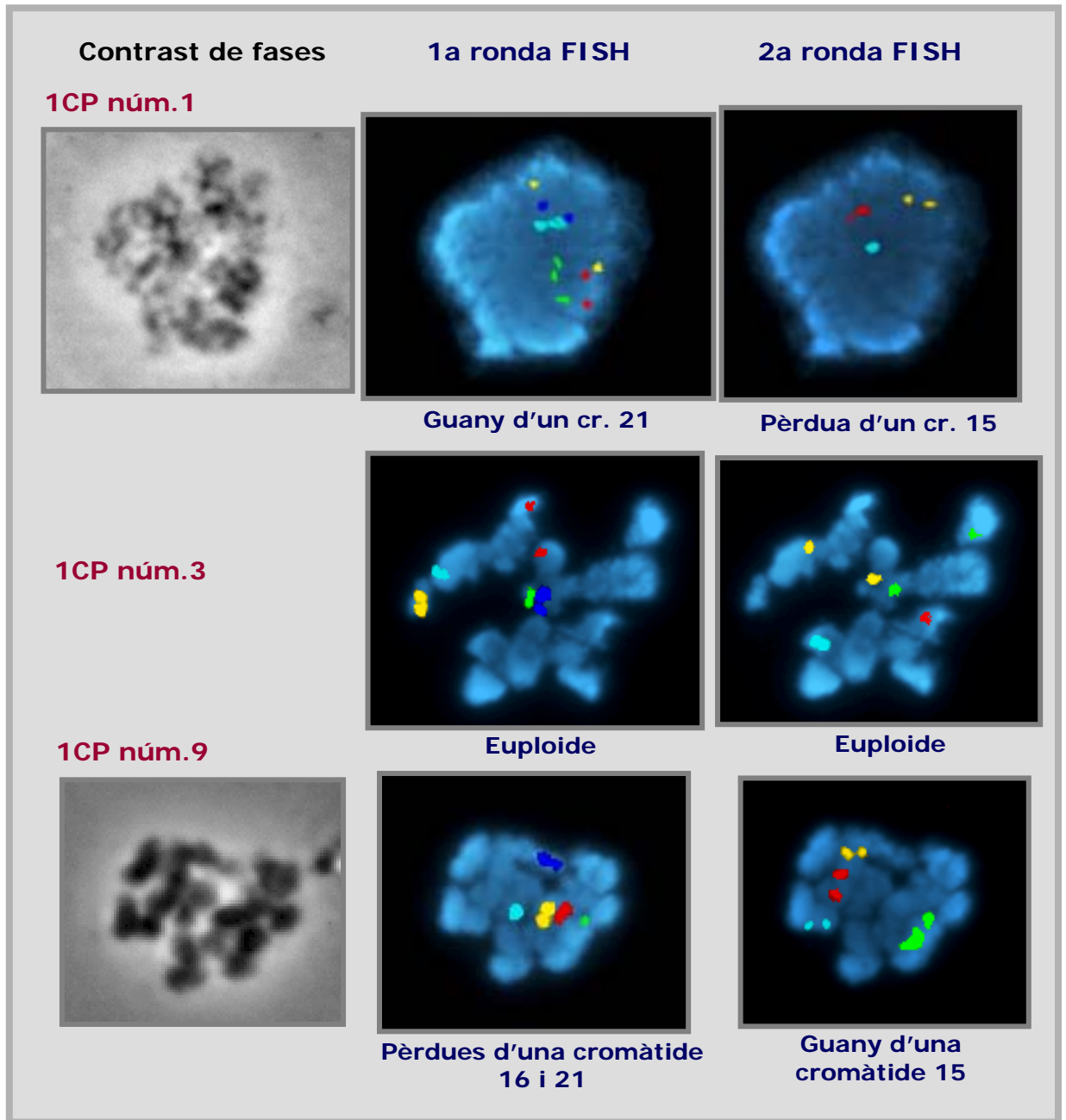


Figura 18: Anàlisi seqüencial mitjançant FISH de 1CP de la pacient PA 1

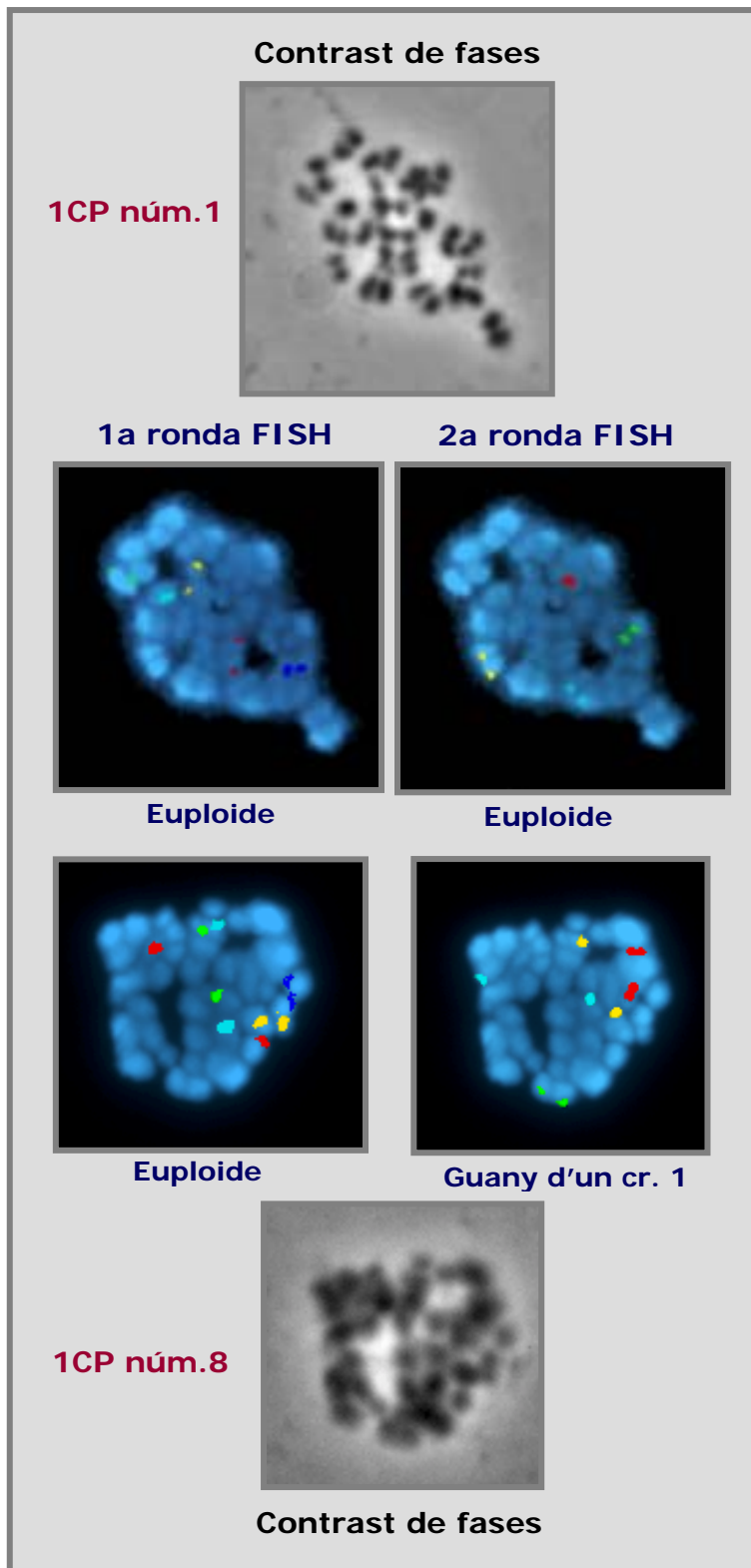


Figura 19: Anàlisi seqüencial mitjançant FISH de 1CP de la pacient PA 2

4.2.2. Pacients portadores de translocacions

Els resultats que es resumeixen a continuació han donat lloc al següent article (art. 2, pàgina 53):

Autors: Aïda Pujol, Mercè Durban, Jordi Benet, Irene Boiso, Josep M. Calafell, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body*

Revista: *Reproduction* 2003; 126: 701-711

S'ha aplicat l'SA a tres pacients. S'han analitzat un total de deu cromosomes en cada 1CP. Les extensions cromosòmiques corresponents a alguns dels 1CPs analitzats es mostren la figura 2, art. 2.

Primera pacient (PT 1): 46, XX, t(8;13)(q24.1;q22)

S'han obtingut 11 oòcits en MII, dels quals deu han estat fixats i deu han estat analitzats (taula 1a, art. 2). Només un dels nou oòcits diagnosticats (11,1%) ha estat cromosòmicament normal o equilibrat. Dels vuit oòcits restants, tres eren resultants d'una segregació 2:2 alternant o adjacent 1 amb recombinació, un era resultat d'una segregació adjacent 2 i quatre d'una segregació 3:1. Un dels oòcits diagnosticats presentava un guany del cromosoma 1 (taula 2, art. 2).

A més de les alteracions observades per als cromosomes implicats en la translocació, només un dels nou oòcits diagnosticats (11,1%) han presentat aneuploïdies per algun dels cromosomes estudiats no implicats en la translocació (taula 2, art. 2).

Tenint en compte les anàlisis tant de l'alteració cromosòmica estructural com de les numèriques, un oòcit ha estat normal però no s'ha realitzat transferència embrionària perquè el zigot tenia tres pronuclis i, per tant, era anòmal i no transferible.

Segona pacient (PT 2): 45, XX, t(13;14)(q10;q10)

S'han obtingut 13 oòcits en MII, dels quals s'han fixat tretze i analitzat dotze (taula 1b, art. 2). Sis dels dotze (50%) oòcits analitzats han estat cromosòmicament normals o equilibrats, mentre que els sis restants (50%) han estat desequilibrats, dos eren resultants d'una segregació 2:1 adjacent,

dos d'una segregació 2:1 alternant o adjacent i dos més d'una segregació 3:0 (taula 2, art. 2).

