



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

ADN lliure en Plasma Matern: Marcadors d'ADN fetal i Detecció d'Anomalies Cromosòmiques d'Origen Patern

Memòria presentada per

Laura Rueda Bravo

Per optar al grau de

Doctora en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció dels doctors

Vincenzo Cirigliano i Carme Fuster

del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la

Universitat Autònoma de Barcelona

**ADN lliure en Plasma Matern:
Marcadors d'ADN fetal i
Detecció d'Anomalies Cromosòmiques
d'Origen Patern**

Memòria presentada per

Laura Rueda Bravo

Per optar al grau de

Doctora en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció dels doctors

Vincenzo Cirigliano i Carme Fuster

Programa de Biologia Cel·lular

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la

Universitat Autònoma de Barcelona

Vincenzo Cirigliano

Laura Rueda

Carme Fuster

Bellaterra, Juliol 2016

Aquest treball ha estat subvencionat per *SAFE Network of Excellence*;
número de referència LSHB-CT-2004-503243

A la Blau i al Liam

Al Jordi

A la meva mare, al meu pare i al meu germà

AGRAÏMENTS

Per fi! Després de tants anys, moltes persones han format part d'aquest projecte de manera directa o indirecta, pel que és un plaer haver arribat a aquest punt on tinc l'oportunitat d'agrair a tothom el seu suport.

Màxim agraïment als meus directors de tesi, han fet un esforç enorme per a l'elaboració d'aquest document en un temps rècord. M'han recolzat en tot moment i no han deixat mai de respondre. Mai em cansaré d'agrair-vos-ho...

Al Dr. Vincenzo Cirigliano, principal responsable d'aquest treball i de la meva trajectòria en el camp de la genètica i la biologia molecular; no em podria haver introduït en el diagnòstic prenatal de la mà d'un mestre millor. La seva generositat, el seu tarannà i la seva ment visionària han fet el camí encara més enriquidor i interessant. Soc molt afortunada de tenir-lo al costat.

A la Dra. Carme Fuster, des del minut ú fins al final, m'ha acompanyat amb la seva incansable energia positiva, els seus consells i les seves encertades indicacions. Serà la darrera tesi que dirigeixi abans de la seva ben merescuda jubilació, espero poder compensar-li algun dia haver-la fet treballar tan intensament fins al final. Gràcies per estar tan pendent de tot.

A tots els companys que, en un moment o altre de la trajectòria professional hem compartit moments de feina, sigui el lloc que sigui. Som el resultat de les vivències viscudes i també formeu part d'aquesta.

Als diferents grups amb qui he tingut l'oportunitat de treballar, a Vall d'Hebron, a *Warwick University*, a General Lab i, en especial, al seu departament de Biologia Molecular amb la Dra. Cañadas al davant: per tants anys i tantes vivències viscudes; m'heu ajudat a créixer com a professional i com a persona.

A la Dra. Loles Pons, per aquest darrer cop de gràcia tan i tan important. Gràcies per la teva ajuda i per la teva generositat amb el teu temps.

A la meva família i als meus amics, que m'han recolzat durant aquests llargs anys i que han demostrat la seva confiança en mi, a vegades molt més que jo mateixa. Gràcies.

A les meves iaies i avis, que creien tant en mi que fa anys que em deien doctora sense ser-ho.

Als meus pares i al meu germà, són els meus fonaments quan el terra es mou. No podria haver construït absolutament res sense el seu suport. Gràcies a vosaltres sóc qui sóc.

Al Jordi, el meu camp base i refugi permanent. Impossible finalitzar aquest projecte sense la seva implicació i confiança incondicional. Gràcies per tot l'esforç i pel temps robat.

Per a la Blau i el Liam, els últims que esdevingueren els primers ja abans d'arribar. Són la meva força i inspiració per tot el que faig, i m'ajuden a ser millor cada dia. Gràcies pels vostres somriures! Pel temps que no us he dedicat...

Desperta, és un nou dia,
la llum,
del sol levant, vell guia,
pels quiets camins de fum.

No deixis res
per caminar i mirar fins al ponent.
Car tot, en un moment,
et serà pres.

“Cançó d'albada”
Salvador Espriu

“Tómame el tiempo que necesitas...”

Anònim

ÍNDEX

ABREVIATURES	15
1. INTRODUCCIÓ	19
1.1. Cribratge i Diagnòstic Prenatal	21
1.2. Biologia de l'ADN fetal lliure en plasma	23
1.3. Metilació de l'ADN en el desenvolupament fetal	25
1.4. Aplicacions clíniques dels àcids nucleics en plasma	27
1.4.1. Anàlisi qualitativa	28
1.4.1.1. Anomalies lligades al sexe	28
1.4.1.2. Genotipatge del gen <i>RHD</i> fetal	29
1.4.1.3. Anomalies gèniques autosòmiques dominants d'origen patern i <i>de novo</i>	30
1.4.1.4. Anomalies gèniques autosòmiques recessives	31
1.4.2. Anàlisi quantitativa	32
1.4.2.1. Testos basats en marcadors fetals d'ARN	32
1.4.2.2. Estratègies basades en la metilació de l'ADN: marcadors epigenètics	34
1.4.2.3. Estratègies per la detecció d'aneuploidies	38
1.5. Identificació d'anomalies cromosòmiques no equilibrades	40
1.6. <i>SAFE Network of Excellence</i>	42
2. OBJECTIUS	43
3. MATERIAL I MÈTODES	47
3.1. Mostres	49
3.2. Obtenció del plasma i extracció d'ADN a partir de diferents teixits	60
3.3. Selecció de seqüències genòmiques susceptibles de presentar metilació diferencial en placenta i sang materna	61
3.3.1. Seqüències promotores en el cromosoma 18	62
3.3.2. Seqüències avaluades mitjançant tecnologia d'arrays de metilació	67
3.3.3. Seqüències a tots els cromosomes segons perfils d'expressió	68
3.4. Digestió amb enzims de restricció sensibles a metilació	70
3.5. PCR de metilació en ADN genòmic digerit i visualització dels productes d'amplificació en gel d'agarosa	71
3.6. PCR a Temps Real de les seqüències candidates	72
3.7. Avaluació del gen <i>RASSF1A</i> com a marcador universal	73
3.8. Selecció de microsatèl·lits al llarg de tots els cromosomes	74
3.9. PCR a Temps Real per a detecció del gen <i>SRY</i>	76

3.10.	PCR múltiplex fluorescent	77
3.10.1.	PCR en famílies on el pare és portador equilibrat d'una translocació i descendència amb translocació desequilibrada	77
3.10.2.	Desenvolupament de PCR Múltiplex Fluorescent Universal i estudi de l'heterozigositat i informativitat dels seus marcadors. Avaluació en mostres de plasma	78
3.10.3.	PCR múltiplex fluorescent en famílies amb gestacions en curs. Aplicació clínica	79
3.11.	Detecció dels productes d'amplificació per electroforesi capil·lar en analitzador genètic	82
4.	RESULTATS	85
4.1.	Estudi de la metilació de les seqüències promotores seleccionades	87
4.1.1.	Seqüències promotores en el cromosoma 18	87
4.1.2.	Seqüències promotores resultants d'arrays de metilació (MeDIP on CHIP)	95
4.1.3.	Seqüències promotores en tots els cromosomes segons perfils d'expressió	97
4.2.	PCR a Temps Real de les seqüències candidates	99
4.3.	Avaluació del gen <i>RASSF1A</i> com marcador universal	100
4.4.	Selecció de marcadors polimòrfics	102
4.5.	PCR múltiplex fluorescent	103
4.5.1.	Famílies on el pare és portador equilibrat d'una translocació i descendència amb translocació desequilibrada	103
4.5.2.	Heterozigositat i informativitat dels marcadors de la Múltiplex Fluorescent Universal	108
4.5.3.	Múltiplex Fluorescent Universal en plasma matern	111
4.5.4.	Aplicació clínica de microsatèl·lits i PCR Fluorescent	114
5.	DISCUSSIÓ	123
5.1.	Estat de metilació de les seqüències promotores seleccionades	126
5.2.	Determinació d'anomalies cromosòmiques desequilibrades d'origen patern: selecció de marcadors i PCR múltiplex fluorescent	131
5.3.	Utilitat de la metodologia desenvolupada. Aplicabilitat clínica	133
6.	CONCLUSIONS	137
7.	BIBLIOGRAFIA	141
8.	ANNEX	159

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
aCGH	Arrays d'Hibridació Genòmica Comparada
-hCG	Gonadotropina coriònica humana lliure
COBRA	<i>Combined bisulfite conversion and restriction analysis</i>
DMR	Regions diferencialment metilades
ffDNA	ADN fetal lliure
EAR	<i>Epigenetic Allelic Ratio</i>
HDFN	<i>Haemolytic disease of the fetus and the newborn</i>
MeDIP	Immunoprecipitació de l'ADN metilat
MeDIP on CHIP	Arrays de metilació
MPS	<i>Massively Parallel Sequencing</i>
s-MPS o MPSS	<i>Shotgun Massively Parallel Sequencing</i>
t-MPS	<i>Targeted Massively Parallel Sequencing</i>
mL, µL	Mil·lilitre, microlitre
mM	Mil·limolar
MSP	PCR específica de metilació
NGS	<i>Next generation sequencing</i> , Seqüenciació de nova generació
NT	Translucència nucal
PAPP-A	Proteïna plasmàtica A associada a la gestació
pb	Parells de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Reacció en cadena de la polimerasa
PGD	Diagnòstic genètic preimplantacional
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Single Tandem Repeats</i>
µg, ng	Microgram, nanogram

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Cribratge i Diagnòstic Prenatal

L'evolució dels mètodes de cribratge d'aneuploïdies en l'embaràs durant les darreres tres dècades del segle passat va comportar canvis significatius en les indicacions del diagnòstic prenatal.

Als anys 70 i principis dels 80 els indicadors més freqüentment utilitzats per l'avaluació del risc d'anomalia cromosòmica en el fetus eren els antecedents familiars, el risc inherent dels portadors d'anomalies cromosòmiques i l'edat materna avançada per sobre de 35 anys. En aquell moment menys d'un terç de les gestacions amb síndrome de Down eren diagnosticades prenatalment i, de les gestacions sotmeses a diagnòstic prenatal mitjançant una tècnica invasiva, només un 2% resultaven amb anomalies en el cariotip (*Ferguson-Smith et al., 1984*).

A finals dels 80 i principis dels 90, la introducció dels marcadors bioquímics en el segon trimestre, va millorar significativament el cribratge per aneuploïdia: la proporció de gestacions amb síndrome de Down diagnosticades es va doblar i, de les gestacions designades com a "cribratge positiu", en el 4% es van trobar anomalies cromosòmiques (*Wald et al., 1988, 1992; Benn et al., 2004*).

Ja a finals dels 90 i principis dels 2000 el cribratge d'aneuploïdies es va traslladar al primer trimestre amb el "test combinat" que incorporava la mesura ecogràfica de la mida de la translucència nucal (NT) juntament amb la concentració en sèrum matern de dues proteïnes placentàries: la gonadotropina coriònica humana lliure (-hCG) i la proteïna plasmàtica A associada a la gestació (*pregnancy-associated plasma protein-A*, PAPP-A) (*Cuckle et al., 1999; Spencer et al., 1999; Borrell et al., 2004; Kagan et al., 2008*).

Posteriorment, el rendiment d'aquests protocols es va millorar amb la incorporació de marcadors ecogràfics addicionals i, eventualment, amb cribratges seqüencials en dues mostres de sang, en el primer i en el segon trimestre respectivament (*Wald et al., 1999, 2006; Wright et al., 2004; Nicolaidis et al., 2005; Muñoz-Cortes et al., 2012*). No obstant, el test combinat és el test que ha esdevingut més àmpliament utilitzat ja que, de manera relativament senzilla i precoç, permet identificar més del 90% de les gestacions amb risc de síndrome de Down (*Cuckle et al., 2010*) i augmenta la proporció d'anomalies cromosòmiques detectades en el test invasiu fins al 6% (*Syngelaki et al., 2011*).

Malgrat disposar d'un cribratge no invasiu cada cop més precís, el diagnòstic prenatal requereix l'anàlisi de material genètic fetal obtingut mitjançant processos invasius com l'amniocentesi o la biòpsia de vellositats corials; l'associació d'aquests processos amb el risc de pèrdua fetal, encara que amb una freqüència mínima (*Wulff et al., 2016*), ha estimulat la recerca d'alternatives no invasives per a l'obtenció de material fetal (*Holzgreve et al., 1992*).

En un principi la recerca es limitava a la utilització de cèl·lules fetals en el canal endocervical o en sang materna (*Adinolfi, 1991; Bianchi, 1995*). Des dels anys 40 es té constància de l'existència d'ADN extracel·lular en el plasma humà i als anys 90 es va demostrar que, en alguns pacients de càncer, una proporció d'aquest ADN extracel·lular era originari de cèl·lules tumorals (*Chen et al., 1996*). Amb aquest antecedent *Lo et al.* a l'any 1997 van considerar que, en plasma de gestants, l'ADN extracel·lular d'origen fetal podria ser detectable de manera similar al tumoral i van demostrar per primera vegada la presència d'ADN fetal lliure (ffDNA) en plasma de dones embarassades de fetus masculins mitjançant la detecció de seqüències del cromosoma Y (*Lo et al., 1997*).

En el moment de començar aquesta tesi doctoral el potencial clínic del diagnòstic prenatal no invasiu només s'havia emprat amb èxit en l'assessorament prenatal del grup sanguini rhesus D fetal (*UK National Institute for Clinical Excellence, 2002*).

1.2. Biologia de l'ADN fetal lliure en plasma

L'ADN lliure fetal consisteix predominantment en fragments curts d'ADN d'una mida aproximada de 150 parells de bases, el 80% dels quals són inferiors a 200 pb (*Chan et al., 2004; Li et al., 2004; Yu et al., 2014*) i representen el genoma sencer.

Inicialment es considerà que conforma només una subfracció d'un 3-6% de l'ADN lliure present en plasma matern (*Lo et al., 1998a*) però estudis posteriors amb tecnologia més avançada han suggerit que aquesta fracció és propera al 10% (*Lun et al., 2008a*) i que disminueix en presència de trisomia del cromosoma 18 (*Ashoor et al., 2013; Rava et al., 2014*).

L'edat gestacional més baixa a la que el ffDNA és detectable en plasma matern correspon a dia 18 post-transferència embrionària en gestants resultants de cicles de reproducció assistida (*Guibert et al., 2003*). Però s'ha detectat des de la 4a setmana de gestació (*Illanes et al., 2007*) i es considera que supera el 4% de tot l'ADN lliure en el plasma de gairebé totes les gestants a partir de la 10a setmana. A més, s'ha observat que la concentració d'ADN fetal augmenta a mesura que progressa la gestació fins al moment del part (*Wang et al., 2013*), on és ràpidament eliminat del plasma matern (*Lo et al., 1998a; Smid et al., 2003; Hui et al., 2008*) amb una vida mitja d'uns 16 minuts (*Lo et al., 1999a*).

Malgrat que hi ha autors que han plantejat la persistència de l'ADN fetal en plasma matern a llarg terme després del part (*Invernizzi et al., 2002*), s'ha demostrat que aquesta suposada persistència no és certa (*Smid et al. 2003; Rijnders et al., 2004*) i s'ha suggerit que el sistema renal podria estar implicat en l'eliminació de l'ADN en plasma (*Botezatu et al., 2000*).

En els darrers anys s'ha confirmat la ràpida eliminació de l'ADN fetal en el plasma després del part (*Hui et al., 2008; Tong et al., 2010*) i representa un fet rellevant ja que, en cas contrari, la presència d'ADN fetal de gestacions prèvies podria interferir en la correcta interpretació de les dades en les següents gestacions.

La principal font d'ADN fetal en plasma matern és la placenta (*Alberry et al., 2007*) a diferència de l'origen de l'ADN matern lliure en sang perifèrica, que és el sistema hematopoètic de la mare (*Partsalis et al., 2006*). La implicació de la placenta en l'alliberament d'ADN fetal queda evidenciada pels següents fets: l'existència d'ADN fetal circulant després de la formació de la placenta però abans de l'establiment del sistema circulatori fetal (*Guibert et al., 2003*), la presència de trets genètics placentaris en plasma matern en casos amb anomalies cromosòmiques confinades a placenta (*Masuzaki et al., 2004*) i la demostració de trets epigenètics placentaris en ADN de plasma matern (*Chim et al., 2005*).

Recentment s'ha confirmat l'origen d'ambdós tipus d'ADN lliure en plasma matern (*Lun et al., 2013*) i l'associació de l'alliberament del fDNA amb l'apoptosi i necrosi, que són fenòmens habituals en el recanvi cel·lular placentari (*Tjoa et al., 2006*). L'associació entre aquest alliberament i la mort cel·lular que es dona a la placenta també podria explicar parcialment l'augment d'ADN fetal circulant descrit en diverses patologies associades a l'embaràs com la preeclàmpsia (*Lo et al., 1999b; Levine et al., 2004*), el part prematur

(Leung et al., 1998) i la síndrome de Down (Lo et al., 1999c; Lee et al., 2002; Rava et al., 2014) (Fig. 1).

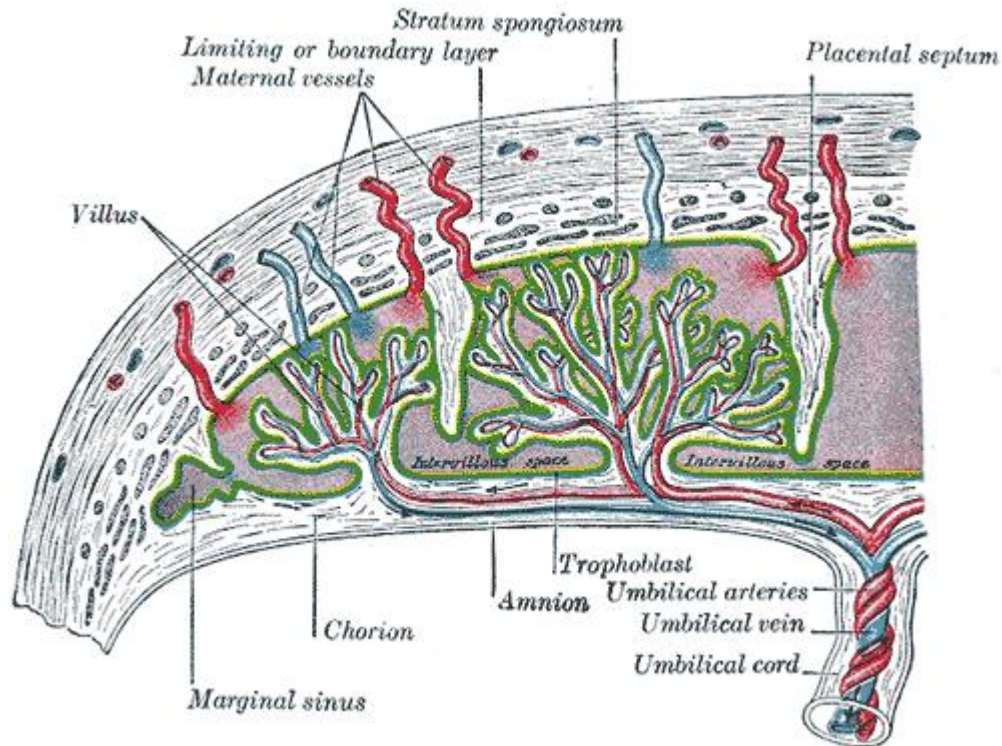


Figura 1. Esquema del sistema vascular de la placenta. (Henry Gray, *Anatomy of the Human Body*. 1918).

1.3. Metilació de l'ADN en el desenvolupament fetal

L'epigenètica estudia les formes reversibles i heretables de l'ADN que, sense cap canvi en la seqüència de nucleòtids, originen variabilitat de l'expressió gènica. Un dels principals canvis epigenètics és la metilació de la citosina dels dinucleòtids CpG, que s'associa amb la inactivació de gens.

La metilació de l'ADN és una modificació química enzimàtica del genoma que consisteix en l'addició d'un grup metil a l'àtom de carboni que està en posició 5 de les citosines dels dinucleòtids CpG (*Raedle et al., 2001*) (Fig. 2).

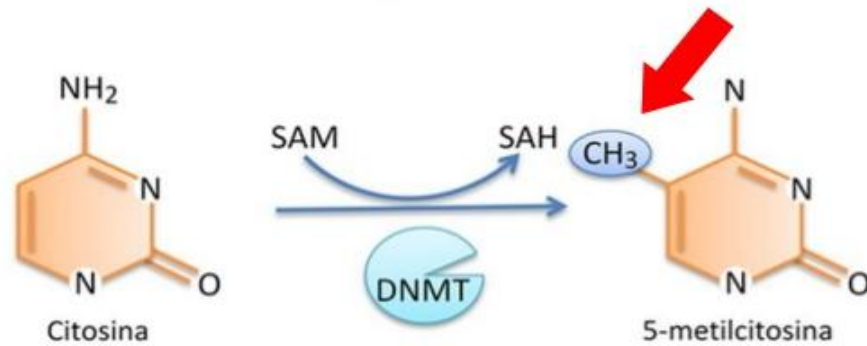


Figura 2. La metilació en els dinucleòtids CpG es dona en el carboni 5 de la citosina. El donant del grup metil (CH₃) és S-adenosil-metionina (SAM) mitjançant l'enzim DNMT (ADN-metil transferasa).

Durant l'embriogènesi s'esborra el patró de metilació de la cèl·lula i es restableix de manera primerenca durant el desenvolupament (*Monk, 1990; Bird, 2001*) i, un cop restablert, aquest patró de metilació s'hereta d'una generació cel·lular a la següent (*Raedle et al., 2001*).

La metilació dels dinucleòtids CpG no té una distribució uniforme en el genoma però les zones riques en dinucleòtids CpG, les illes CpG, s'ubiquen normalment en zones promotores dels gens i la majoria no es troben metilades (*Raedle et al., 2001*). S'estima que el genoma humà conté aproximadament 30.000 illes CpG i el 50-60% d'elles es situa en les regions promotores (*Szyf, 2005*). Encara que la majoria d'aquestes seqüències no estan metilades, les illes CpG dels gens imprimats i del cromosoma X inactiu predominantment sí que ho estan (*Costello et al., 2001*).

La metilació de l'ADN també és un procés dinàmic i que pot variar després del desenvolupament (*Reik et al., 2001*). De fet, es considera que el 60% de les regions diferencialment metilades (DMR) específiques de teixit es troben metilades en cèl·lules embrionàries i passen per un procés de desmetilació durant la diferenciació de teixit embrionari a teixit adult (*Kawai et al., 1993; Watanabe et al., 1995; Shiota, 2004; Song et al., 2005*). Així, s'ha descrit que una elevada proporció de DMR específiques de teixit romanen metilades en teixit de nou-nat i s'ha confirmat que aquest procés de desmetilació es dona en un estadi del desenvolupament tardà (*Song et al., 2009*). A més, en aquests estudis *Song et al. (2009)* descriuen que hi ha regions específiques del genoma que presenten un patró de metilació diferent segons els teixits i segons l'estadi del desenvolupament, pel que queda evidenciat que l'ADN fetal presenta patrons de metilació diferents dels de l'ADN matern.

1.4. Aplicacions clíniques dels àcids nucleics en plasma

L'ADN fetal en plasma matern és una font valuosa d'informació genètica del fetus i l'embaràs i, per tant, amb potencial de complementar el diagnòstic prenatal i monitoritzar la gestació.

Les seves aplicacions es poden dividir en dos grups: les que en requereixen l'anàlisi qualitativa i les en requereixen la quantificació (aneuploidies fetals).

Independentment del tipus d'anàlisi el primer procés a realitzar és la separació del plasma dels components cel·lulars de la sang materna, seguit de l'extracció de l'ADN de la fracció de plasma (*Chiu et al., 2001 i 2005*). Donat que el cfDNA representa una fracció de l'ADN lliure present en plasma matern la sensibilitat de l'anàlisi ha de ser suficientment elevada per detectar aquesta subpoblació i diferenciar-la de l'enorme *background* d'ADN matern.

És per això que, a la pràctica, la manera més fàcil d'aconseguir-ho és la detecció de seqüències de tot tipus (cromosomes, gens o polimorfismes genètics i mutacions) que el fetus ha heretat del pare i són absents o diferents en la mare (Fig. 3).

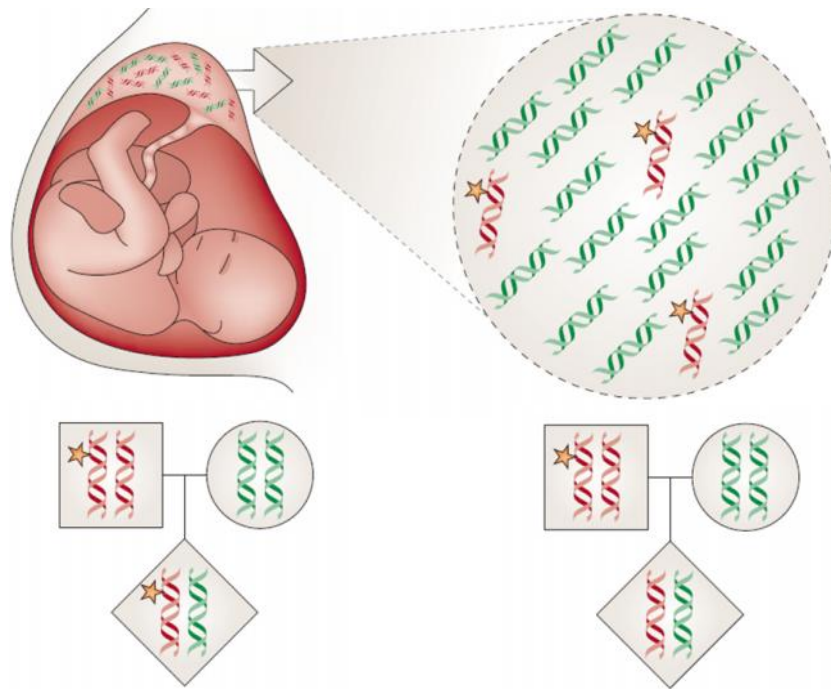


Figura 3. En el plasma matern, l'ADN lliure fetal representa una fracció mitjana del 10% de l'ADN lliure total. El seu origen és placentari i només les seqüències fetals d'origen patern poden ser, *a priori*, distingibles entre el *background* de seqüències maternes (Lo et al., 2007a).

1.4.1. Anàlisi qualitativa

1.4.1.1. Anomalies lligades al sexe

Unes de les aplicacions més òbvies són les que detecten seqüències del cromosoma Y de fetus en plasma matern. Aquests tests són altament sensibles en la determinació del sexe fetal des de la 7a setmana de gestació (Devaney et al., 2011; Colmant et al., 2013), abans fins i tot de la determinació del sexe per ecografia, pel que la utilitat clínica es focalitza

en gestacions de risc en famílies portadores d'anomalies lligades al sexe (*Costa et al., 2002*). D'aquesta manera es limiten els tests diagnòstics addicionals només a les gestacions de fetus masculins i, de fet, s'ha dut ja a la pràctica en un ampli nombre d'anomalies lligades al cromosoma X com l'hemofília i la distròfia muscular de Duchenne (*Rodríguez de Alba et al., 2012*).

Com a contrapunt, aquesta aplicació també comporta una seriosa preocupació en quant a la seva utilització per motius no mèdics, que pren rellevància en països amb presència de factors econòmics i socials que afavoreixen la descendència d'un sexe en particular (*Chapman et al., 2013; Benn, 2014; Madan et al., 2014*).

1.4.1.2. Genotipatge del gen RHD fetal

La primera aplicació clínica a gran escala del diagnòstic prenatal no invasiu ha estat la detecció del gen que codifica per l'antigen D del grup sanguini rhesus (RhD) de fetus RhD positius en plasma de mares RhD negatives (*Faas et al., 1998; Lo et al., 1998b*).

A mitjans dels anys 90 i després de la caracterització dels gens *RH* es va introduir el genotipatge del gen *RHD* fetal per millorar l'assessorament clínic de les gestants RhD negatives.

El fenotip RhD negatiu presenta una freqüència aproximada del 15% en població caucàsica, és menys comú en població africana amb una freqüència del 8% i en població asiàtica és un fenotip rar de freqüència inferior a l'1% (*Dean, 2005*).

Les gestants RhD negatives amb una parella RhD positiva heterozigòtica presenten un 50% de possibilitats de ser portadores d'un fetus RhD negatiu. Si el fetus és RhD negatiu no hi ha necessitat d'immunització. No obstant, si el fetus és RhD positiu la gestant RhD negativa pot produir anticossos (al·loimmunització) contra els antigens RhD fetals, principalment durant el tercer trimestre de gestació i el part, que podrien comportar la malaltia hemolítica del fetus i el nounat (*haemolytic disease of the fetus and the newborn*, HDFN) en properes gestacions (*Wright et al., 2009*).

El subministrament d'anticossos anti-D, la profilaxis Rh, a totes les gestants RhD negatives resulta un mètode preventiu de l'eritroblastosi fetal en la majoria de casos. Tot i així, moltes dones RhD negatives són portadores de fetus RhD negatius i, per tant, reben l'anti-D innecessàriament, amb els riscos associats que podria suposar l'administració d'hemoderivats (*Smith et al., 1999*).

La fiabilitat de gairebé el 100% dels tests no invasius per al genotipatge del RhD fetal ha permès la seva implementació en la rutina dels centres dedicats al diagnòstic (*Finning et al., 2002; Avent, 2008; Grande et al., 2013*), limitant la profilaxis RhD només a les gestacions on és estrictament necessari.

1.4.1.3. Anomalies gèniques autosòmiques dominants d'origen patern i *de novo*

El diagnòstic prenatal no invasiu per a la detecció d'anomalies gèniques autosòmiques dominants amb una mutació paterna coneguda es basa en la detecció o exclusió de la mutació paterna en l'ADN fetal lliure, és a dir, en la presència o absència d'un marcador fetal específic. Aquesta estratègia fou ja utilitzada amb èxit per al diagnòstic de la distròfia

miotònica tipus I (*Amicucci et al., 2000*), malaltia de Huntington (*González-González et al., 2003*), i distonia primària I (*Meaney et al., 2009*).

La detecció d'un fetus amb una malaltia autosòmica dominant amb una mutació d'herència materna és molt més difícil tècnicament perquè cal que el genotip fetal sigui identificat en presència d'un excés d'ADN matern en el total d'ADN lliure. Per aquest motiu, és necessària la identificació de marcadors fetals específics independents del sexe i de regions polimòrfiques que permetin la discriminació directa entre l'ADN lliure fetal i l'ADN lliure matern.

1.4.1.4. Anomalies gèniques autosòmiques recessives

Quan ambdós pares són portadors d'una malaltia autosòmica recessiva es pot determinar que el fetus no és afecte si podem excloure la mutació paterna en l'ADN lliure matern. Aquesta hipòtesi és relativament factible si l'al·lel mutat patern és diferent del matern (el fetus és potencialment heterozigot) o si existeixen polimorfismes del mateix grup de lligament que permetin la clara identificació de l'al·lel d'herència paterna.

Quan ambdós pares són portadors de la mateixa mutació o quan és necessari establir la presència o absència d'un al·lel matern particular en el fetus, la caracterització del genotip fetal respecte l'enorme *background* d'ADN novament representa un gran repte. Una solució per superar aquesta limitació és la quantificació del nombre relatiu d'al·lells present en l'ADN lliure i establir si hi ha un excés estadísticament significatiu d'un tipus respecte un altre que sigui consistent amb la presència d'una o dues mutacions presents en el fetus (*Lun et al., 2008b*).

1.4.2. Anàlisi quantitativa

La quantificació de l'ADN fetal lliure en plasma podria ser utilitzada com a eina de cribatge de diversos trastorns associats a la gestació que cursen amb nivells anormalment alts de ffDNA (*Levine et al., 2004*) com la preeclàmpsia (*Lo et al., 1999b; Levine et al., 2004*), el part prematur (*Leung et al., 1998*), *hyperemesis gravidarum* (*Sekizawa et al., 2001*) i aneuploidies cromosòmiques fetals (*Lo et al., 1999c i Lee et al., 2002*).

No obstant, la superposició en els nivells d'ADN fetal entre gestacions normals i amb complicacions (*Lo et al., 1999b, 1999c; Lee et al., 2002*) ha suposat una limitació que ha reduït la sensibilitat i especificitat d'aquest tipus d'estratègia de cribatge.

1.4.2.1. Tests basats en marcadors fetals d'ARN

Donat que l'ADN fetal representa una fracció mínima del total d'àcids nucleics presents en plasma matern, una opció per avançar cap a la detecció d'aneuploidies és centrar-nos en la subfracció d'àcids nucleics en plasma matern que és gairebé completa i específicament fetal: l'ARNm expressat únicament en placenta (*Ng et al., 2003a*).

La primera vegada que es va demostrar la presència d'ARN fetal en plasma matern va ser utilitzant transcrits del cromosoma Y (*Poon et al., 2000*). Es va observar una inesperada estabilitat de les molècules d'ARN en plasma deguda, probablement, a la seva associació amb partícules apoptòtiques (*Ng et al., 2002*) que les protegeixen de la digestió d'ARNases plasmàtiques (*Tsui et al., 2002*).

D'altra banda, el descobriment que la placenta és també la principal font d'ARN fetal circulant (Ng *et al.*, 2003a) ha augmentat moltíssim el nombre de marcadors moleculars potencials pel diagnòstic prenatal i monitorització de les gestacions.

S'han descrit més de deu espècies d'ARNm placentari com a específiques de gestació i detectables en plasma matern (Ng *et al.*, 2003a; Tsui *et al.*, 2004; Go *et al.*, 2004), i s'ha suggerit que les partícules d'ARNm placentari circulant podrien estar relacionades amb micropartícules sincitiotrofoblàstiques alliberades per la placenta, especialment en condicions patològiques com la preeclàmpsia (Gupta *et al.*, 2004). De fet, s'han observat alteracions en la quantitat d'espècies seleccionades d'ARNm placentari en diverses anomalies associades a l'embaràs (Ng *et al.*, 2003b; Masuzaki *et al.*, 2005).

Els principals avantatges que aporta l'ARN fetal en plasma són l'especificitat respecte a potencials malalties i l'extensa cobertura de la població, independentment del sexe fetal i dels polimorfismes. La identificació de gens expressats en trofoblasts, però no en cèl·lules maternes, s'hauria de correspondre amb les pertinents espècies d'ARN lliure en plasma matern sense contaminació d'ARN matern de seqüència similar.

Per determinar la presència d'aneuploïdies en el fetus l'ARNm expressat en la placenta hauria de pertànyer al cromosoma implicat en l'aneuploïdia i proporcionar informació de la dosi cromosòmica (Lo *et al.*, 2007a, b). Així, per a un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) localitzat en la regió codificant d'un transcrit específic de placenta la ràtio entre els dos al·lels d'un fetus euploide heterozigot hauria de ser 1:1, mentre que per a un fetus amb trisomia hauria de ser 1:2 o 2:1 (Lo *et al.*, 2007a, b).

La principal limitació de la utilització de l'estratègia ARN-SNP és la necessitat de trobar SNP informatius en els transcrits d'ARN diana i, en tot cas, caldrien millores en els mètodes d'extracció d'ARN a partir de plasma matern per augmentar la quantitat d'ARNm disponible per aquests tipus d'anàlisis que alhora disminueixin la possibilitat d'error en el diagnòstic.

1.4.2.2. Estratègies basades en la metilació de l'ADN: marcadors epigenètics

Una alternativa a la utilització de l'ARNm placentari en la detecció d'aneuploidies és l'anàlisi de l'ADN circulant amb un marcatge epigenètic específic fetal, que hauria d'estar present en el cromosoma implicat en l'aneuploidia.

Les estratègies basades en la metilació de l'ADN es basen en les diferències epigenètiques presents arreu del genoma que es tradueixen en expressió diferencial dels gens en funció del tipus de teixit (*Poon et al., 2002*) i que poden estar associades tant amb hiper com amb hipometilació dels gens. D'aquesta manera, el patró de metilació d'alguns gens presents en cèl·lules de la placenta (específicament trofoblasts) pot diferir del de les cèl·lules maternes.

L'objectiu d'aquest tipus d'estratègies és la identificació de marcadors de metilació específics del fetus que permetin discriminar l'ADN fetal de l'ADN matern en la circulació materna i que, potencialment, poden esdevenir marcadors de diagnòstic genètic independentment del sexe i polimorfismes del fetus.

Aquest tipus d'assaigs amb marcadors de metilació específics del fetus es poden classificar en tres categories: els que es basen en l'ús de bisulfit sòdic, els que utilitzen enzims de restricció i els que es realitzen amb immunoprecipitació de l'ADN metilat.

) **Assaigs que inclouen el bisulfit sòdic.** El bisulfit sòdic converteix les citosines no metilades en uracils, mentre que les citosines metilades no canvien (*Frommer et al., 1992*). És a dir, el bisulfit sòdic transforma una modificació epigenètica en un canvi de seqüència de nucleòtids.

La composició genètica de les seqüències de nucleòtids d'interès transformades pel bisulfit sòdic pot ser estudiada mitjançant una PCR específica de metilació (MSP) on els fragments metilats (no convertits) i els no metilats (convertits) s'amplifiquen per separat (*Herman et al., 1996*) o, alternativament, també podria estudiar-se mitjançant seqüenciació (*Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994*) (Fig. 4).

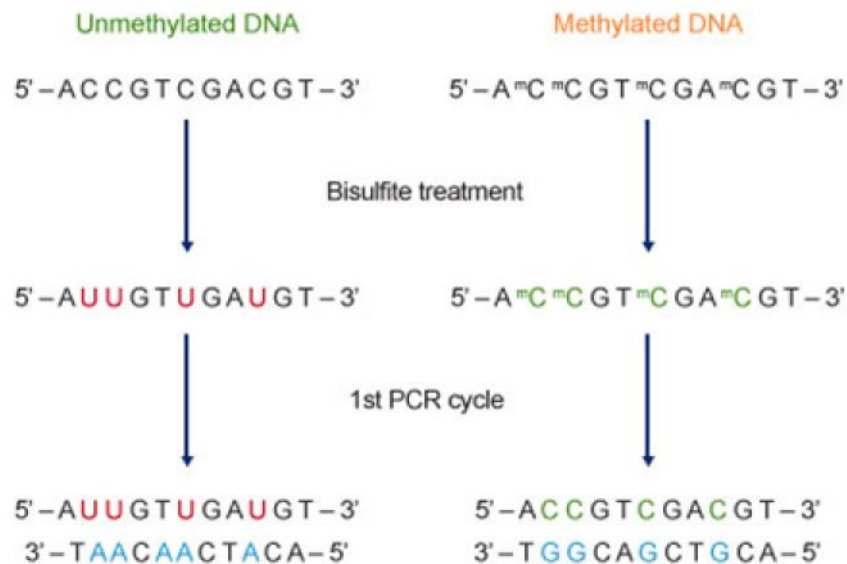


Figura 4. L'ADN modificat amb bisulfit sòdic pot ser analitzat amb mètodes de PCR per a discriminar l'estat de metilació de les citosines de regions genòmiques específiques. Alternativament, el tractament amb bisulfit es pot combinar amb tècniques de seqüenciació de nova generació per arribar a la resolució d'un únic nucleòtid i analitzar la metilació de les citosines en tot el genoma.

L'any 2002 *Poon et al.* van ser els primers en demostrar el potencial de la presència de diferències epigenètiques entre fetus i mare i ho van fer realitzant conversió de bisulfit en ADN de placenta i de sang perifèrica seguida de MSP (*Herman et al., 1996; Poon et al., 2002*).

L'any 2005 emprant l'esmentat procés es va identificar la primera regió diferencialment metilada corresponent al gen *SERPINB5*, caracteritzada com a hipometilada en ADN fetal i hipermetilada en ADN matern (*Chim et al., 2005*); es va aconseguir la identificació de seqüències fetals específiques hipometilades del *SERPINB5* en plasma matern durant la gestació i aquesta troballa es va utilitzar per demostrar que l'ADN fetal no es detecta en plasma matern 24 h després del part (*Chiu et al., 2011*). A més, l'estudi d'un SNP localitzat en aquest gen va permetre introduir l'estratègia *Epigenetic Allelic Ratio* (EAR) per a la detecció de la trisomia 18, on el número de còpies del cromosoma 18 era avaluat en base al càlcul de la ràtio dels al·lels informatius per al SNP en qüestió, però no va ser possible la seva implementació en la rutina clínica degut a la seva baixa informativitat (*Tong et al., 2006*).

L'any 2010 es va realitzar un segon estudi amb l'objectiu d'identificar marcadors fetals hipermetilats en el cromosoma 21 emprant el patró de metilació del gen *RASSF1A*. Aquest gen es localitza al cromosoma 3 i està completament metilat en l'ADN fetal i completament no metilat en l'ADN matern, possibilitant el seu ús com a marcador fetal universal (*Chan et al., 2006; Chiu et al., 2007*). L'estudi combinava la conversió amb bisulfit sòdic amb l'anàlisi de restricció (COBRA) (*Xiong et al., 1997*) i va permetre comprovar que el gen *HLCS*, localitzat al cromosoma 21, està completament metilat en placenta i no metilat en sang materna (*Tong et al., 2010*).

) **Assaigs basats en enzims de restricció.** Els patrons de metilació dels dinucleòtids CpG també poden ser caracteritzats amb enzims de restricció sensibles a metilació que tinguin llocs de reconeixement per a seqüències CpG ja que digereixen la seva diana de restricció únicament quan no està metilada. Fent ús d'aquesta estratègia la caracterització del patró de metilació del promotor del gen *RASSF1A* (hipermetilat en placenta i hipometilat en cèl·lules sanguínies maternes) el va revelar com a possible marcador epigenètic específic fetal (*Chan et al., 2006*).

L'any 2007 es van identificar les primeres regions en el cromosoma 21 diferencialment metilades mitjançant l'ús de l'enzim de restricció sensible a metilació *HpaII* (*Old et al., 2007*) que només digeriria l'espècie no metilada del seu lloc de reconeixement (CCGG), identificant l'estat de metilació de les seqüències amb l'esmentada diana de restricció.

) **Assaigs basats en la immunoprecipitació de l'ADN metilat (MeDIP).** Aquesta metodologia fou descrita per Weber et al. (2005) per investigar els patrons de metilació en cèl·lules tumorals utilitzant plataforma d'arrays. L'assaig consisteix en la fragmentació de l'ADN (per sonicació o digestió enzimàtica) en fragments de 300-1000 parells de bases seguida de desnaturalització i incubació amb un anticòs monoclonal que reconeix i s'uneix a les 5-metilcitosines dels nucleòtids CpG. Les seqüències metilades son immunoprecipitades per l'addició de boles magnètiques obtenint un enriquiment directe dels fragments metilats. En aquest punt és possible l'estudi de les seqüències emprant diferents tecnologies com PCR, PCR quantitativa, microarrays o seqüenciació.

L'any 2009 aquest assaig va ser utilitzat per a la identificació de regions de metilació diferencial entre placenta i sang materna amb la finalitat de seleccionar seqüències amb potencial d'utilització per la detecció d'aneuploidies fetals (*Papageorgiou et al., 2009*). Darrerament s'ha publicat la metodologia per a la seva aplicació en el diagnòstic prenatal no invasiu, on la combinació amb PCR a Temps Real ha permès avaluar la dosi

cromosòmica de regions diferencialment metilades del cromosoma 21 específiques del fetus (*Papageorgiou et al., 2011*).

1.4.2.3. Estratègies per la detecció d'aneuploidies

El desenvolupament de tècniques moleculars, que permeten el recompte de gran quantitat de molècules d'ADN en plasma matern, ha permès recentment la detecció d'aneuploidies.

Actualment s'utilitzen tres metodologies, dues d'elles basades en la seqüenciació massiva (*Shotgun Massively Parallel Sequencing* i *Targeted Massively Parallel Sequencing*) i la tercera en la seqüenciació de SNP.

) ***Shotgun Massively Parallel Sequencing (s-MPS)***. El desenvolupament de les tècniques de seqüenciació massiva (*massively parallel sequencing, MPS*) basades en la seqüenciació, identificació i recompte d'un elevat nombre de fragments d'ADN en el plasma ha possibilitat l'anàlisi d'ADN fetal circulant amb precisió (*Chiu et al., 2008; Fan et al., 2008*). En la tècnica de s-MPS milions de fragments d'ADN, tant fetal com matern, són seqüenciats i comptats simultàniament i assignats a cada locus del cromosoma on pertanyen (*Chiu et al., 2008; Fan et al., 2008*). La presència d'aneuploidia és evident quan hi ha un excés relatiu (trisomia) o deficiència (monosomia) per a qualsevol dels cromosomes d'interès en comparació amb el que seria l'esperat (*Chiu et al., 2008; Fan et al., 2008; Sehnert et al., 2011; Dan et al., 2012*). Es requereix, per tant, un nombre de recompte de seqüències elevat per discriminar entre aneuploidia i euploidia ja que la diferència entre elles serà petita, especialment quan la fracció fetal és baixa. En principi, seria possible la detecció d'aneuploidies en tots els cromosomes però, a la pràctica, els assaigs clínics desenvolupats només s'han validat per les trisomies complertes dels cromosomes 21, 18, 13 i la

monosomia del cromosoma X. Les aneuploïdies de la resta de cromosomes són molt rares en estadis relativament avançats de la gestació i, en cas d'estar presents, moltes ho són en mosaic (trisomies 8, 9 i 16). De la mateixa manera, augmentant el número de seqüències analitzades també és possible l'aplicació del mètode en parts de cromosomes per a la detecció de desequilibris petits que incloguin microdeleccions i microduplicacions (*Zhao et al., 2015*). Actualment els costos d'aquesta tècnica són elevats però la possibilitat de processar múltiples mostres alhora permet optimitzar els assaigs i l'aplicació a gran escala.

) **Targeted Massively Parallel Sequencing (t-MPS).** La tècnica de *Targeted Massively Parallel Sequencing (t-MPS)* inclou un pas previ que permet l'amplificació selectiva de regions cromosòmiques d'interès amb la consegüent avaluació d'excés respecte a un altre cromosoma en els recomptes de fragments d'ADN d'un cromosoma determinat (*Sparks et al., 2012*). Un dels avantatges de la metodologia del t-MPS és que, en eliminar la necessitat de seqüenciar totes les regions cromosòmiques, el cost de la seqüenciació és més baix i és possible analitzar més mostres simultàniament.

) **Mètodes basats en polimorfismes d'un únic nucleòtid.** Les tècniques de cribratge d'aneuploïdies basades en polimorfismes d'un únic nucleòtid (*Single nucleotide polymorphism, SNP*) són substancialment diferents en quant a metodologia i l'anàlisi de les dades, tot i que també requereixen amplificació de múltiples seqüències de SNP seguides de seqüenciació (*Zimmermann et al., 2012; Samango-Sprouse et al., 2013*). Així, cada producte és avaluat en base a la hipòtesi que el fetus és monosòmic, disòmic o trisòmic pels cromosomes 21, 18, 13, X, Y i, un cop considerades les posicions dels SNP en els cromosomes i la possibilitat que s'hagi pogut donar recombinació, es calcula la probabilitat que el fetus sigui normal o presenti una alteració numèrica d'aquests cromosomes. L'assaig també pot identificar regions d'homologia cromosòmica fetal que podrien indicar consanguinitat o disomia uniparental i, eventualment, l'anàlisi de SNP d'una mostra paterna

pot millorar el rendiment del test. Aquest mètode és ampliable a la detecció de petits desequilibris addicionals, microdelecions i duplicacions, si s'identifiquen suficients SNP informatius en la regió d'interès malgrat no estar limitat per recomptes estadístics com d'altres mètodes. No obstant, la baixa fracció fetal pot ser motiu de la fallida del test.

1.5. Identificació d'anomalies cromosòmiques no equilibrades

Les translocacions cromosòmiques són les reorganitzacions cromosòmiques estructurals més freqüents en humans amb una incidència del 0,2% en la població neonatal, 0,6% en parelles infèrtils, 2-3,2% en homes amb infertilitat severa i 9,2% en parelles fèrtils amb avortaments de repetició (*Testart et al., 1996; Meschede et al., 1998; van der Ven et al., 1998; Stern et al., 1999*).

Dels dos tipus més comuns de translocacions cromosòmiques, les recíproques i les Robertsonianes, les recíproques són les més abundants, presentant una freqüència a la població d'1 de cada 625 nounats vs. les Robertsonianes 1 de cada 1.000 (*Shaffer et al., 2000*).

Les translocacions recíproques consisteixen en l'intercanvi recíproc dels segments terminals entre els cromosomes no homòlegs i poden tenir un origen familiar (80%) o *de novo* (20%) (*Jacobs, 1992*). L'aparició de translocacions recíproques *de novo* té més freqüentment un origen patern, en un 84,4% dels casos (*Olson et al., 1998*). En general són equilibrades i no tenen cap repercussió fenotípica. No obstant, els individus portadors d'aquestes reorganitzacions cromosòmiques produeixen un nombre significativament elevat de gàmetes amb complement genètic desequilibrat (*Gardner et al., 1996; Pierce et al., 1998*).

S'han realitzat nombrosos estudis en espermatozoides de portadors de reorganitzacions estructurals i s'ha vist que entre 20-77% dels espermatozoides de portadors de translocacions recíproques presenten desequilibris genètics (*Estop et al., 1995*). És a dir, els individus portadors de translocacions recíproques equilibrades tenen un risc més elevat d'avortaments espontanis i de repetició, i un risc augmentat d'infertilitat i de descendència amb malformacions congènites (1-10%) (*Gardner et al., 1996; Pierce et al., 1998*).

Els productes anòmals de reorganitzacions equilibrades no Robertsonianes són bastant variables i els seus efectes fenotípics varien des de nuls a mort peri-implantacional. Presenten una freqüència inferior al 2% en avortaments espontanis i la probabilitat de naixement és del 62% (*Jacobs et al., 1995*).

Així doncs, la contribució de les reorganitzacions estructurals als avortaments de repetició depèn de la freqüència d'espermatozoides anòmals i de la severitat de les duplicacions i/o deficiències (trisomies i monosomies parcials) degudes a la segregació anormal de cada reorganització durant la gametogènesi; el grau de severitat és variable des de trisomia o monosomia gairebé completa fins a mínimes duplicacions i/o delecions, difícils de detectar i amb conseqüències fenotípiques severes però de baixa freqüència (*Egozcue et al., 2000*).

Davant l'existència d'una translocació equilibrada coneguda en una família es recomana consell genètic i diagnòstic prenatal.

La identificació prenatal no invasiva de la translocació desequilibrada és teòricament possible mitjançant MPSS si la trisomia o monosomia parcial impliquen regions de gran grandària de 3 a 40 Mb (*Zhao et al., 2015*) o utilitzant marcadors polimòrfics seleccionats en les regions d'interès (*Chen et al., 2001*).

1.6. **SAFE Network of Excellence**

La Unió Europea va promoure i subvencionar una xarxa d'excel·lència formada per experts de diferents disciplines (pediatres, obstetres, biòlegs moleculars, genetistes clínics i experts en ciències socials i ètica d'arreu del món) per desenvolupar un programa de recerca dedicat a potenciar la utilitat clínica del Diagnòstic Prenatal no Invasiu i el Cribratge Neonatal. Aquest programa es va anomenar *Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network (SAFE Network of Excellence)* i va començar l'1 de Març del 2004 amb una durada prevista de 5 anys (LSHB-CT-2004-503243) incloent 56 centres en 19 països.

El present estudi està englobat dins d'aquest projecte, concretament dins el *SAFE Workpackage 3A (Free fetal nucleic acids in maternal plasma)* com a Partner 54 amb dues línies de recerca: el projecte *NIPD of unbalanced chromosome abnormalities by microsatellite analysis of fetal DNA in Maternal Plasma* i la recerca de marcadors universals d'ADN fetal en plasma matern en el cromosoma 18. Aquesta darrera línia d'estudi estava integrada dins el Grup de Recerca Epigenètica, juntament amb grups de la *University of Warwick*, del *Cyprus Institute of Neurology and Genetics*, de l'*Institute of Genetics and Biophysics* i del *Wellcome Trust Sanger Center*.

2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball és:

La recerca de marcadors universals per la detecció d'ADN fetal en plasma matern i avaluar la utilització de polimorfismes d'ADN per a la seva aplicació clínica en diagnòstic prenatal no invasiu d'anomalies cromosòmiques d'origen patern.

Per tal d'aconseguir el nostre objectiu ens proposem:

1. Analitzar patrons de metilació en promotors de gens amb expressió oposada en placenta i sang materna per tal d'explorar la possibilitat de desenvolupar assaigs específics per la detecció d'ADN fetal.
2. Seleccionar marcadors polimòrfics (*STRs*) en tots el cromosomes i avaluar la seva utilitat per a la detecció d'ADN fetal en plasma matern.
3. Desenvolupar mètodes per a la detecció d'anomalies cromosòmiques d'origen patern a partir d'ADN fetal lliure en sang materna i la seva aplicació clínica.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Mostres

Totes les mostres s'han recollit prèvia signatura del consentiment informat aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron. S'han processat de manera anònima i s'han agrupat en cinc grups segons l'estudi dut a terme (Taula 1).

Taula 1. Grups d'estudi del present treball.

Grup 1	Estudi de la metilació diferencial entre placenta i sang perifèrica
Mostres	30 biòpsia de còrion 30 sang perifèrica
Grup 2	Estudi de famílies on el pare és portador equilibrat d'una translocació cromosòmica
Mostres	3 sang perifèrica de la Família 1 5 sang perifèrica de la Família 2
Grup 3	Estudi de l'heterozigositat i informativitat dels marcadors de la PCR Múltiplex Fluorescent Universal
Mostres	100 sang perifèrica (50 homes i 50 dones)
Grup 4	Avaluació de la detecció de microsatèl·lits fetals en plasma matern i sensibilitat de la PCR Múltiplex Fluorescent Universal
Mostres	12 sang perifèrica de gestants 12 mucosa bucal de les parelles 1 biòpsia de còrion de la Família 3 1 biòpsia de còrion de la Família 4
Grup 5	Aplicació clínica de la PCR múltiplex fluorescent
Mostres	1 sang perifèrica i 1 biòpsia de còrion de la Família 5 2 sang perifèrica i 1 biòpsia de còrion de la Família 6 2 sang perifèrica i 1 biòpsia de còrion de la Família 7 2 sang perifèrica i 1 biòpsia de còrion de la Família 8 2 sang perifèrica de la Família 9

Grup 1

Per a l'estudi de la metilació diferencial entre placenta i sang perifèrica s'han emprat 30 mostres de biòpsia de còrion i 30 de sang perifèrica per tal de comparar els patrons de metilació de les seqüències seleccionades en l'ADN extret dels dos teixits.

Grup 2

Per l'estudi de famílies on el pare és portador d'una translocació cromosòmica equilibrada amb descendència afectada per translocacions desequilibrades s'han analitzat mostres de sang corresponents als membres de dues famílies:

) **Família 1.** El pare presenta la translocació equilibrada $t(4;11)(p15.1;q23.3)$, la mare cariotip normal i la filla presenta el cromosoma derivatiu $der(11)t(4;11)(p15.1;q23.3)pat$ originat per desequilibri durant l'espermatogènesi paterna (Fig. 5).

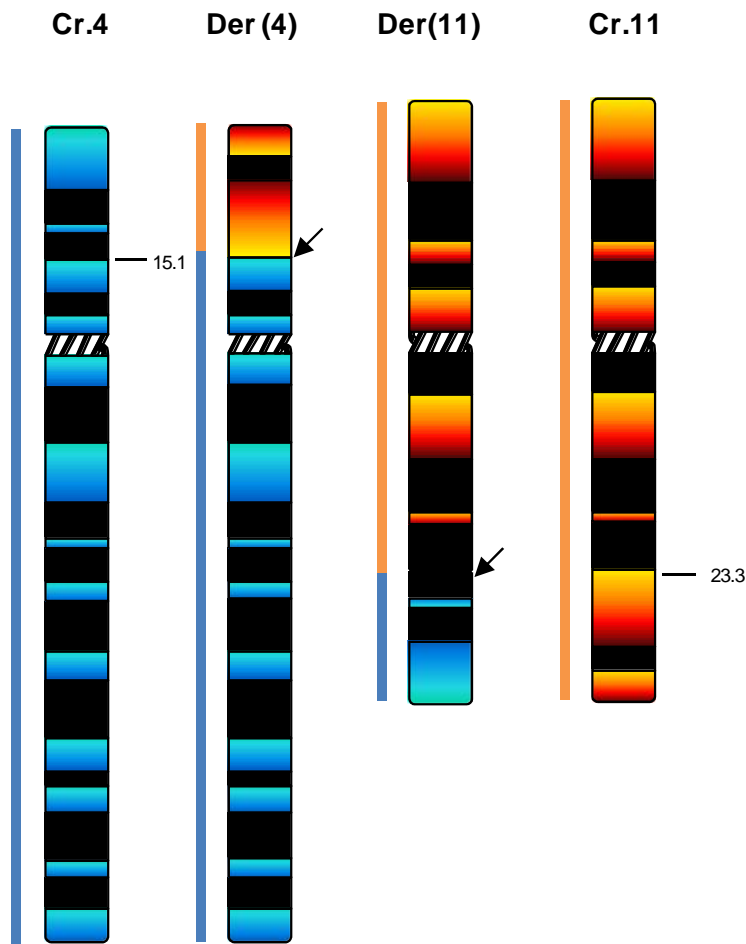


Figura 5. Idiograma on es mostren els cromosomes implicats en la translocació de la Família 1. Les fletxes indiquen els punts de trencament.

) **Família 2.** El pare i un dels tres fills són portadors de la translocació equilibrada $t(10;18)(q24;p11.31)$, la mare i un altre dels fills presenten un cariotip normal, i el tercer fill presenta en el cariotip el cromosoma derivatiu $der(18)t(10;18)(q24;p11.31)pat$ resultat de l'herència de la translocació en desequilibri (Fig. 6).

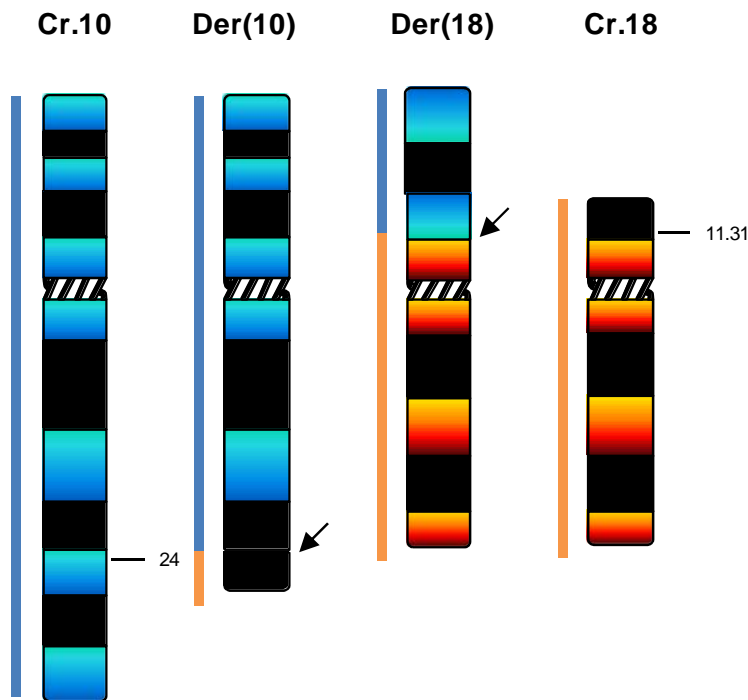


Figura 6. Idiograma dels cromosomes implicats en la translocació paterna de la Família 2. Les fletxes indiquen els punts de trencament.

Grup 3

Per a l'estudi de l'heterozigositat i informativitat dels marcadors emprats en la PCR Múltiplex Fluorescent Universal s'han extret un total de 100 ADNs de mostres anònimes de sang perifèrica de 50 parelles (50 dones i 50 homes).

Grup 4

Per l'avaluació de la detecció de microsatèl·lits fetals en plasma matern i sensibilitat de la PCR Múltiplex Fluorescent Universal s'han analitzat 12 mostres de sang perifèrica de gestants entre la setmana 12-24 (mitjana de 14 setmanes), 7 d'elles amb fetus masculins i 5 amb fetus femenins.

S'ha obtingut plasma matern a partir de la sang perifèrica i, en les gestacions de fetus masculins, s'ha valorat l'eficiència de l'extracció d'ADN fetal en plasma matern mitjançant PCR a Temps Real.

En tots els casos s'ha disposat de la corresponent mostra de mucosa bucal de la parella per avaluar la sensibilitat de la PCR múltiplex fluorescent en la detecció de microsatèl·lits fetals.

En dos dels casos, donat que el pare era portador d'una translocació equilibrada, s'han analitzat, si es requeria, les mostres de vellositats corials biopsiades posteriorment a l'extracció de sang perifèrica de la gestant per tal de confirmar el resultat de la PCR múltiplex.

) **Família 3.** El pare és portador de la translocació equilibrada $t(8;17)(q22.1;p11.2)$ (Fig. 7), la mare, de 36 anys i en la setmana 12 de gestació, presenta un cariotip normal. La vellositat corial analitzada posteriorment presenta també cariotip normal.

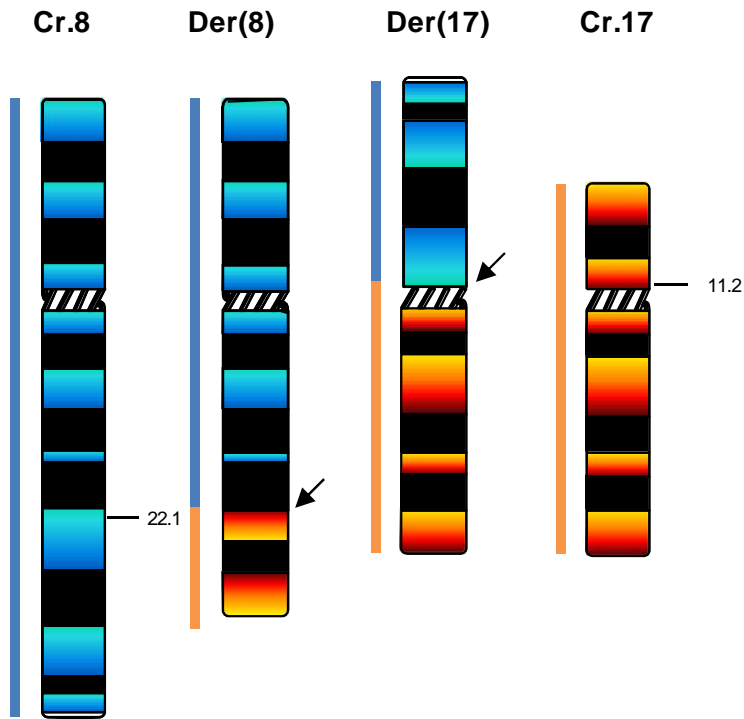


Figura 7. Idiograma dels cromosomes implicats en la translocació paterna de la Família 3. Les fletxes indiquen els punts de trencament.

) **Família 4.** El pare és portador de la translocació equilibrada $t(8;9)(q22;q22)$ (Fig. 8), la mare, de 38 anys i en la setmana 12 de gestació presenta un cariotip normal. La vellositat corial analitzada posteriorment presenta un cariotip amb la translocació equilibrada.

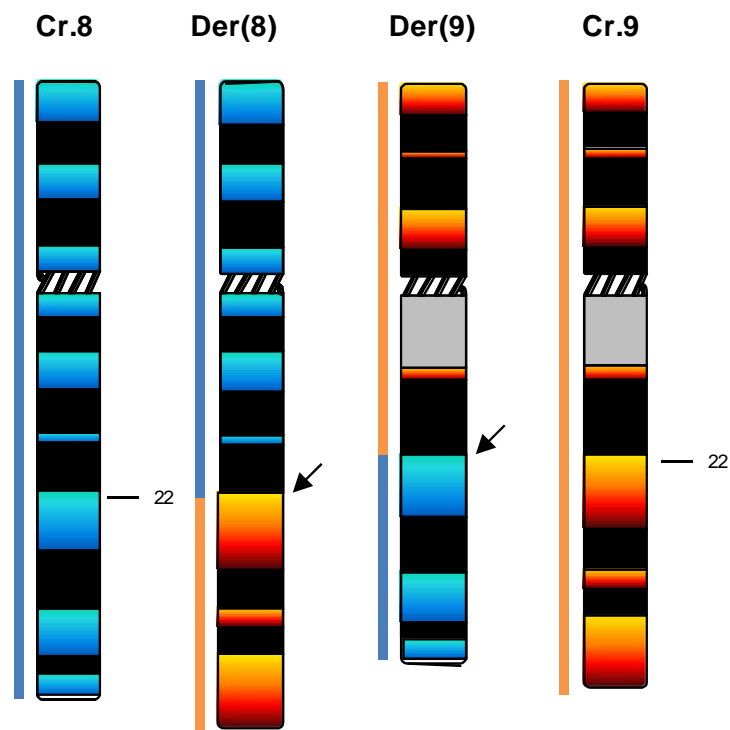


Figura 8. Idiograma dels cromosomes implicats en la translocació paterna de la Família 4. Les fletxes indiquen els punts de trencament.

Grup 5

Per l'aplicació clínica de la PCR Fluorescent s'han analitzat 9 mostres de sang corresponents als progenitors de les 5 famílies, 4 mostres de vellositat corial i el plasma matern de les 5 gestants.

) **Família 5.** Gestació resultant de cicle de Fecundació *in Vitro* (FIV) amb ovodonació. Gestant de 45 anys en la setmana 12 de gestació, presenta un cariotip normal i es realitza biòpsia de vellositats corials degut a omfalocèle fetal detectat ecogràficament. En la vellositat corial s'observa un cariotip normal.

) **Família 6.** Pare portador de Distròfia Miotònica tipus 1 o Malaltia de Steinert. La Distròfia Miotònica tipus 1 (*Shaw et al, 1989*) és la forma més freqüent de malaltia neuromuscular hereditària en adults, amb una prevalença de 1/20.000. Es tracta d'una malaltia progressiva autosòmica dominant causada per l'expansió d'una seqüència inestable de trinucleòtids repetits CTG situada a la regió UTR de l'extrem 3' del gen de la proteïna miotonin quinasa (*DMPK*) localitzat en el braç llarg del cromosoma 19 (19q13.2-q13.3).

Mare de 31 anys en la setmana 12 de gestació amb cariotip normal, es realitza biòpsia de còrion per a estudiar la presència/absència del triplet expandit d'origen patern en el fetus, que resulta lliure de l'expansió paterna.

) **Família 7.** Pare portador de la translocació equilibrada $t(6;21)(q21.2;q22.2)$ (Fig. 9), mare de 37 anys en la 12 setmana de gestació amb cariotip normal. La vellositat corial també presenta un cariotip normal.

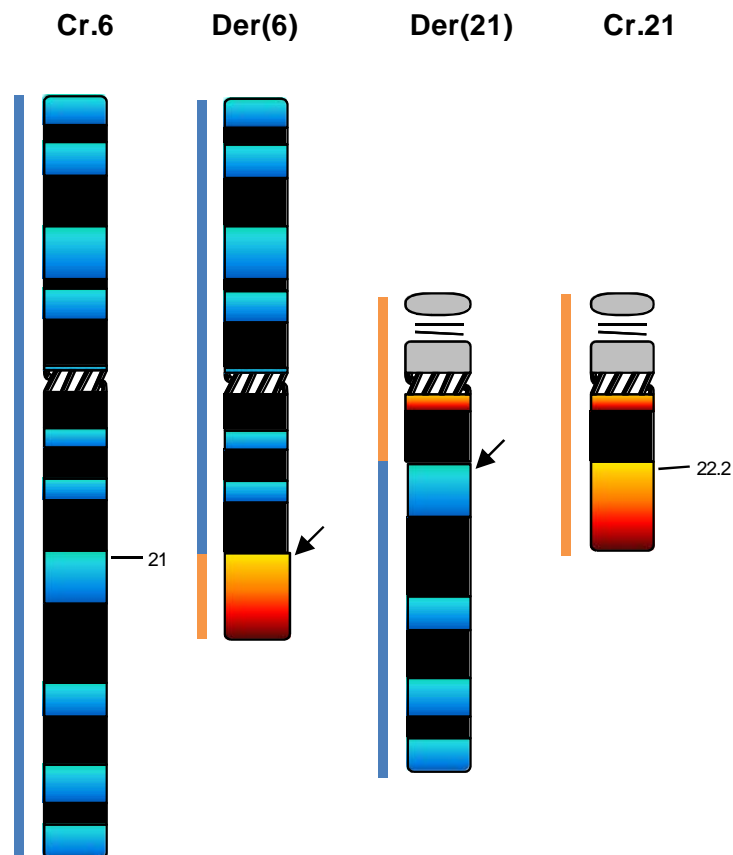


Figura 9. Idiograma dels cromosomes implicats en la translocació paterna de la Família 7. Les fletxes indiquen els punts de trencament.

) **Família 8.** Pare portador de la translocació robertsoniana equilibrada t(13;14) (Fig. 10). Mare de 29 anys en la setmana 14 de gestació, presenta un cariotip normal. El fetus presenta polimalformacions ecogràfiques compatibles amb trisomia del cromosoma 18 i la vellositat corial analitzada resulta amb el cariotip 46,XY,+13 t(13;14)rob pat.