A més de les alteracions observades per als cromosomes implicats en la translocació, onze dels dotze oòcits diagnosticats (91,7%) han presentat aneuploïdies per algun dels cromosomes estudiats no implicats en la translocació (taula 2, art. 2). En aquesta anàlisi, els cromosomes implicats en aneuploïdies han estat el 16 (cinc cops), 1, 18 i 22 (quatre cops), l'X (tres cops), el 17 (dos cops) i el 15 i 21 (un cop). S'ha observat predivisió de cromàtides en set dels vuit cromosomes analitzats per aneuploïdies.

Tenint en compte les anàlisis tant de l'alteració cromosòmica estructural com de les numèriques, només un oòcit ha estat normal, ha donat lloc a un embrió de màxima qualitat (puntuació 10 segons Plachot et al. 1990) que s'ha transferit però malauradament no s'ha aconseguit embaràs.

Tercera pacient (PT 3): 45, XX, t(13;14) (q10;q10)

S'han obtingut dotze oòcits en MII, s'han fixat dotze 1CPs, dels quals s'han analitzat 11 (taula 1b, art. 2). Quatre dels onze oòcits diagnosticats (36,4%) han estat normals o equilibrats resultants d'una segregació alternant, sis han resultat desequilibrats, dels quals cinc provenien d'una segregació 2:1 adjacent i un d'una segregació 3:1 (taula 2, art. 2).

Dels quatre oòcits normals o equilibrats per la translocació, tres s'han trobat aneuploides després de l'SA. A més de les alteracions observades per als cromosomes implicats en la translocació, vuit dels onze oòcits diagnosticats (72,7%) han presentat aneuploïdies per a algun dels cromosomes no implicats en la translocació (taula 2, art. 2).

En l'SA, els cromosomes implicats en alteracions han estat l'X (tres cops), el 16, 17, 21 i 22 (dos cops) i el 15 (un cop). S'ha observat predivisió de cromàtides dels cromosomes implicats en la translocació en el 50% dels 1CPs i també se n'ha observat en cinc dels vuit cromosomes analitzats en l'SA.

Només un dels oòcits ha estat euploide tant pels cromosomes implicats en la translocació com pels altres cromosomes analitzats, però l'embrió ha esdevingut morfològicament anòmal i no s'ha transferit.

És important destacar que en les pacients PT 2 i PT 3 (39 i 36 anys), el 81,8% i el 90%, respectivament, dels oòcits aneuploides tenien guanys

d'un, dos o tres cromosomes que, en la majoria dels casos, no estaven implicats en la translocació.

El rang de segregació anòmala per a cada un dels vuit cromosomes analitzats en l'SA va del 0% al 1,92 % (PT 1, 34 anys), del 0,9% al 5,40% (PT 2, 39 anys) i del 0% al 3,64% (PT 3, 36 anys), amb una mitjana del 0,24%, 3,11% i 2,20%, respectivament (taula 3, art. 2).

Article núm.2

Autors: Aïda Pujol, Mercè Durban, Jordi Benet, Irene Boiso, Josep M. Calafell, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body*

Revista: *Reproduction* 2003; 126: 701-711

4.3. Estudi d'aneuploidies en cèl·lules embrionàries de pacients portadores de translocacions recíproques

Els resultats que es resumeixen a continuació han donat lloc al següent article (art. 3, pàgina 56), pendent de publicació:

Autors: Aïda Pujol, Jordi Benet, Catherine Staessen, Elvire Van Assche, Mercedes Campillo, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers*

S'ha fet un SA mitjançant reanàlisi del embrions ja analitzats en cicles de FIV amb DGP en parelles en què un dels dos era portador d'una translocació recíproca (taula I, art. 3). En cada embrió s'han analitzat dos blastòmers.

Tots els embrions s'havien diagnosticat pel que fa al patró de segregació dels cromosomes implicats en la translocació. S'havien detectat embrions amb complements cromosòmics derivats de tot tipus de segregacions; el 37,3% dels embrions tenien segregacions desequilibrades del tipus adjacent 1 o adjacent 2, 3:1 o 4:0 i el 4,7% tenien alguna combinació de cromosomes no coincident amb cap dels tipus de segregació esmentats. A més, en el 41,1% dels embrions s'havia detectat presència de mosaïcisme (taula II, art. 3).

L'SA s'ha fet utilitzant sondes LSI i CEP per als cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22. S'ha diagnosticat el 91,3% dels embrions; el 30,9% han estat euploides i el 60,4% aneuploides. El 8,7% han resultat ser euploides per SA i normals o equilibrats per la translocació i el 22,2% s'han trobat euploides per SA però desequilibrats per la translocació. El 8% dels embrions han estat aneuploides per SA però normals o equilibrats per la translocació, i el 52,4% s'han trobat aneuploides per SA i també desequilibrats per la translocació (taula III, art. 3).

El rang de segregació anòmala de cada cromosoma analitzat va del 4,49% al 8,76%, amb una mitjana del 7,48%.

Almenys el 58,7% dels embrions han estat mosaics pels cromosomes implicats o no implicats en la translocació (taula V, art. 3).

Dels setze embrions que s'havien transferit en els cicles de FIV amb DGP per a l'anàlisi dels cromosomes de la translocació, deu s'han identificat com

a euploides després de la reanàlisi per SA, els altres sis s'han diagnosticat com a aneuploides, quatre d'aquests, també com a mosaics. Això evidencia que en els DGP es van transferir almenys sis embrions amb aneuploïdies i almenys quatre presentaven mosaïcisme.

Article núm.3

Autors: Aïda Pujol, Jordi Benet, Catherine Staessen, Elvire Van Assche, Mercedes Campillo, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers*

4.4. Estadi replicatiu de la cromatina en cèl·lules proliferants. Avaluació de la interpretació dels resultats de la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent

Els resultats que es resumeixen a continuació han donat lloc a l'article següent (art. 4, pàgina 59):

Autors: Aïda Pujol, Jordi Benet, Mercedes Campillo, Montserrat Codina-Pascual, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD*

Revista: *Cytogenetic and Genome Research* 2004; 105: 29-35

En analitzar el tipus de marques obtingudes en la FISH en els limfòcits d'un cultiu no sincronitzat (representant cèl·lules proliferants) i comparar-les amb les obtingudes en cèl·lules de Sertoli (cèl·lules no proliferants), s'ha observat que els limfòcits presentaven una variabilitat més elevada de marques que les cèl·lules de Sertoli (taules 1a-c, art. 4).

Els resultats han mostrat, en les extensions dels nuclis de la majoria de les cèl·lules, la presència de dues marques per cada parell cromosòmic corresponents a un estadi de G0 a les cèl·lules de Sertoli i G1 o un estadi prereplicatiu en limfòcits. Les freqüències obtingudes per a les cèl·lules de Sertoli i per a limfòcits han estat, respectivament, del 98,5% i 93,5% per les sondes LSI, del 91,5% i 80,5% per les Tel i del 74,5% i 91% per la CEP (taules 2a-c, art. 4).

El percentatge de nuclis amb dos cromosomes o amb un nombre diferent de dos cromosomes en cèl·lules proliferants ha estat significativament diferent del que s'ha observat en les cèl·lules que no estaven en divisió ($p < 0,05$). Així, la freqüència de cèl·lules amb dos cromosomes per a cada parell ha estat més gran en cèl·lules de Sertoli que en limfòcits per les sondes LSI i Tel, però per la CEP ha estat inferior, ja que s'ha trobat un nombre superior de cèl·lules amb un sol cromosoma. Això s'explica pel fet que s'ha descrit, en les cèl·lules de Sertoli, una tendència a l'associació d'alguns cromosomes homòlegs (3, 7, 8, 13, 17 i 21) (Chandley et al. 1996) que incrementaria la proporció de marques úniques. Fent aquesta consideració, els percentatges

de cèl·lules de Sertoli euploides pel cromosoma 17 s'equipararia amb els obtinguts en LSI i Tel (taules 2a-c, art. 4).

També s'ha observat que les sondes LSI i CEP produïen menys errors de FISH (6,5% i 9%, respectivament) que les sondes Tel (19,5%).

En cèl·lules no proliferants (cèl·lules de Sertoli), per a algun dels cromosomes analitzats, s'han observat marques dobles atribuïbles a les característiques de marcatge de les sondes (anomenades *senyals partits*) amb una freqüència del 65,5%. En cèl·lules proliferants (limfòcits), aquestes dobles marques, atribuïbles a senyals partits o a senyals resultants de la replicació, apareixien en un 76,4%. És a dir, el 10,8% de dobles marques de més trobades en limfòcits serien atribuïbles, amb tota probabilitat, al procés de replicació de les diferents regions cromosòmiques analitzades.

El 19% dels limfòcits han presentat dobles marques per LSI degudes a la replicació, el 16,2% les han presentat per Tel i el 13,3% per CEP (taula 4, art. 4). Aquestes freqüències ens permeten atribuir moments diferents en l'inici de la replicació de les tres regions estudiades: LSI, Tel i CEP. La regió amb una freqüència més alta de marques dobles degudes a la replicació correspondria a una replicació més primerenca. Això voldria dir que la regió cromosòmica marcada amb la sonda LSI replicaria la primera, seguida de la regió telomèrica, i que la centromèrica seria la darrera de replicar.

En general, s'han trobat més cèl·lules amb només una regió homòloga replicada (una sola marca doble) que amb dues (dues marques dobles) (taula 5, art. 4). Això significa que en un cultiu de limfòcits, model de cèl·lula proliferant, la replicació de les regions cromosòmiques estudiades es dona de manera asincrònica.

Article núm.4

Autors: Aïda Pujol, Jordi Benet, Mercedes Campillo, Montserrat Codina-Pascual, Josep Egozcue, Joaquina Navarro

Títol: *The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD*

Revista: *Cytogenetic and Genome Research* 2004; 105: 29-35

5. DISCUSSIÓ

5.1. Anàlisi d'aneuploidies en oòcits descartats de cicles de FIV

S'ha utilitzat una sèrie d'oòcits descartats de cicles de FIV per a posar a punt l'anàlisi d'aneuploidies en 1CP mitjançant l'aplicació de FISH per a la detecció de nou cromosomes diferents. S'han aplicat dues rondes de FISH per a poder detectar les aneuploidies autosòmiques més comunes, aquelles que afecten els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 (Egozcue 1996) (Verlinsky et al. 1999) (Munné et al. 2000) (Petit et al. 2002) i també les causades pels cromosomes X, 1, 15 i 17, que també podrien contribuir a les baixes taxes d'embaràs aconseguides en dones d'edat avançada (Bahçe et al. 1999).

Fins ara, a la literatura, hi ha descrita l'aplicació de fins a set sondes diferents en 1CP en estudis bàsics sense DGP (Mahmood et al. 2000) i, en la realització de DGP-1CP, només s'han arribat a aplicar fins a cinc sondes (Munné et al. 2000) (Petit et al. 2002) (Montag 2004).

En aquest treball s'han aplicat amb èxit nou sondes distribuïdes en dues rondes consecutives. La utilització del microones per a l'aplicació de la segona ronda de FISH ha donat bons resultats pel que fa al tipus de marques fluorescents obtingudes, de manera que considerem que és una millora que s'ha d'aplicar en el protocol de FISH en la realització de DGP-1CP, ja que escurça el temps necessari d'hibridació sense comprometre els resultats. Altres autors també han usat aquesta tècnica satisfactòriament en DGP usant blastòmer (Bahçe et al. 2000).

S'han diagnosticat 80 dels 89 oòcits analitzats (90%) i 73 dels 89 1CPs analitzats (82%). Quan es detecta una aneuploidia en un oòcit que en té d'altres, encara que alguna de les alteracions quedi sense diagnosticar, la freqüència d'oòcits aneuploides no varia ja que aquest oòcit ja es considera anormal. El problema es fa evident quan l'aneuploidia implica un sol cromosoma, sobretot si és un cromosoma responsable d'alteracions viables. L'absència de diagnòstic és deguda sovint o bé a la pèrdua de material durant la FISH o bé a la dificultat d'assignar marques de FISH difoses a un cromosoma o a una cromàtide. Aquesta dificultat d'interpretació s'ha vist en tots els cromosomes analitzats, independentment de la sonda emprada, LSI o CEP. La LSI 22 ha estat la més afectada i la CEP 18 la que menys ho ha estat. Altres estudis cromosòmics realitzats en embrions mitjançant FISH (Munné et al. 2003) o bé en oòcits mitjançant la tècnica de CGH (Gutiérrez-

Mateo et al. 2004a) han mostrat que el cromosoma 22 és un dels que té un índex més alt d'aneuploïdies; per tant, es podria pensar que, probablement, els senyals de FISH de difícil interpretació podrien correspondre a aneuploïdies d'aquest cromosoma.

L'anàlisi de les parelles 1CP-MII incloses en aquesta sèrie ha permès valorar també el percentatge de pèrdues cromosòmiques artefactuals. S'ha constatat que el 74,2% de les manques de cromosomes i cromàtides trobades al 1CP no són artefactes, ja que han estat trobades com a cromosomes o cromàtides extra a la MII. Això significa que només una de cada quatre hipohaploïdies trobades en 1CP serien artefactuals. Segons aquest resultat s'ha pogut fer un càlcul més acurat de l'índex d'alteracions cromosòmiques trobat en la sèrie estudiada. En els 1CPs que estan analitzats sense estudiar la corresponent MII (tal com es fa en el DGP-1CP), s'ha considerat que cada pèrdua de cromosoma o cromàtide contribueix en un 0,74 en lloc d'1 en comptar el nombre total de cromosomes aneuploides. D'aquesta manera, la incidència d'aneuploïdies trobada ha estat del 47,5% (taula 5, art. 1).

S'ha estimat que, per als 23 cromosomes, la probabilitat que un oòcit sigui aneuploide és del 57,2%. Els valors per a aneuploïdies que afecten un, dos, tres, quatre o més de quatre cromosomes és del 36,3%, 15,4%, 4,4%, 0,9% i 0,2%, respectivament.

El cromosoma més implicat en aneuploïdies ha estat el 16 (1,70%). De fet, la trisomia 16 és la més freqüent en avortaments espontanis (Hassold i Jacobs 1984).

En estudis de citogenètica clàssica, la freqüència mitjana d'aneuploïdies en oòcits no fecundats i no inseminats s'ha avaluat en un 25,9% (Pellestor et al. 2005). En oòcits no inseminats s'ha descrit una taxa mitjana del 31,3%, que varia del 20% al 57,1% (Pellestor et al. 2005). Més recentment, aplicant citogenètica molecular, s'han analitzat 1CPs d'oòcits madurats *in vivo* de dones de 37 a 41 anys, s'han estudiat els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 i s'ha trobat que un 38,2% són aneuploides (Petit et al. 2002). En dones de ≥ 35 anys, altres autors han trobat un índex d'aneuploïdia del 50,7% (Montag 2004). Tots els resultats indiquen un percentatge elevat d'aneuploïdies en els gàmetes femenins, tot i que són força variats i caldria fer estudis utilitzant el mateix tipus de material i la mateixa metodologia de

fixació i d'anàlisi de les aneuploidies per a obtenir resultats comparables. No obstant això, la incidència d'aneuploidies estimada en el nostre treball (57,2%) coincideix amb els resultats obtinguts analitzant tot el complement cromosòmic de l'oòcit i el 1CP mitjançant CGH (57,1%) (Gutiérrez-Mateo et al. 2004b).

Els nostres resultats han mostrat una incidència de predivisió de cromàtides equilibrada més alta en el 1CP que en la MII de l'oòcit ($p < 0,0001$), probablement a causa de la ràpida degeneració que pateix el 1CP en el cultiu *in vitro* (Munné et al. 1995b). La predivisió de cromàtides equilibrada no seria responsable d'aneuploidia (Munné et al. 1995b) (Dailey et al. 1996) (Sandalinas et al. 2002), però sí que s'hauria de considerar com un factor que hi predisposa.

Els nostres resultats no han mostrat diferències significatives relacionades amb l'edat materna ni amb el tipus i freqüència de les alteracions cromosòmiques observades. Probablement la mostra analitzada és massa petita per a poder fer aquesta valoració.

Hi ha diverses hipòtesis sobre l'origen de les aneuploidies en l'oòcit. La més acceptada és que l'augment d'aneuploidia podria ser causat per alteracions en la freqüència de recombinació (Lamb et al. 1996) o per errors en la formació del fus meiòtic (Battaglia et al. 1996) (Eichenlaub-Ritter et al. 2004), que alterarien la segregació dels cromosomes, i que, a més, ambdós podrien estar agreujats per l'augment en l'edat materna. Per altra banda, el DNA de les mitocòndries de les dones d'edat avançada acumula mutacions que provoquen una disminució en la producció d'ATP (Bartmann et al. 2004), cosa que afecta negativament les cohesines, proteïnes el funcionament de les quals depèn d'una proteïna ATP-dependent (Uhlmann 2004) i que s'encarreguen de mantenir les cromàtides unides durant la replicació i fins a la segregació cromosòmica.

Estudis seqüencials del 1CP i el 2CP en dones d'edat avançada han mostrat que la majoria d'alteracions s'originen tant en la meiosi I com en la meiosi II i que són alteracions de cromàtide (Kuliev i Verlinsky 2004). El 47,2% dels oòcits amb alteracions originades durant la meiosi I també tenen alteracions en la meiosi II, cosa que dóna lloc a zigots aparentment equilibrats en el 32,5% dels casos; els embrions resultants, però, són predominantment aneuploides, fet que suggereix una predisposició als errors

cromosòmics postzigòtics (Kuliev i Verlinsky 2004). Pellestor et al. (2005) fan una extensa revisió dels mecanismes que causen aneuploïdia i fan èmfasi en la separació precoç de cromàtides germanes a la meiosi I com a factor que predisposa a l'aparició d'alteracions. El protocol d'anàlisi que proposem permet, en analitzar el 1CP, valorar la incidència d'aneuploïdia en la meiosi I i, amb l'anàlisi de blastòmer, valorar les alteracions que s'originen posteriorment. Aquesta anàlisi seqüencial sembla cada cop més interessant sobretot tenint en compte els resultats presentats per Kuliev i Verlinsky (2004).

S'ha observat que 40 de les 54 parelles 1CP-MII estudiades són complementàries (28 corresponen a oòcits euploides i 12 a oòcits aneuploides, 2 a hiperhaploides i 10 a hipohaploides). Això suposa una complementarietat del 74,1%. Un dels motius de l'absència de complementarietat ha estat les pèrdues artefactuals durant la fixació o les fallades de la FISH. En el nostre treball, onze oòcits de dones amb cariotip normal han presentat guanys cromosòmics en una de les dotacions cromosòmiques del 1CP o de la MII. Aquest fet s'ha observat en un 25,7% de les pacients analitzades. Aquest tipus d'alteració ja s'havia detectat en oòcits (Mahmood et al. 2000) i també en cèl·lules embrionàries (Conn et al. 1999). El seu origen estaria lligat a una predisposició individual a errors en la segregació dels cromosomes durant l'etapa proliferativa de les oogònies en el desenvolupament embrionari primerenc. Els errors podrien produir-se en les successives divisions mitòtiques d'algunes oogònies i podrien implicar un o més cromosomes. Aquest fet produiria que algunes cèl·lules germinals fossin trisòmiques o nul·lisòmiques i coexistissin a l'ovari amb la línia disòmica normal. Considerant complementàries aquestes onze parelles 1CP-MII hiperhaploides, la freqüència de complementarietat trobada és del 94,4%. L'existència del mosaïcisme gonadal fa que sigui necessari realitzar un diagnòstic prenatal a les dones sotmeses a DGP-1CP per SA que quedin embarassades.