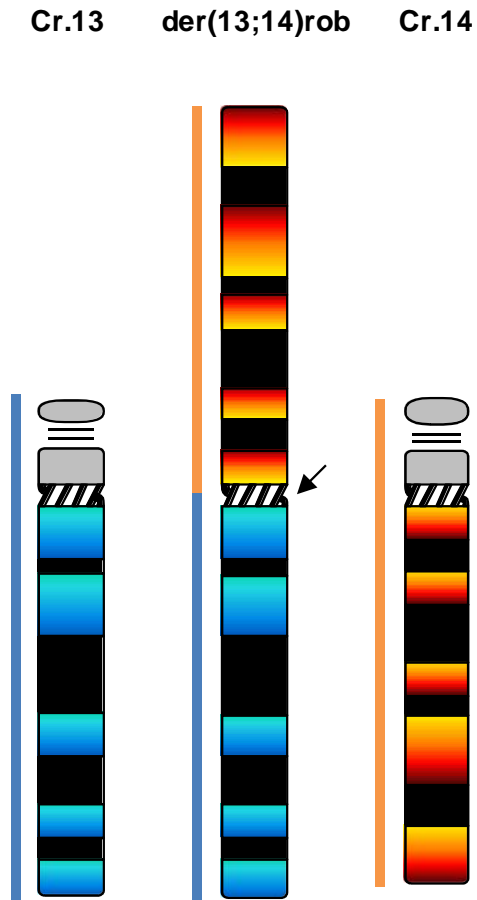


Figura 10. Idiograma dels cromosomes implicats en la translocació paterna de la Família 8. La fletxa indica el punt de trencament.

) **Família 9.** Pare portador de la translocació equilibrada $t(8;15)(p23;q15)$ (Fig. 11). Mare de 38 anys en la setmana 15 de gestació amb cariotip normal. Gestació resultant d'un cicle de Fecundació *in Vitro* amb Diagnòstic Preimplantacional (PGD) per a la selecció d'embrions sans. No realitzen diagnòstic prenatal confirmatori del PGD.

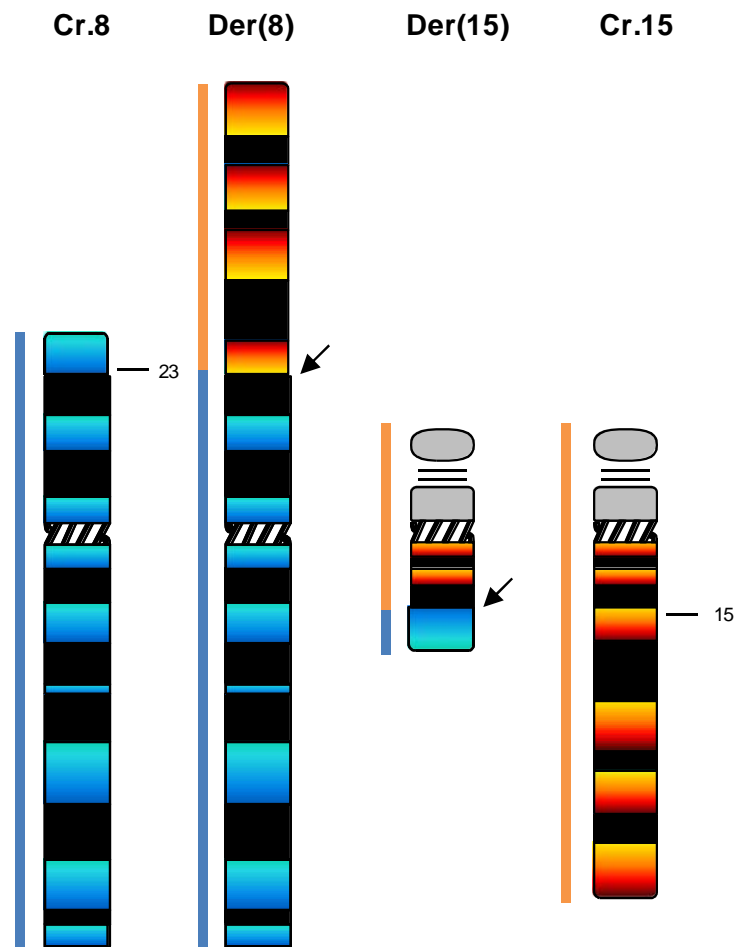


Figura 11. Idiograma dels cromosomes implicats en la translocació paterna de la Família 9. Les fletxes indiquen els punts de trencament.

3.2. Obtenció del plasma i extracció d'ADN a partir de diferents teixits

El plasma s'ha obtingut a partir de sang perifèrica recollida en EDTA (3 mL) abans de les 24 hores posteriors a l'extracció mitjançant centrifugació a 3.000 rpm durant 10 min, obtenint un volum d'1-1,5 mL. Posteriorment s'ha centrifugat a 12.500 rpm, en centrífuga refrigerada a 4 °C, durant 10 min per tal d'eliminar les restes cel·lulars al màxim. El sobrenedant obtingut (plasma) s'ha conservat a -20 °C fins al moment del seu processament.

L'extracció d'ADN a partir de diferents teixits s'ha realitzat utilitzant diferents protocols:

) **A partir de sang total**, l'extracció d'ADN s'ha dut a terme amb el kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc.)* seguint el protocol d'extracció de sang suggerit pel fabricant.

) **A partir de vellositat corial**, l'extracció d'ADN s'ha dut a terme amb el kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc.)*, seguint el protocol d'extracció de teixits suggerit pel fabricant.

) **A partir de plasma matern**, l'extracció d'ADN fetal lliure (ffDNA) s'ha realitzat amb el kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc.)*, amb el protocol adaptat a 600 µL de plasma i eluint en 50 µL d'aigua destil·lada pre-escalfada a 56 °C.

3.3. Selecció de seqüències genòmiques susceptibles de presentar metilació diferencial en placenta i sang materna

Per trobar un marcador d'ADN fetal universal és necessari explorar les variacions genètiques presents entre mare i fetus, pel que és rellevant l'enfocament epigenètic de la qüestió i l'estudi dels estats de metilació dels promotors de determinades seqüències escollides en ambdós teixits (placenta i sang perifèrica).

Està descrita la presència de promotors gènics hipometilats en placenta i metilats en sang materna com el promotor del gen *Maspin (SERPINB5)* (*Chim et al., 2005*), susceptibles de ser utilitzats com a marcadors universals d'ADN fetal. El problema rau en que la detecció de seqüències hipometilades dins el *background* de seqüències maternes hipermetilades fa necessari el procés de conversió amb bisulfit sòdic.

El tractament d'una mostra d'ADN amb bisulfit sòdic converteix els residus de citosina no metilats en uracil, mentre que les citosines metilades romanen inalterades. Tanmateix, és un tractament força agressiu i comporta degradació de l'ADN de fins al 96% (*Grunau et al., 2001*) pel que l'eficiència i aplicabilitat d'aquest tipus de seqüències com a marcadors d'ADN fetal universals en la rutina clínica queda compromesa.

Per tant, idealment i amb visió d'aplicabilitat en plasma matern, el desitjable és la recerca de seqüències hipermetilades en placenta i hipometilades en sang perifèrica, patró exactament oposat a la situació descrita anteriorment, que descarta la utilització del tractament amb bisulfit sòdic i inclou la digestió enzimàtica amb enzims de restricció sensibles a metilació (Fig. 12). D'aquesta manera únicament les seqüències d'origen fetal serien resistents a la digestió i, per tant, detectables i quantificables.

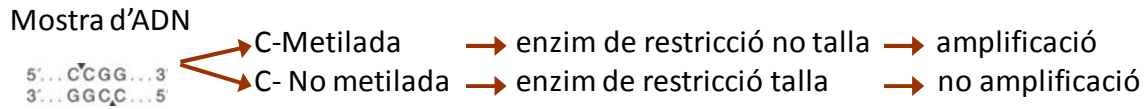


Figura 12. Esquema de l'assaig de restricció sensible a metilació emprat en el nostre estudi.

S'han seleccionat seqüències promotores seguint tres estratègies diferents i s'han estudiat una a una, evidenciant les posicions CG presents i identificant les que formen part d'una seqüència diana de restricció d'enzims sensibles a metilació. S'ha procedit al disseny de *primers* per l'amplificació de les regions promotores on hi havia, com a mínim, dues dianes de restricció. Els *primers* s'han dissenyat mitjançant el programa *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), procurant una mida d'amplificació en el rang de 100-400pb.

Les tres estratègies seguides per a la selecció de les seqüències estudiades han estat:

3.3.1. Seqüències promotores en el cromosoma 18

Segons la bibliografia (*Azhikina et al., 2005*) un 5%-10% de les posicions CpG presenten, aleatòriament, un estat diferent de metilació entre sang perifèrica i placenta. En el present estudi ens hem centrat en la recerca de seqüències promotores en el cromosoma 18. S'ha obtingut un llistat complet dels gens presents en l'esmentat cromosoma a través de la base de dades <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>.

Un total de 143 parells de *primers* s'han amplificat per avaluar l'estat de metilació de les regions amb el màxim de posicions CpG possibles (Taula 2). Les primeres 59 seqüències són de 100-300 pb on hi ha incloses, com a mínim, dues dianes de restricció per a *HpaII*. De la 59 a la 143 s'ha augmentat la mida de l'*amplicon* fins a casi 600 pb en algun cas, per incloure més dianes de restricció de *HpaII* i de tres enzims més, *Maell*, *CfoI* i *Aci*, sensibles també a la metilació.

Taula 2. *Primers* dissenyats en les seqüències promotores del cromosoma 18.

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
1F	GCCAAGTGCTGTTCACCTCC	20	1R	CAGGATGGGAAAGAGGACAC	20
2F	GAGAGACCTCGGAGCACCTG	20	2R	AGCGCTTCTTCAAGTTAGTC	20
3F	GCTGAAGTTGTAACAAGTG	20	3R	TGGAAAACATATTTCTCGCC	20
4F	CCAAAATTCTGTAATTCAC	20	4R	CCAGGCAGGGATGGGAGCAT	20
5F	GCATTCTCAGCATTAGGGCG	20	5R	TTATGGACGCTACAAGATG	19
6F	GGATGTATCTGAACGGTGGA	20	6R	CTACCTGAATAAAGCAGCTG	20
7F	GTCTGCAGAGCAGTGTGGCT	20	7R	GCAGCTGCATGCTTGCTTCT	20
8F	CAAAAATCCTTAATCAAAAC	20	8R	TCCCGCACCTCCCTTTACT	20
9F	TAAAGTTAAAAGCCACCTCCC	21	9R	ATCCAGACTGGCTGGCCATT	20
10F	TTCTCCCCCTTTGGTGTTCAA	22	10R	CTGAGTCTCGATTTCCTCCG	20
11F	CCTTCCAGCTGTACATTCTG	21	11R	ATGTGGCTAAGAAAACAAGC	20
12F	GGGAGCGGGGACGCGAGCA	19	12R	AATCCGCGGGAGCGCGGCTGT	21
13F	CAAAGCGCTGTCCGTGGTTG	20	13R	CCCTGTCCAGGTGGATTTC	19
14F	TACTATATGGCAGATTTCA	20	14R	AGCAGCAGCCTCTAGTGCCT	21
15F	CTTCTCTCCTTAATCCGCTCA	21	15R	CGGCCTCTGAAGAGCGGATG	20
16F	GGCTGAATCAGGATCTGACC	20	16R	CAAAGTCATGCCTGCCTAGC	20
17F	GCTAGGCAGGCATGACTTTG	20	17R	GTACGTCGTCGGCGATCC	18
18F	TGCTTAAGAAAACCTTTGCTGCT	22	18R	TTAGAACGGAAGGTTGGTCC	20
19F	GGACGTTAGGACATGGTTG	19	19R	GTGTTTTAAAAATCATTTCA	20
20F	GAGTTTGACCCCGAGGGGAG	20	20R	TTCACCCTTCAGCCCTCTGAA	21
21F	TTCACTAGCATCTGAATATTG	21	21R	GTTTGTGGAGCAGTGAAATC	21
22F	AGGTGGAGGAAGGAAGGAGC	20	22R	GTATTTGGCGGCTGGACTAT	20
23F	AGGCGGCGCGCTCGGGAAGAG	21	23R	GTGGCGGAACCGCGCCGGG	19
24F	CCTTAAGGCCGCGCTCGCCAG	21	24R	CCGCCGAACCAATGGATCTC	21
25F	CTCTGTTTAAATAGACTCGC	20	25R	TTCTTCTCTCAGCCTCCCTCC	21
26F	CCGTGGCTCGTCGGGTCTT	20	26R	GTCGCTGGGCTTCCGAGAGGT	22
27F	CTGCGTAGGGGCGCTTTGTT	20	27R	GAGAGTGCGAGAGAGGCGGT	20
28F	CCTCTGTAACCAGCGGTAGC	20	28R	TCCCTCCCTTACCCTTCAAC	20
29F	CAAAGCGACCGGCT	14	29R	CAACCCCAAAAAGCTCTGGAA	21
30F	CTCACTTTTTCCAAAGGGCC	20	30R	GGTTTGTACCGAGGTCCGGCA	21
31F	AACGTCAAGTGATGGGGCGG	20	31R	TGGGGAAAAGAGAAGTCTGCCG	21
32F	CTCTAGGCTACCGCACCGCCT	21	32R	GTGGGTGGCTCGGCCAGTGCA	21
33F	TCACTTCTCCTCCCTGTAAG	20	33R	TCTGGGGCTTGACGTCTGAT	20
34F	CGGCTCACGCTGTGGTTCCA	20	34R	TCTTCAACTAGCCACTAGGC	21
35F	CGGAGAGCCGGCGAGCCCG	19	35R	TCCGAGTTCCTGGACGAGA	19
36F	CGAGCCTCGCTTAGACCGCG	19	36R	GTCCTCGACTCACCCCTCCT	20
37F	TCTGCCGCTCCTTCTTTCC	20	37R	CTGTTCCCAACAGGACCGC	20

Material i mètodes

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
38F	ATTTCTGTCTCCCAGCTG	19	38R	TAACAGTGAGGCAAGGGAGA	20
39F	CCAGAAAGGATCGGTGATGT	20	39R	TCGTGAAGGTTAAGTAACC	19
40F	ATGGGCTAGACACAAAGGAT	20	40R	TCGGTGCTTGTCCCAGCCAG	20
41F	GCCCTCGGCGACGCGGGCAG	20	41R	TGGGAGGGGAATGGGCGC	18
42F	TGCGACTCCACCTACCTAGT	20	42R	GCCAGCGCACGTGCGCCGTGT	20
43F	AGATGTCGCGTCAGAGGCG	19	43R	TGCAGCGGTTTAGTTTAATT	20
44F	TCGCTTGTAGTTCTCAAAT	20	44R	TGAAGAGGAGCGGAGCGGC	19
45F	TAGTTCAAAACTGACATTCA	20	45R	CATCCTAATAGATAATACC	19
46F	ATGCAAACGTAGAGACCACT	20	46R	CACTTCTCGTATTCTTGAT	20
47F	GGTAAGTTCATCTCAATGTC	20	47R	GTTAGGAACTCAGCAAATGTT	21
48F	AACTGATTTGTTTTACTATA	20	48R	CGATTTTTCAAACATCCTAA	20
49F	TCCAGGGGAGTATTCAGAGA	20	49R	ACTGGCTTAGATAAAAATTCA	20
50F	TCAGCAGCAGCCTCTAGT	18	50R	GTCCTCCTCCCAGGGACTCT	20
51F	CTCCTGACACCAGAGTTGG	19	51R	ATCAAGCCGCACTGGCGGCT	20
52F	AGTGGTGGCCGGCAGAGCACA	21	52R	TTGCAAGGAAGTGAGGACTT	20
53F	CCTGAATAAAGCAGCTGGT	19	53R	GAAGTGACTCCATTTCCCCC	20
54F	CGGCTCGGCAGGATTTCT	19	54R	CAGCCACATTGTGCTGAATG	20
55F	TAGTCTAGAGGTTCCGTCT	20	55R	TCAGAGCAGTGTGGCTTTG	19
56F	AGCTGCATGCTTGCTTCTGT	20	56R	CGCACCTCCTTTACTCCCAA	21
57F	GTTCCGGGTTTGGGGGAAA	20	57R	TGAGCATATAACTGAAGGACA	21
58F	CACAGCTGCCTGGGCCGGAG	20	58R	TGGTGAAGAGGCACGAGCGT	20
59F	GATGGTAAGTTCATCTCAATG	21	59R	TGTGAATCTGTTAATGGAAT	20
60F	CCCATAAAGGCTCTCTCGTG	20	60R	ATAGCTGTTTGTGGCGCTGT	20
61F	GCTAATCGGAGTACACATTCAGG	23	61R	CAGACCGCTCTGGACTGTTT	20
62F	AACTCCCAGGCTCAGGTGAT	20	62R	CTTCTTCTCCTCCGACCTCA	20
63F	TGAGGTCGGAGGAAGAGAAG	20	63R	CGTTCCTGAGCCCTACCTAC	20
64F	TCAGGAACGCAGTCTTTCAC	20	64R	CACCCTCCACTCCAGCAG	18
65F	GTGCTGGCCGTGTTTCGAG	18	65R	ACAGCCACCCATGAGTTTTC	20
66F	TGGTGCAGTCTGTTTCGTG	20	66R	CCTCAACAAACACAGGGTCA	20
67F	TTTGCCACAAGGAAATTCT	20	67R	TAAAGGTGTCTTCCCAACG	20
68F	GCACACACCATTGACCTCAC	20	68R	GATCTCTCGGAAGTGCTTGG	20
69F	ACTTCCGAGAGATCCACTCC	20	69R	CAAGGGAAGAGAGCTGAGGA	20
70F	CTCTCTCCCTTGCCCTAC	20	70R	GATTGTACACACTGGGCCATC	21
71F	AGCTAATCCGGACTCCTTC	20	71R	CTATGGCCGTGGAGAACAGT	20
72F	GAGCAACAAAATGCCCTACG	20	72R	GCAATAACAGGATTCAATGAGG	22
73F	TTCCAAAAGCCAATTGATTC	21	73R	TCTCGCTTATCAATTGCAACA	21
74F	AAGATTTTGCCAATTCCAA	20	74R	GTGCAGCTGGAGGAGGAA	18
75F	ACCCGTCTTTCTGCTC	18	75R	GCCCCAATTAGACAGGTTTG	20
76F	TCGGCAAACCTGTCTAATTG	20	76R	CCTCAATGACCGAAGTCCTC	20
77F	GAGGACTTCGGTCATTGAGG	20	77R	CAGCCATTCCAAACCTAACAA	21
78F	ATCGTACGGTAATGGGCACT	20	78R	TGAGAGCAATGTGCTTGTC	20
79F	GGAGTTGGGAGAGGAGAAGG	20	79R	GTGGGTGGGAGAAGGAG	18
80F	TGGATCCCAAAGTGTGGTT	20	80R	TCACTCAGAAGCCCTCCTC	20
81F	GGGCTTCTGAGTGACTGGAG	20	81R	AGCCACTTACCGAGGCAGAG	20
82F	GCTCTGCCTCGGTAAGTGG	19	82R	CTGCGATCCGAATCTGAACT	20
83F	CCTCTCCCTTTCTCGTTGAA	20	83R	GCCTCCAATGGTCATTTG	19
84F	AAGACCAGCCTGAGCAACTC	20	84R	TGTCTCCAGAGAGGAGAGA	20
85F	TGGGGTTTTACATGCCAGAT	20	85R	ACTGCCTTCTCCCAGCTCTC	20
86F	GAAGACGCAGCCACCTTC	18	86R	TCGAAGGCAGCAAACCTATT	20
87F	CCTCCATCTTTCTTCCA	20	87R	ACCTCAGCAAAAGACCAGGA	20
88F	CAGCCTGAGCAACAGAGAAG	20	88R	AGCTTCATTACGCGAGTTGG	20
89F	GCTGGCTCACGGAGTTTAGA	20	89R	TCCCCAACTTTCTTTCTGA	20
90F	GCGGAATTGGAAGATTCAGA	20	90R	TCTACCCACCTAGCACCAT	20

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
91F	ATGGTGCTAGGTGGGTGAGA	20	91R	AAATTTTCAGAAGGCCTCACAAAC	22
92F	ATGGTGCAATCTTGGCTCA	19	92R	ACATTTCGTTTCATGCTTTTGC	20
93F	ATGGCGGAAGAGGGTTAAAA	20	93R	TCCCACCAATAAAGTCATCCA	21
94F	GAAGCCCTGTTAGGACACCA	20	94R	AGCACGAAATCCAGGCTCT	19
95F	CAGCTAGCTTCGGGCTGATA	20	95R	CCCACGACTTACCCAAAAGT	20
96F	GGGAAACTTTTGGGTAAGTCG	21	96R	TGAGAGGAGGGGTTGATGTC	20
97F	GACATCAACCCCTCCTCTCA	20	97R	CAGACCTGCTCCCTCCAG	18
98F	TCCAACCTGATGCAAGTTTCCT	21	98R	TCAGAAGAAGATTGATTATTTCCCTCAT	27
99F	TTATACCTGGCATCCCTACC	21	99R	ATCAGCACGAGGGAAGCTC	19
100F	AGCTTCCCTCGTGTGATT	19	100R	GAAGGAGGGGGTGAGGAC	18
101F	GTCCTCACCCCTCCTTC	18	101R	CCCTTCGGCTTTAAAAATCA	20
102F	TTCATTGTTTCATGTCCACAGACT	23	102R	AAAGTAACACAAGACAATCTTCACTGT	27
103F	CAGCCTGAGCAACAAGAGTG	20	103R	TTCTCCGAGGCGGAGTTT	18
104F	CATTGAAACGGCAGCATTAC	20	104R	TTCAGTGGTACTCCATGGACAG	22
105F	CAACCCAGAGGAAACAGAGC	20	105R	TGTTCAAACAAACGGAGACC	20
106F	GAACAGGAAGGCGGACATATT	21	106R	AGCCTCACTCTCCCATTTTG	20
107F	CTCGTGGCCGAGACTGAT	18	107R	AAAGAGAAGCAGGGTGGAGA	20
108F	GGAGTCTCCACCCTGCTTCT	20	108R	GGACCTCCGCTCTCCAGAC	19
109F	GGTCTGGAGAGCGGAGGT	18	109R	AGACATGCAAACCCAGAC	20
110F	CAGCAAGAATTCCAGTGCAG	20	110R	ACTGTGGGAGCCCCTCTC	18
111F	CCTGAGGAGGTGCTGAGAG	19	111R	AGATCTCGGGTCACTGCAAC	20
112F	TCTTGAGGACCAACGCAAAC	20	112R	CCAGCCACTCAGGAACCTT	19
113F	TCTGGAAGTTCTCTGAGTGG	20	113R	GCCCAGGATAAGGGATAAGC	20
114F	AGCATTGCCAAGGTGAGC	18	114R	TGCTGAGATTACAGGCGTGA	20
115F	TGGTGAAACCCCGTTACAAT	20	115R	GAGCAAAGTTTCTGCCAACCC	20
116F	TGGGCCCTTCTCTGATACTG	20	116R	TTACATCAGGTTGGCGGTTA	20
117F	TAGCGGGATCTCGACTCACT	20	117R	GTGAACTGGATCACGCCACT	20
118F	CAGTGGCGTGATCCAGTTC	19	118R	GGAGATCAGTACTGGAGACATTCA	24
119F	GTCAGCCCCGACCAACCTT	18	119R	CACTCTCCCCCTCCTCCT	18
120F	AGGAGGAGGGGGAGAGTG	18	120R	GCACTTAGCCCAGATTTTCG	20
121F	CGAAAATCTGGGCTAAGTGC	20	121R	CGACGCCTTCCACATAAGAT	20
122F	TCAGGAAATCGAGACCATCC	20	122R	GAGTGCCCGTCTCTCTGTTG	20
123F	GGGAAGGCCACTGGAATTTA	20	123R	ACCGTCTGCAAAGGTACCAC	20
124F	GGGGAAGCAGAGAAGTTTCA	20	124R	TCAAAAGGCTGAACAGCAAA	20
125F	CATTAATAAATAAGAAAAAGCCAAA	25	125R	CTCCTTATCCACAGTCACAACG	22
126F	TGTTCCAGATTTTCTTAGCTTC	23	126R	GAGGTCAGGAGTTCAAGACCAG	22
127F	GGCTGGTCTTGAACCTCTGA	20	127R	AATGCCGTAGAAGCATGGAC	20
128F	AACTTCTGAAAGGCCCAAT	20	128R	AGCAGCTCTGTCTTGGCATT	20
129F	GAATCTCCCTGCACCATGAG	20	129R	CACTGCTTTTCCGCCTCTAC	20
130F	GTAGAGGCGGAAAAGCAGTG	20	130R	GACAGACGGGGCAGTAGAAA	20
131F	TCTGTGAGGAGGTGCTCAAA	20	131R	ACTTGAAAGCAGGGCAGGT	19
132F	GGAAAGAGCCCTTGTGAGA	20	132R	GGTTGGTCAATTCTTTTCAGTTG	23
133F	GGACAACTGTCTTAAATCTTT	24	133R	CGAGATGGAGTCTTGCTCTG	20
134F	GTTCTCCCCCTCCTCTGTG	20	134R	TCCTGGAGGTTACGGTTCTG	20
135F	AGGAGCTGGGTTGAGGAAG	19	135R	CGGGCCTTACCAGAGGTC	18
136F	CGCGAGACCTCTGGTAAGG	19	136R	GGTGCAGAAAGAGCGAGAAA	20
137F	TCTGAGATTGGACCGATTCC	20	137R	TGATAGCCACAAGCATCAGG	20
138F	TTGCTAGTGACAGGCAGAGC	20	138R	AAATTAGCTGCCCTCAGGTG	20
139F	GATCTCGGCTCACTGCAAG	19	139R	CTCCCCTCACATGAGCTTTC	20
140F	CCCATCCTGAGAAATTCCTG	20	140R	AGGCTGCTTAGGGAAAGAGG	20
141F	TGAGTGTCTCTCTGCGTTG	20	141R	TCGGGCTATGACCCACTTTA	20
142F	AATGAAAACAACACTACTCTGAGCA	25	142R	GGAACATGAGGAACTGTTGGA	21
143F	CAGATCAAGATGGGGCATT	20	143R	TCCTATCCCATCACTTTTCCA	21

Ampliació de la regió 18-29. L'*amplicon* 18-29 mesura 245 pb i inclou 6 dianes de restricció per *HpaII*. S'han dissenyat dos nous parells de *primers* per a aquesta regió, dividint-la en dues subregions, 29.1 i 29.2 per tal d'estudiar més concretament cada un dels llocs de restricció i tenir un fragment més curt aplicable en ADN fetal en cas que un dels dos sigui determinant (Taula 3, Fig. 13).

Taula 3. Nous *primers* dissenyats per a la regió 18-29 en el present estudi.

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
29.1F	CAAAGCGACCGGCT	14	29.1R	CCCGGCGCCCAATAACTA	18
29.2F	GCGCCGGGTAGATGCATATAT	21	29.2R	CAACCCCAAAAAGCTCTGGAA	21

18-29 (245 pb)

CAAAGCGACCGGCTCACTCGACTGCTGATTCTTTCGCTTGGCATCGCGTCAGGGGAGTTAGCTTTCCTTCAGCCGGGTCTGGCTAGTTATTGGGCGCCGGGTAGATGCATATATATATATTTTTTCTAACTATAGCAAGCAAGAAGTGGCAGGGCGCGCA
CCGGCTGTGCGCAAGTGTGTTCAACTCAGGGAGCCGGGGCTTCGCTCCGTCCTCCC
CCGGCTTCCAGAGCTTTTTGGG
GTTG

18-29.1 (101 pb)

CAAAGCGACCGGCTCACTCGACTGCTGATTCTTTCGCTTGGCATCGCGTCAGGGGAGTTAGCTTTCCTTCAGCCGGGTCTGGCTAGTTATTGGGCGCCGGG

18-29.2 (152 pb)

GCGCCGGGTAGATGCATATATATATTTTTTCTAACTATAGCAAGCAAGAAGTGGCAGGGCGCGCA
CCGGCTGTGCGCAAGTGTGTTCAACTCAGGGAGCCGGGGCTTCGCTCCGTCCTCCC
CCGGCTTCCAGAGCTTTTTGGG
GTTG

Figura 13. *Amplicons* 18-29, 18-29.1 i 18-29.2. En groc les dianes de restricció de *HpaII*, en verd els *primers*.

A més, s'ha dissenyat un nou parell de *primers* per a amplificar la part de la seqüència que, *a priori*, pot tenir la diferència de metilació més acusada, M29, la que és comú a 18-29.1 i 18-29.2 (Taula 4).

Taula 4. Parell de *primers* dissenyat en el present estudi per a la regió de la seqüència 18-29 amb possible diferència de metilació.

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
M29F	GAGTTAGCTTTCCTTCAGCCGG	22	M29R	GCCACTTCTTGCTTGCTATAGTTAGA	26

3.3.2. Seqüències avaluades mitjançant tecnologia d'arrays de metilació

Com a part del grup específic de recerca de marcadors epigenètics d'ADN fetal universals del SAFE *Network of Excellence*, s'han avaluat diverses seqüències del cromosoma 18 amb metilació diferencial en col·laboració amb el *Wellcome Trust Sanger Institut*. La selecció de les seqüències procedeixen dels resultats de la tecnologia basada en microarrays de metilació (MeDIP on ChIP) (*Papageorgiou et al., 2009*).

S'han seleccionat cinc regions:

Dues regions hipermetilades en placenta i hipometilades en sang total:

Position 1 (NCBI36) of differentially methylated region: 26797871-26799016

Position 2 (NCBI36) of differentially methylated region: 58956134-58956604

Tres regions hipometilades en placenta i hipermetilades en sang total:

Position 3 (NCBI36) of differentially methylated region: 20104455-20105324

Position 4 (NCBI36) of differentially methylated region: 23755747-23756252

Position 5 (NCBI36) of differentially methylated region: 47366842-47367222

S'han dissenyat 9 parells de *primers* excepte en les regions 1 i 5, que no s'han pogut estudiar degut a la manca de dianes de restricció en les seves seqüències (Taula 5).

Taula 5. *Primers* dissenyats en les seqüències seleccionades per arrays de metilació.

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
2.1F	TGGATCCCTGGAGCATGTGT	20	2.1R	TCCTTGGGAACCGGCTAAC	19
2.2F	AGAGGTCAAAGGCTGTTTCTAGACA	25	2.2R	TGGTGAATCTAGGATCAGGACAT	24
2.3F	GCAACCGTCAGGTGAGAGAGA	21	2.3R	TCTGGTGTGAGGAGAATCTTGCT	23
2.4F	GCTCCATGAAGCCAAGCAA	19	2.4R	TCGCCAGCCTGGAGGAA	17
3.1F	ATGCTCTGAATGCTAGGAAACGT	23	3.1R	TTTTCGCATGGCTGTGCTC	19
4.1F	CCTTAGTTCTTTGACAGTGGGTTTGAT	27	4.1R	AGCAAACCTTAACCAGCCTTCA	22
4.2F	CCTCACGGTAGGCCCGC	17	4.2R	TGGGTGAAAGTAGCACTGGCTC	22
4.3F	GCCCTGACGGCGAGTTTT	18	4.3R	AGGTAGATCGTAAGGCTATTAAGGAGAC	28
4.4F	TTATATATCTGGTTCAAATGTCAAAGCA	28	4.4R	GAAACTCCAACCTGGCATCTCT	22

3.3.3. Seqüències a tots els cromosomes segons perfils d'expressió

En base al fet que la metilació en les regions promotores és un dels mecanismes de la regulació de l'expressió gènica, també s'han explorat les bases de dades d'expressió (<http://symatlas.gnf.org>) per a centrar-nos en gens dels quals se'n coneix ja la transcripció diferencial entre placenta i sang perifèrica (Fig. 14).

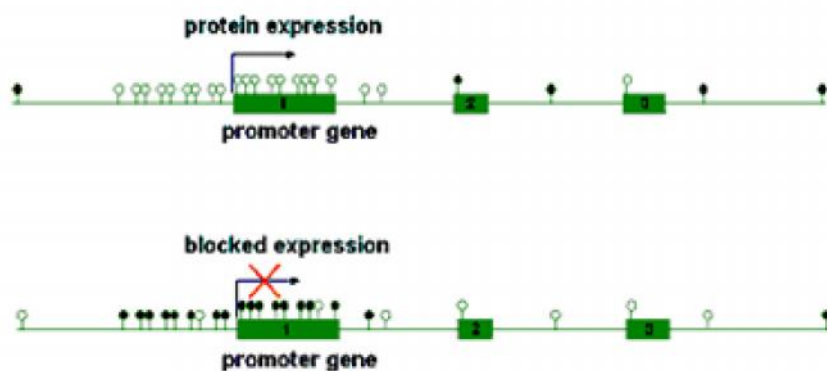


Figura 14. L'estat de metilació de les citosines en els promotors gènics en regula la transcripció.

S'han dissenyat 19 parells de *primers* en promotors de gens amb elevada expressió en sang total i mínima en placenta en els cromosomes 12, 9 i 1 (Taula 6).

Taula 6. *Primers* dissenyats segons perfils d'expressió diferents en sang i placenta.

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
200F	AGTGTTAGGAGACTTGCATCTAGTCCT	27	200R	CAACTGCCTCCCCACCC	17
201F	GGAGAAGAGAAAACGCTGGAATACT	24	201R	GCCATGGACATTGGCTGC	18
202F	GGCCTTAAGTGTGCTTGGGA	20	202R	GGCCTAGGGAAGAAGCCAAA	20
203F	CCCCGAACCTCAGGCC	16	203R	AGCCCCCTTTTTTTAGTGCC	20
204F	CCTGCGCGCTCCTAGAGCT	19	204R	CCCGTTAGACACTCGCACGT	20
205F	TCTGAGTGAAATCTACCTACCGGG	24	205R	TCAGTGGCTTCCTGTTTCATGC	21
206F	TCCTGGGCTCGACTTCCC	18	206R	CCTGACTCCTCGGCGTACG	19
207F	GAGCGGCCAGCAGGG	15	207R	CCGCAATCAGGAGGCT	17
208F	TCTAGTTTGAAGAATGGAAGACTTTTCA	28	208R	GCGGTGACGGCCAG	15
209F	GGTTAGGACCAACAGGCCT	20	209R	AGTTGACTGAATGAAAAACAACCTTGG	27
210F	AAGAAATTGTTATTAATGCTACCCGG	26	210R	TTTTTCCCCTTCTAATCTTCTAG	25

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
211F	ACAAGGGAGCCACCAACGT	19	211R	AGTCCTCACTGCCCCGC	17
212F	TTCTTGAGCGCCAGGAAAA	19	212R	TGGCCGTAACTTAACGACACTCT	24
213F	GCTGAGCCCAGGTCTCCTAGG	21	213R	CCTTGTTCTCCTCGCGCA	18
214F	GACACCAACCAAGCAATTCAAG	22	214R	TATTCCAGAGTATCTCTGCAATGAATTC	28
215F	GTCCAACACCAATTAACAAAACTCTA	29	215R	GGAACCTCGGCGGCCG	15
216F	CTTCCTCCCTGGCCGC	16	216R	GTAACAGTGTGTTAGTTGGTTTGTGAG	28
217F	ACTGTCACACCCAGTCCCAAG	21	217R	CTGCACTCCAGCCCGG	16
218F	GGAGTGCAGTGGCCGC	16	218R	CCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAAA	29

Ampliació de la regió 12-200. L'*amplicon* 12-200 mesura 361 pb i inclou 2 dianes de restricció per *HpaII*. S'han dissenyat dos nous parells de *primers* dividint-lo en dues subregions, 200.1 i 200.2 per estudiar cada diana de restricció per separat i, en cas que un dels dos sigui determinant, tenir un fragment més curt aplicable en ADN fetal (Taula 7 i Fig. 15).