5.2. Anàlisi d'aneuploïdies en la línia germinal femenina

5.2.1. Pacients amb cariotip normal

El DGP-1CP analitzant els nou cromosomes descrits s'ha aplicat a dues pacients incloses en programes de reproducció assistida, PA 1 (42 anys) i

PA 2 (38 anys). La freqüència d'aneuploïdies detectada ha estat del 63,6% i del 57,1%, respectivament. Altres autors també han trobat freqüències d'aneuploïdia elevades en realitzar DGP-1CP en pacients d'edat avançada (≥ 37 anys). Així, per exemple, analitzant els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22, s'han trobat freqüències del 38,2% (Petit et al. 2002), 41,5% (Munné et al. 2000) i 50,7% (Montag 2004). Analitzant tant el 1CP com el 2CP, s'ha trobat una freqüència d'aneuploïdies del 52,1% (Kuliev et al. 2003). Per altra banda, la taxa d'aneuploïdies calculada per als 23 cromosomes en la sèrie control (art. 1), en què les pacients tenien una mitjana d'edat de 33,7 anys, és molt elevada (57,2%).

En realitzar DGP-SA analitzant blastòmer en pacients d'edat avançada, entre juny i desembre de l'any 2001 (Sermon et al. 2005), el 57,5% dels embrions van ser diagnosticats com a no transferibles.

Munné et al. (2002) han demostrat que l'aplicació del DGP-SA a pacients d'edat avançada (≥ 37 anys) permet un augment en la implantació si s'analitzen almenys vuit cromosomes a, com a mínim, sis embrions. La taxa d'avortaments espontanis disminueix, i passa del 23% sense fer DGP-SA a l'11% en realitzar-lo en dones de ≥ 40 anys fins i tot analitzant menys cromosomes. Els autors també observen una reducció en la incidència d'embarassos múltiples i descendència amb trisomies. En pacients amb avortaments recurrents es redueix el risc d'avortament, però, per altra banda, en pacients amb fallades de FIV, no es detecta un clar efecte beneficiós del DGP-SA en l'augment de les taxes d'implantació o embaràs o la reducció de la taxa d'avortament.

En una revisió recent, Werlin et al. (2003) han valorat l'aplicació del DGP-SA a tres grups de pacients: pacients amb avortaments recurrents (definint-ho com a dos o més avortaments espontanis), pacients d'edat materna avançada (aquelles amb > 38 anys) i pacients amb fallades de FIV recurrents (aquelles que han realitzat més de dos cicles de FIV sense èxit). Analitzant els cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y en aquests tres grups de pacients i comparant les taxes d'embaràs amb els corresponents grups control, s'ha arribat a la conclusió que l'aneuploïdia és la causa principal dels avortaments recurrents i, per tant, l'aplicació del DGP-SA pot ser beneficiosa en aquests grups. Per altra banda, també s'ha indicat que el SA no aporta beneficis en les pacients amb fallades de FIV i, segons aquests

autors, no queda clar si realment aquesta tècnica beneficia les pacients de més de 38 anys.

Altres estudis (Staessen et al. 2004) no han detectat millores en la taxa d'implantació ni en la taxa de β -HCG positiva en sang en aplicar SA analitzant set cromosomes en pacients de ≥ 37 anys als quals es va fer la transferència embrionària en estadi de blastocist.

Malgrat tot, es continua evidenciant una influència de l'edat materna en la taxa d'aneuploïdies. L'anàlisi citogenètica realitzada en fetus d'avortaments de pacients de FIV mostra que la taxa d'aneuploïdies és del 65% en dones de < 40 anys però augmenta al 82% en dones de ≥ 40 anys (Spandorfer et al. 2004).

El DGP-1CP per a la detecció d'aneuploïdies comporta, d'una banda, evitar la transferència d'aquells embrions amb alteracions per als cromosomes analitzats, fet que pot contribuir a augmentar la taxa d'embaràs. Per altra banda, i no menys important, permet una valoració de les alteracions citogenètiques dels oòcits produïts per una dona amb risc d'aneuploïdies per a la descendència. Ambdós constitueixen estudis imprescindibles per a un millor coneixement de l'aneuploïdia d'origen femení. És molt important tenir present, i, en aquest sentit, poder-ho explicar a les parelles, que s'ha demostrat que el fet d'aplicar la tècnica de biòpsia i anàlisi del 1CP no compromet la taxa de fecundació, no empitjora el desenvolupament embrionari i no s'ha detectat que produeixi un augment en la incidència d'alteracions en nounats (Montag 2004). Amb tot això, i tenint en compte l'elevada proporció d'oòcits aneuploides detectada en els nostres estudis de DGP-1CP per al cribatge d'aneuploïdies, corroborem l'interès de l'aplicació d'aquesta tècnica a determinats grups de pacients.

5.2.2. Pacients portadores de translocacions

El DGP aplicat a dones portadores de translocacions pretén seleccionar embrions amb dotacions cromosòmiques normals o equilibrades per als cromosomes implicats en la translocació estudiada. Aquests embrions únicament es poden originar a partir d'oòcits resultants d'una segregació alternant 2:2 o adjacent 1 amb recombinació al segment intersticial en el cas d'una translocació recíproca i d'una segregació alternant 2:1 en el cas d'una translocació robertsoniana.

En la pacient PT 1, portadora d'una translocació recíproca $t(8;13)(q24.1;q22)$, la freqüència de segregació equilibrada va ser força baixa, 11,1% (1/9) (taula 2, art. 2). El cromosoma 13 té un lloc de recombinació en el braç q que s'expressa en una freqüència alta; en espermatòcits és del 86% (Laurie i Hultén 1985). En aquesta translocació recíproca, la zona de recombinació es troba a la part intersticial del tetravalent format pels cromosomes 8 i 13 (figura 3, art. 2). Com a conseqüència d'aquest fet es formen cromosomes amb cromàtides diferents, com s'ha identificat en el 1CP dels oòcits 6, 7 i 11 (taula 2, art. 2). En aquest cas no és possible distingir entre les segregacions alternant i adjacent 1 i l'intercanvi pot afavorir la segregació adjacent (Durban et al. 2001). En les pacients PT 2 i PT 3, portadores d'una translocació robertsoniana $t(13;14)(q10;q10)$, la freqüència de segregació normal o equilibrada va ser del 50% (6/12) i del 44,4% (4/9), respectivament. En les translocacions robertsonianes, mai no es troben cromosomes amb cromàtides desiguals (figura 3, art. 2).

L'aplicació de diverses rondes de FISH sobre la mateixa cèl·lula s'ha dut a terme amb èxit tant en el nostre treball com en altres estudis. Bahçe et al. (2000) apliquen dues rondes en DGP analitzant blastòmer, i Escudero et al. (1998) n'apliquen fins a vuit en extensions cromosòmiques en metafase II. Tot i així, en algunes de les cèl·lules analitzades, la desnaturalització progressiva del DNA ha fet que en alguns casos augmenti el nombre de cromosomes no diagnosticats, fet que no implica un augment en el nombre d'errors de FISH.

En els DGP de portadores de translocacions, habitualment s'analitzen només els cromosomes implicats en la translocació. El nostre treball confirma que és molt important analitzar també altres cromosomes no implicats en la translocació, ja que és freqüent trobar alteracions en aquests cromosomes. Aquest alt índex d'aneuploidies per als cromosomes no implicats en la translocació, majoritàriament d'hiperhaploïdies, que es troba en les pacients portadores de translocacions robertsonianes més que no pas en les recíproques, podria ser degut a diverses causes. Així, com ja s'ha descrit a l'apartat 5.1, hi ha diversos factors que podrien provocar un augment en l'índex d'aneuploidies en augmentar l'edat materna; per exemple, Sandalinas et al. (2002) han trobat un increment en la predivisió

desequilibrada de cromàtides amb l'edat que predisposaria a un augment en la taxa d'aneuploïdies. L'edat avançada podria explicar la presència d'alteracions en cromosomes no implicats en la translocació en la pacient PT 2 (91,7%), de 39 anys. No obstant això, l'elevada taxa d'aneuploïdia detectada en la pacient PT 3 (72,7%), de 36 anys, pot indicar l'existència d'una tendència pacient-específica a la no-disjunció.

Una altra possible causa podria ser originada per la mateixa presència del trivalent que formen els cromosomes implicats en la translocació durant la meiosi I. És freqüent que el trivalent presenti un aparellament incomplet dels braços p dels cromosomes homòlegs que podria provocar alteracions generalitzades en l'aparellament d'altres bivalents (Navarro et al. 1991) i que afectarien la seva segregació meiòtica, cosa que generaria el que Lejeune (1963) va anomenar *efectes intercromosòmics* (EIC). Per altra banda, la baixa taxa d'aneuploïdies trobada en la pacient portadora de la translocació recíproca podria suggerir que el quadrivalent format durant la meiosi I, si més no en aquest cas, no influencia la segregació dels altres cromosomes no involucrats en la translocació.

S'ha trobat que la pacient PT 1 presenta un risc de segregació anòmala per cromosoma del 0,24%, la PT 2 el té del 3,1% i la PT 3 del 2,2%. Les pacients portadores de translocacions robertsonianes (PT 2 i PT 3) presenten un risc superior al que s'ha trobat en la sèrie control d'oòcits de pacients amb cariotip normal (art. 1), que és del 0,89%. Aquest fet referma la influència que pot tenir una translocació robertsoniana en l'increment d'aneuploïdies de cromosomes no implicats en la reorganització.

És important saber la constitució cromosòmica de l'oòcit no només pel que fa als cromosomes implicats en les translocacions, sinó també pel que fa a altres cromosomes, sobretot per a aquells que es troben més freqüentment implicats en aneuploïdies. Tot i que el nombre d'embrions transferibles seria més alt si només s'analitzessin els cromosomes de les translocacions, es produirien més avortaments, ja que freqüentment s'estarien transferint embrions amb alteracions per a altres cromosomes.

Aquest treball mostra clarament un origen matern de les aneuploïdies, atribuïble als EIC més que únicament a l'edat materna avançada. Caldrà analitzar més casos per esbrinar si la tendència a un alt índex

d'aneuploïdies és pacient-específica o bé és conseqüència del comportament meiòtic associat a les translocacions recíproques o robertsonianes.

La possibilitat d'analitzar en una segona etapa dels DGP-1CP per SA els embrions derivats d'òocits no informatius, tal com es va fer en la pacient PT 3, constitueix un fet molt interessant que pot implicar incrementar el nombre d'embrions transferibles. Aquesta alternativa ha estat considerada de manera positiva recentment per Magli et al. (2004) i Kuliev i Verlinsky (2004).

5.3. Estudi d'aneuploïdies en cèl·lules embrionàries de pacients portadores de translocacions recíproques

S'ha vist que les parelles portadores de translocacions tenen un risc augmentat de produir embrions amb un desenvolupament alentit i, en conseqüència, fallades de FIV. S'ha suggerit que aquest fet pot ser degut a la producció de gàmetes desequilibrats per als cromosomes implicats en la translocació i també a la producció de gàmetes aneuploides per als altres cromosomes (Findikli 2003).

Per a aprofundir en l'estudi d'aneuploïdies presents en portadors o portadores de translocacions recíproques, s'ha triat un grup de pacients portadors que ja s'havien sotmès a DGP per a l'anàlisi de la segregació mitjançant l'estudi en blastòmer dels cromosomes implicats en la translocació. S'ha dut a terme una reanàlisi dels blastòmers per a cinc cromosomes no implicats en les translocacions recíproques analitzades (13, 16, 18, 21 i 22), fet que ha permès avaluar la taxa d'aneuploïdies per a cromosomes no implicats en la translocació i el grau de mosaïcisme dels embrions analitzats.

En el nostre treball (art. 3) s'han estudiat les aneuploïdies no relacionades amb la translocació separant els embrions que provenen d'homes portadors d'aquells que provenen de dones portadores i considerant dos grups segons l'edat materna. Està descrit que analitzant únicament els cinc cromosomes esmentats s'identifiquen el 82% d'embrions amb alteracions (Abdelhadi et al. 2003).

S'han trobat 115 (91,3%) embrions anormals, 28 dels quals (22,2%) afectant només els cromosomes implicats en la translocació, 66 (52,4%) afectant els cromosomes implicats i no implicats en la translocació, 10 (8%)

afectant només els cromosomes no implicats en la translocació i 11 s'han trobat anormals per la translocació però no s'han diagnosticat per l'SA (taula III, art. 3).

L'existència d'una reorganització pot modificar el procés meiòtic normal en dos vessants: un de relacionat amb el comportament del quadrivalent i l'altre relacionat amb les conseqüències d'aquest comportament vers la segregació d'altres cromosomes (EIC). El quadrivalent, que és una estructura formada a l'etapa de paquitè i única per a cada translocació, té un comportament que depèn de les característiques morfològiques dels cromosomes translocats, de la mida dels segments cromosòmics intersticials i translocats i del patró de recombinació que es dona durant la meiosi I, i determina la distribució en la producció de gàmetes normals i equilibrats respecte a la de desequilibrats. La resolució del quadrivalent i la segregació dels cromosomes implicats en la translocació estan influenciades per la presència o absència de quiasmes intersticials (Durban et al. 2001).

La majoria dels embrions analitzats (83,3%; 84,2% en dones portadores i 82% en homes portadors) (taula III, art. 3) tenen complements cromosòmics desequilibrats a causa de la segregació dels cromosomes implicats en la translocació. Altres estudis també mostren freqüències elevades d'embrions desequilibrats per als cromosomes implicats en la translocació. Verlinsky et al. (2002) van trobar un 72,3% d'embrions desequilibrats (76,4% en dones portadores i 68,2% en homes portadors). Findikli (2003) va trobar un 78,3% d'embrions desequilibrats en dones portadores i un 63,2% en homes portadors. Segons dades de l'ESHRE (Sermon et al. 2005), entre els anys 1997 i 2001 es van realitzar 336 cicles de FIV amb DGP en pacients portadors de translocacions recíproques (159 en dones portadores i 177 en homes portadors) i es van diagnosticar com a no transferibles el 85,7% dels embrions (77,8% en dones portadores i 93,5% en homes portadors).

En el nostre treball, el 84,2% dels embrions de dones portadores són desequilibrats, percentatge que resulta força elevat en relació amb el percentatge d'òcits desequilibrats obtingut per Findikli (2003) (69,2%) i amb el descrit en una revisió de resultats obtinguts en aquest tipus de pacients (Durban et al. 2001), que mostrava que el 56% dels òcits diagnosticats a través de 1CP són desequilibrats.

En el nostre treball, el 82% dels embrions d'homes portadors són desequilibrats. Les freqüències d'espermatozoides desequilibrats trobades en portadors de translocacions recíproques, en estudis realitzats utilitzant el test de l'hàmsster o analitzant caps descondensats d'espermatozoide mitjançant FISH, varien àmpliament del 23% al 81% (Benet et al. 2005).

Així doncs, la freqüència d'embrions desequilibrats que hem trobat en el nostre estudi en parelles en què o bé l'home o bé la dona són portadors de la translocació és força elevada, però la mida de la mostra analitzada és petita. Tant la mida de la mostra analitzada com les diferents característiques pròpies de cada translocació poden explicar els nostres resultats.

Alguns treballs han posat en evidència l'existència d'EIC en estudiar portadors de translocacions mitjançant FISH en caps descondensats d'espermatozoide (Estop et al. 2000) (Pellestor et al. 2001) (Oliver-Bonet et al. 2002) (Anton et al. 2004). En general, sembla que aquest fenomen es presenta bàsicament en portadors de translocacions amb seminogrames alterats. Quan s'avalua el seu risc genètic, la importància de la presència d'EIC radica en la possible producció de gàmetes amb aneuploïdies viables que podrien generar embrions anormals.

En el nostre estudi, el risc de segregació anòmala per cromosoma en l'SA ha estat del 7,48%, un risc superior al que s'ha trobat en els oòcits de la sèrie control (0,89%) (art. 1). Aquesta diferència, així com l'alt índex d'alteracions trobades en cromosomes no implicats en les translocacions (60,4%) fa pensar que els EIC tenen un paper en les translocacions recíproques analitzades. Aquest fet podria explicar el poc èxit aconseguit en realitzar el DGP analitzant únicament la segregació dels cromosomes implicats en la translocació tot i haver-se realitzat transferència d'embrions normals o equilibrats en la majoria dels cicles de FIV amb DGP escollits per a la reanàlisi.

Un estudi recent (Gianaroli et al. 2002) indica que les aneuploïdies de cromosomes no implicats en la translocació no contribueixen significativament a la baixa taxa d'embaràs aconseguida en realitzar DGP en portadors de translocacions recíproques, però sí en portadors de translocacions robertsonianes. Aquests autors van analitzar conjuntament

embrions provinents tant de dones com d'homes portadors, incloent cicles en els quals es va aconseguir embaràs i cicles en què no.

En la meiosi femenina el punt de control anafàsic no és gaire estricte i es poden produir oòcits alterats (LeMarie-Adkins et al. 1997); en la gametogènesi masculina, alguns estudis indiquen que existeix un punt de control estricte que atura la meiosi i redueix la producció d'espermatozoides anòmals (Roeder i Bailis 2000). Segons aquestes hipòtesis, la freqüència d'alteracions cromosòmiques detectada en embrions podria dependre del sexe del portador de la reorganització. En el nostre treball no s'han obtingut diferències significatives en aquestes freqüències i, per tant, no s'ha detectat l'existència d'un procés selectiu lligat al sexe.

L'increment en la taxa d'aneuploïdia dels cromosomes no implicats en la translocació també pot estar influenciat per l'edat materna. De fet, recentment s'ha descrit que un 33% dels embrions de dones de < 37 anys, amb cariotip normal i sotmeses a FIV, presenten aneuploïdies (estudiant els cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X i Y) i aquesta incidència es duplica (66%) si les pacients tenen ≥ 37 anys (Rubio et al. 2003).

Per a avaluar el possible efecte de l'edat, s'han comparat els resultats de l'SA en dones portadores amb una edat de ≤ 37 anys i de > 37 anys. El percentatge d'embrions amb alteracions en cromosomes no implicats en la translocació ha estat del 52,8% (≤ 37 anys) i del 60% (> 37 anys). Aquesta diferència no ha estat significativa. Aquests resultats fan pensar que la presència del quadrivalent afecta la segregació dels cromosomes no implicats en la translocació i incrementa la incidència d'aneuploïdies en les portadores més joves.

Un altre fet que també suggereix l'existència dels EIC és que en homes portadors amb una parella de ≤ 37 anys, tot i que no s'esperaria trobar aneuploïdies relacionades amb l'edat, un 77,4% dels embrions han estat aneuploides per a cromosomes no implicats en la translocació.