Taula 7. Nous *primers* dissenyats en el present estudi per a la regió 12-200.

Nom	Seqüència	Longitud	Nom	Seqüència	Longitud
200.1F	CCTGAGTGTTAGGAGACTTGCATCT	25	200.1R	AAATCGAGACTCAGAGAGGTTTCC	24
200.2F	ATGCATTAACCTTTGGCTCAAACC	23	200.2R	GGCTGCCCTGAGACAAAGC	19

12-200 (361 pb)

AGTGTTAGGAGACTTGCATCTAGTCCTGACTCCGGTACCAACCGAATGCATGTCCCTGGACAGGAAACCTCTCTGAGTCTC
GATTTCCCTCCGTGGTAAAAAGGAGAGGGTTAAACCCAGGGTCCCGAGGGTCCCTTCCAGCTGTCACATTCTGGAGCGTAT
GAGATGAGGTAGGCACACAAAGTGGACAAGATGTGGCTAAGAAAAACAAGCTACACATCAAGCTCATCTGTAGCATAGGTGC
TTAAGAAAACCTTTGCTGCTGTGTAATATTAGAACGGAAGTTGTTTCCAGTAAAATGCATTAACCTTTGGCTCAAACCAAGAT
GATGGGTA^{CCGG}GCATGGGGTGGGAGGCAGTTG

12-200.1 (90 pb)

CTGAGTGTAGGAGACTTGCATCTAGTCCTGACTCCGGTACCAACCGAATGCATGTCCCTGGACAGGAAACCTCTCTGAG
TCTCGATT

12-200.2 (94 pb)

ATGCATTAACCTTTGGCTCAAACC AAGATGATGGGTA^{CCGG}GCATGGGGTGGGAGGCAGTTGAAGATCCACTGAGCTTT
GTCTCAGGGCAGCC

Figura 15. *Amplicon* 12-200, 12-200.1, 12-200.2. Dianes de restricció per a *HpaII* en groc; en verd els *primers*.

En total s'han dissenyat: 146 parells de *primers* en seqüències promotores del cromosoma 18, 9 parells de *primers* en seqüències promotores del cromosoma 18 seleccionades per arrays de metilació i 21 parells de *primers* en seqüències promotores seleccionades segons perfils d'expressió en tot el genoma.

Cada joc de *primers* s'ha testat en 5 mostres d'ADN de vellositat corial digerides, 5 mostres d'ADN de sang total digerides, 1 mostra d'ADN de vellositat corial sense digerir, 1 mostra d'ADN de sang total sense digerir i 1 control sense mostra.

3.4. Digestió amb enzims de restricció sensibles a metilació

En el primer cribratge de seqüències (de la 1 a la 59) només s'ha realitzat digestió amb l'enzim de restricció sensible a metilació *HpaII*. En els següents cribratges s'ha ampliat el nombre d'enzims emprats fins a tres més per tal d'augmentar el nombre de posicions CpG estudiades (Taula 8).

Taula 8. Enzims de restricció emprats en el present estudi i les seves dianes de restricció.

ENZIM	DIANA
<i>HpaII</i>	C*CGG
<i>Maell</i>	A*CGT
<i>CfoI</i>	GCG*C
<i>Acil</i>	C*CGC

*punt de tall

S'ha digerit ADN genòmic extret de sang total i de vellositats corials amb *HpaII*, *Maell*, *CfoI* i *Acil* (New England Biolabs, Inc., USA) d'acord amb les instruccions del proveïdor: 2 h a 37 °C, 40 min a 65 °C per inactivar l'endonucleasa. S'ha emprat una concentració

d'enzim 10 vegades superior a la recomanada pel fabricant per tal de minimitzar la presència de digestió parcial. Les mostres d'ADN genòmic digerit s'han utilitzat com a substrat per a PCR de metilació juntament als mateixos ADN sense digerir com a Controls Positius i un Control sense mostra.

3.5. PCR de metilació en ADN genòmic digerit i visualització dels productes d'amplificació en gel d'agarosa

La mescla de PCR té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de 1x *Ecotaq Reaction Buffer* (*Ecogen, Biología Molecular S.L.*), 0,2 mM per cada dNTP (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*), 2-3 mM de *MgCl₂ solution* (*Ecogen, Biología Molecular S.L.*), 4 pmol de cada *primer*, 1,5 UI d'*Ecotaq DNA Polimerasa* (*Ecogen, Biología Molecular S.L.*) i 1 µL d'ADN (10-20 ng d'ADN).

La PCR es duu a terme en un termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700* (*PE Applied Biosystems*) amb el programa: 5 min de desnaturalització a 95 °C, seguit per 35 cicles de 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C i 40 s a 72 °C, i una extensió final de 10 min a 60 °C.

Després de la PCR, la presència o absència d'amplificació d'ADN s'ha monitoritzat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1,5% amb Bromur d'Etidi.

En els casos on no s'ha obtingut amplificació amb les condicions de PCR inicials, s'ha variat el temps i la temperatura d'*annealing* en un rang de 53 °C a 64 °C, s'ha augmentat la quantitat d'ADN al doble del descrit i s'han fet proves amb diferents concentracions de MgCl₂.

3.6. PCR a Temps Real de les seqüències candidates

S'ha ampliat l'estudi de la seqüència 12-200 mitjançant el disseny de *primers* i sonda per la tècnica de PCR a Temps Real (Taula 9) que permet la detecció i quantificació de determinades seqüències d'àcids nucleics mitjançant la combinació de termociclatge i detecció de fluorescència cicle a cicle. Donada la seva elevada sensibilitat i especificitat s'ha emprat per excloure la presència de metilació residual en sang perifèrica.

Taula 9. *Primers* i sonda emprats per l'estudi de la seqüència 12-200.

Seqüència 12-200	
Forward	5'-AGTGTTAGGAGACTTGCATCTAGTCCT-3'
Reverse	5'-CAACTGCCTCCCCACCC-3'
Sonda	5'FAM-TATGAGATGAGGTAGGCACACAAAGTGGACAAGAT-TAMRA3'

La mescla de PCR té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de 1x *Gene Expression PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)*, 7,5 pmol de cada *primer* i 6,25 pmol de sonda, 3 µL d'ADN de sang perifèrica i de vellositats corials sense digerir, 5 µL dels mateixos ADN digerits i 10 µL d'ADN de plasma (5-20 ng d'ADN).

L'assaig es duu a terme en un *7300 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems)* amb el programa: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C (desnaturalització i activació de l'*AmpliTaq Gold DNA polimerasa*), seguit per 40 cicles (55 en ADN de plasma) de 15 s a 95 °C (desnaturalització) i 1 min a 60 °C (*annealing* i extensió). És en aquesta última fase on es realitza la detecció, que s'analitza amb el programa *SDS Software v1.2.1*.

3.7. Avaluació del gen *RASSF1A* com a marcador universal

S'ha explorat l'aplicabilitat clínica real com a marcador fetal universal del promotor del gen *RASSF1A* localitzat al cromosoma 3 (*Chan et al., 2006*). El promotor d'aquest gen supressor de tumor s'ha descrit com a hipermetilat en placenta i hipometilat en sang materna, el patró de metilació exactament oposat al del promotor del gen *Maspin* (*Chim et al., 2005*). S'ha dut a terme un assaig de restricció sensible a metilació per comprovar si les seqüències maternes hipometilades podrien ser eliminades mentre que les seqüències fetals hipermetilades romandrien intactes (essent detectables i quantificables per PCR a Temps Real).

Com a control de digestió s'ha introduït una seqüència del gen de la *-actina* per indicar la presència de digestió parcial. Els primers i sondes per a l'amplificació dels gens *RASSF1A* i *-actina* utilitzats es mostren a la Taula 10.

Taula 10. Primers i sondes per a l'amplificació dels gens *RASSF1A* i *-Actina* emprats en el present estudi.

Gen <i>RASSF1A</i>		Gen <i>-Actina</i>	
Forward	5'-AGCCTGAGCTCATTGAGCTG-3'	Forward	5'-GCGCCGTTCCGAAAGTT-3'
Reverse	5'-ACCAGCTGCCGTGTGG-3'	Reverse	5'-CGGCGGATCGGCAAA-3'
Sonda	5' ^{FAM} -CCAACGCGCTGCGCAT-(MGB) ^{3'}	Sonda	5' ^{FAM} -ACCGCCGAGACCGCGTC-(MGB) ^{3'}

S'han digerit 100 ng d'ADN de sang perifèrica i de vellositats corials amb 100 UI de l'enzim de restricció sensible a metilació *BstUI*, a 60 °C durant 16 h. En el cas de l'ADN extret a partir de plasma s'han emprat 35 µL.

Cada reacció té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de *1xTaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)*, 300 nmol/L de cada primer (veure

Taula 10) i 85 nmol/L de cada sonda. El volum d'ADN afegit ha estat de 3 µL en sang perifèrica i de vellositats corials sense digerir, 2 µL de sang perifèrica i de vellositats corials digerides, 5 µL per al plasma i 7,5 µL de plasma digerit (5-20 ng d'ADN).

Totes les mostres s'han amplificat per duplicat en un *7300 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems)* amb el programa: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C (desnaturalització i activació de *l'AmpliTaq Gold DNA polimerasa*), seguit per 55 cicles de 15 s a 95 °C (desnaturalització) i 1 min a 60 °C (*annealing* i extensió). Es realitza la detecció en l'última fase i s'analitza amb el programa *SDS Software v1.2.1*.

3.8. Selecció de microsatèl·lits al llarg de tots els cromosomes

Donat que la segregació anormal de cada reorganització origina trisomies i monosomies parcials variables, s'han cercat i seleccionat marcadors polimòrfics en totes les regions cromosòmiques per tal de possibilitar l'adaptació del protocol a qualsevol tipus de reorganització que origini una trisomia parcial. Per a la detecció de les trisomies parcials cal que els al·lels materns siguin diferents dels paterns (informativitat), d'aquesta manera es poden interpretar els resultats en funció dels al·lels amplificats no corresponents a la mare: el fetus és normal en la regió amplificada si detectem un sol al·lel patern; i el fetus presenta trisomia parcial si detectem els dos al·lels paterns (Fig. 16).

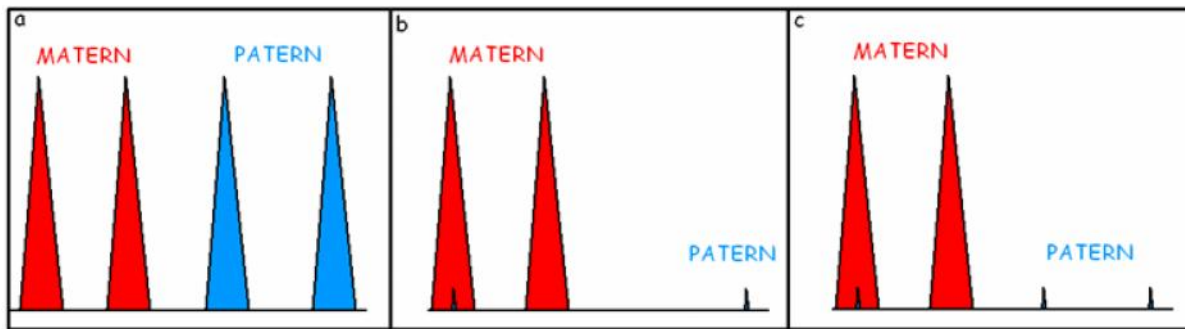


Figura 16. Representació gràfica de la detecció d'una trisomia parcial en un ADN fetal obtingut a partir de plasma matern. L'eix horitzontal indica la mida dels fragments en parells de bases (pb) de menor a major d'esquerra a dreta. L'eix vertical indica les unitats de fluorescència, proporcionals a la quantitat de producte amplificat. a) Amplificació de l'ADN dels progenitors on s'observen al·lels materns i paterns de diferent mida, b) Amplificació d'ADN extret de plasma matern on, a més dels al·lels materns, s'amplifica també un al·lel patern corresponent a l'ADN d'un fetus normal i c) Amplificació d'ADN extret de plasma matern on, a més dels al·lels materns, s'amplifiquen també dos al·lels paterns corresponents a l'ADN d'un fetus amb trisomia parcial d'origen patern.

S'ha realitzat una recerca de microsatèl·lits en les bases de dades *GDB Human Genome Database* (GDB), *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH) i *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Aquesta recerca s'ha restringit només a STR formats per la repetició en tàndem de quatre bases (tetranucleòtids). El motiu d'aquesta selecció és l'estabilitat d'aquestes seqüències durant l'amplificació per PCR i la mínima producció d'artefactes com *stutter bands* que poden dificultar la quantificació i detecció dels productes amplificats. A aquest criteri de recerca s'ha afegit un nou requeriment: que aquests STR tinguessin una mida inferior a 250 pb ja que l'ADN fetal està format per fragments inferiors a 200 pb en un 80%. D'altra banda també s'ha requerit que els STR presentin una heterozigositat mínima del 75% sempre que sigui possible ja que caldrà que els marcadors siguin informatius a les famílies (al·lels paterns diferents dels materns) per poder establir la metodologia.

Amb aquests criteris hem seleccionat microsatèl·lits localitzats al llarg de tots els cromosomes incloent les regions telomèriques (permetent la detecció de trisomies parcials) per tal d'augmentar l'aplicabilitat del protocol i tenir ja seleccionats els marcadors més

adients per aplicar-lo en qualsevol tipus de translocació equilibrada. Els marcadors localitzats a regions telomèriques implicades en la translocació permetran valorar la presència d'una trisomia parcial de la regió mentre que els marcadors localitzats fora de la regió, però propers a ella, permetran definir el punt de trencament de la translocació, confirmant o descartant la trisomia parcial.

3.9. PCR a Temps Real per a detecció del gen *SRY*

L'elevada especificitat i sensibilitat de la PCR a Temps Real ha permès valorar l'eficiència de l'extracció d'ADN fetal en plasma matern en les gestacions de fetus masculins. En el present estudi s'han seleccionat els *primers* i sondes per a l'amplificació del locus *SRY* (seqüència específica del cromosoma Y) tal com es mostra a la Taula 11.

Taula 11. *Primers* i sonda per l'amplificació del gen *SRY* emprats en aquest estudi.

Gen <i>SRY</i>	
Forward	5'-TCCTCA AAAGAAACCGTGCAT-3'
Reverse	5'-AGATTAATGGTTGCTAAGGACTGGAT-3'
Sonda	5'FAM-CACCAGCAGTAACTCCCCACAACCTCTTT-TAMRA3'

La mescla de PCR té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de *1xTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 20 pmol de cada *primer (SRY-F, SRY-R)*, 12 pmol de la sonda (*SRY-probe*) i 7,5 µL de l'ADN extret de plasma.

L'assaig es duu a terme en un *7300 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems)* amb el programa: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C (desnaturalització i activació de l'*AmpliTaq Gold DNA polimerasa*), seguit per 50 cicles de 15 s a 95 °C (desnaturalització) i 1 min a 60°C (*annealing* i extensió). És en aquesta última fase on es realitza la detecció, que s'analitza amb el programa *SDS Software v1.2.1*.

3.10. PCR múltiplex fluorescent

3.10.1. PCR en famílies on el pare és portador equilibrat d'una translocació i descendència amb translocació desequilibrada

S'han extret, analitzat i fet experiments de dilució amb els ADNs de les famílies 1 i 2 per testar la informativitat i sensibilitat dels marcadors polimòrfics en la PCR múltiplex fluorescent, així com per posar a punt el protocol amb els marcadors informatius per a cada família.

S'ha desenvolupat una PCR múltiplex fluorescent per amplificar els STR seleccionats de les famílies analitzades (Taula 12) mitjançant un joc de *primers* dissenyats per cadascun d'ells. Els *primers* estan marcats amb fluorocroms diferents que permeten amplificar en la mateixa reacció seqüències de mida molecular similar.

Taula 12. Marcadors amplificats en la PCR fluorescent específica per a les famílies estudiades.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
<i>Múltiplex Família 1 t(4;11)(p15.1;q23.3)</i>				
D4S2366	6-Fam	80,6	4p16.1	118-144
D4S1511	VIC	66,7	4p15.33	142-212
D4S2639	NED	81,5	4p15.32-p15.31	160-195
D4S1533	PET	90,0	4p15.31	177-201
D4S1643	6-Fam	76,9	4p15.1	159-194
D4S1627	VIC	70,4	4p13	177-201
<i>Múltiplex Família 2 t(10;18)(q24;p11.31 or p11.32)</i>				
D10S1434	NED	64,3	10q25.1	146-178
D10S1246	NED	73,1	10q25.1	207-247
D10S1425	VIC	52,2	10q26.11	168-184
D10S1236	VIC	55,6	10q26.11	121-137
D10S1213	6-Fam	83,6	10q26.13	91-133
D10S1432	6-Fam	92,6	10q22.1	157-185

La mescla de PCR té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de 1x QIAgen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), 0,5x QSolution (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), 0,5-2,5 µmol/L de cada primer i 5-20 ng d'ADN. La PCR es duu a terme en un termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (PE Applied Biosystems) seguint el programa: 15 min de desnaturalització a 95 °C, seguit per 28 cicles (35 quan estem amplificant l'ADN extret de plasma) de 35 s a 94 °C, 90 s a 60 °C i 40 s a 72 °C, i una extensió final de 20 min a 60 °C.

3.10.2. Desenvolupament de PCR Múltiplex Fluorescent Universal i estudi de l'heterozigositat i informativitat dels seus marcadors. Avaluació en mostres de plasma

A partir dels marcadors inclosos a les múltiples de la Família 1 i la Família 2 s'ha desenvolupat una PCR Múltiplex Fluorescent Universal amb l'objectiu de ser aplicable a qualsevol gestació com a detector universal d'ADN fetal (Taula 13). S'ha estudiat l'heterozigositat real dels seus 5 marcadors altament polimòrfics en 100 mostres de sang perifèrica (50 dones i 50 homes), així com la seva informativitat en aquestes 50 parelles.

S'ha avaluat la seva sensibilitat en la detecció dels al·lels paterns en les 12 mostres dels plasmes de gestants.

Taula 13. Marcadors amplificats en la PCR Múltiplex Fluorescent Universal en aquest estudi.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
D4S2639	NED	81,5	4p15.32-p15.31	160-195
D4S1533	PET	90,0	4p15.31	177-201
D4S1627	VIC	70,4	4p13	177-201
D10S1246	NED	73,1	10q25.1	207-247
D10S1213	6-Fam	83,6	10q26.13	91-133

La mescla de PCR té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de 1x *Colorless Go Taq Flexi Buffer* (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*), 2 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*), 7-35 pmols de cada *primer*, 1,5 UI de *Go Taq Hot Start Polimerase* (*Promega Corporation, Madison, WI, USA*) i 5-20 ng d'ADN.

La PCR es duu a terme en un termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700* (*PE Applied Biosystems*) d'acord amb el programa: 3 min de desnaturalització a 95 °C, seguit per 28 cicles (35 quan estem amplificant l'ADN extret de plasma) de 35 s a 94 °C, 90 s a 59 °C i 40 s a 72 °C, i una extensió final de 40 min a 60 °C.

3.10.3. PCR múltiplex fluorescent en famílies amb gestacions en curs.

Aplicació clínica

En primer terme s'ha confirmat la presència d'ADN fetal en el plasma de totes les gestants mitjançant la PCR Múltiplex Fluorescent Universal. Seguidament, s'ha desenvolupat una PCR múltiplex fluorescent dissenyada per amplificar les regions afectades en cada cas. Els *primers* estan marcats amb fluorocroms diferents que permeten amplificar en la mateixa reacció seqüències de grandària molecular similar.

) **Família 5.** En aquest cas d'ovodonació amb anomalia ecogràfica i, donat que les aneuploidies dels cromosomes 13, 18, 21 i sexuals engloben el 98% de les anomalies cromosòmiques més freqüentment trobades en diagnòstic prenatal, s'ha realitzat la PCR múltiplex fluorescent amb marcadors presents als esmentats cromosomes (Taula 14) per tal d'avaluar la presència d'aneuploidia.

Taula 14. Marcadors amplificats en la PCR múltiplex fluorescent per a la Família 5 emprats en el present treball.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
AMXY	6-Fam		Xp22.1-22.31 Yp11.2	X 104 Y 109
X22	6-Fam	91	Xq28 Yq (PAR2)	189-253
DXYS218	PET	65	Xp22.32 Yp11.3 (PAR1)	266-294
HPRT	6-Fam	75	Xq26.1	268-313
D21S1411	VIC	93	21q22.3	246-319
D21S1446	PET	77	21q22.3-ter	200-228
D21S1435	VIC	75	21q21	142-188
D18S391	VIC	75	18pter-18p11.22	144-168
D18S535	NED	82	18q12.2	126-156
D13S631	VIC	78	13q31-32	192-218
D13S258	NED	89	13q21	230-281

Les condicions de PCR en quant a mescla i perfil de temperatures són les mateixes que per la PCR Múltiplex Universal.

) **Família 6.** El pare és portador d'un al·lel expandit del gen *DMPK* i, donat que aquest triplet CTG expandit és refractari a la PCR, s'ha desenvolupat una PCR que amplifica directament l'al·lel sa del gen responsable *DMPK*. Addicionalment, també s'amplifiquen dos marcadors polimòrfics adjacents al gen per ajudar a confirmar el diagnòstic mitjançant anàlisi de lligament (Taula 15).

Taula 15. Marcadors amplificats en la PCR Fluorescent específica per la malaltia de Steinert en l'estudi.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
DMPK	6-Fam	85	19q13.2-q13.3	70-235
APOC2	6-FAM	85	19q13.2-q13.3	297-
D19S559	NED	88	19q13.2-q13.3	191-215
AMXY	6-FAM			X 105 Y 110

La PCR té un volum total de 25 µL i inclou una concentració final de 1x *Qiagen Multiplex PCR Master Mix* (*Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada*), 0,5x *QSolution* (*Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada*), 0,5-2,5 µmol/L de cada primer i 5-20 ng d'ADN.

La PCR es duu a terme en un termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700 (PE Applied Biosystems)* seguint el següent programa: 15 min de desnaturalització a 95 °C, seguit de 35 cicles de 35 s a 95 °C, 45 s a 57 °C i 40 s a 72 °C, per acabar amb una extensió final de 30 min a 60 °C.

) **Família 7.** Donat que el pare és portador de la translocació equilibrada t(6;21)(q21.2;q22.2) s'ha desenvolupat una PCR amb marcadors seleccionats al cromosoma 21 per tal de detectar trisomia d'aquest cromosoma (Taula 16). Les condicions de PCR en quant a mescla i perfil de temperatures són les mateixes que per la PCR Múltiplex Universal.

Taula 16. Marcadors amplificats en la PCR Fluorescent específica per al cromosoma 21 emprat en aquest estudi.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
D21S1411	VIC	93	21q22.3	246-319
D21S1446	PET	77	21q22.3-qter	200-228
D21S1435	VIC	75	21q21	142-188
D21S1008	6-Fam	70	21q22.1	196-220
D21S1437	PET	78	21q21.1	120-144

) **Família 8.** El pare és portador de la translocació robertsoniana equilibrada t(13;14)rob, pel que la PCR desenvolupada ha estat dissenyada per la detecció d'aneuploïdia del cromosoma 13 mitjançant amplificació dels marcadors que s'especifiquen a la Taula 17. Les condicions de PCR en quant a mescla i perfil de temperatures són les mateixes que per la PCR Múltiplex Universal.

Taula 17. Marcadors amplificats en la PCR Fluorescent específica per al cromosoma 13 utilitzats en el present treball.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
D13S631	VIC	78	13q31-32	192-218
D13S742	VIC	75	13q12.12	254-274

) **Família 9.** En aquest cas, on el pare és portador de la translocació equilibrada t(8;15)(p23;q15), s'han seleccionat els marcadors implicats en cromosoma 15 (Taula 18). Les condicions de PCR en quant a mescla i perfil de temperatures són les mateixes que per la PCR Múltiplex Universal.

Taula 18. Marcadors amplificats en la PCR Fluorescent específica per al cromosoma 15 emprats en l'estudi.

Marcador	Fluorocrom	Heterozigositat (%)	Localització	Rang de Mida (pb)
D15S520	VIC	66	15q23-q24	170-195
D15S172	VIC	68	15q15.2-15.3	123-159
D15S195	VIC	75	15q21.3	145-154
D15S643	VIC	85	15q21.3	195-223
D15S644	VIC	74	15q22.2	203-204

3.11. Detecció dels productes d'amplificació per electroforesi capil·lar en analitzador genètic

La detecció dels productes d'amplificació s'ha realitzat mitjançant l'analitzador genètic ABI 3130XL *Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems), que fa servir l'electroforesi capil·lar per a l'anàlisi de fragments. Cada capil·lar (16 en total) és obert i omplert amb *Performance Optimized Polymer* (POP), la matriu a través de la qual migren els fragments d'ADN (i altres molècules amb càrrega negativa) atrets per un elèctrode càtode de platí que hi ha al final de cada capil·lar. Quan s'aplica el corrent els fragments d'ADN són atrets a través del capil·lar i viatgen pel polímer cap a la finestra de detecció. A mesura que els fragments passen a través de l'àrea clara del capil·lar, els fluorocroms són excitats per un làser i la longitud d'ona que emeten (diferent en cada un) es detecta i enregistra amb una càmera CCD. L'ABI 3130XL pot detectar fins a 5 fluorocroms diferents, propietat que li confereix la possibilitat de detectar un elevat nombre de fragments d'ADN de mida similar.

La detecció mitjançant el *Genetic Analyzer* ABI 3130XL permet un anàlisi molt sensible, fins al punt de detectar els al·lels fetals en plasma matern i discriminant, si n'hi hagués, la possible contaminació de la mostra. Per a dur a terme la detecció es prepara una mescla de 1,6 µL del producte fluorescent de la PCR, 15 µL de formamida i 0,5 µL d'indicador de pes molecular *GeneScan 500 LIZ* (*PE Applied Biosystems*) i es desnatura durant 5 min a 95 °C.

La mostra desnaturaada es sotmet a electroforesis capil·lar utilitzant *Performance Optimised Polymer 7*. Les dades s'analitzen mitjançant el programa *GeneMapper 3.7* d'*Applied Biosystems*.

4. RESULTATS

4.1. Estudi de la metilació de les seqüències promotores seleccionades

4.1.1. Seqüències promotores en el cromosoma 18

A partir dels 480 gens descrits en el cromosoma 18 al *Nacional Center for Biotechnology Information* s'han estudiat els promotors gènics de 43 gens amb expressió diferencial entre placenta i sang perifèrica (Taula 19).

Taula 19. Resultats de metilació de les regions del cromosoma 18 en placenta i sang materna.

Primer	Gen	Cromosoma	Mida (pb)	Enzim	Resultat
1	<i>USP14</i>	18	257	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
2	<i>CETN1</i>		298	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
3	<i>YES1</i>		227	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
4	<i>EMILIN2</i>		251	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
5			201	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
6			294	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
7	<i>TGIF</i>		278	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
8	<i>LAMA1</i>		302	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
9			287	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
10	<i>PTPRM</i>		265	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
11			234	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
12			283	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
13			249	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
14			311	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
15			243	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
16	<i>PPP4R1</i>		236	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
17			274	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
18	<i>VAPA</i>		288	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
19			246	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
20	<i>GNAL</i>		269	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
21			256	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
22			239	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
23	<i>CIDEA</i>		228	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
24	<i>RNMT</i>		253	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
25	<i>COLEC12</i>		284	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
26			336	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
27			280	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
28	<i>ADCYAP1</i>		203	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
29			245	<i>HpaII</i>	CVS met, WB unmet
30			276	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
31			285	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
32			247	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
33	<i>LPIN2</i>		307	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
34			248	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet

Resultats

Primer	Gen	Cromosoma	Mida (pb)	Enzim	Resultat
35			294	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
36			238	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
37	<i>MRCL3</i>		255	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
38	<i>DLGAP1</i>		282	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
39	<i>SERPINB8</i>		311	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
40	<i>ZFP161</i>		236	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
41	<i>NDUFV2</i>		318	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
42	<i>TWSG1</i>		293	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
43			254	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
44			273	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
45	<i>RALBP1</i>		324	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
46			249	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
47			203	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
48	<i>RAB31</i>		256	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
49			191	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
50			248	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
51	<i>APCDD1</i>		274	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
52	<i>NAPG</i>		243	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
53	<i>MPPE1</i>		327	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
54			299	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
55	<i>IMPA2</i>		328	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
56			264	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
57			226	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
58	<i>AFG3L2</i>		294	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
59			308	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
60	<i>CTDP1</i>		346	<i>Maell</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
61			295	<i>Maell</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
62			352	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
63			440	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
64			396	<i>HpaII</i>	CVS hypomet, WB hypermet
				<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB hypermet
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB hypermet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB hypermet
65			510	<i>HpaII</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
66			448	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
67	<i>KIAA1012</i>	18	593	<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB met

<i>Primer</i>	<i>Gen</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Mida (pb)</i>	<i>Enzim</i>	<i>Resultat</i>
68			425	<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
69			410	<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
71			445	<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
72			493	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
73			401	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
74	<i>MALT1</i>	18	341	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
77			490	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB hypomet
78	<i>MAPK4</i>	18	187	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS met, WB met
82			430	<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
83			382	<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB met
84	<i>MAPRE2</i>	18	245	<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
85			227	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
86			417	<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
87			500	<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
88	<i>NARS</i>		394	<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
89			533	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB hypomet
90			398	<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet

Resultats

<i>Primer</i>	<i>Gen</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Mida (pb)</i>	<i>Enzim</i>	<i>Resultat</i>
91			525	<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
93	<i>PSTPIP2</i>	18	450	<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB hypomet
94			303	<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
95			356	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB met
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
96			375	<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB unmet
97			386	<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
98			404	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
102	<i>ROCK1</i>	18	155	<i>Acil</i>	CVS met, WB met
103				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
104				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS hypomet, WB met
	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet			
106			275	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet
107			213	<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
108			238	<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
109			316	<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
110	<i>ABHD3</i>	18	290	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB met
115			307	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
116			427	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet

<i>Primer</i>	<i>Gen</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Mida (pb)</i>	<i>Enzim</i>	<i>Resultat</i>
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
117	<i>MBD2</i>	18	322	<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS met, WB met
118			287	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB met
120			475	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS hypomet, WB met
121			276	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB hypomet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB hypomet
122	<i>PIK3C3</i>	18	212	<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS met, WB met
123			451	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
124			352	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
125			309	<i>Hpall</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Maell</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS hypomet, WB met
126	<i>RNF138</i>	18	296	<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS met, WB met
127			314	<i>Hpall</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS met, WB met
				<i>Cfol</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
				<i>TOTS</i>	CVS hypomet, WB met
128			273	<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
129			331	<i>Hpall</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Cfol</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>TOTS</i>	CVS unmet, WB unmet
132			382	<i>Hpall</i>	CVS met, WB met

Resultats

Primer	Gen	Cromosoma	Mida (pb)	Enzim	Resultat
133	ME2	18	338	Maell	CVS met, WB met
				Cfol	CVS met, WB met
				Acil	CVS met, WB met
				TOTS	CVS unmet, WB met
				Hpall	CVS met, WB met
134			239	Cfol	CVS met, WB met
				Acil	CVS met, WB met
				TOTS	CVS hypomet, WB met
				Hpall	CVS hypomet, WB hypomet
				Cfol	CVS unmet, WB hypomet
138			432	Acil	CVS unmet, WB unmet
				TOTS	CVS unmet, WB unmet
				Maell	CVS hypomet, WB hypomet
				Cfol	CVS hypomet, WB hypomet
				TOTS	CVS unmet, WB unmet
140			428	Maell	CVS unmet, WB unmet
				Acil	CVS hypomet, WB met
				TOTS	CVS unmet, WB unmet
142			328	Hpall	CVS hypomet, WB met
				Maell	CVS unmet, WB met
				TOTS	CVS unmet, WB met
143			456	Maell	CVS hypomet, WB met
				Cfol	CVS met, WB met
				TOTS	CVS unmet, WB met

CVS met, vellositat corial metilada; CVS unmet, vellositat corial no metilada; CVS hypomet, vellositat corial hipometilada; WB met, sang metilada; WB unmet, sang no metilada; WB hypomet, sang hipometilada; WB hypermet, sang hipermetilada.

En 7 de les 143 seqüències estudiades s'ha trobat diferència d'amplificació i, per tant, possibles patrons de metilació diferencial entre vellositat corial i sang total: 18-29, 18-94, 18-110, 18-118, 18-132, 18-142 i 18-143 (Taula 20).

Taula 20. Seqüències amb diferències de metilació de les regions del cromosoma 18 en placenta i sang materna.

Primer	Gen	Cr.	Mida (pb)	Enzim	Resultat	Aplicació clínica
29	ADCYAP1	18	245	Hpall	CVS met, WB unmet	Assaig restricció
94	PSTPIP2	18	303	TOTS	CVS unmet, WB met	Bisulfit
110	ABHD3	18	290	TOTS	CVS unmet, WB met	Bisulfit
118	MBD2	18	287	TOTS	CVS unmet, WB met	Bisulfit
132	RNF138	18	382	TOTS	CVS unmet, WB met	Bisulfit
142	ME2	18	328	Maell	CVS unmet, WB met	Bisulfit
			328	TOTS	CVS unmet, WB met	Bisulfit
143	ME2	18	456	Maell	CVS hypomet, WB met	Bisulfit
			456	TOTS	CVS unmet, WB met	Bisulfit

CVS met, vellositat corial metilada; CVS unmet, vellositat corial no metilada; CVS hypomet, vellositat corial hipometilada; WB met, sang metilada; WB unmet, sang no metilada.

Les seqüències 18-94, 18-110, 18-118, 18-132, 18-142 i 18-143 presenten un patró d'hipometilació en vellositats corials i hipermetilació en sang, que és l'oposat al desitjable en el present estudi ja que la possibilitat del seu ús en plasma matern requereix la conversió mitjançant bisulfit sòdic (Fig. 17).

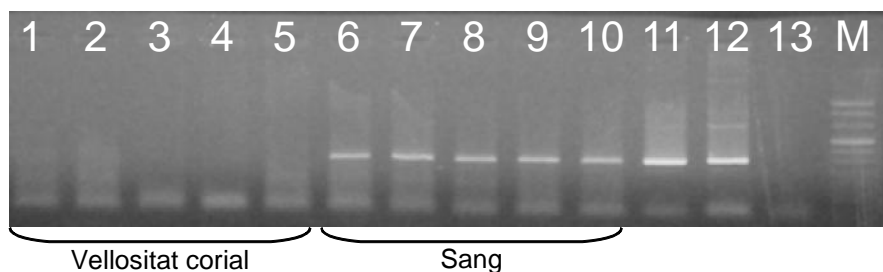


Figura 17. Anàlisi de la seqüència 18-94 amb enzims de restricció sensibles a metilació. Carril 1 a 5, ADNs de vellositat corial digerides amb *HpaII*, *MaeII* i *AclI*. La hipometilació de la seqüència resulta en digestió completa impossibilitant l'amplificació per PCR. Carril 6 a 10, ADNs de sang digerits amb *HpaII*, *MaeII* i *AclI*. S'observa amplificació en totes les mostres resultat de la hipermetilació de la regió, que protegeix de la digestió enzimàtica. Carril 11 i 12, ADNs de vellositat corial i sang sense digerir, respectivament. Carril 13, NTC, Control sense mostra; M, marcador de pes molecular.

La seqüència 18-29 és la única hipermetilada en vellositat corial i hipometilada en sang (Fig. 18) i la única amb possibilitats d'aplicabilitat en plasma matern com a marcador universal d'ADN fetal.

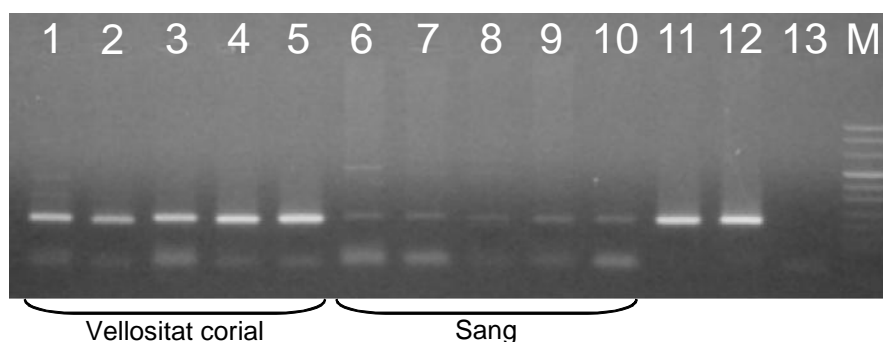


Figura 18. Anàlisi de la seqüència 18-29 amb enzims de restricció sensibles a metilació. Carril 1 a 5, ADNs de vellositat corial digerits amb *HpaII*. La hipermetilació de la citosina de la diana de restricció evita la digestió enzimàtica i permet l'amplificació de la regió mitjançant PCR. Carril 6 a 10, ADNs de sang digerits amb *HpaII*. Les regions CpG no metilades són sensibles a la digestió reduint l'eficiència d'amplificació de la seqüència. Carril 11 i 12, ADNs control sense digerir de vellositat corial i sang, respectivament. Carril 13, NTC Control sense mostra. M, marcador de pes molecular.

En ampliar l'estudi de la seqüència 18-29 (Fig. 19) els nous *primers* de la regió 18-29.1 i 18-29.2 van mostrar un patró compatible amb digestió parcial de les mostres d'ADN o metilació residual. La primera opció ha quedat descartada en extremer les condicions de digestió, augmentant la concentració d'enzim fins a 4 vegades i el temps d'incubació de 2 hores a 65 hores.

La seqüència amplificada amb hipotètica diferència de metilació, M29, no ha resultat ser-ho.

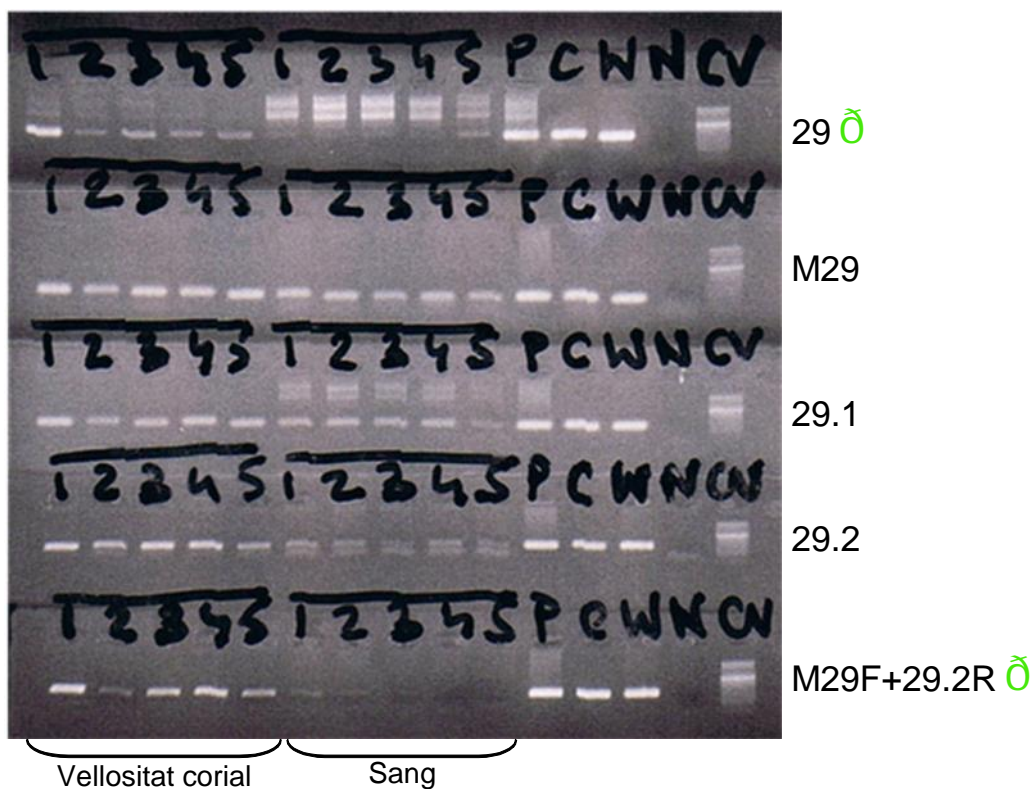


Figura 19. Resultats de les amplificacions dels nous jocs de *primers* dissenyats a la regió 18-29. Els *primers* 5 carrils, ADNs de vellositats corial digerits amb *HpaII*. Els següents 5 carrils, ADNs de sang digerits també amb *HpaII*. P, placenta; C, vellositat corial; W, sang; N, Control sense mostra; CV, marcador de pes molecular.

Els resultats obtinguts de l'estudi de la regió 18-29 en el cromosoma 18 (Taula 21) mostren que només hi ha una única seqüència amb diferència de metilació amb possibilitats per l'aplicabilitat en plasma (18-29). Donat que aquesta seqüència té una mida superior a la dels fragments d'ADN fetal lliure és, per tant, massa gran com per prosseguir amb la seva optimització.

Taula 21. Resultats de l'estudi de la regió 18-29 en el cromosoma 18.

<i>Primer</i>	<i>Gen</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Mida (pb)</i>	<i>Enzim</i>	<i>Resultat</i>
29	ADCYAP1	18	245	HpaII	CVS met, WB unmet
				<i>CfoI</i>	CVS hypomet, WB hypomet
M29			97	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>CfoI</i>	CVS met, WB met
29.1			101	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>CfoI</i>	CVS met, WB met
29.2			152	<i>HpaII</i>	CVS met, WB hypomet
				<i>CfoI</i>	CVS met, WB met
M29F/29.2R			191	<i>HpaII</i>	CVS met, WB hypomet
				<i>CfoI</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>TOTS</i>	CVS hypomet, WB hypomet

En groc s'indica la seqüència amb metilació diferencial. CVS met, vellositat corial metilada; CVS hypomet, vellositat corial hipometilada; WB met, sang metilada; WB hypomet, sang hipometilada; WB unmet, sang no metilada.

En 23 dels 143 parells de *primers* dissenyats no ha estat possible aconseguir amplificació suficient per obtenir un resultat satisfactori.

4.1.2. Seqüències promotores resultants d'arrays de metilació (MeDIP on CHIP)

Els experiments de MeDIP Microarray realitzats al *Wellcome Trust Sanger Institute* han permès seleccionar 5 regions al cromosoma 18. Els resultats de l'anàlisi de metilació d'aquestes 5 regions seleccionades es mostren a la Taula 22.

Taula 22. Resultats de l'anàlisi de metilació obtinguts de l'estudi de les seqüències.

Primer	Cromosoma	Mida (pb)	Enzim	Resultat
<i>Regions hipermetilades en PL i hipometilades en WB</i>				
2.1	18	251	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
			<i>Maell</i>	CVS met, WB met
2.2		76	<i>Maell</i>	CVS met, WB met
2.3		128	<i>CfoI</i>	CVS met, WB met
2.4		472	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
			<i>Acil</i>	CVS met, WB met
<i>Regions hipometilades en PL i hipermetilades en WB</i>				
3.1		248	<i>HpaII</i>	CVS hypomet, WB met
			<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB met
			<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
4.1		326	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB met
4.2		310	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB met
			<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
4.3		315	<i>HpaII</i>	CVS hypomet, WB met
			<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB met
4.4		270	<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB met
			<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met

En groc s'indica la seqüència amb metilació diferencial. CVS met, vellositat corial metilada; CVS hypomet, vellositat corial hipometilada; WB met, sang metilada.

Les regions 3 i 4 s'han confirmat amb diferents jocs de *primers* com a hipometilades en vellositat corial i hipermetilades en sang total. En ambdues regions és essencial el disseny dels *primers* ja que les diferències no són detectables amb totes les seqüències. Només en dos dels *primers* d'una de les regions, 4.1 i 4.2, s'han obtingut resultats amb claredat suficient de metilació en sang i no metilació en placenta.

En la regió 2 no s'ha trobat diferència de l'estat de metilació en cap de les 10 mostres analitzades.

4.1.3. Seqüències promotores en tots els cromosomes segons perfils d'expressió

En la recerca en les bases de dades d'expressió gènica s'han localitzat 4 gens amb patrons de metilació diferencial entre placenta i sang total, que estan ubicats en els cromosomes 1, 9 i 12. S'han dissenyat un total de 19 parells de *primers* per a que incloguin el màxim de regions CpG possibles; en 5 parells de *primers* no ha estat possible aconseguir amplificació suficient per obtenir un resultat satisfactori (Taula 23).

Taula 23. Resultats del *screening* per expressió en tot el genoma.

<i>Primer</i>	Gen	Cr.	Mida (pb)	Enzim	Resultat
200	<i>CDKN1b</i>	12	361	<i>HpaII</i>	CVS met, WB unmet
201			314	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB hypomet
202			252	<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
204			199	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>CfoI</i>	CVS hypomet, WB hypomet
205	<i>CDKN2A</i>	9	367	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS met, WB met
				<i>CfoI</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
206			327	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>CfoI</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
207			392	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
210			477	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
211			393	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Maell</i>	CVS unmet, WB met
				<i>CfoI</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>Acil</i>	CVS unmet, WB unmet
212			179	<i>HpaII</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>CfoI</i>	CVS hypomet, WB hypomet
				<i>Acil</i>	CVS met, WB met
213			145	<i>HpaII</i>	CVS hypomet, WB met
				<i>CfoI</i>	CVS unmet, WB unmet
				<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
214	<i>CDKN2C</i>	1	102	<i>Acil</i>	CVS hypomet, WB met
217			398	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>Maell</i>	CVS hypomet, WB met

Resultats

Primer	Gen	Cr.	Mida (pb)	Enzim	Resultat
218			149	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
				<i>CfoI</i>	CVS met, WB met
				<i>AclI</i>	CVS met, WB met

En groc s'indica la seqüència amb metilació diferencial. CVS met, vellositat corial metilada; CVS unmet, vellositat corial no metilada; CVS hypomet, vellositat corial hipometilada; WB met, sang metilada; WB unmet, sang no metilada; WB hypomet, sang hipometilada

De les 19 regions estudiades, la seqüència 9-211 ha resultat amb notable diferència de metilació, hipometilada en vellositats corials i hipermetilada en sang, però el patró ha estat l'oposat al desitjable per a l'aplicació en plasma matern.

En canvi, la seqüència 12-200 ha mostrat un fort patró de metilació diferencial entre vellositat corial i sang aplicable a plasma matern tot i contenir només dues dianes de restricció: l'amplificació s'ha detectat només en la vellositat corial digerida, indicant hipermetilació en mostres de vellositats corials i no metilació en sang (Fig. 20).

La seva anàlisi més detallada amb *primers* i sonda específics per a Real Time PCR es mostra més endavant (apartat 4.2).

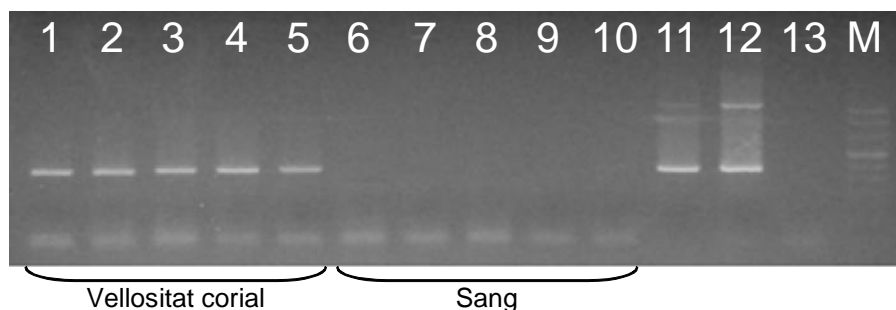


Figura 20. Assaig de restricció sensible a metilació per a la seqüència 12-200. Carril 1 al 5, ADNs de vellositat corial digerits amb *HpaII*. L'amplificació en totes les mostres indica hipermetilació de la seqüència. Carril 6 al 10, ADNs de sang digerits amb *HpaII*. La manca d'amplificació en totes les mostres (digestió complerta) denota hipometilació de la seqüència en ambdues dianes de restricció. Carril 11 i 12, ADNs de vellositat corial i sang sense digerir, respectivament. Carril 13, NTC, Control sense mostra; M, Marcador de pes molecular.

En l'ampliació de l'estudi de la regió 12-200 cap de les noves regions amplificades de menor mida han mostrat el fort patró diferencial reflectit en l'*amplicon* sencer (Taula 24).

Taula 24. Resultats de l'ampliació de l'estudi de la regió 12-200 en el cromosoma 12.

Primer	Gen	Cr.	Mida (pb)	Enzim	Resultat
200.1	CDKN1b	12	90	<i>HpaII</i>	CVS met, WB met
200.2			94	<i>HpaII</i>	CVS hypomet, WB hypomet
200.1F-200.2R			396	<i>HpaII</i>	CVS met, WB hypomet

CVS met, vellositat corial metilada; CVS hypomet, vellositat corial hipometilada; WB met, sang metilada; WB hypomet, sang hipometilada

4.2. PCR a Temps Real de les seqüències candidates

En 10 ADNs de vellositats corials i 10 ADNs de sang digerits amb enzims de restricció sensibles a metilació s'ha detectat amplificació en les vellositats corials i cap traça d'amplificació en les sangs (Fig. 21).

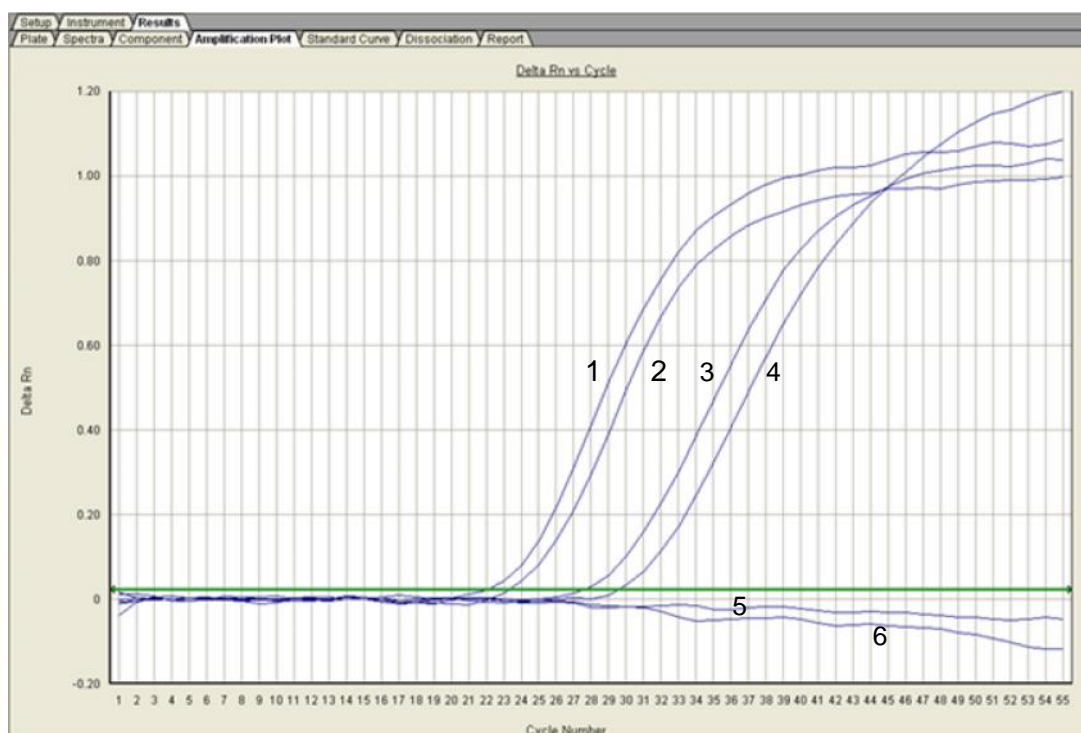


Figura 21. Amplificació mitjançant PCR a Temps Real de la seqüència 12-200. Línies 1 i 2, ADNs de vellositat corial i sang sense digerir. Línies 3 i 4, ADNs de vellositat corial digerits amb *HpaII*. L'amplificació en aquestes mostres indica hipermetilació de la seqüència que impossibilita la digestió enzimàtica. Línies 5 i 6, ADNs de sang total digerits amb *HpaII*. La mostra no s'amplifica perquè es digereixen les dianes de restricció no metilades.

Sorprenentment i malgrat la presència d'únicament dues dianes de restricció per *HpaII*, només s'han obtingut resultats clars i satisfactoris amb la digestió enzimàtica múltiple de la seqüència 12-200 (*HpaII*, *MaeII*, *CfoI* i *AclI*): amplificació dels ADN de vellositat corial digerits i no amplificació dels ADN de sang total digerits, permetent així discriminar ADN fetal i matern.

Les digestions exclusivament amb *HpaII* no han estat suficient per discriminar de manera clara entre vellositats corials i sang total, ja que sempre hi ha hagut amplificació residual de la darrera. Malauradament, l'exploració de 12-200 en plasma matern no ha estat productiva en termes d'una futura aplicació com a marcador universal d'ADN fetal ja que no ha estat possible reproduir aquests resultats i aconseguir amplificació d'ADN fetal en 7 plasmes materns on la presència d'ADN fetal havia estat prèviament comprovada mitjançant amplificació de SRY.

4.3. Avaluació del gen *RASSF1A* com marcador universal

La utilitat del gen *RASSF1A* com a marcador fetal universal en rutina de diagnòstic prenatal no invasiu seria possible si, prèvia restricció sensible a metilació, només s'observa amplificació en plasma matern.

En teixit fetal (vellositats corials) el *RASSF1A* presenta amplificació amb un Ct (primer cicle a partir del qual hi ha amplificació exponencial) similar abans i després de la digestió, tal i com s'espera. En canvi, en sang total després de la digestió amb l'enzim *BstUI* es segueix detectant amplificació tot i que amb una diferència de 10 Ct com a mínim. En plasma de dones no gestants s'han observat resultats similars als de sang, on la diferència entre ADN digerit i no digerit són comparables. En plasma de gestants es detecta

amplificació post-digestió amb una diferència d'aproximadament 5 Ct respecte a l'ADN sense digerir (Fig. 22).

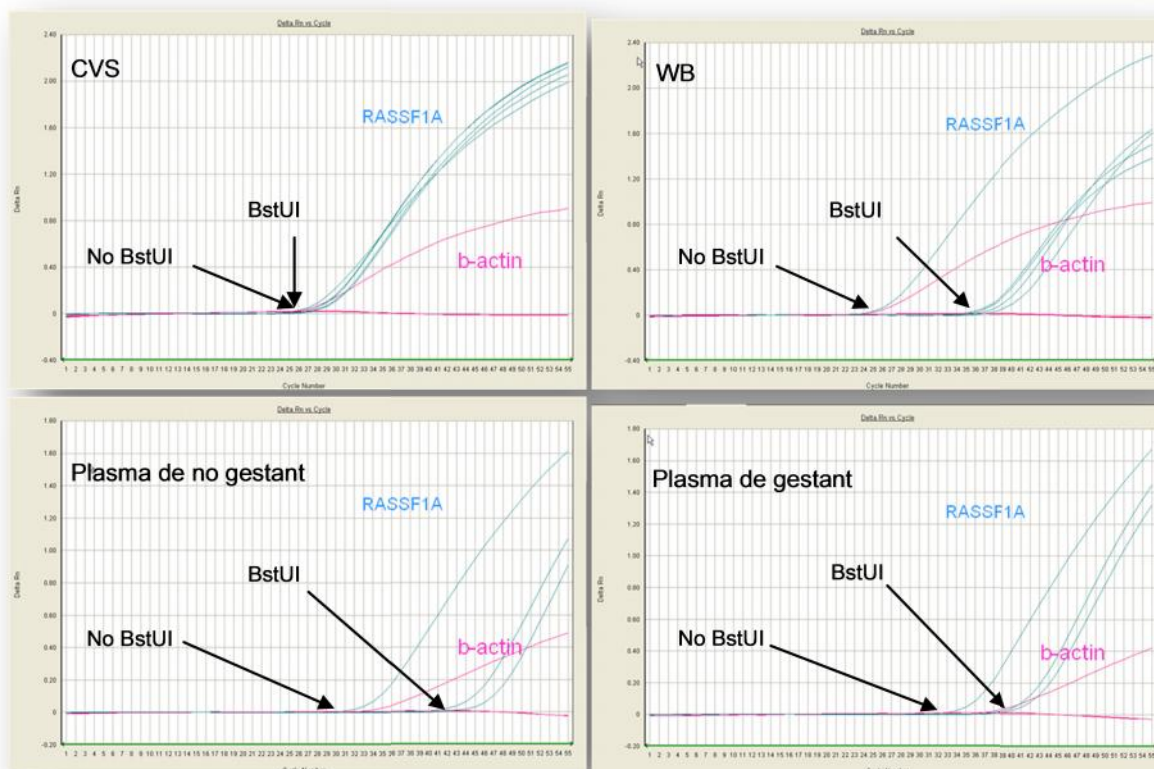


Figura 22. PCR a Temps Real de *RASSF1A* (en blau) i *-actina* (en rosa). Corbes d'amplificació de l'avaluació de *RASSF1A*. Ambdues seqüències són presents abans de la digestió amb *BstUI*. Després de la digestió, *RASSF1A* encara és detectable en plasma de no gestant tot i la manca d'amplificació de *-actina*, indicant la digestió completa de la seqüència.

Després d'optimitzar l'assaig s'observa una diferència clara de 5 Ct entre plasma de gestant i de no gestant fins i tot en tots els casos on la *-actina* concorda amb digestió completa de l'ADN. La presència d'amplificació residual en plasma de no gestant dificulta l'aplicació d'aquest protocol per a la detecció clara i inequívoca de l'ADN fetal lliure en plasma matern, especialment en casos on és present en proporció més baixa.

4.4. Selecció de marcadors polimòrfics

Dels 2.824 marcadors polimòrfics trobats a les bases de dades s'han seleccionat 1.470 marcadors al llarg de tots els cromosomes d'acord amb els criteris de selecció de microsatèl·lits esmentats anteriorment en quant a mida, heterozigositat, posició i tipus (Fig. 23 i Annex).

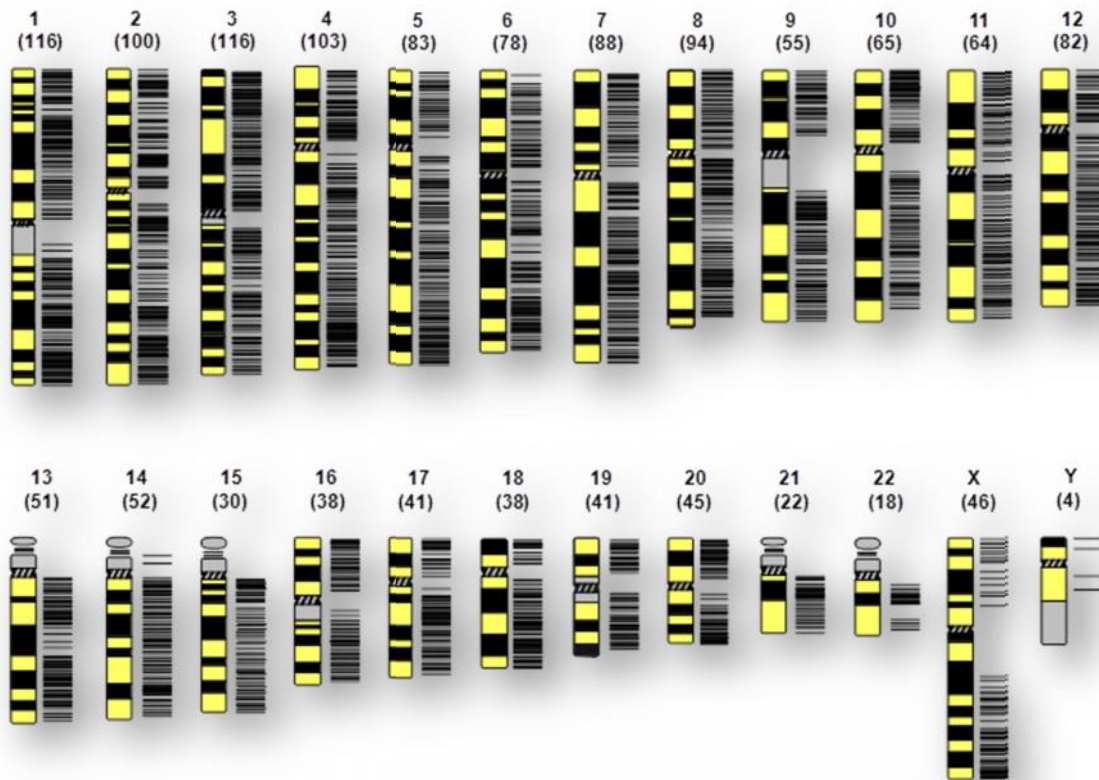


Figura 23. Idiograma dels cromosomes humans on es representen els microsatèl·lits que s'ajusten als criteris de selecció i la seva localització (línia horitzontal a la dreta de cada cromosoma). A sota del nom de cada cromosoma s'indiquen el nombre de marcadors seleccionats en cada cromosoma que compleixen els criteris establerts.

La idoneïtat d'aquests STR és teòrica, ja que la seva informativitat en termes d'heterozigositat ha de ser avaluada en cada família. No obstant, la disponibilitat d'una base de dades de seqüències específiques potencialment utilitzables en plasma permet una ràpida selecció de marcadors en regions específiques en tots els cromosomes.

4.5. PCR múltiplex fluorescent

4.5.1. Famílies on el pare és portador equilibrat d'una translocació i descendència amb translocació desequilibrada

) **Família 1 amb pare portador de la t(4;11)(p15.1;q23.3).** Els resultats de la PCR múltiplex fluorescent (Taula 25) mostren que, en aquesta família, són informatius 2 dels 5 STR localitzats a la regió amb trisomia parcial detectada en la filla (D4S2639, D4S1643) i el STR localitzat fora d'ella (D4S1627) (Fig. 24 i 25).

Taula 25. Resultats de la PCR múltiplex fluorescent de la Família 1 on es detallen els al·lels presents en cada un dels individus segons el marcador a què corresponen.

Fluorocrom	6-Fam	VIC	NED	PET	6-Fam	VIC
Rang	120-140	142-181	159-195	177-201	181-190	177-201
Marcador	D4S2366	D4S1511	D4S2639	D4S1533	D4S1643	D4S1627
Mare	122-134	152-181	163-191	185-189	190	181-189
Pare	118-122	181	163-183	185-189	182-186	184-200
Filla amb translocació deseq.	118-122	181	163-183-191	185-189	182-186-190	181-200

En groc els STR que són informatius

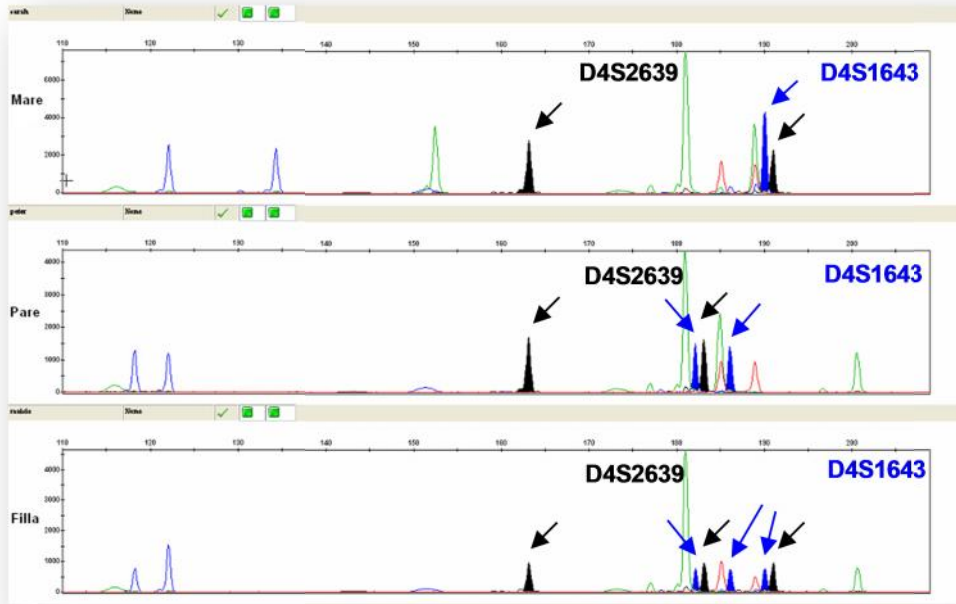


Figura 24. Electroforetograma de la PCR múltiplex fluorescent de la Família 1. La trisomia parcial de la filla es detecta observant patrons dial·lèlics amb doble dosi d'un al·lel respecte l'altre, o bé per la presència de patrons tri·lèlics en els marcadors seleccionats que, en aquest cas, serien els informatius (indicats amb fletxes).

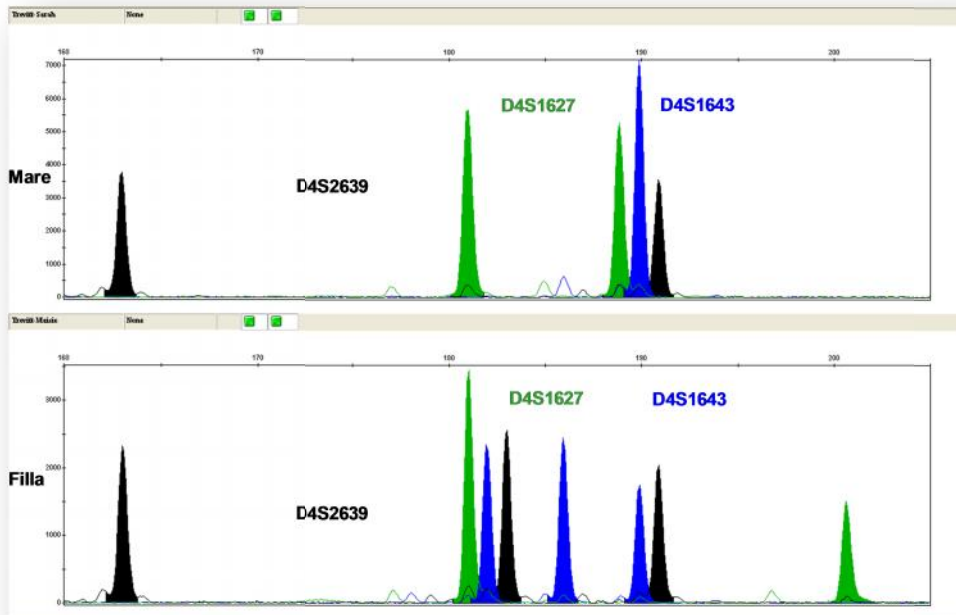


Figura 25. Electroforetograma de la PCR múltiplex fluorescent dels marcadors informatius de la Família 1 on es detecta la trisomia parcial de la filla.

En realitzar la PCR múltiplex fluorescent dels marcadors informatius amb l'ADN de la filla diluït en l'ADN matern en dilucions de fins a 2,5:100, s'han seguit detectant els al·lels resultants de la trisomia parcial de la filla (Fig. 26) així com també l'al·lel d'origen patern del marcador informatiu D4S1627 (Fig. 27).

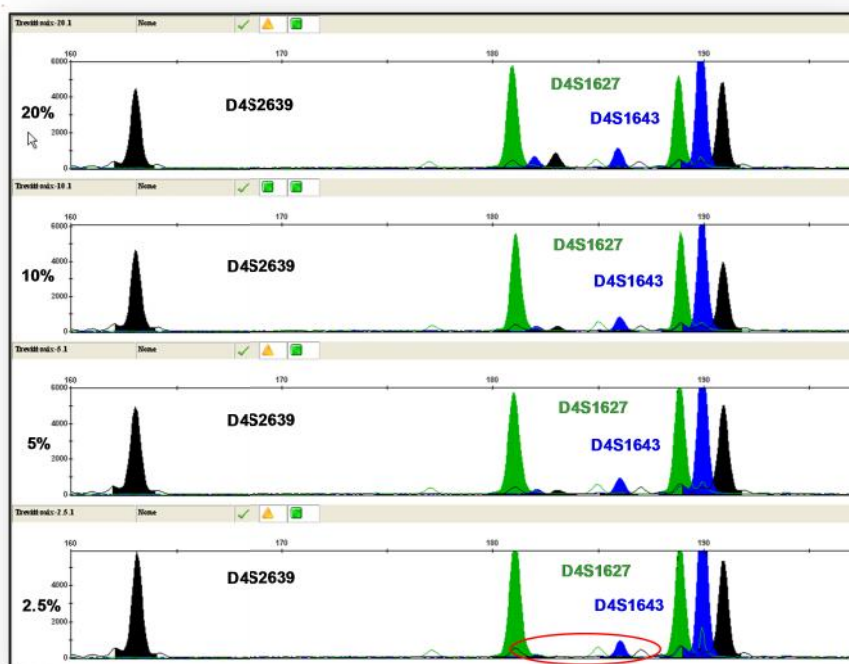


Figura 26. Electroforetograma de la PCR múltiplex fluorescent dels marcadors informatius de la Família 1 amb dilucions d'ADN de la filla en ADN de la mare. En la dilució 2,5% es segueixen detectant els al·lels de la filla, encerclats en vermell.