Així doncs, els nostres resultats indiquen que, en aquest grup de pacients, la generació d'aneuploïdies estaria més influenciada per la presència del quadrivalent que no pas per l'edat materna.

En estudiar el mosaïcisme, s'ha trobat que almenys el 58,7% (74/126) dels embrions són mosaics pel que fa als cromosomes implicats i no implicats en la translocació: el 13,5% (17/126) són mosaics tant pels cromosomes de la

translocació com pels analitzats en l'SA, el 7,1% (9/126) són mosaics només pels cromosomes de la translocació, el 21,4% (27/126) són mosaics només pels cromosomes estudiats en l'SA i el 17,6% (21/126) són mosaics per la translocació, però no han estat diagnosticats per SA (taula V, art. 3). Aquests resultats concorden amb treballs recents en què s'ha detectat un alt índex de mosaïcisme en embrions de portadors de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades: 73%, 98% i fins i tot 100% (Emiliani et al. 2003) (Iwarsson et al. 2000) (Malmgren et al. 2002). La pèrdua de cromosomes en estadis postzigòtics ha estat descrita com el mecanisme generador de mosaïcisme més comú, seguit del guany cromosòmic (Daphnis et al. 2005).

El nostre estudi corrobora la importància d'incloure rutinàriament l'estudi d'aneuploidies en els cicles de FIV amb DGP realitzats en parelles portadores de translocacions. En l'SA s'ha detectat que almenys el 60,4% (76/126) dels embrions analitzats són aneuploides per cromosomes no implicats en la translocació (taula III, art. 3); deu d'aquests embrions (8%) havien estat diagnosticats com a normals o equilibrats per la translocació i sis s'havien transferit durant el cicle de FIV amb DGP (taula IV, art. 3). El fet de realitzar una selecció més estricta dels embrions que es transfereixen milloraria els resultats assolits en aquest grup de pacients.

5.4. Estadi replicatiu de la cromatina en cèl·lules proliferants i errors en la interpretació dels resultats de la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent

En els últims anys hi ha hagut un augment important en el nombre de DGP realitzats utilitzant FISH. L'eficiència d'aquesta tècnica és important que sigui òptima, ja que un error podria portar al naixement d'un nadó afectat per algun desordre cromosòmic.

El protocol de DGP-1CP establert pel nostre grup (Durban et al. 2001) permet també l'anàlisi de blastòmer dels embrions procedents d'òocits dels quals no es disposa de diagnòstic de 1CP. A vegades, el tipus de senyals obtinguts en FISH poden ser difícils d'interpretar i provocar errors de diagnòstic. Ens vam plantejar si el fet que els blastòmers siguin cèl·lules en proliferació pot complicar el diagnòstic mitjançant FISH.

Per a avaluar la incidència de senyals confusos degut a les característiques de replicació dels blastòmers, l'estudi s'ha dut a terme en dues línies cel·lulars model de comportaments diferenciats. Com a cèl·lules no proliferants que estan en estadi de G0 s'han emprat cèl·lules de Sertoli, i com a cèl·lules en proliferació s'han emprat limfòcits estimulats que s'han considerat com a model de blastòmers.

S'espera que una cèl·lula diploide que no està en divisió presenti dos senyals per cada un dels tres parells cromosòmics analitzats, és a dir, expressi un patró de FISH 2:2:2. Tal com es mostra a la figura 2 (art. 4), els limfòcits han presentat una freqüència significativament més elevada de cèl·lules amb un patró diferent del 2:2:2 que les cèl·lules de Sertoli. Això està relacionat probablement amb l'estat proliferatiu dels limfòcits analitzats. Conseqüentment, el fet d'analitzar mitjançant FISH cèl·lules que poden estar replicant podria causar errors d'interpretació segons la fase del cicle cel·lular en què es trobi la cèl·lula analitzada.

L'absència de senyal per a un dels cromosomes analitzats pot ser considerada com un error de la tècnica de FISH. S'ha observat que en les cèl·lules de Sertoli aquest error es dona amb una freqüència de l'1,5%, mentre que en limfòcits és del 7%. La tècnica de FISH s'està aplicant amb èxit en el DGP, ja sigui per a l'estudi de la segregació meiótica en portadors de reorganitzacions cromosòmiques com per a l'SA (Sermon et al. 2005). Els errors de diagnòstic, que solen ser poc freqüents, almenys pel que fa als falsos negatius, podrien ser resultat de l'observació de cèl·lules en proliferació que es troben, en el moment de l'anàlisi, en diferents estadis replicatius i que, a més a més, contenen regions cromosòmiques que no repliquen a la vegada. La freqüència mostrada per les cèl·lules proliferants en el nostre estudi coincideix exactament amb la taxa d'error en la FISH estimada per un grup experimentat en la realització de DGP-SA (Munné et al. 2002).

A més, els cromosomes dels diferents tipus cel·lulars no estan sempre organitzats en el nucli de la mateixa manera. L'estadi de diferenciació cel·lular també s'ha relacionat amb l'eficiència de la FISH. S'ha descrit que la reducció en el percentatge de resultats positius de FISH en cèl·lules fetals podria ser degut al fet que algunes regions de cromatina es disposessin de manera estructuralment diferent en nuclis de cèl·lules adultes i prenatales

(Grao et al. 1993). En conseqüència, la freqüència d'aparició de dobles marques degudes a les característiques de marcatge de les sondes (senyals partits) s'hauria d'avaluar en cada tipus cel·lular.

S'ha deduït que en limfòcits les sondes LSI i CEP produeixen menys errors de FISH (6,5% i 9%, respectivament) que les sondes Tel (19,5%). Aquest resultat suggereix que les sondes Tel s'haurien d'utilitzar amb més cura a l'hora d'aplicar-les en cèl·lules en proliferació. Per a identificar correctament les senyals de FISH i obtenir un diagnòstic acurat, és recomanable l'ús d'un criteri adequat per personal amb experiència.

A més, de la mateixa manera que, en alguns casos, s'usen dues sondes diferents per a un mateix cromosoma com a marcadors d'aquell cromosoma (Magli et al. 2001), pensem que seria recomanable incloure marcadors de l'inici i el final de la replicació per tal de ser usats simultàniament amb les sondes diagnòstiques de FISH en realitzar un DGP en blastòmers, tal com ja s'ha fet en alguns tipus cel·lulars. Per exemple, el gen CD3D i el gen de la glicogen fosforilasa muscular (PYGM) són gens de replicació primerenca en la línia cel·lular *Manca* de limfòcits humans; la sonda per a una regió variable de la IgH va mostrar un patró de replicació tardana (Calza et al. 1984) (Selig et al. 1992), i CFTR i β -globina repliquen tard en fibroblasts en fase S (Ofir et al. 2002). El fet que alguns gens repliquin de manera sincrònica en cèl·lules disòmiques i asincrònica en cèl·lules aneuploides (Amiel et al. 1998) (Amiel et al. 1999) fonamentaria la utilitat que tindria l'aplicació d'un marcador de l'estadi replicatiu que informés de la fase del cicle cel·lular. L'ordre de replicació trobat de les regions marcades en cada cèl·lula (locus específic, telomèric i centromèric, respectivament), juntament amb el marcador escollit, facilitarien la interpretació dels senyals d'hibridació.

6. CONCLUSIONS

1. S'ha desenvolupat una metodologia de FISH que permet detectar, per primera vegada, fins a nou cromosomes en 1CPs i en MII. Aquesta detecció permet estimar el rang de segregació anòmala i seleccionar oòcits euploides per als cromosomes analitzats.
2. Aquest treball posa en evidència que només una minoria de les absències de cromosomes o cromàtides detectades en 1CP (25,8%) són artefactuals.
3. Tant la freqüència d'aneuploïdia obtinguda per als nou cromosomes estudiats (47,5%) com el risc estimat d'aneuploïdia per els 23 cromosomes (57,2%) són molt elevats. S'estima un risc de segregació anòmala del 0,89% per a cada un del 23 cromosomes.
4. L'estudi realitzat ha permès identificar diferents mecanismes de generació d'aneuploïdies en l'oòcit: separació precoç de cromàtides germanes i no-disjunció de cromosomes homòlegs en la meiosi i segregació anòmala en la mitosi de l'etapa proliferativa de la línia germinal (mosaicisme gonadal). Són més freqüents les alteracions de cromosoma (55,8%) que les de cromàtide (44,2%). La predivisió de cromàtides s'observa amb més freqüència al 1CP que a la MII ($p < 0,0001$). En un 25,7% de les pacients analitzades s'ha evidenciat l'existència de mosaicisme gonadal.
5. L'anàlisi d'aneuploïdies per a nou cromosomes es pot aplicar al DGP-1CP en dones amb un risc augmentat de tenir descendència aneuploide. S'ha establert un protocol que permet, si cal, l'anàlisi de l'embrió corresponent. Aquest protocol aplicat a dones d'edat avançada ha permès constatar una alta incidència d'aneuploïdies (60,4%).
6. L'anàlisi d'aneuploïdies en 1CP de dues pacients portadores de translocacions robertsonianes ha mostrat una taxa d'aneuploïdia molt alta per als cromosomes no implicats en la translocació (91,7% i 72,7%), independentment de les alteracions observades per als cromosomes de la translocació.

7. L'anàlisi d'aneuploïdies en blastòmers de pacients portadors i portadores de translocacions recíproques mostra una alta taxa d'aneuploïdies de cromosomes no implicats en la translocació (60,3%) i també un alt percentatge de mosaïcisme (58,7%), tenint en compte tant els cromosomes implicats com els no implicats en la translocació. S'han trobat embrions normals o equilibrats per la translocació però aneuploides per altres cromosomes.