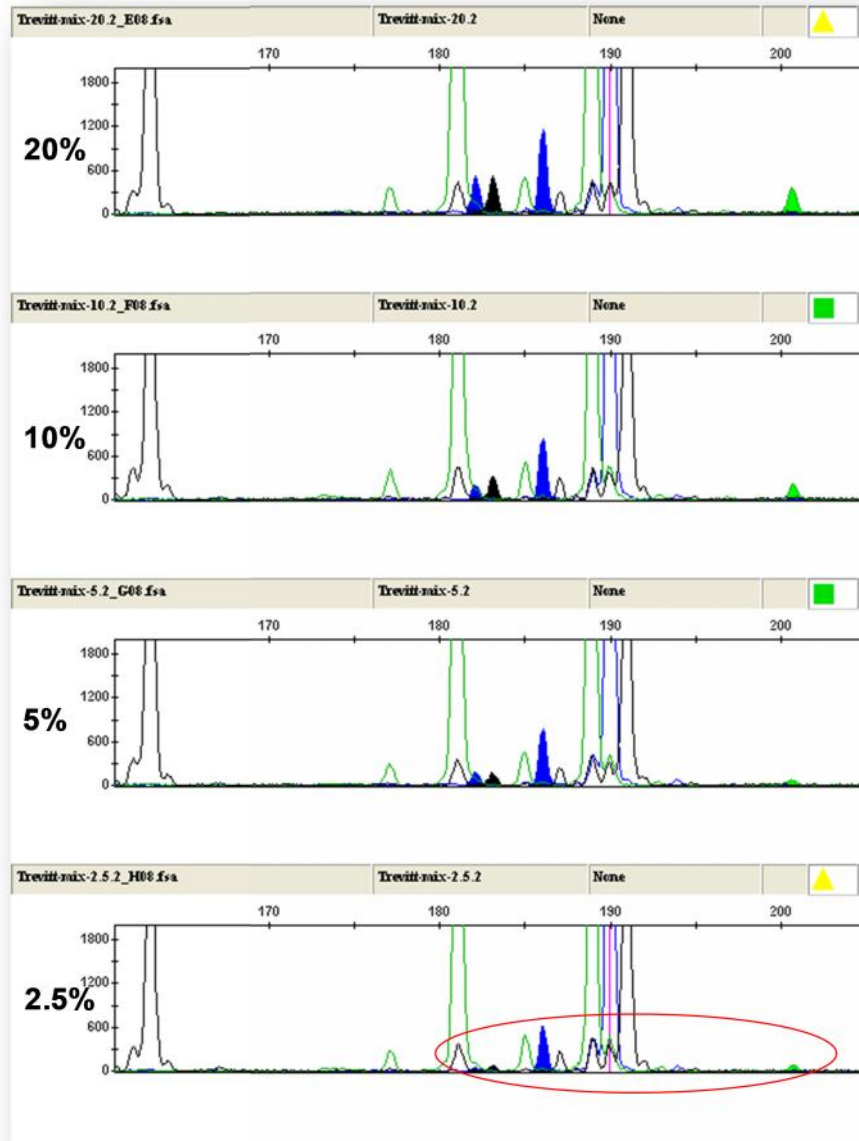


Figura 27. Electroforetograma de la PCR múltiplex fluorescent dels marcadors informatius de la Família 1 amb dilucions d'ADN de la filla en ADN de la mare. En color i encerclats en vermell s'indiquen els al·lels de la filla de procedència paterna que són detectats a la dilució del 2.5%.

) **Família 2 amb pare portador de $t(10;18)(q24;p11.31$ or $p11.32$).** Segons els resultats de la PCR múltiplex fluorescent en aquesta família (Taula 26) i amb els al·lels heretats en el fill afectat amb la translocació desequilibrada, només dos dels 6 STR (5 a la regió amb trisomia i 1 fora d'ella) són informatius i/o serien útils en plasma, el D10S1434 i el D10S1425 (Fig. 28).

Taula 26. Resultats de la PCR múltiplex fluorescent de la Família on es detallen els al·lels presents en cada un dels individus segons el marcador a què corresponen.

Fluorocrom	6-Fam	NED	NED	VIC	VIC	6-Fam
Rang	157-185	149-150	213-245	168-184	121-137	93-121
Marcador	D10S1432	D10S1434	D10S1246	D10S1425	D10S1236	D10S1213
Mare	170-174	156-168	223-227	168-180	124-128	111-119
Pare	170-174	160-164	219-227	176-184	132	119-123
Fill 1 amb translocació deseq.	174	156-160-164	219-227	176-180-184	128-132	119-123
Filla 2 amb translocació eq.	170	156-160	227	180-184	128-132	119-123
Fill 3 sa	174	164-168	219-223	168-176	124-132	111-119

En groc els STR que són informatius

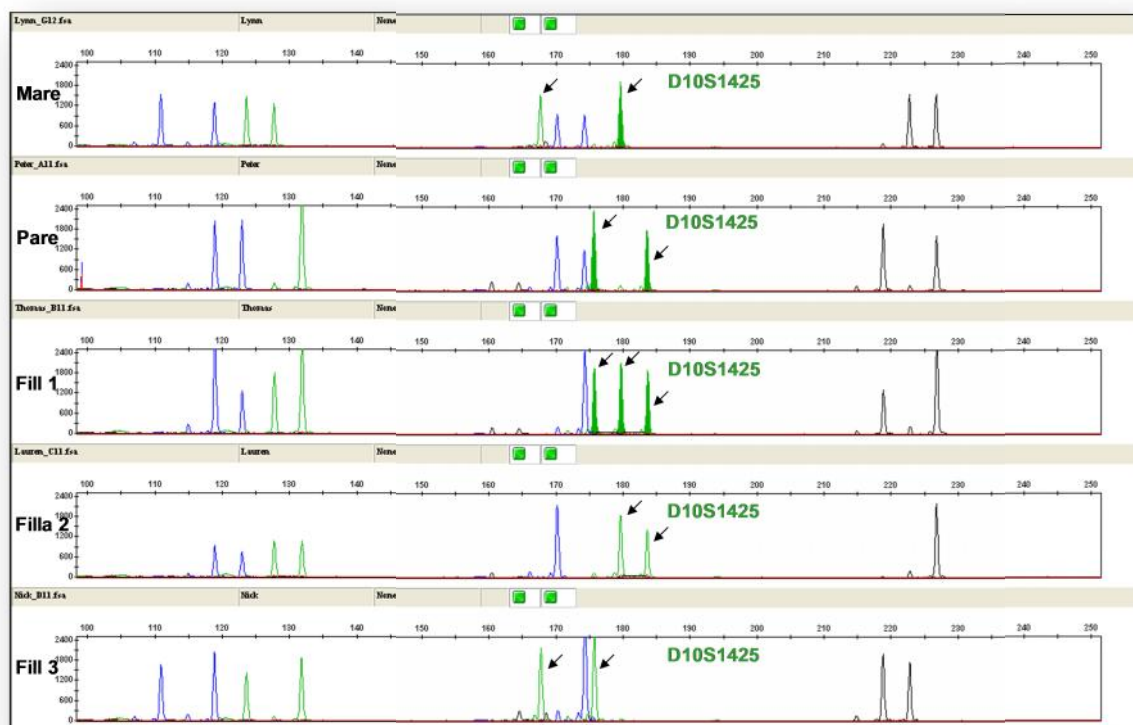


Figura 28. Electroforetograma de la PCR múltiplex fluorescent de la Família 2. La trisomia parcial del fill es detecta observant patrons dial·lèlics amb doble dosi d'un al·lel respecte l'altre, o bé per la presència de patrons tri·al·lèlics en els marcadors seleccionats (indicat amb fletxes).

En realitzar la PCR múltiplex fluorescent dels marcadors informatius amb l'ADN del fill diluït en l'ADN matern en dilucions de fins a 2,5:100 s'han seguit detectant els al·lels resultants de la trisomia parcial del fill (Fig. 29).

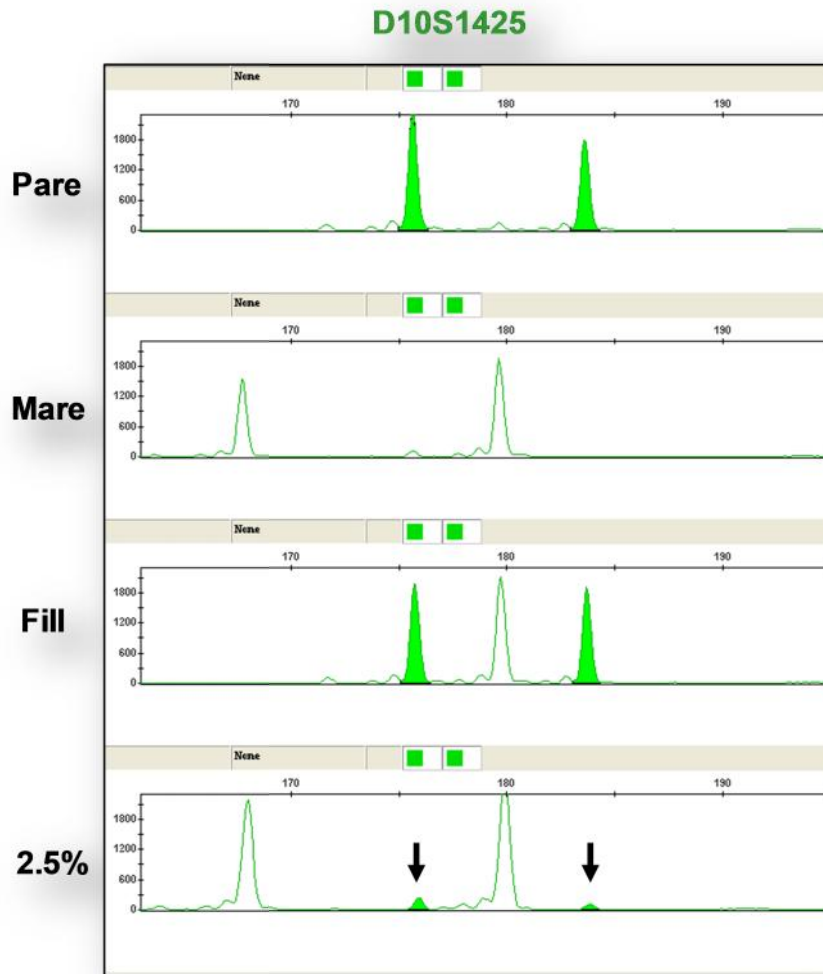


Figura 29. Electroforetograma de la PCR múltiplex fluorescent en la Família 2 amb l'ADN del pare, la mare, el fill i dilució d'ADN del fill en ADN de la mare. En la dilució 2.5% es segueixen detectant els al·lells patens del marcador D10S1425 (indicat amb fletxes).

4.5.2. Heterozigositat i informativitat dels marcadors de la Múltiplex Fluorescent Universal

L'heterozigositat dels 5 marcadors altament polimòrfics de la PCR Múltiplex Universal desenvolupada, així com la seva informativitat en les 50 parelles analitzades es mostra a la Taula 27, on també s'indica l'heterozigositat estimada de cada un dels marcadors.

Taula 27. Resultats de la Múltiplex Universal en 50 parelles. En cada marcador es descriuen els al·lels de cada individu.

Fluorocrom	6-Fam	VIC	NED	NED	PET	
Rang	91-127	177-201	159-195	207-247	177-201	
Marcador	D10S1213	D4S1627	D4S2639	D10S1246	D4S1533	totalment informatius
1XX	99-111	181-189	163	219-223	185-189	1
1XY	103-111	181-193	171	223-231	177-185	
2XX	91-107	185-193	171-183	219-223	189	1
2XY	99-103	193-201	159-171	219	185-189	
3XX	103-111	193	163-183	211-219	185-189	1
3XY	103-123	181-185	183-187	219-223	181-189	
4XX	107-119	181-193	171	227	185-193	3
4XY	107	185-189	183	219-239	185-189	
5XX	107-115	193-201	167-183	215-219	185-189	1
5XY	115-119	189-193	171-183	223-238	185-189	
6XX	107	181-189	163-183	211-223	181-185	2
6XY	107-119	181-185	159-187	223-227	189	
7XX	107-111	181	163	215-231	185-193	2
7XY	103-107	181-197	163-187	211-243	181-197	
8XX	103-107	185-197	171	223-235	193-197	2
8XY	107	193-197	163-171	219-231	181-189	
9XX	107	193-197	163	219-223	189-193	3
9XY	107	185-189	171-179	211-227	181-193	
10XX	107-123	181-189	163-179	223	177-181	3
10XY	115	181-189	163	219-235	185-193	
11XX	99-103	181-193	159-175	219-227	181-189	3
11XY	107-111	181-189	163-167	215-223	181-189	
12XX	107-115	185-193	175-183	219-223	177-189	2
12XY	103-107	181-197	163-171	223	185-189	
13XX	103-127	181-197	171-183	215-235	185-189	2
13XY	103-107	181-185	159-163	223	181-185	
14XX	107-115	185-197	171	211-243	177-197	2
14XY	115-119	185-189	175	211-223	181	
15XX	107-115	189-197	163-187	219-223	177-185	1
15XY	103-107	181-185	167-187	219	177-193	
16XX	107	181-193	163-179	215-219	181-185	2
16XY	107	181	171-183	223	177-185	
17XX	107-119	181-185	175-183	219	181-189	2
17XY	107	181-185	163	223-239	189-201	
18XX	107	181-189	167-171	223-235	189-193	3
18XY	103-107	185	163-187	219	189	
19XX	107	181-197	163-167	223-235	177-185	1
19XY	91-107	181-193	167	219-231	185-189	
20XX	107-119	181-193	167-191	211-223	177-185	4
20XY	91-123	181-197	163-171	215-219	189	
21XX	103-111	181-189	163-175	215-235	181-185	4
21XY	119	189	179-183	219-223	189-197	
22XX	111	189-196	179-183	211	193-201	2
22XY	111-115	189-193	183	227-243	185-189	
23XX	111-115	181-185	175	219	177-197	3
23XY	111-115	189	163	243	177-189	
24XX	107-111	185-201	167-175	223-227	176-193	5
24XY	99-119	193-197	163-171	219-231	181-197	
25XX	103-111	185	163-171	219-227	185-189	2
25XY	107-111	181-189	183	219-247	189-193	

Resultats

Fluorocrom	6-Fam	VIC	NED	NED	PET	
Rang	91-127	177-201	159-195	207-247	177-201	
Marcador	D10S1213	D4S1627	D4S2639	D10S1246	D4S1533	totalment informatius
26XX	103-107	189-197	167-171	219-235	185-189	2
26XY	103	181-185	175	211-219	185-189	
27XX	99-107	185	175-183	211-223	177	2
27XY	99-115	185-189	171	223-243	185	
28XX	103	185-189	179	223-231	189	5
28XY	115-119	181-193	159-167	211-239	181-185	
29XX	107-111	185-201	163-167	215-227	189	1
29XY	103-107	185-193	163-171	219-223	181-189	
30XX	103-115	181-185	159-167	223	189	3
30XY	99-107	185-197	163	219-227	185-189	
31XX	103-111	181-193	171-179	223-231	193-197	2
31XY	99-107	193-197	163-171	215	189-193	
32XX	99-103	197-201	167-171	211-231	181-189	1
32XY	99-107	197-201	171-187	223-231	185-197	
33XX	103-107	189-197	163-171	215-223	189-193	4
33XY	99-111	189	167	235-239	177-181	
34XX	107-111	189-197	163-171	215-219	177-189	2
34XY	99-115	185-197	163-167	215-219	193	
35XX	107	181-189	171-175	219	185-189	4
35XY	103-127	185-193	163-183	219-223	181	
36XX	103-111	189	171-183	219-223	185-189	1
36XY	111-119	181-185	171-183	219-243	177-189	
37XX	107-119	185-197	163-179	219-227	181-185	2
37XY	91-111	189	163	219-223	181	
38XX	103-107	181	163-183	207-211	181-185	2
38XY	91-103	189-197	163-175	223-227	181	
39XX	119	181-197	163	223	181-189	2
39XY	119	181-189	167-171	211-219	177-181	
40XX	107-111	181-193	163-175	215-223	185-189	2
40XY	103-119	185-197	163-171	223-239	177-185	
41XX	103-107	181-197	179-183	211-235	189-193	3
41XY	111-119	185	171-183	219	189-197	
42XX	107-119	181	167-183	219-227	185-189	3
42XY	107-111	193-197	163	223-231	189	
43XX	107	193-205	163-171	215-227	177-189	3
43XY	91-107	181-197	179-183	211	181-189	
44XX	107-111	185	163-175	211-219	181-185	1
44XY	107-123	181-185	163-167	231-235	185-189	
45XX	103-111	185-189	163-183	219	181-193	1
45XY	107-111	193	163	219-231	181-185	
46XX	107-111	193-197	163	219-227	185-189	3
46XY	107-123	185-201	171-183	211-243	189	
47XX	107-111	185-201	163-167	215-227	189	4
47XY	99-115	189-193	163-187	219	181	
48XX	107-115	189-193	173-183	219	193	4
48XY	103-107	181-197	103-171	211-235	185-189	
49XX	107-123	181-193	171-179	215-223	185-189	2
49XY	103-111	181-209	163-183	215-239	181-189	
50XX	111-119	189-197	163-183	223-239	181-185	2
50XY	111-115	185-193	175-183	219	185	
Heterozigositat	81	84	74	78	80	

En groc, s'indiquen els marcadors de cada parella que serien útils per detectar al·lels paterns en plasma matern.

L'heterozigositat de cada marcador ha estat superior al 74%, i el 78% dels casos analitzats han presentat com a mínim dos marcadors informatius (Taula 28).

Taula 28. Resum del número de marcadors informatius en cada parella.

Parelles	Número de parelles
1 marcador informatiu	11
2 marcadors informatius	20
3 marcadors informatius	11
4 marcadors informatius	6
5 marcadors informatius	2

4.5.3. Múltiplex Fluorescent Universal en plasma matern

S'ha avaluat la sensibilitat de la Múltiplex Fluorescent Universal en la detecció dels al·lels paterns en 12 mostres dels plasmes de gestants (Taula 29).

S'han considerat com a marcadors detectables aquells on pare i mare tenen al·lels completament diferents (marcadors informatius per a la família) i el patern no coincideix amb la mida d'un *stutter peak* d'un dels al·lels materns.

En 10 de les 12 parelles avaluades s'ha detectat, com a mínim, un dels al·lels paterns en plasma matern (Fig. 30).

Resultats

Taula 29. Resultats de la Múltiplex Universal en plasma. En cada marcador, es descriuen els al·lels de la mare, del pare i del plasma.

Fluorocrom	NED	PET	VIC	NED	6-Fam	proporció detectables
Rang	159-195	177-201	177-201	207-247	91-121	
Marcador	D4S2639	D4S1533	D4S1627	D10S1246	D10S1213	
Mare 1	179-183	189-201	189-197	219	103-107	3/3
Pare 1	183-195	181-185	181	211-219	111-119	
Plasma 1	NI (183?)	185? stutter	181	211	119	
Mare 2	159	185-189	189-193	219-227	107	4/4
Pare 2	175-183	181-185	181-201	211-219	107-111	
Plasma 2	183	181? stutter	181	211	111	
Mare 3	183-187	181-193	181-189	223-239	103-107	2/3
Pare 3	163	181-193	181-197	207-219	107-111	
Plasma 3	ND	NI	197	219? stutter	111	
Mare 4	163-191	185-189	189-193	219-243	111-115	1/1?
Pare 4	163-171	185	193-201	219-247	107	
Plasma 4	NI (163)	NI	201	NI (219?)	107? Stutter	
Mare 5	167-171	185-193	181-197	215-223	91-107	1/2?
Pare 5	159-167	189-193	193-197	235-247	107-111	
Plasma 5	NI (167?)	189? stutter	193? stutter	ND	111	
Mare 6	171-175	185	181-197	223-227	115	3/3
Pare 6	163	177-181	181-193	223	107-111	
Plasma 6	163	181? Stutter	193	NI	107	
Mare 7	167-171	177-181	185-189	219-235	107-111	3/3
Pare 7	163-187	185	189-193	211-223	107-115	
Plasma 7	163? stutter	185	193	223	NI (107?)	
Mare 8	171-179	181-189	181-189	227-235	107-115	2/2
Pare 8	163-171	181-189	185-197	219-227	99-111	
Plasma 8	NI (171?)	NI	197	NI (227?)	99	
Mare 9	163-179	189-193	185-189	219-223	99-115	3/3
Pare 9	163-183	181-185	193-197	219-239	107	
Plasma 9	NI (163?)	181	193	NI (219?)	107	
Mare 10	167-183	181-193	181-189	219-223	103-115	3/3
Pare 10	175	185	189-197	219-223	111-115	
Plasma 10	175	185	197	NI	111? stutter	
<i>Família 3</i>						
Mare Fam.3	183	189-193	189	219	91-103	0/2
Pare Fam.3	163-183	181-197	189-193	211-231	103	
Plasma Fam.3	NI (183)	ND	NI (189)	ND	NI	
CVS Fam.3	183	181-193	189	219-231	103	
<i>Família 4</i>						
Mare Fam.4	163	181-189	181-185	219-239	107-119	0/2
Pare Fam. 4	167-191	181-185	189-197	219-235	107-123	
Plasma Fam.4	ND	NI (181)	ND	235 stutter	NI (107)	
CVS Fam.4	163-191	181	185-197	219-235	107	

CVS, vellositat corial; ND, no detectat; NI, no informatiu. *Stutter*, l'al·lel coincideix amb el stutter peak d'un dels al·lels materns, pel que no és valorable la seva detecció. En groc, els marcadors de cada parella detectats en plasma matern i a la columna de la dreta, la proporció d'al·lels paterns detectats en plasma respecte als que es podrien haver detectat. Els dos darrers casos són els de la Família 3 i 4, on es disposa del resultat de la vellositat corial.

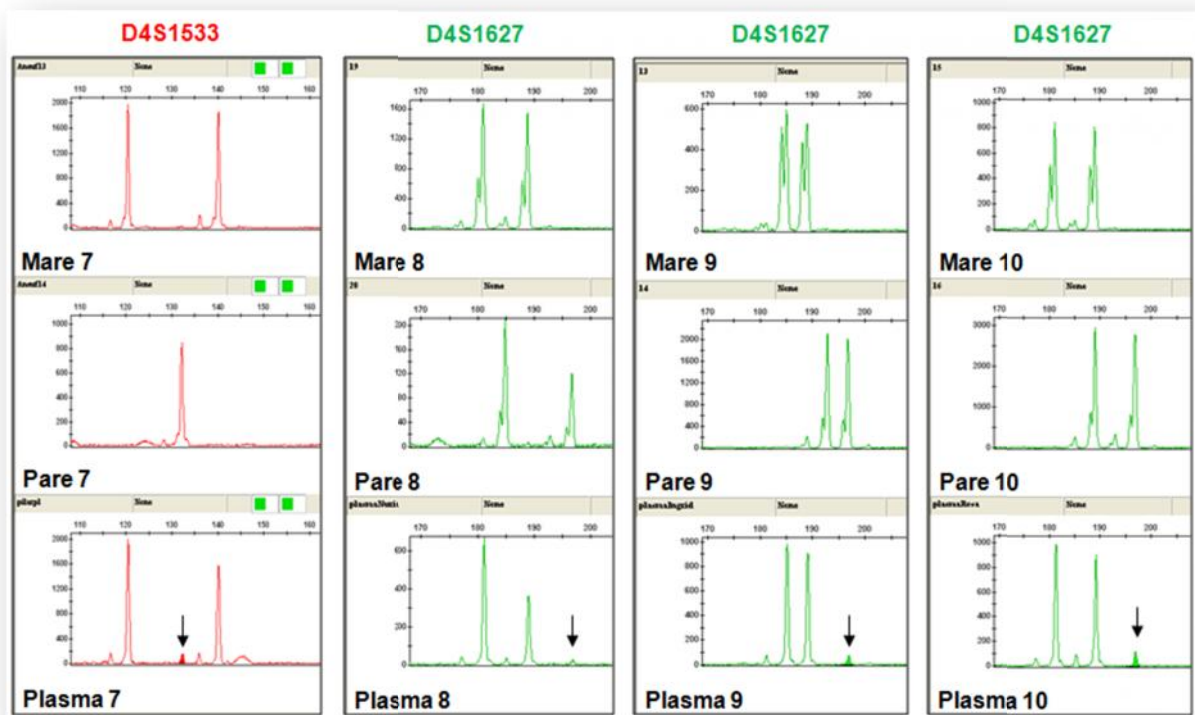
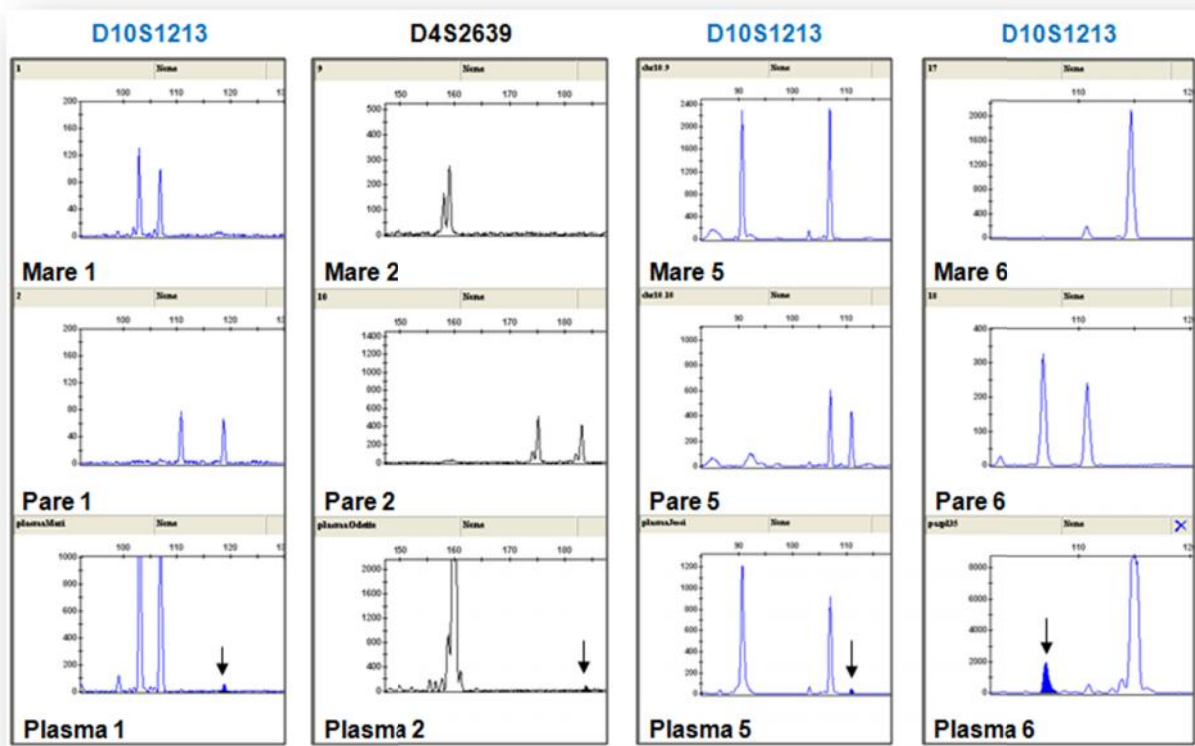


Figura 30. Exemples de la detecció d'ADN fetal en plasma mitjançant PCR Múltiplex Fluorescent Universal de marcadors polimòrfics. Els al·lels fetals d'origen patern detectats en plasma s'indiquen amb fletxes.

4.5.4. Aplicació clínica de microsatèl·lits i PCR Fluorescent

) **Família 5.** L'ADN de la mare receptora d'ovodonació es troba barrejat amb l'ADN fetal que és un 50% ADN de la mare donant i un 50% ADN patern. Els resultats de la PCR múltiplex fluorescent descarten trisomies, parcials o totals, amb patró tri-al·lèlic d'origen patern dels cromosomes 13, 18 i 21 donat que no s'ha detectat en cap cas tres al·lèls extra de cap dels marcadors en plasma matern. S'han comparat els resultats obtinguts en plasma amb els de la vellositat corial (Taula 30 i Fig. 31).

Taula 30. Resultats de l'amplificació dels marcadors analitzats a la Família 5.

Marcador	Mare	CVS	Plasma
AMXY	105	105-110	110
X22	199-228	199-228	NI
DXYS218	281-285	277-285	ND
HPRT	277-285	288	288
D21S1411	286-290	278-290	278
D21S1446	210-223	223	NI
D21S1435	176	176-180	180
D18S391	160	156-160	Stutter
D18S535	128-141	136-150	136-150
D13S631	193-197	197-208	ND
D13S258	274	236-274	236-274

En groc els al·lèls fetals susceptibles de ser detectats en plasma matern. A la columna del Plasma, els al·lèls no materns que es detecten. NI, no informatiu. ND, no detectat.

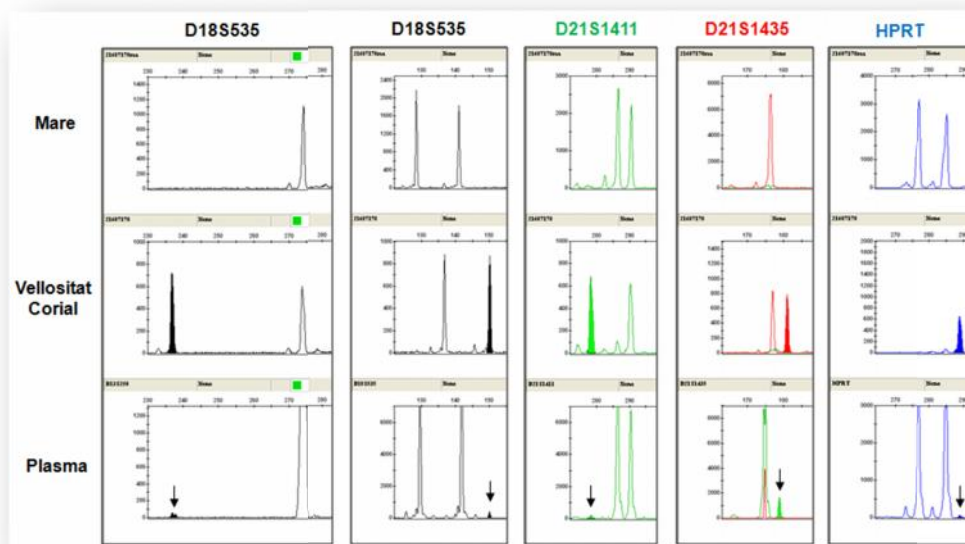


Figura 31. Electroforetoqrames dels marcadors informatius en la Família 5. Els al·lèls fetals detectats en el plasma matern s'indiquen amb fletxes. El fluorocrom utilitzat en el marcador D21S1435 en plasma difereix de l'utilitzat en la mateixa seqüència en mare i CVS.

J) **Família 6 amb Malaltia de Steinert.** L'estudi dels marcadors seleccionats per a la detecció del gen *DMPK* ha evidenciat amplificació de l'al·lel patern sa de 141 pb, pel que la gestació ha resultat lliure de la malaltia. El resultat s'ha comprovat en la biòpsia de vellositats corials (Taula 31 i Fig. 32).

Taula 31. Resultats de la PCR per a la detecció del gen *DMPK* en plasma.

Fluorocrom	6-Fam	6-Fam	6-Fam	NED
Rang	105-110	70-235	297-	191-215
Marcador	<i>AMXY</i>	<i>DMPK</i>	<i>APOC2</i>	<i>D19S559</i>
Mare	105	123-148	271-298	178-190
Pare	105-110	141	287-293	170-178
CVS	105-110	123-141	293-298	170-190
Al·lel patern en Plasma	110	141	ND	170

En groc els al·lells fetals susceptibles de ser detectats en plasma matern.

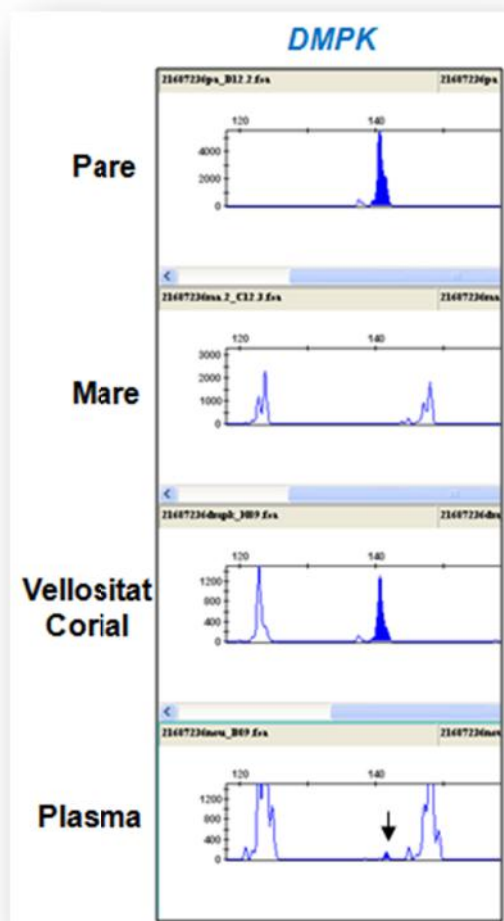


Figura 32. Electroforetograma de l'amplificació del gen *DMPK*. L'al·lel patern expandit és refractari a la PCR pel que només es detecta un al·lel dins el rang de la normalitat. La detecció del mateix al·lel patern en plasma està indicat amb una fletxa i confirma la presència d'un fetus lliure de la mutació.

) **Família 7 amb t(6;21)(q21.2;q22.2)**. S'han detectat al·lels fetals d'origen patern en el plasma de la gestant mitjançant amplificació amb la Múltiple Fluorescent Universal. Els al·lels de cada un dels progenitors i els fetals es mostren a la Taula 32. Els resultats de la PCR en plasma es visualitzen a la Fig. 33.

Taula 32. Resultats de la PCR Múltiple Universal en la Família 7.

Fluorocrom	6-Fam	VIC	NED	NED	PET
Rang	93-121	177-201	159-195	213-245	177-201
Marcador	D10S1213	D4S1627	D4S2639	D10S1246	D4S1533
Mare	107-111	185-193	171-183	223-235	181-185
Pare	103-107	197	171-187	223	185-193
CVS	107-111	185-197	171-187	223	181-193
Al·lel patern en Plasma	NI	ND	187	NI	193

En groc els al·lels fetals susceptibles de ser detectats en plasma matern. NI, no informatiu. ND, no detectat.

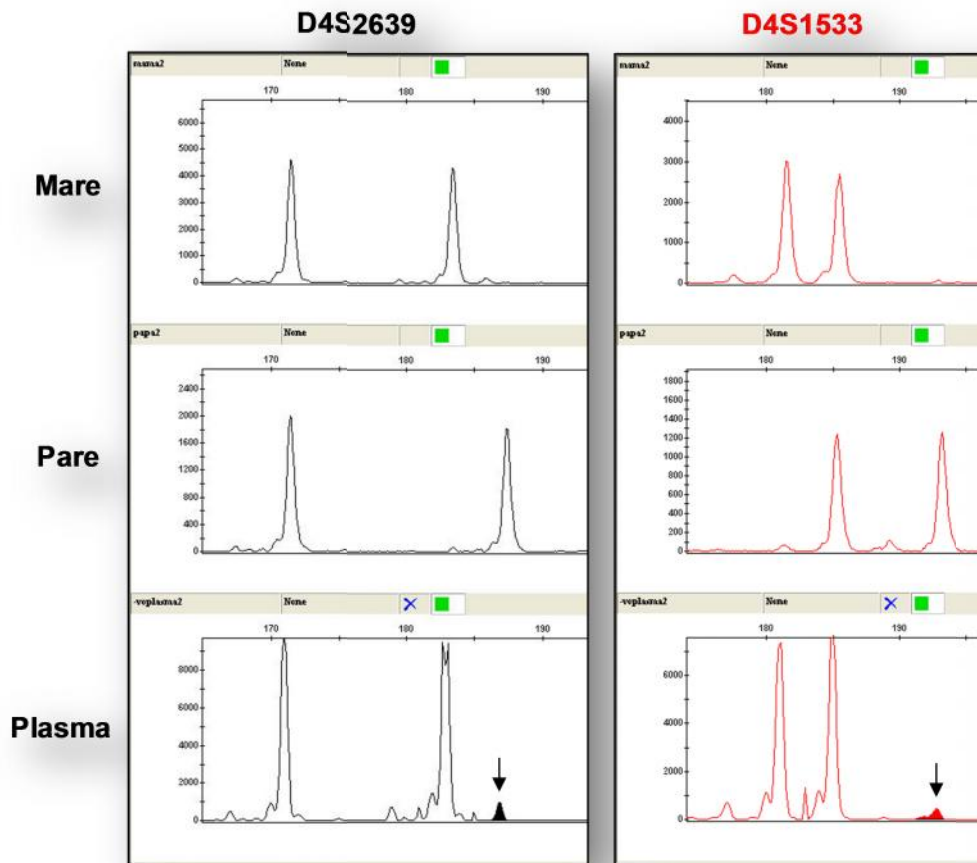


Figura 33. Electroforetograma de l'amplificació de la Múltiple Universal en la Família 7. Els al·lels d'origen patern detectats en el plasma matern s'indiquen amb fletxes i confirmen la presència d'ADN fetal en la mostra.

En realitzar la PCR múltiplex amb els marcadors específics per al cas s'ha obtingut amplificació d'ADN fetal en plasma matern d'un marcador del cromosoma 21 que descarta la presència de trisomia trial·lèlica d'aquest cromosoma (Taula 33 i Fig. 34).

Taula 33. Resultats de la PCR Múltiplex Universal en la Família 7.

Fluorocrom	PET	6-Fam	PET	VIC	VIC
Rang	200-228	196-220	120-144	246-319	142-188
Marcador	D21S1446	D21S1008	D21S1437	D21S1411	D21S1435
Mare	210-218	208-212	119-143	294-302	184-188
Pare	220-228	200-208	131	270-286	176-180
CVS	210-220	208-212	131-143	270-302	176-188
Al·lel patern en Plasma	ND	NI	ND	ND	176

En groc els al·lels fetals susceptibles de ser detectats en plasma matern. NI, no informatiu. ND, no detectat.

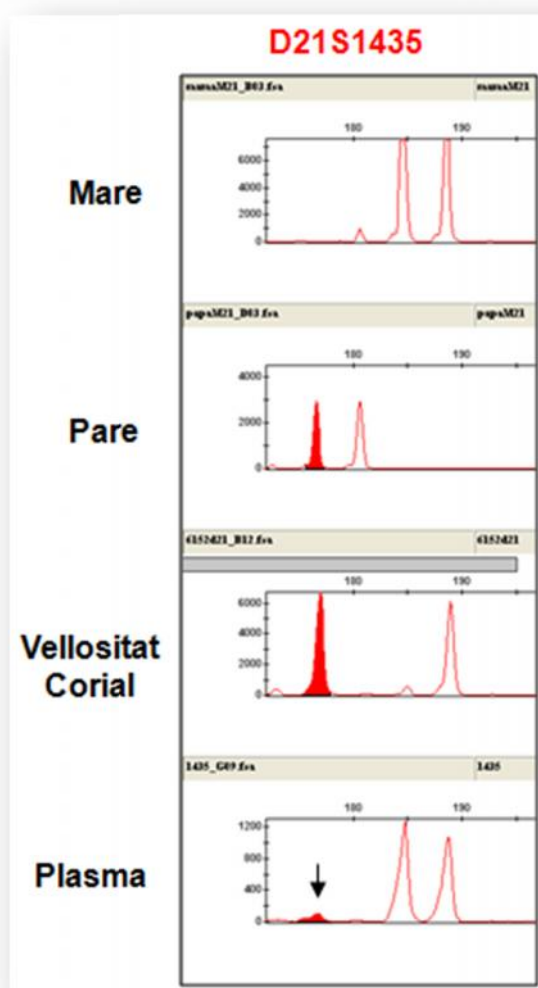


Figura 34. Electroforetograma de l'amplificació del marcador D21S1435 en ADN matern, patern, fetal (CVS) i plasma matern. La presència d'ADN fetal en plasma és confirmada per la detecció d'un al·lel d'origen patern (indicat amb una fletxa). La detecció de només un al·lel descarta la presència de trisomia.

) **Família 8 amb t(13;14)rob.** L'amplificació dels marcadors seleccionats per al cromosoma 13 així com la identificació dels seus al·lels en les mostres de la família ha permès la detecció de la trisomia del cromosoma 13 en plasma matern en visualitzar ambdós al·lels paterns en el plasma de la mare (Taula 34 i Fig. 35).

Taula 34. Resultats de la PCR específica per al cromosoma 13 en la Família 8.

Fluorocrom	VIC	VIC
Rang	192-218	254-274
Marcador	D13S631	D13S742
Mare	197-209	258-289
Pare	201-205	275-279
CVS	201-205-209	275-279-289
Al·lels paterns en Plasma	201-205	275-279

En groc els al·lels fetals susceptibles de ser detectats en plasma matern.

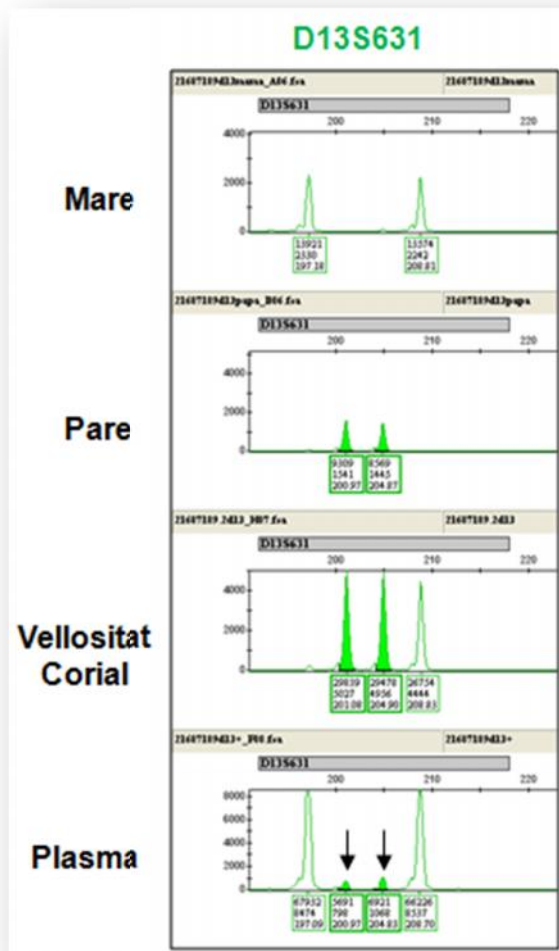


Figura 35. Electroforetograma de l'amplificació del marcador D13S631 en ADN matern, patern, fetal (CVS) i plasma matern. L'amplificació d'ambdós al·lels paterns en el plasma (indicats amb fletxes) permet la detecció de la trisomia 13.

) **Família 9 amb t(8;15)(p23;q15)**. L'amplificació del plasma matern amb la PCR Múltiplex Fluorescent Universal ha permès detectar al·lells fetals d'origen patern en els tres marcadors informatius (Taula 35 i Fig. 36 i 37).

Taula 35. Resultats de la PCR Múltiplex Universal en la Família 9.

Fluorocrom	6-Fam	VIC	NED	NED	PET
Rang	93-121	177-201	159-195	213-245	177-201
Marcador	D10S1213	D4S1627	D4S2639	D10S1246	D4S1533
Mare	107	185-197	159-175	219-223	181-189
Pare	107-127	181-197	168-183	226-230	177-201
Al·lel patern en Plasma	NI	NI	168	226	177

NI, no informatiu.

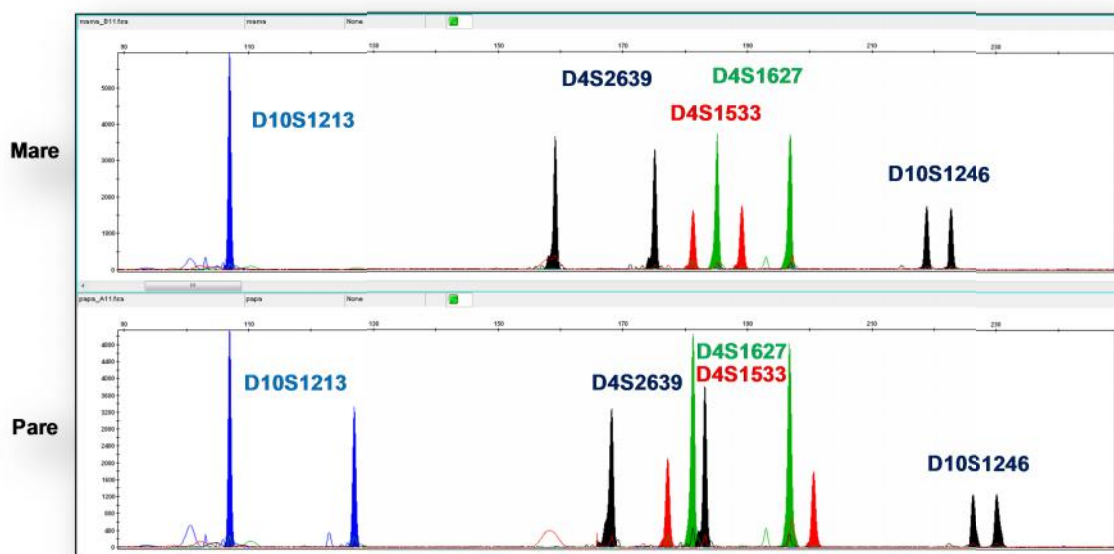


Figura 36. Electroforetograma de l'amplificació de la Múltiplex Universal en la Família 9. Cada marcador està identificat amb un color. Els marcadors D4S2639, D4S1533 i D10S1246 són informatius en presentar al·lells paterns amb diferent mida dels al·lells materns, que permeten la detecció de l'ADN fetal en el plasma.

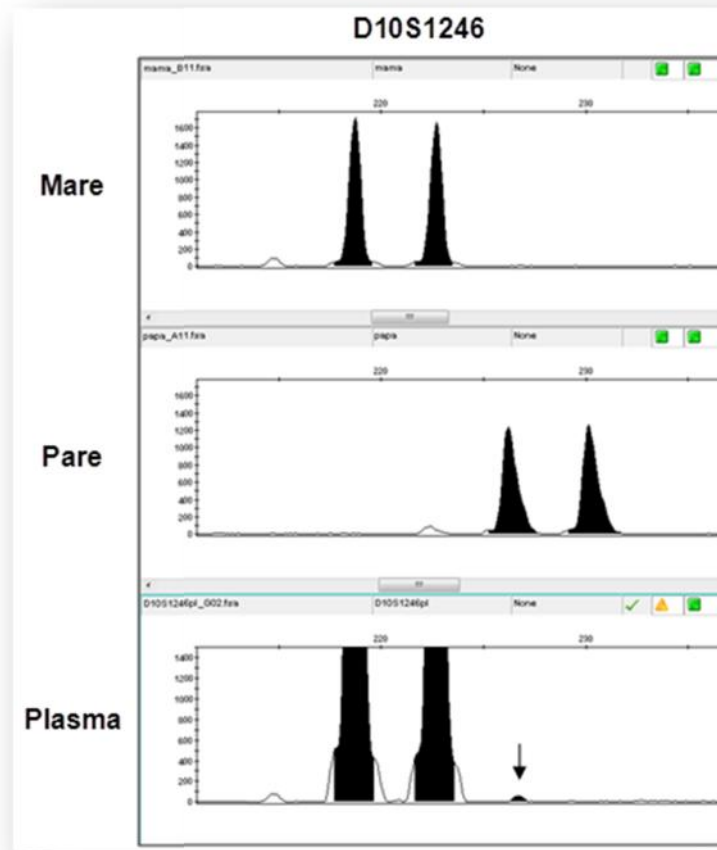


Figura 37. Electroforetograma de l'amplificació del marcador D10S1246 en plasma matern. La detecció de l'al·lel fetal d'origen patern s'indica amb la fletxa i confirma la presència d'ADN fetal en plasma de la mare.

En realitzar la PCR amb els marcadors específics per al cromosoma 15 s'han detectat dos al·lells fetal dels 5 marcadors presents a la múltiplex. En un dels marcadors no s'ha aconseguit amplificació, en un segon els al·lells paterns coincideixen amb les mides dels *stutter bands* dels al·lells materns, i en el darrer no s'ha detectat l'al·lel fetal (Taula 36 i Fig. 38).

Taula 36. Resultats de la PCR específica per al cromosoma 15 en la Família 9.

Fluorocrom	VIC	VIC	VIC	VIC	VIC
Rang	170-195	123-159	145-156	195-223	203-204
Marcador	D15S520	D15S172	D15S195	D15S643	D15S644
Mare	171	NA	150	206-218	202-206
Pare	181	NA	145-154	204-214	190-206
Al·lells paterns en Plasma	181	NA	154	Stutter	ND

En groc els al·lells paterns susceptibles de ser detectats en plasma matern. ND, no detectat. NA, no amplificació.

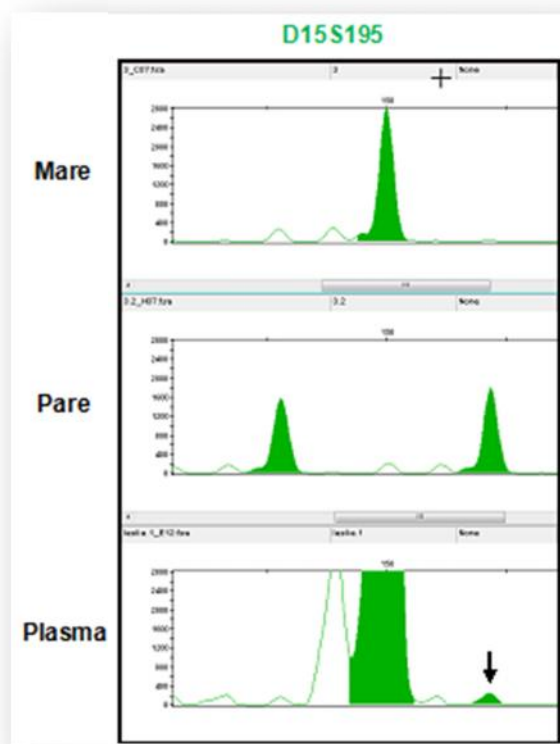


Figura 38. Electroforetograma de l'amplificació del marcador D15S195 en plasma matern. L'amplificació d'un dels al·lells paterns en el plasma (indicat amb la fletxa) permet confirmar la detecció d'ADN fetal així com descartar la presència de trisomia parcial del cromosoma 15, en concordança amb els resultats del PGD.

El resum de l'aplicació clínica de la PCR múltiplex fluorescent en gestacions en curs queda reflectit a la Taula 37, amb un 100% de concordança entre els resultats de l'anàlisi en plasma fetal i les altres tècniques utilitzades en Diagnòstic Prenatal convencional o Diagnòstic Preimplantacional.

Taula 37. Resum dels resultats de les PCR múltiplex fluorescents específiques desenvolupades per l'aplicació clínica en les famílies estudiades.

Família	Resultat		
	Plasma	Biòpsia de Vellostitat Corial	PGD
5	No aneuploidia per als marcadors estudiats	Cariotip normal	-
6	Lliure de l'expansió paterna	Lliure de l'expansió paterna	-
7	No aneuploidia per als marcadors estudiats	Cariotip normal	-
8	Trisomia 13	Trisomia 13	-
9	No aneuploidia per als marcadors estudiats	-	No aneuploidia

PGD, Diagnòstic Genètic Preimplantacional

5. DISCUSSIÓ

Els individus portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades, en produir gàmetes amb desequilibri cromosòmic a la meiosi, presenten un risc variable d'entre 1-10% de tenir descendència (embrió, fetus, avortaments, nounats) amb anomalies cromosòmiques (*Gardner et al., 1996; Pierce et al., 1998; Tempest et al., 2010*). Per aquesta raó, en les parelles on un dels membres presenta aquest tipus d'anomalia està indicat, en cas d'embaràs, realitzar un diagnòstic prenatal amb tècniques que puguin detectar variacions del nombre de còpies inclús les de mida petita (com els arrays de aCGH).

El descobriment d'ADN fetal lliure en plasma matern per *Lo et al., (1997)*, ha obert un nou camp de perspectives en el Diagnòstic Prenatal en possibilitar la realització d'anàlisis genètiques sense el risc de pèrdua fetal. Aquest descobriment ha permès la detecció de seqüències que el fetus hereta del pare i que es troben absents en la mare, com el cromosoma Y per a la determinació del sexe fetal o el gen *RHD* per al genotipatge fetal.

El fet que l'ADN lliure d'origen fetal sigui component minoritari del total d'àcids nucleics en plasma matern, ha representat un obstacle tècnic per a la detecció no invasiva d'anomalies gèniques o cromosòmiques de forma rutinària en la pràctica clínica. El desenvolupament de les tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS) ha resultat parcialment aquesta limitació i, en l'actualitat, han permès la incorporació de l'anàlisi d'ADN fetal lliure a la pràctica del cribratge d'aneuploidies fetals i el diagnòstic prenatal d'alguns defectes gènics (*Sehnert et al., 2011; Norton et al., 2012; Lench et al., 2013; Hill et al., 2014; Gil et al., 2015*).

No obstant, el diagnòstic prenatal basat en la detecció de seqüències d'origen patern en el plasma matern requereix una estricta avaluació prèvia de la sensibilitat de les tècniques utilitzades, ja que es basa en la presència o absència d'aquestes seqüències i no es disposa encara de marcadors universals que confirmin la presència d'ADN fetal en tots els casos. A més, la detecció d'anomalies cromosòmiques mitjançant NGS encara es limita a l'anàlisi

d'aneuploidies totals o alguna de les microdeleccions relativament més freqüents (*Srinivasan et al., 2013; Yu et al., 2013; Zhao et al., 2015*).

En la present tesi, ens hem centrat en la necessitat d'identificar marcadors per a la detecció d'ADN fetal en plasma matern, així com en la possibilitat de fer extensiu el diagnòstic prenatal no invasiu a famílies amb alt risc d'anomalies cromosòmiques degut a la presència d'una translocació equilibrada d'origen patern. Ens vàrem plantejar explorar el fenomen de la metilació específica de teixit per a la recerca de marcadors universals per la detecció d'ADN fetal i, d'altra banda, avaluar la utilitat clínica de marcadors polimòrfics per al diagnòstic prenatal de diverses anomalies cromosòmiques d'origen patern.

5.1. Estat de metilació de les seqüències promotores seleccionades

La metilació de l'ADN és un procés dinàmic durant el desenvolupament embrionari (*Reik et al., 2001*). En els darrers anys s'ha descrit la presència de patrons de metilació diferencials entre l'ADN fetal i l'ADN matern – presents tots dos en plasma matern durant la gestació (*Chim et al., 2008*)– que possibiliten l'explotació d'aquestes regions diferencialment metilades per ser utilitzades com a marcadors epigenètics universals que, durant el període gestacional, permetin la detecció de l'ADN fetal en un *background* principalment matern (*Chim et al., 2005*).

En el present estudi, per a la identificació de regions candidates de presentar metilació diferencial en placenta (fetus) i sang materna s'han analitzat els perfils de metilació dels promotors de 52 gens seleccionats prèvia recerca en bases de dades d'expressió gènica o caracteritzats mitjançant arrays de metilació (MeDIP on CHIP). D'aquests gens, 48 es localitzen en el cromosoma 18 i els 4 restants en els cromosomes 1, 9 i 12.

En total s'ha analitzat el perfil de metilació de 176 regions, on 14 presentaven diferència d'amplificació entre placenta i sang materna: 12 d'elles amb un patró d'hipometilació en vellositats corials i hipermetilació en sang i 2 amb el patró oposat.

Si bé és cert que els estudis que inclouen metodologies de seqüenciació per a caracteritzar les diferències epigenètiques existents entre teixit fetal i matern permeten ampliar el nombre de posicions CpG estudiades (*Chim et al., 2008*), en el nostre cas, el fet de limitar el nombre de CpG només a aquelles que formen part d'una diana de restricció ha permès la identificació d'un 8% de regions susceptibles de ser explorades com a marcador universal d'ADN fetal. De fet, la majoria de les seqüències diferencialment metilades contenen dianes de restricció per varis dels enzims utilitzats però, fins i tot les que presenten dianes només per a un dels enzims, mostren diferència d'amplificació entre placenta i sang materna, confirmant inequívocament la presència d'un patró de metilació completament diferent entre elles.

El patró d'hipometilació en ADN placentari i hipermetilació en ADN de sang total identificat en 12 de les regions estudiades és similar al patró descrit pel promotor del gen *SERPINB5*, ubicat també al cromosoma 18 i postulat com a primer candidat a marcador universal d'ADN fetal (*Chim et al., 2005*).

Cinc de les 12 seqüències identificades com a hipometilades en placenta i hipermetilades en sang materna provenien de les 12 regions caracteritzades per arrays de metilació (MeDIP on CHIP) al *Wellcome Trust Sanger Institute* en el marc del *SAFE Network* (*Papageorgiou et al., 2009*), confirmant la hipometilació de l'ADN fetal en les regions identificades i amb concordança entre les dues tècniques.

A diferència dels assaigs amb bisulfit sòdic i restricció, la immunoprecipitació de l'ADN utilitza anticossos específics per la 5-metilcitosina per a l'enriquiment de seqüències amb diferències epigenètiques, així facilita la seva detecció en plasma i amplia les regions analitzables, incloent les que no contenen dianes de restricció (*Papageorgiou et al., 2009*). Aquesta característica podria explicar la discordança observada en 7 de les 12 regions caracteritzades amb ambdues tècniques utilitzades en aquest estudi.

D'altra banda, les regions CpG no presenten sempre el mateix estat de metilació en tots els individus degut a factors múltiples com condicions ambientals, dieta o edat (*Bock et al., 2008; Ioannides et al., 2014*). Per tant, com més àmplia sigui la regió estudiada menys resultarà afectada per la variabilitat de metilació de cada CpG. És a dir, és possible minimitzar la variabilitat inter-individual si les regions objecte d'estudi inclouen el màxim de dianes de restricció possibles.

Les seqüències dels candidats a marcadors epigenètics universals descrits en el nostre estudi han resultat amb una mida dels productes analitzables per PCR massa gran per a la detecció eficient de la forma hipometilada (específicament fetal) en plasma; a més, la necessitat d'utilitzar el bisulfit sòdic per a la transformació prèvia de l'ADN fetal disminueix molt significativament la, ja de per sí, baixa quantitat d'ADN de la que es parteix.

Els resultats que hem obtingut confirmen que, tot i la utilització de diferents condicions, mai s'aconsegueix la conversió del 100% de les citosines no metilades i, inevitablement, es degrada entre el 84-96% de l'ADN present en la reacció (*Grunau et al., 2001*), dificultant la detecció de seqüències presents en baixa proporció com les fetals.

Des del punt de vista tècnic, el repte és el desenvolupament de mètodes d'anàlisi de la metilació que no es basin en la conversió amb bisulfit sòdic per evitar la degradació de l'ADN

que hi està associada. De fet, les dificultats tècniques, la baixa sensibilitat demostrada en la detecció d'ADN fetal i la dificultat per a reproduir els resultats han impedit la implementació a la pràctica clínica d'aquests tipus d'assaigs. Possiblement l'estratègia d'arrays de metilació MeDIP on CHIP per a l'enriquiment d'ADN fetal en plasma sembla ser prometedora (*Papageorgiou et al., 2011; Tsaliki et al., 2012*) però, de moment, només se n'ha descrit la prova de principi i l'aplicació en la rutina clínica sembla llunyana.

La identificació de dues seqüències diferencialment metilades amb un patró oposat, d'hipermetilació en vellositats corials (fetus) i hipometilació en sang materna suposa un potencial d'aplicabilitat real ja que el mètode de detecció no comporta la degradació d'ADN. Similar al mètode emprat en la seqüència promotora del gen *RASSF1A* (*Chan et al., 2006*) i el gen *AIRE* (*Old et al., 2007*), la digestió enzimàtica sensible a metilació talla específicament el *background* de seqüències maternes no metilades i manté intactes les seqüències metilades d'origen fetal permetent la detecció específica d'ADN fetal més eficient que amb els mètodes basats en el tractament de la mostra amb bisulfit sòdic.

De les dues darreres seqüències candidates identificades en aquest estudi, la variabilitat de metilació observada en la seqüència 18-29 entre mostres i en els diferents llocs de restricció fa imprescindible la inclusió de més d'una diana en el producte amplificat per mantenir diferència constant entre ADN fetal i matern. Aquest motiu ha fet necessari augmentar la grandària dels productes amplificats fora del rang de mida detectable per a l'ADN fetal en plasma (>150-200 pb).

En canvi, malgrat incloure únicament dues dianes de restricció per discriminar l'estat de metilació, la seqüència 12-200 ha mostrat resultats clars i prometedors presentant amplificació en ADN de vellositat corial digerit, i no amplificar en absolut l'ADN de sang també digerit amb endonucleases sensibles a metilació, possibilitant una discriminació total

entre l'ADN fetal i el matern. Això podria permetre la utilització de la seqüència 12-200 (localitzada al cromosoma 12) com a seqüència de referència en experiments de quantificació relativa dirigits a la detecció d'aneuploïdies fetals, o bé com a marcador universal per confirmar la presència d'ADN fetal en les aplicacions que requereixen la detecció qualitativa de l'ADN fetal –com la determinació del grup sanguini RhD i la detecció de mutacions–, incrementant la fiabilitat de resultats que es basen en la detectabilitat d'una característica paterna en els casos on els resultats són negatius.

No obstant, l'aplicació en l'ADN extret de plasmes de gestants no ha donat els mateixos resultats, probablement degut a les condicions astringents de la digestió enzimàtica a que s'ha de sotmetre l'ADN, que poden estar degradant la baixa quantitat d'ADN fetal i, per tant, reduint la sensibilitat de detecció. Malgrat tot, la millora en els mètodes de conservació de la mostra recollida i la millora en els mètodes d'extracció d'ADN fetal a partir del plasma matern, paral·lelament a l'aplicació de mètodes d'enriquiment d'ADN fetal previs a la digestió, podria propiciar la seva utilització com marcador epigenètic. No obstant, la laboriositat i el cost dels assaigs necessaris, especialment en comparació amb la seqüenciació NGS directa de l'ADN disponible avui en dia, no faciliten una possible aplicació a gran escala com el cribratge d'aneuploïdies.

Adicionalment, els resultats obtinguts en les seqüències hipermetilades en placenta identificades en aquest estudi han estat semblants als observats per la primera seqüència d'aquestes característiques descrita com a possible marcador universal d'ADN fetal en plasma, la seqüència per al gen *RASSF1A* (Chan et al., 2006). A diferència dels resultats descrits per aquests autors, en el nostre estudi amb mostres de gestants i controls, el plasma de no gestants ha presentat ampliació residual de *RASSF1A* de manera constant, limitant la seva especificitat per a la detecció d'ADN fetal en plasma matern. La utilització del promotor gènic de la β -actina com a control intern per a la detecció de digestió enzimàtica

incomplerta ha permès descartar aquesta opció com a possible explicació de la discrepància entre els nostres resultats i els publicats prèviament.

Els resultats obtinguts en el nostre treball confirmen la presència de diferències epigenètiques entre teixit fetal i teixit matern, així com que el genoma fetal està majoritàriament hipometilat en contrast amb la sang perifèrica de la mare, que està principalment hipermetilada (*Rakyan et al., 2008, Papageorgiou et al., 2009, Chu et al., 2011*). Hem comprovat que, per a que un marcador de metilació sigui útil, ha de reunir uns requeriments específics: presentar gran diferència de metilació entre ADN fetal (completament metilat) i matern (no metilat), i que aquesta diferència sigui estable i no canviï entre individus en la població o durant la gestació. No obstant, malgrat el potencial de les diferències epigenètiques i la caracterització de les seqüències, la dificultat pràctica de la utilització de marcadors com els identificats en el nostre estudi explica l'escassa aplicació clínica en l'anàlisi de l'ADN fetal lliure en plasma matern.

5.2. Determinació d'anomalies cromosòmiques desequilibrades d'origen patern: selecció de marcadors i PCR múltiplex fluorescent

D'entre les possibles aplicacions en l'ADN fetal lliure en plasma matern, una de les menys explorades ha estat la detecció d'anomalies cromosòmiques com trisomies parcials d'origen patern. La limitació principal és la necessitat de dissenyar un assaig específic per a cada tipus d'anomalia ja que, generalment, en cada cas s'impliquen regions i llocs de trencament cromosòmics molt diferents en quant a localització i mida.

Per tal de solucionar aquesta limitació principal, en el present estudi hem creat una base de dades seleccionant 1.470 marcadors polimòrfics per a tots els cromosomes, restringint-la únicament als microsatèl·lits que compleixen els criteris per a la seva utilització en plasma matern. La base de dades desenvolupada possibilita l'adaptació d'un protocol d'anàlisi a qualsevol tipus de reorganització cromosòmica que pugui resultar en una trisomia parcial.

El nostre estudi evidencia que els criteris de selecció dels marcadors són fonamentals per a l'èxit de la metodologia: la selecció de tetra i penta nucleòtids proporciona estabilitat a les seqüències durant l'amplificació, augmenta l'eficiència de l'assaig i minimitza artefactes ben coneguts com els *stutter bands*, que podrien complicar la detecció i la interpretació dels al·lels fetals poc representats entre l'elevada proporció d'al·lels materns (*Cirigliano et al., 2001, 2004; Chen, 2001; Mann et al., 2008*). D'altra banda, la selecció de microsatèl·lits amb una heterozigositat mínima del 75% i ubicats al llarg de tots els cromosomes augmenta la informativitat dels tests específics que es puguin dissenyar per a cada cas.

A banda de l'àmplia selecció de marcadors polimòrfics utilitzables en plasma matern, el present treball demostra l'elevada sensibilitat de la PCR múltiplex fluorescent per a la seva aplicació en tests prenatal no invasius, permetent l'anàlisi d'ADN en dilució amb un altre fins al 2,5% i possibilitant la detecció d'al·lels paterns directament en plasma matern.

Com a alternativa a la detecció d'un marcador epigenètic universal d'ADN fetal que permeti la confirmació de la presència d'ADN fetal en el plasma matern, s'ha desenvolupat una PCR Múltiplex Fluorescent Universal seleccionant marcadors que han presentat una heterozigositat mínima del 74%, i amb un mínim de 2 marcadors informatius per a la discriminació d'ADN fetal en les 50 parelles analitzades en gairebé el 80% dels casos.

La selecció de microsatèl·lits amb reduïda producció d'artefactes d'amplificació i amb diferents fluorocroms per a diferenciar seqüències de mida similar, ha permès determinar la presència d'ADN fetal independentment del sexe en gairebé el 90% de les gestants estudiades.

Només en dos casos no es va detectar ADN fetal per l'absència d'amplificació dels al·lels paterns, probablement degut a l'alteració de la mostra de plasma (llarg temps d'emmagatzematge, transport, separació del plasma fora de temps, variacions de temperatura de la mostra) i/o quantitat d'ADN fetal insuficient per a la seva detecció.

La PCR Múltiplex Fluorescent Universal desenvolupada en aquest estudi ha mostrat ser un assaig simple, ràpid i econòmic que permet confirmar la presència d'ADN fetal lliure en la gran majoria de casos, essent de gran utilitat diagnòstica en la confirmació del diagnòstic en casos d'absència de mutació paterna o genotip fetal RhD negatiu i amb fetus de sexe femení.

5.3. Utilitat de la metodologia desenvolupada. Aplicabilitat clínica

La fecundació *in vitro* és una opció reproductiva per famílies portadores de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades, sigui com a possible solució a un problema d'infertilitat (*De Braekeleer et al., 1990*) o per evitar la interrupció de gestacions amb reorganitzacions desequilibrades (*Braude et al., 2002; Munné, 2002; Sermon et al., 2004; Verlinsky et al., 2004*). En aquests casos es realitza un Diagnòstic Genètic Preimplantacional (PGD) que, en ser realitzat en cèl·lula única, fa aconsellable la seva posterior confirmació mitjançant tècniques de diagnòstic prenatal com l'amniocentesi o la biòpsia de còrion.

No obstant, la utilització de tècniques invasives pot ser un impediment en gestacions resultants de processos mèdics llargs i estressants per als progenitors (*Schover et al., 1998; Elimian et al., 2003*). Per tant, la possibilitat de dissenyar assaigs específics per a la detecció de trisomies parcials d'origen patern en una mostra de sang materna, representa el complement ideal per la confirmació de resultats de PGD sense sotmetre a la gestant a cap procés invasiu.

La selecció prèvia de marcadors distribuïts al llarg dels diferents cromosomes ens ha permès desenvolupar assaigs informatius per detectar els al·lels d'origen patern en les regions implicades en les translocacions de cada família.

La tècnica emprada en aquest estudi ha demostrat un elevat potencial diagnòstic en la totalitat dels casos clínics analitzats. En dues famílies amb translocacions d'origen patern s'ha exclòs la presència de desequilibris cromosòmics fetals, i en la família amb translocació paterna Robertsoniana s'ha pogut detectar correctament una Trisomia 13. En un cas d'ovodonació, l'anàlisi de microsatèl·lits en plasma matern ha permès descartar la presència de les trisomies més freqüents, discriminant ambdós al·lels fetals dels al·lels materns. D'altra banda, el disseny d'un assaig específic per a la detecció del gen *DMPK* ha permès el diagnòstic prenatal no invasiu en un cas de distròfia miotònica tipus I paterna, resultant una gestació lliure de l'expansió paterna. En tots els casos els resultats en plasma matern han estat confirmats amb anàlisi de vellositats corial, confirmant la sensibilitat i especificitat de la tècnica en la detecció dels al·lels fetals en plasma matern a partir del primer trimestre de gestació.