8. Sembla necessari l'estudi seqüencial de la segregació dels cromosomes implicats en la translocació i de les aneuploïdies per altres cromosomes, en pacients portadors de translocacions.

9. En aplicar FISH en cèl·lules en proliferació s'estima que el 10,8% de dobles marques en excés trobades, en comparació amb les trobades en cèl·lules no proliferants, no són senyals partits, sinó probablement resultat de l'estat replicatiu de les cèl·lules. Això explicaria part dels errors, deguts al resultat de la FISH, que es poden cometre durant el diagnòstic d'embrions en blastòmers.

10. Caldria aplicar un marcador de l'estat replicatiu cel·lular simultàniament amb les sondes diagnòstiques de FISH en blastòmers.

7. BIBLIOGRAFIA

A

Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munné S (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reproductive BioMedicine Online* 6, 226-231

American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (1998) Society for Assisted Reproduction Technology 1998. Assisted Reproductive technology in the United States and Canada: 1995 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproduction Technology Registry. *Fertility and Sterility* 69, 389-398

Amiel A, Avivi L, Gaber E , Fejgin MD (1998) Asynchronous replication of allelic loci in Down syndrome. *European Journal of Human Genetics* 6, 359-364

Amiel A, Korenstein A, Gaber E , Avivi L (1999) Asynchronous replication of alleles in genomes carrying an extra autosome. *European Journal of Human Genetics* 7, 223-230

Angell R, Aitken R, van Look P, Lumsden M, Templeton A (1983) Chromosome abnormalities in human embryos after in vitro fertilization. *Nature* 303, 336-338

Angell RR, Xian J , Keith J (1993) Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Human Reproduction* 8, 1047-1054

Anton E, Vidal F, Egozcue J, Blanco J (2004) Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reproductive BioMedicine Online* 9, 637-644

B

Baart E, Van Opstal D, Los F, Fauser B , Martini E (2004) Fluorescence *in situ* hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-

- thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Human Reproduction* 19, 685-693
- Bahçe M, Cohen J , Munné S (1999) Preimplantation Genetic Diagnosis of Aneuploidy: Were we Looking at the Wrong Chromosomes? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16, 176-181
- Bahçe M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M , Munné S (2000) Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave hybridization, cell recycling and monocolour labelling of probes. *Molecular Human Reproduction* 6, 849-854
- Barri PN, Veiga A , Calderon G (1984) Embarazo por fecundación *in vitro*. *Progresos en Obstetricia y Ginecología* 27, 211-214
- Bartmann AK, Salata Romao G, da Silveira Ramos E, Ferriani RA (2004) Why Do Older Women Have Poor Implantation Rates? A Possible Role of the Mitochondria. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 79-83
- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA , Soules MR (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human Reproduction* 11, 2217-2222.
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C, Navarro J (2005) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers. *Cytogenetics and Genome Research*. In press
- Bielanska M, Tan S, Ao A (2002) Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Human Reproduction* 17, 413-419
- Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM (2002) Preimplantation Genetic Diagnosis. *Nature Reviews* 3, 941-953

C

- Calza R, Eckhardt A, DelGiudice T, Schildkraut C (1984) Changes in gene position are accompanied by a change in time of replication. *Cell* 36, 689-696
- Chandley AC, Speed R, Leitch A (1996) Different distributions of homologous chromosomes in adult human Sertoli cells and in lymphocytes signify nuclear differentiation. *Journal of Cell Science* 109, 773-776
- Chandley AC, Speed R, Ma K (1994) Meiotic chromosome preparation. *Methods in Cell Biology* 29, 27-40
- Chang M (1959) Fertilization of Rabbit in vitro. *Nature*, 184 466-467. Suppl 7
- Clyde J, Gosden J, Rutherford A, Picton H (2001) Demonstration of a mechanism of aneuploidy in human oocytes using Multifluor fluorescence *in situ* hybridization. *Fertility and Sterility* 76, 837-840
- Conn C, Harper J, Winston R, Delhanty J (1998) Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Human Genetics* 102, 117-123
- Conn CM, Cozzi J, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD (1999) Preimplantation genetic diagnosis for couples at high risk of Down syndrome pregnancy owing to parental translocation or mosaicism. *Journal of Medical Genetics* 36, 45-50
- Coonen E, Dumoulin J, Ramaekers F, Hopman A (1994) Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 9, 533-537
- Coonen E, Martini E, Dumoulin JC, Hollanders-Crombach HT, Die-Smulders C, Geraedts JP, Hopman AH, Evers JL (2000) Preimplantation genetic

diagnosis of a reciprocal translocation t(3;11)(q27.3;q24.3) in siblings. *Molecular Human Reproduction* 6, 199-206

D

Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II. *American Journal of Human Genetics* 59, 176-184

Daphnis D, Delhanty J, Jerkovic S, Geyer J, Craft I, Harper J (2005) Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Human Reproduction* 20, 129-137

De Vos A, Sermon K, De Rijcke M, Grossens V, Henderix P, Van Ranst N, Platteau P, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A et al. (2003) Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Molecular Human Reproduction* 9, 429-435

Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Laila JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J (2001) PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Human Reproduction Update* 7, 591-602

Durban M, Benet J, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J (1998) Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes. *Human Reproduction* 13, 583-587

Dyban A, Freidine M, Severova E, Cieslak J, Ivakhnenko V, Verlinsky Y (1996) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13, 73-78

E

Egozcue J (1996) Preimplantation diagnosis in older patients. To biopsy or not to biopsy. Of course, not. *Human Reproduction* 11, 2077-2078

- Egozcue J, Santaló J, Giménez C, Durban M, Benet J, Navarro J, Vidal F (2002) Preimplantation genetic screening and human implantation. *Journal of Reproductive Immunology* 55, 65-72
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell J, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 6, 93-105
- Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden J (2004) Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 8, 45-58
- Emiliani S, González-Merino E, Van den Bergh M, Abramowicz M, Englert Y (2003) Higher Degree of Chromosome Mosaicism in Preimplantation Embryos from Carriers of Robertsonian Translocation t(13;14) in comparison with Embryos from Karyotypically Normal IVF Patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20, 95-100
- Escudero T, Fuster C, Coll M, Egozcue J (1998) Cytogenetic analysis using simultaneous and sequential fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 100, 111-113
- ESHRE Capri Workshop Group (2000) Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. *Human Reproduction* 15, 723-732
- Estop AM, Ciepły K, Munné S, Surti U, Wakim A, Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Human Genetics* 106, 517-524
- Evsikov S, Cieslak J, Verlinsky Y (2000) The effect of chromosomal translocations on the development of preimplantation human embryos *in vitro*. *Fertility and Sterility* 7, 672-677

F

Findikli N (2003) Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases. *Reproductive BioMedicine Online* 7, 563-571

FIVCAT (2001) Informe de la Generalitat sobre Reproducció Humana a Catalunya 2001. Servei d'informació i Estudis. Direcció General de Recursos Sanitaris. Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya

Ford C , Clegg H (1969) Reciprocal translocations. *British Medical Bulletin* 25, 110-114

G

Gianaroli L, Magli M, Ferraretti A, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Human Reproduction* 17, 3201-3207

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti A, Munné 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. *Fertility and Sterility* 72, 837-844

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP (2001) The *in vivo* and *in vitro* efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Molecular and Cellular Endocrinology* 183, S13-18

Grao P, Guitart M, Coll M, Egozcue J (1993) Appraisal of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques in prenatal diagnosis. *Early Human Development* 33, 101-108

Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez M, Sánchez-García JF, Egozcue J, Navarro J, Munné S (2004 a) Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization

and metaphase II fluorescence *in situ* hybridization analysis. Human Reproduction 19, 2859-2868

Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia J, Bermudez M, Belil I, Egozcue J, Munné S, Navarro J (2004 b) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. Human Reproduction 19, 2118-2125

H

Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston R (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 344, 768-770

Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD (1995) Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. Prenatal Diagnosis 15, 41-49

Hassold T, Chiu D (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. Human Genetics 70, 11-17

Hassold T, Jacobs P (1984) Trisomy in man. Annual Review of Genetics 18, 69-97

Hook E, Hamerton J (1977) The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies/differences between studies. Results by sex and by severity of phenotypic involvement. A Hook B i Porter I (ed) Population Cytogenetics. Academic Press, New York, 66-79

I

Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J, Ährlund-Richter L, Sjöblom P, Rosenlund B, Fridström M, Hovatta O, Nordenskjöld M, Blennow E (2000) Highly abnormal cleavage divisions in preimplantation

embryos from translocation carriers. *Prenatal Diagnosis* 20, 1038-1047

J

Jacobs P, Hassold T (1995) The origin of numerical chromosomal abnormalities. *Advances in Genetics* 33, 101-133

K

Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakisn K, Cengiz G, Dönmez E (2000) Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Human Reproduction* 15, 2003-2007

Krey L, Grifo JA (2001) Poor embryo quality: the answer lies (mostly) in the egg. *Fertility and Sterility* 75, 466-468

Kuliev A, Cieslak J, Iikevitch Y, Verlinsky Y (2003) Chromosome abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reproductive BioMedicine Online* 6, 54-59

Kuliev A, Verlinsky Y (2002) Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive BioMedicine Online* 5, 296-301

Kuliev A, Verlinsky Y (2004) Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction* 10, 401-407

L

Lamb N, Freeman S, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May K, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to nondisjunction in both maternal meiosis-I and meiosis-II. *Nature Genetics* 14, 400-405

Laurie D, Hultén M (1985) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Annals of Human Genetics* 49, 203-214

Lejeune J (1963) Autosomal disorders. *Pediatrics* 32, 326-337

LeMarie-Adkins R, Radke K, Hunt P (1997) Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *Journal of Cell Biology* 139, 1611-1619

Leridon H (2004) Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Human Reproduction* 19, 1548-1553

Los F, Van Opstal D, van den Berg C (2004) The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Human Reproduction Update* 10, 79-94

M

Macklon N, Geraedts JP, Fauser B (2002) Conception to ongoing pregnancy: the "black box" of early pregnancy loss. *Human Reproduction Update* 8, 333-343

Magli C, Sandalinas M, Escudero T, Morrison L, Ferraretti A, Gianaroli L, Munné S (2001) Double locus analysis of chromosome 21 for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Prenatal Diagnosis* 21, 1080-1085

Magli M, Gianaroli L, Ferraretti A, Toschi M, Esposito F, Fasolino M (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Human Reproduction* 19, 1163-1169

Mahmood R, Brierley C, Faed M, Mills J, Delhanty J (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Human Genetics* 106, 620-626

Malmgren H, Sahlén S, Inzunza J, Aho M, Rosenlund B, Fridström M, Hovatta O, Ährlund-Richter L, Nordenskjöld M, Blennow E (2002) Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human

- embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Molecular Human Reproduction* 8, 502-510
- Márquez C, Cohen J, Munné S (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenetic and Cell Genetics* 81, 254-258
- Meldrum D (1993) Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertility and Sterility* 59, 1-5
- Ménezo Y, Bellec V, Zaroukian A, Benkhalifa M (1997) Embryo selection by IVF, co-culture and transfer at the blastocyst stage in case of translocation. *Human Reproduction* 12, 2802-2803
- Ménezo Y, Hazaout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B (1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Human Reproduction* 7, 101-106
- Miller E, Therman E (2001) *Human chromosomes*. Fourth Edition. Springer-Verlag, New York, 199
- Montag M (2004) Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing. *Reproductive Biomedicine Online* 9, 425-429
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris M, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M (2004) Meiotic segregation of translocation during male gametogenesis. *International Journal of Andrology* 27, 200-212
- Munné S (2002) Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reproductive Biomedicine Online* 4, 183-196
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995 a) Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility* 64, 382-391

- Munné S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M, Cohen J (2003) Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reproductive BioMedicine Online* 8, 81-90
- Munné S, Cohen J, Sable D (2002) Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertility and Sterility* 78, 234-236
- Munné S, Dailey T, Sultan K, Grigo J, Cohen J (1995 b) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Human Reproduction* 10, 1014-1020
- Munné S, Fung J, Cassel M, Márquez C, Weier H (1998 a) Preimplantation Genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis. *Human Genetics* 102, 663-674
- Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohen J, Gianaroli L (1998 b) Preimplantation Diagnosis of the Aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY,13,14,15,16,18,21,22. *Prenatal Diagnosis* 18, 1459-1466
- Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Márquez C, Sable D, Ferraretti A, Massey JB, Scott R (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reproduction* 14, 2191-2199
- Munné S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D (2004) Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenatal Diagnosis* 24, 638-643
- Munné S, Sapulveda S, Balmaceda J, Fernández E, Fabres C, Mackenna A, López T, Crosby J, Zegers-Hochschild F (2000) Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenatal Diagnosis* 20, 582-586

Munné S, Scott R, Sable D, Cohen J (1998 c) First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertility and Sterility* 69, 675-681

Munné S, Weier H (1996) Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis. *Cytogenetic and Cell Genetics* 75, 263-270

Munné S, Weier H, Stein J, Grifo J, Cohen J (1993) A fast and efficient method for simultaneous X and Y *in situ* hybridization of human blastomeres. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 10, 82-90

N

Navarro J, Vidal F, Benet J, Templado C, Marina S, Egozcue J (1991) XY-trivalent association and synaptic anomalies in a male carrier of a Robertsonian t(13;14) translocation. *Human Reproduction* 6 3, 376-381

Navot D, Bergh P, Williams M, Garrisi G, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *The Lancet* 337, 1375-1377

Nicolaidis P, Petersen M (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Human Reproduction* 13, 311-319

O

Ofir R, Yalon-Hacohen M, Segev Y, Schultz A, Skorecki KL, Selig S (2002) Replication and/or separation of some human telomeres is delayed beyond S-phase in pre-senescent cells. *Chromosoma* 111, 147-155

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

P

Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z (1995) Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertility and Sterility* 63, 1231-1240

- Paulasova P, Andreo B, Diblik J, Macek M, Pellestor F (2004) The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction* 10, 467-472
- Pellestor F, Anahory T, Andreo B, Regnier-Vigouroux G, Soulie J, Baudouin M, Demaille J (2004a) Fast multicolor primed *in situ* protocol for chromosome identification in isolated cells may be used for human oocytes and polar bodies. *Fertility and Sterility* 81, 408-415
- Pellestor F, Anahory T, Hamamah S (2005) The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Human Reproduction Update* 11, 15-32
- Pellestor F, Imbert I, Andreo B, 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. *Human Reproduction* 16, 1155-1164
- Pellestor F, Paulasova P, Macek M, Hamamah S (2004 b) The peptide nucleic acids: a new way for chromosomal investigation on isolated cells? *Human Reproduction* 19, 1946-1951
- Petit C, Bergère M, Lombroso R, Monnier-Barbarino P, Selva J, Gérard H (2002) First pregnancies after polar body biopsy laser-assisted and FISH analysis. *Human Reproduction* 17, 59-60. Abstracts book 1
- Petit C, Martel-Petit V, Fleurentin A, Monnier-Barbarino P, Joveaux P, Gerard H (2000) Use of PRINS for preconception screening of polar bodies for common aneuploidies. *Prenatal Diagnosis* 20, 1067-1071
- Pierce K, LM F, Seibel M, Zilberstein M (1998) Preimplantation genetic diagnosis of chromosome balance in embryos from a patient with a

balanced reciprocal translocation. *Molecular Human Reproduction* 4, 167-172

Plachot M, Mandelbaum J, Junca A (1990) Qualite de l'oocyte et de l'embryon et resultat de la FIV. *Contraception, Fertility and Sexuality* 18, 636-638

Plachot M, Veiga A, Montagut J, de Grouchy J, Calderon G, Lepretre S, Junca A, Santaló J, Carles E, Mandelbaum J (1988) Are clinical and biological parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Human Reproduction* 3, 627-635

R

Roeder G, Bailis J (2000) The pachitene checkpoint. *Trends in Genetics* 16, 395-403

Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction* 18, 182-188

S

Sandalinas M, Márquez C, Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Molecular Human Reproduction* 8, 580-585

Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S (2001) Developmental ability of chromosomically abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Human Reproduction* 16, 1954-1958

Scriven P, Flinter F, Braude P, Ogilvie CM (2001) Robertsonian translocations - reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction* 16, 2267-2273

Scriven P, Handyside A, Ogilvie M (1998) Chromosome translocations: Segregation Modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 18, 1437-1449

- Selig S, Okumura K, Ward D, Cedar H (1992) Delineation of DNA replication time zones by fluorescence *in situ* hybridization. *EMBO Journal* 11, 1217-1225
- Sermon K, Moutou C, Harper JC, Geraedts JP, Scriven P, Wilton L, Magli C, Michiels A, Viville S, De Die C (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Human Reproduction* 20, 19-34
- Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Preimplantation genetic diagnosis. *The Lancet* 363, 1633-1641
- Solari AJ (1996) *Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina*, 260. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires
- Spandorfer S, Davis O, Barmat L, Chung P, Rosenwaks Z (2004) Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertility and Sterility* 81, 1265-1269
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers 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. *Human Reproduction* 19, 2849-2858
- Staessen C, Van Assche E, Joris H, Bonduelle M, Vandervorst M, Liebaers I, Van Steirteghem A (1999) Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction* 4, 382-389
- Steptoe P, Edwards R (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 12, 366
- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker H (1999) Chromosome translocations in couples with in vitro fertilization implantation failures. *Human Reproduction* 14, 2097-2101

Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Kasterstein E, Schachter M, Ron-El R (2004) The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes. *Human Reproduction* 19, 1587-1590

Strom C, Verlinsky Y, Milayeva S, Evsikov S, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Ginsberg N, Applebaum M (1990) Preconception Genetic Diagnosis of Cystic Fibrosis. *The Lancet* 336, 306-307

T

Tarkowski A (1966) An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5, 394-400

Testart J, Gautier E, Bami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A (1996) Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. *Human Reproduction* 11, 2609-2612

U

Uhlmann F (2004) The mechanism of sister chromatid cohesion. *Experimental Cell Research* 296, 80-85

V

Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I (1999) Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence *in situ* hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Molecular Human Reproduction* 5, 682-690

Verlinsky Y, Cieslak J, Evsikov S, Galat V, Kuliev A (2002) Nuclear transfer for full karyotyping and preimplantation diagnosis for translocations. *Reproductive BioMedicine Online* 5, 300-305

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J (1995) Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent *in situ* hybridization. *Human Reproduction* 10, 1923-1927

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1999)

Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16, 165-169

Verlinsky Y, Evsikov S (1999) A simplified and efficient method for obtaining metaphase chromosomes from individual human blastomeres. *Fertility and Sterility* 72, 1127-1133

Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom C (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human Reproduction* 5, 826-829

Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Human Genetics* 106, 210-217

W

Wells D, Delhanty J (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction* 6, 1055-1062

Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty J, Munné S (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility* 78, 543-549

Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Mareello E, Hill D, Munné S (2003) Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility* 80, 467-468

Willadsen S, Levron J, Munné S, Schimmel T, Márquez C, Scott R, Cohen J (1999) Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with in-vitro matured bovine eggs. *Human Reproduction* 14, 470-475

Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J (2003)
Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic
hybridization or fluorescence *in situ* hybridization on embryos from
patients with recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility* 80,
860-866

Imatges

Gàmetes i embrions: Institut Universitari Dexeus i Clínica Eugén de
Barcelona

Nadó de la portada: www.anneddes.com