La PCR múltiplex fluorescent i el disseny d'un assaig específic per la detecció d'una translocació recíproca desequilibrada d'origen patern han demostrat la seva utilitat clínica en una família que s'havia sotmès a un programa de fecundació *in vitro* i PGD, permetent confirmar l'absència de desequilibris cromosòmics en ADN fetal lliure en plasma matern en el primer trimestre d'embaràs.

Certament, amb la revolució tecnològica dels darrers anys en el camp de la NGS, la detecció de translocacions desequilibrades com a resultat de la presència d'una trisomia o una monosomia parcials (delecions/duplicacions) seria possible utilitzant Tests Prenatals no Invasius basats en la seqüenciació aleatòria de tot el genoma (MPS). No obstant, actualment les variacions en el nombre de còpies de segments cromosòmics només poden ser detectades en plasma si assoleixen una mida mínima de 3-9 Mb (Zhao *et al.*, 2015).

Tot i tractar-se d'una metodologia possible, aquests casos també requereixen una major profunditat de seqüenciació i un anàlisi bioinformàtic de les dades obtingudes més complex, amb la conseqüent repercussió en l'increment dels costos de l'anàlisi (Chen *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013; Srinivasan *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2016).

A diferència de la seqüenciació, l'amplificació directa de polimorfismes paterns està dirigida només a les regions d'interès, sense cap limitació de mida excepte la del producte a amplificar; a més, la possibilitat de seleccionar microsatèl·lits informatius en les regions d'interès fa possible la seva aplicació en tots els casos.

Si també es considera l'elevat cost i el difícil accés a la seqüenciació massiva que, de moment, està limitada només a laboratoris altament especialitzats (Thung *et al.*, 2015), la PCR múltiplex fluorescent desenvolupada en el present estudi representa una opció robusta, fiable, ràpida i de més fàcil implementació per al laboratori clínic.

6. CONCLUSIONS

1. S'han identificat 14 seqüències genòmiques amb metilació diferenciada entre placenta i sang materna candidates a ser marcadors epigenètics universals d'ADN fetal en el diagnòstic prenatal no invasiu.
2. S'ha creat una base de dades amb 1.470 marcadors polimòrfics localitzats arreu de totes les regions cromosòmiques que possibilita la detecció no invasiva de qualsevol reorganització cromosòmica desequilibrada d'origen patern i s'ha desenvolupat una metodologia de PCR Múltiplex Fluorescent Universal sensible i efectiva per a la detecció d'ADN fetal en el plasma matern en totes les gestacions.
3. S'ha demostrat l'aplicabilitat clínica de la metodologia desenvolupada en famílies portadores d'anomalies d'origen patern com a test alternatiu a les tècniques invasives i com a test confirmatori del diagnòstic genètic preimplantacional en famílies sotmeses a tècniques de reproducció assistida.

7. BIBLIOGRAFIA

Adinolfi M. On a non-invasive approach to prenatal diagnosis based on the detection of fetal nucleated cells in maternal blood samples. *Prenat Diagn.* 1991 Oct;11(10):799-804.

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007 May;27(5):415-8.

Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem.* 2000 Feb;46(2):301-2.

Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Jan;41(1):26-32.

Avent ND. RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol.* 2008;444:185-201.

Azhikina TL, Sverdlov ED. Study of tissue-specific CpG methylation of DNA in extended genomic loci. *Biochemistry (Mosc).* 2005 May;70(5):596-603.

Benn PA, Cuckle H, Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Jul;42(1):15-33.

Benn PA, Egan JF, Fang M, Smith-Bindman R. Changes in the utilization of prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2004 Jun;103(6):1255-60.

Benn PA. Prenatal technologies and the sex ratio. *Genet Med.* 2014 Jun;16(6):433-4.

Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr.* 1995 Dec;127(6):847-56.

Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv.* 1996;28:87-101.

Bock C, Walter J, Paulsen M, Lengauer T. Inter-individual variation of DNA methylation and its implications for large-scale epigenome mapping. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jun;36(10):e55.

Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farre MT, Gonce A, Sanchez A, Soler A, Cararach V, Vanrell JA. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn.* 2004 Jul;24(7):541-5.

Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, Ananév V, Bazin I, Garin A, Narimanov M, Knysh V, Melkonyan H, Umansky S, Lichtenstein A. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem*. 2000 Aug;46(8 Pt 1):1078-84.

Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet*. 2002 Dec;3(12):941-53.

Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem*. 2006 Dec;52(12):2211-8.

Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004 Jan;50(1):88-92.

Chapman AR, Benn PA. Noninvasive prenatal testing for early sex identification: a few benefits and many concerns. *Perspect Biol Med*. 2013 Autumn;56(4):530-47.

Chen CP, Chern SR, Wang W. Fetal DNA analyzed in plasma from a mother's three consecutive pregnancies to detect paternally inherited aneuploidy. *Clin Chem*. 2001 May;47(5):937-9.

Chen S, Lau TK, Zhang C, Xu C, Xu Z, Hu P, Xu J, Huang H, Pan L, Jiang F, Chen F, Pan X, Xie W, Liu P, Li X, Zhang L, Li S, Li Y, Xu X, Wang W, Wang J, Jiang H, Zhang X. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing. *Prenat Diagn*. 2013 Jun;33(6):584-90.

Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med*. 1996 Sep;2(9):1033-5.

Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, Jin Y, Yang N, Tong YK, Leung TY, Lau TK, Ding C, Chiu RW, Lo YM. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem*. 2008 Mar;54(3):500-11.

Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14753-8.

Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 23;105(51):20458-63.

Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, Tong JH, Yuen RK, Shum AS, Chan JK, Chan LY, Yuen JW, Tong YK, Weier JF, Ferlatte C, Leung TN, Lau TK, Lo KW, Lo YM. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol*. 2007 Mar;170(3):941-50.

Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011 Apr;16(2):88-93.

Chiu RW, Lui WB, El-Sheikhah A, Chan AT, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Comparison of protocols for extracting circulating DNA and RNA from maternal plasma. *Clin Chem*. 2005 Nov;51(11):2209-10.

Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*. 2001 Sep;47(9):1607-13.

Chu T, Handley D, Bunce K, Surti U, Hogge WA, Peters DG. Structural and regulatory characterization of the placental epigenome at its maternal interface. *PLoS One*. 2011 Feb 23;6(2):e14723.

Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, Fuster C, Egozcue J. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod*. 2001 Oct;7(10):1001-6.

Cirigliano V, Voglino G, Cañadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod*. 2004 Nov;10(11):839-46.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994 Aug 11;22(15):2990-7.

Colmant C, Morin-Surroca M, Fuchs F, Fernandez H, Senat MV. Non-invasive prenatal testing for fetal sex determination: is ultrasound still relevant? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Dec;171(2):197-204.

Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med*. 2002 May 9;346(19):1502.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet*. 2001 May;38(5):285-303.

Cuckle HS, Benn P. Multianalyte maternal serum screening for chromosomal defects. In *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment* (6th edn), Milunsky A, Milunsky JM (eds.), Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2010; 771-818.

Cuckle HS, van Lith JM. Appropriate biochemical parameters in first-trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn*. 1999 Jun;19(6):505-12.

Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, Lau TK, Xie J, Zhao W, Huang H, Xie J, Sun L, Zhang X, Wang W, Liao S, Qiang R, Cao J, Zhang Q, Zhou Y, Zhu H, Zhong M, Guo Y, Lin L, Gao Z, Yao H, Zhang H, Zhao L, Jiang F, Chen F, Jiang H, Li S, Li Y, Wang J, Wang J, Duan T, Su Y, Zhang X. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn*. 2012 Dec;32(13):1225-32.

De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod*. 1990 Jul;5(5):519-28.

Dean L. The Rh blood group, Chapter 7: Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US); 2005.

Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011 Aug 10;306(6):627-36.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000 Jan-Feb;6(1):93-105.

Elimian A, Demsky M, Figueroa R, Ogburn P, Spitzer AR, Gerald Quirk J. The influence of IVF, multiple gestation and miscarriage on the acceptance of genetic amniocentesis. *Prenat Diagn*. 2003 Jun;23(6):501-3.

Estop AM, Van Kirk V, Cieply K. Segregation analysis of four translocations, t(2;18), t(3;15), t(5;7), and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;70(1-2):80-7.

Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet*. 1998 Oct 10;352(9135):1196.

Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16266-71.

Ferguson-Smith MA, Yates JR. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. *Prenat Diagn*. 1984 Spring;4 Spec No:5-44.

Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*. 2002 Aug;42(8):1079-85.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1827-31.

Gardner RJ and Sutherland GR. *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. Oxford University Press, New Cork. 1996.

Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, Van Vugt JM, Oudejans CB. Detection of placental transcription factor mRNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004 Aug;50(8):1413-4.

González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn*. 2003 Mar;23(3):232-4.

Grande M, Ordoñez E, Cirigliano V, Cid J, Grau E, Pericot A, Teixido I, Marin JL, Borrell A. Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population. *Prenat Diagn*. 2013 Feb;33(2):173-8.

Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/.

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jul 1;29(13):E65-5.

Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003 Aug;18(8):1733-6.

Gupta AK, Holzgreve W, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Hahn S. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles generated in vitro. *Clin Chem.* 2004 Nov;50(11):2187-90.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9821-6.

Hill M, Wright D, Daley R, Lewis C, McKay F, Mason S, Lench N, Howarth A, Boustred C, Lo K, Plagnol V, Spencer K, Fisher J, Kroese M, Morris S, Chitty LS. Evaluation of non-invasive prenatal testing (NIPT) for aneuploidy in an NHS setting: a reliable accurate prenatal non-invasive diagnosis (RAPID) protocol. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014 Jul 16;14:229.

Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in the maternal circulation. *J Reprod Med.* 1992 May;37(5):410-8.

Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn.* 2008 Apr;28(4):304-8.

Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev.* 2007 Sep;83(9):563-6.

Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, Perego F, Selmi C, Cecchini F, Podda M, Simoni G. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet.* 2002 Jun;110(6):587-91. Epub 2002 Apr 18.

Ioannides M, Papageorgiou EA, Keravnou A, Tsaliki E, Spyrou C, Hadjidaniel M, Sismani C, Koumbaris G, Patsalis PC. Inter-individual methylation variability in differentially methylated regions between maternal whole blood and first trimester CVS. *Mol Cytogenet.* 2014 Nov 1;7(1):73.

Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet.* 1995;33:101-33.

Jacobs PA. The chromosome complement of human gametes. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1992;14:47-72.

Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Jun;31(6):618-24.

Kawai J, Hirotsune S, Hirose K, Fushiki S, Watanabe S, Hayashizaki Y. Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. *Nucleic Acids Res.* 1993 Dec 11;21(24):5604-8.

Lau TK, Jiang FM, Stevenson RJ, Lo TK, Chan LW, Chan MK, Lo PSS, Wang W, Zhang H-Y, Chen F, Choy KW. Secondary findings from non-invasive prenatal testing for common fetal aneuploidies by whole genome sequencing as a clinical service. *Prenat Diagn* 2013; 33: 602-608.

Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Farina A, Heber WW, Bianchi DW. Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Nov;187(5):1217-21.

Lench N, Barrett A, Fielding S, McKay F, Hill M, Jenkins L, White H, Chitty LS. The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn.* 2013 Jun;33(6):555-62.

Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet.* 1998 Dec 12;352(9144):1904-5.

Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, Wataganara T, Romero R, Bianchi DW. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):707-13.

Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem.* 2004 Jun;50(6):1002-11.

Liang D, Lv W, Wang H, Xu L, Liu J, Li H, Hu L, Peng Y, Wu L. Non-invasive prenatal testing of fetal whole chromosome aneuploidy by massively parallel sequencing. *Prenat Diagn.* 2013 May;33(5):409-15.

Liu H, Gao Y, Hu Z, Lin L, Yin X, Wang J, Chen D, Chen F, Jiang H, Ren J, Wang W. Performance Evaluation of NIPT in Detection of Chromosomal Copy Number *PLoS One.* 2016 Jul 14;11(7):e0159233. Variants Using Low-Coverage Whole-Genome Sequencing of Plasma DNA.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997 Aug 16;350(9076):485-7.

Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998b Dec 10;339(24):1734-8.

Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem.* 1999c Oct;45(10):1747-51.

Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem.* 1999b Feb;45(2):184-8.

Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007b Aug 7;104(32):13116-21.

Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998a Apr;62(4):768-75.

Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007a Feb;13(2):218-23.

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999a Jan;64(1):218-24.

Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2008a Oct;54(10):1664-72.

Lun FM, Chiu RW, Sun K, Leung TY, Jiang P, Chan KC, Sun H, Lo YM. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. *Clin Chem.* 2013 Nov;59(11):1583-94.

Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008b Dec 16;105(50):19920-5.

Madan K, Breuning MH1. Impact of prenatal technologies on the sex ratio in India: an overview. *Genet Med.* 2014 Jun;16(6):425-32.

Mann K, Petek E, Pertl B. Prenatal detection of chromosome aneuploidy by quantitative fluorescence PCR. *Methods Mol Biol.* 2008;444:71-94.

Masuzaki H, Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura K, Yoshimura S, Nakayama D, Mapendano CK, Niikawa N, Ishimaru T. Clinical applications of plasma circulating mRNA analysis in cases of gestational trophoblastic disease. *Clin Chem.* 2005 Jul;51(7):1261-3.

Masuzaki H, Miura K, Yoshiura KI, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet.* 2004 Apr;41(4):289-92.

Meaney C, Norbury G. Noninvasive prenatal diagnosis of early onset primary dystonia I in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2009 Dec;29(13):1218-21.

Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, Horst J. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod.* 1998 Mar;13(3):576-82.

Monk M. Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1990 Jan 30;326(1235):299-312.

Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online.* 2002 Mar-Apr;4(2):183-96.

Muñoz-Cortes M, Arigita M, Falguera G, Seres A, Guix D, Baldrich E, Acera A, Torrent A, Rodriguez-Veret A, Lopez-Quesada E, Garcia-Moreno R, Gonce A, Borobio V, Borrell A. Contingent screening for Down syndrome completed in the first trimester: a multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012 Apr;39(4):396-400.

National Institute for Clinical Excellence. Technology appraisal guidance 41. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women. London: NICE, 2002.

Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, Lo YM. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem.* 2003b May;49(5):727-31.

Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002 Aug;48(8):1212-7.

Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003a Apr 15;100(8):4748-53.

Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005 Mar;25(3):221-6.

Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, Rodriguez MH, Williams J 3rd, Mitchell ME, Adair CD, Lee H, Jacobsson B, Tomlinson MW, Oepkes D, Hollemon D, Sparks AB, Oliphant A, Song K. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Aug;207(2):137.e1-8.

Old RW, Crea F, Puszyk W, Hultén MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2007 Aug;15(2):227-35.

Olson SD et al. Preferential paternal origin of the novo structural rearrangements. In Daniel A. (ed.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. Alan R. Liss, New York, USA. 1998;583-510.

Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, Carter NP, Patsalis PC. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol*. 2009 May;174(5):1609-18.

Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):510-3.

Partsalis T, Chan LY, Hurworth M, Willers C, Pavlos N, Kumta N, Wood D, Xu J, Kumta S, Lo YM, Zheng MH. Evidence of circulating donor genetic material in bone allotransplantation. *Int J Mol Med*. 2006 Jun;17(6):1151-5.

Pierce KE, Fitzgerald LM, Seibel MM, Zilberstein M. Preimplantation genetic diagnosis of chromosome balance in embryos from a patient with a balanced reciprocal translocation. *Mol Hum Reprod*. 1998 Feb;4(2):167-72.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2002 Jan;48(1):35-41.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2000 Nov;46(11):1832-4.

Raedle J, Trojan J, Brieger A, Weber N, Schäfer D, Plotz G, Staib-Sebler E, Kriener S, Lorenz M, Zeuzem S. Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2001 Oct 16;135(8 Pt 1):566-76.

Rakyan VK, Down TA, Thorne NP, Flicek P, Kulesha E, Gräf S, Tomazou EM, Bäckdahl L, Johnson N, Herberth M, Howe KL, Jackson DK, Miretti MM, Fiegler H, Marioni JC, Birney E, Hubbard TJ, Carter NP, Tavaré S, Beck S. An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Res*. 2008 Sep;18(9):1518-29.

Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem*. 2014 Jan;60(1):243-50.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1089-93.

Rijnders RJ, Christiaens GC, Soussan AA, van der Schoot CE. Cell-free fetal DNA is not present in plasma of nonpregnant mothers. *Clin Chem*. 2004 Mar;50(3):679-81; author reply 681.

Rodríguez de Alba M, Bustamante-Aragonés A, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Díaz-Recasens J, Plaza-Arranz J, Ramos C. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic disorders. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Jun;12 Suppl 1:S171-9.

Samango-Sprouse C, Banjevic M, Ryan A, Sigurjonsson S, Zimmermann B, Hill M, Hall MP, Westemeyer M, Saucier J, Demko Z, Rabinowitz M. SNP-based non-invasive prenatal testing detects sex chromosome aneuploidies with high accuracy. *Prenat Diagn*. 2013 Jul;33(7):643-9.

Schover LR, Thomas AJ, Falcone T, Attaran M, Goldberg J. Attitudes about genetic risk of couples undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1998 Apr;13(4):862-6.

Sehnert AJ, Rhee B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava RP. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem*. 2011 Jul;57(7):1042-9.

Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, Okai T. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem*. 2001 Dec;47(12):2164-5.

Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet*. 2004 May 15;363(9421):1633-41.

Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*. 2000;34:297-329.

Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res*. 2004;105(2-4):325-34.

Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E, Pagliano M, Restagno G, Ferrari M, Cremonesi L. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet*. 2003 May;112(5-6):617-8.

Smith DB, Lawlor E, Power J, O'Riordan J, McAllister J, Lycett C, Davidson F, Pathirana S, Garson JA, Tedder RS, Yap PL, Simmonds P. A second outbreak of hepatitis C virus infection from anti-D immunoglobulin in Ireland. *Vox Sang*. 1999;76(3):175-80.

Song F, Mahmood S, Ghosh S, Liang P, Smiraglia DJ, Nagase H, Held WA. Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): Changes in DNA methylation during development. *Genomics*. 2009 Feb;93(2):130-9.

Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, Held WA. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 1;102(9):3336-41.

Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, Zahn J, Lee K, Shen N, Doshi J, Sun M, Garrison J, Sandler J, Hollemon D, Pattee P, Tomita-Mitchell A, Mitchell M, Stuelpnagel J, Song K, Oliphant A. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn*. 2012 Jan;32(1):3-9.

Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999 Apr;13(4):231-7.

Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 2013 Feb 7;92(2):167-76.

Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod*. 1999 Aug;14(8):2097-101.

Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaides KH. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011 Jan;31(1):90-102.

Szyf M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy. *Biochemistry (Mosc).* 2005 May;70(5):533-49.

Tempest HG, Simpson JL. Role of preimplantation genetic diagnosis (PGD) in current infertility practice. *Int J Infertil Fetal Med.* 2010; 1:1-10.

Testart J, Gautier E, Bami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A. Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. *Hum Reprod.* 1996 Dec;11(12):2609-12.

Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol.* 2006 Aug;169(2):400-4.

Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. *Clin Chem.* 2006 Dec;52(12):2194-202.

Tong YK, Jin S, Chiu RW, Ding C, Chan KC, Leung TY, Yu L, Lau TK, Lo YM. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clin Chem.* 2010 Jan;56(1):90-8.

Tsaliki E, Papageorgiou EA, Spyrou C, Koumbaris G, Kypri E, Kyriakou S, Sotiriou C, Touvana E, Keravnou A, Karagrorgiou A, Lamnissou K, Velissariou V, Patsalis PC. MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenat Diagn.* 2012 Oct;32(10):996-1001.

Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, Chow KC, Leung TY, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Clin Chem.* 2010 Jan;56(1):73-81.

Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, Tong YK, Chan KC, Lo YM. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet.* 2004 Jun;41(6):461-7.

Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem.* 2002 Oct;48(10):1647-53.

Tsui NB, Wong BC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn.* 2009 Nov;29(11):1031-7.

van der Ven K, Peschka B, Montag M, Lange R, Schwanitz G, van der Ven HH. Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998 Jan;13(1):48-54.

Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2004 Aug;82(2):302-3.

Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T, Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, Canick JA. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ.* 1988 Oct 8;297(6653):883-7.

Wald NJ, Kennard A, Densem JW, Cuckle HS, Chard T, Butler L. Antenatal maternal serum screening for Down's syndrome: results of a demonstration project. *BMJ.* 1992 Aug 15;305(6850):391-4.

Wald NJ, Rudnicka AR, Bestwick JP. Sequential and contingent prenatal screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 2006 Sep;26(9):769-77.

Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down's syndrome on the basis of tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med.* 1999 Aug 12;341(7):461-7.

Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013 Jul;33(7):662-6.

Watanabe S, Kawai J, Hirotsune S, Suzuki H, Hirose K, Taga C, Ozawa N, Fushiki S, Hayashizaki Y. Accessibility to tissue-specific genes from methylation profiles of mouse brain genomic DNA. *Electrophoresis.* 1995 Feb;16(2):218-26.

Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet.* 2005 Aug;37(8):853-62.

Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update.* 2009 Jan-Feb;15(1):139-51.

Wright D, Bradbury I, Benn P, Cuckle H, Ritchie K. Contingent screening for Down syndrome is an efficient alternative to non-disclosure sequential screening. *Prenat Diagn.* 2004 Oct;24(10):762-6.

Wulff CB, Gerds TA, Rode L, Ekelund CK, Petersen OB, Tabor A; Danish Fetal Medicine Study Group. Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147,987 singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Jan;47(1):38-44.

Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2532-4.

Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, Akolekar R, Leung TY, Go AT, van Vugt JM, Minekawa R, Oudejans CB, Nicolaides KH, Chiu RW, Lo YM. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jun 10;111(23):8583-8.

Yu SC, Jiang P, Choy KW, Chan KC, Won HS, Leung WC, Lau ET, Tang MH, Leung TY, Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal molecular karyotyping from maternal plasma. *PLoS One.* 2013 Apr 17;8(4):e60968.

Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar JS, Oeth P, van den Boom D, Deciu C. Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clin Chem.* 2015 Apr;61(4):608-16.

Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M, Levy B, Rabinowitz M. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2012 Dec;32(13):1233-41.

8. ANNEX

Marcadors seleccionats en els 22 autosomes, X i Y.

Marcadors seleccionats en el cromosoma 1

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D5S582	1q41	207-	50
DXS6813	1p22.2	159-	
D1S1674	1p36.13	200	
D1S2142	1q32.3	118	
D1S2146	1p36.33-1q44	149	
D1S2147	1p35.1	138	
D1S3472	1p36.21	200	
D1S377	1q23.3	111	66,7
D1S387	1q32.1	180	50
D1S1660	1q31.3	226-250	83,3
D1S2145	1p36.31	245-261	69,2
D1S2132	1p36.32	236-248	
D1S1611	1p31.1	214-238	
D1S2136	1q32.2	240-241	
D1S548	1p36.23	148-172	63,3
D1S1650	1q25.2	161-162	
D1S1646	1q36.31-p36.23	130-150	
D1S1612	1p36.23	94-130	92,9
D1S1597	1p36.21	155-183	78
D1S402	1p36.21	249	63,6
D1S407	1p36.21	136-160	76,5
D1S1592	1p36.13	232-244	57,1
D1S1193	1p36.22-p36.21	207	53,3
D1S3669	1p36.13	171-215	80,3
D1S552	1p36.13	244-260	64,3
D1S2144	1p36.13	195-228	85,7
D1S378	1p36.13	155	68,8
D1S1676	1p36.11	138-162	92,3
D1S388	1p35.2-p35.1	148-208	75
D1S396	1p35.2-p35.1	118-137	90
D1S1591	1p34.3	86-87	68,8
D1S1596	1p32.1	105-125	60,7
D1S1157	1p34.3	232	93,3
D1S2130	1p34.2	246-262	
D1S1641	1p34.2	193-194	
D1S1667	1q32.3	198-218	50
D1S534	1p12	196-212	89,3
D1S3175	1p34.1	130-184	
D1S1616	1p33	135-145	51,9
D1S1671	1p21.2	218-234	52
D1S1661	1p33-p32.3	89-101	50
D1S405	1p32.2	243-264	64,9
D1S1647	1q32.1	223-243	70,8
D1S390	1p31.3	214	93,3
D1S1594	1q43	104-128	57,6
D1S1182	1p31.3	206	86,7
D1S520	1p31.3	173	57,1

Annex

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D1S3473	1p31.3	247	
D1S1603	1p31.1	196-197	78,6
D1S1672	1p31.1	159-160	71,4
D1S2137	1p31.3	245-246	
D1S2133	1q23.3	184-196	60
D1S1178	1p31.1	250	80
D1S1665	1p31.1	219-239	71,1
D1S550	1p31.1	169-189	68,8
D1S1195	1p31.1	149	62,5
D1S1162	1p31.2	178	81,3
D1S1679	1q23.3	144-176	82,6
D1S532	1p31.1	117-133	50
D1S1172	1p22.3	151	81,3
D1S551	1p31.1	166-186	55,6
D1S375	1p31.1	146-	56,3
D1S3471	1p22.3	147-167	
D1S2129	1p22.2	141-165	85,7
D1S1610	1q41	169-170	50
D1S1673	1p22.2	233-234	
D1S406	1p22.1	205	81,3
D1S1170	1p22.1	120	75
D1S1174	1p21.2	187-268	82,1
D1S535	1p21.1	174-175	56,3
D1S1155		225	77,8
D1S1166	1p13.3	205	87,5
D1S1191	1p13.2	123	68,8
D1S1675	1p13.2	227-251	64,3
D1S3466	1q21.2	189-209	
D1S1664		149-150	
D1S2140	1q22	232-260	71,4
D1S1653	1q23.1	100-116	81
D1S1600	1q23.1	148-164	80
D1S398	1q23.2	175	81,3
D1S1677	1q23.3	184-212	74,2
D1S1158	1q24.1	180	56,3
D1S376	1q25.3	110	62,5
D1S1165	1q24.3	117-210	87,1
D1S370	1q25.1	210	75
D1S1651	1q25.2	189-190	
D1S1652	1q25.2	197-198	
D1S1640	1q25.2	152-172	
D1S1593	1q31.2	209-210	86,7
D1S1599	1q31.1	230-231	78,6
D1S2127	1q25.3	112-132	71,4
D1S399	1q41	180	62,5
D1S1194	1q31.1	125	68,8
D1S2138	1q31.1	237-245	65,2
D1S1642	1q31.1	248-278	76,3
D1S518	1q31.1	191-223	78,6
D1S1604	1q31.1	203-204	83,3
D1S408	1q31.3	182	68,8
D1S1614	1q31.3	210-277	63
D1S533	1q31.3	193-225	82,4

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D1S1164	1q32.1	180	68,8
D1S3469	1q31.3	133	
D1S1656	1q42.2	130-165	95,2
D1S1171	1q32.1	120	93,8
D1S1666	1q41	168-169	
D1S2141	1q41	236-263	73,9
D1S3465	1q32.2	127	
D1S549	1q41	157-193	100
D1S2135		154-173	85,7
D1S1601	1q42.13	221	74,1
D1S395	1q41	205	91,7
D1S1668	1q42.13-q42.2	167-191	75
D0S9039	1q42.3	176	68,8
D1S526	1q43	187-247	
D1S517	1q43	213	93,8
D1S1609	1q44	180-208	84

Marcadors seleccionats en el cromosoma 2

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D21S1241	2p11.2	214-	50
D2S413	2p25.1	208-217	
D2S258	2q24.1	113-	66,7
D2S419	2q24.1	85-97	
D2S1252	2q14.3	205-	
D2S1271	2q33.2	245-	81,2
D2S1359	2q37.3	130-134	
D2S1362	2q14.3	206-	
D2S1373	2q32.2	125-	
D2S1378	2q37.3	121-	
D2S1381	2q11.2	174-	
D2S1390	2q14	172-	
D2S1766	2q36.2	150-	
D2S1768	2p-2q	188-	
D2S2734	2p16.1	216-	
D2S2737	2q14.3	199-	
D2S2738	2p16.1	152-	
D2S1769	2q22.1	177-201	92,9
D2S1370	2q36.3	240-260	72,6
D2S1335	2q37.1	149-	60
D2S407	2q37.2	194-	72,7
D2S3020	2p25-2q37	138-166	
D2S1275	2p25.1	183-	93,8
D2S423	2p25.1	111-131	75
D2S1400	2p25.1	111-140	50
D2S262	2p25.1	175-208	87,5
D2S1240	2p24-p23.3	215-	75
D2S272	2p24.3	185-245	86,1
D2S1360	2p24.2	136-176	82,1
D2S1324	2p24.1	202-211	51,9

Annex

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D2S405	2p23.2	233-253	80
D2S1325	2p22.3	107-131	63,5
D2S1788	2p22.3	159-211	
D2S1364	2p16.1	118-134	61,3
D2S1337	2p16.1	143-	63,3
D2S1261	2p16.1	178-	80
D2S444	2p16.1	110-126	59,3
D2S1779	2p14	127-159	74,7
D2S1772	2p14	152-202	75
D2S1336	2p14	241-261	64,6
D2S1778	2p14	146-174	74,1
D2S443	2p13.3	223-255	77,8
D2S1394	2p13.2	156-174	75
D2S1398	2p13.2	137-	
D2S1774	2p12	171-199	72,7
D2S1777	2p12	196-242	64,3
D2S438	2p12	147-163	70
D2S1262	2p12	249-	87,8
D2S1770	2p12	133-149	78,6
D2S1396	2p12	110-130	85,7
D2S428	2p12	143-158	76,2
D2S1387	2p11.2	145-181	
D2S440	2p11.2	187-211	61,4
D2S435	2p12	192-212	65,4
D2S1786	2p11.2	214-	
D2S1789	2q12.1	246-	
D2S274	2q12.2	131-210	97,1
D2S1258	2q11.2	181-	72,7
D2S410	2q14.1	156-182	82,8
D2S436	2q12.2-q12.3	179-202	81,6
D2S1784	2q12.3	196-214	65,4
D2S1277	2q14.1	184-	80
D2S437	2q14.1	185-221	77,8
D2S1771	2q14.1	127-155	
D2S1328	2q14.3	142-166	83,3
D2S1273	2q14.3	213-	62,50
D2S275	2q14.3	214-280	94,1
D2S1375	2q14.3	171-	
D2S442	2q22.1	196-212	65,2
D2S255	2q22.1	238-	87,5
D2S409	2q21.3	233-	
D2S1326	2q22.1	233-268	83,9
D2S1792	2q22.2-q22.3	133-197	85,7
D2S1399	2q22.3	137-173	82,1
D2S1395	2q24.3	118-132	55,6
D2S1379	2q24.3	147-162	57,1
D2S1281	2q24.3	181-	53,3
D2S1791	2q31.1	220-	
D2S1267	2q31.1	177-	58,3
D2S1391	2q32.1	109-133	64,3
D2S1361	2q32.1	162-190	
D2S1775	2q32	115-135	55,6
D2S1384	2q33.2	141-161	76,2

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D2S1380	2q34	124-156	
D2S1366	2q34	217-	
D2S1385	2q34	231-251	70,4
D2S1327	2q34	143-171	83,9
D1S1649	2q34	108-136	85,7
D2S1365	2q34	204-	
D2S1371	2q35	101-125	72,1
D2S1338	2q35	165-205	
D2S433	2q35	179-199	64,4
D2S424	2q35	158-194	57,7
D2S1242	2q35	117-183	93,8
D2S1386	2q36.3	219-	
D2S1363	2q36.3	172-192	85,3
D2S439	2q36.3	165-193	61,2
D2S268	2q36.3	119-	50
D2S427	2q37.1	243-263	57,1
D2S1279	2q37.1	147-184	93,8

Marcadors seleccionats en el cromosoma 3

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D3S1028	3q26.31	141-	
D3S1244	3p24.2	177-189	61,5
D3S1359	3p21.31	213-257	89
D3S2303	3p24.3	183-	87,5
D3S2339	3p12.2	147-	62,5
D3S1351	3p25.2	112-124	56
D3S1358	3p21.31	97-121	78
D3S1675	3p25.3	139-155	68,7
D3S1747	3p12.3	118-144	
D3S2430	3p13	234-	
D3S3028	3pter-qter	168-	
D3S3032	3p12.1	126-	
D3S3033	3p21	224-	
D3S3046	3p14.2	201-	
D3S4012	3p24	204-	
D3S4013	3p12.1	249-	
D3S4014	3pter-qter	94-	
D3S4015	3p13.32	250-	
D3S3030	3p26.1	134-154	57,1
D3S3034	3p24.2	147-155	78,6
D3S1764	3q23	225-253	89,3
D3S1537	3p26.1	212-	85,7
D3S2397	3p26.2	200-	64,3
D3S2387	3p26.3	177-213	87,3
D3S2426	3p26.3	177-197	
D3S3050	3p26.3	227-242	59,1
D3S2405	3p25.3	108-	86,4
D3S2450	3p26.1	246-266	71,4
D3S2403	3p25.1	248-292	80,8

Annex

Marçador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D3S2385	3p25.1	142-154	65,1
D3S2431	3p24.3	236-256	
D3S3038	3p24.3	187-219	81,5
D3S2327	3p24.2	146-	75
D3S2396	3p24.1	183-	87,5
D3S2423	3p23-p22.3	196-	
D3S1745	3p22.3	194-	57,7
D3S2432	3p23-22.3	118-170	77,4
D3S1768	3p22.3	186-206	74,1
D3S2447	3p22.3	238-	
D3S3042	3p22.3	206-	
D3S2304	3p22.1	113-	68,8
D3S1767	3p21.31	244-264	61,2
D3S2449	3p21.31	227-	
D3S2456	3p21.31	115-135	71,4
D3S3026	3p21.1	209-226	69,2
D3S1514	3p14.3	200-280	87,5
D3S2402	3p14.3	222-250	74,6
D3S2452	3p14.2	150-166	64,3
D3S1766	3p14.2	208-232	72,7
D3S3040	3p14.2	194-218	60,7
D3S2428	3p13	136-	
D3S4260	3p14.2	214-230	68,6
D3S2454	3p14.1	240-260	61,1
D3S2318	3p11.2	123-	80
D3S2445	3p12.1	216-232	85,7
D3S3039	3p13	196-304	78,6
D3S1542	3p12.3	245-	83,3
D3S2438	3p12.3	188-	
D3S2425	3q26.31	133-153	64,3
D3S2392	3p12.1	132-	83,3
D3S2388	3p12.2	101-125	63,5
D3S2446	3p12.2	235-255	69,8
D3S2451	3p12.1	176-196	80,8
D3S2461	3q11.2-q12.1	158-	
D3S1350	3p25.3	124-208	70
D3S1352	3cen-qter	92-132	76
D3S2462	3q11.2	232-254	77,8
D3S2434	3q13.11	204-	
D3S1749	3q13.11	110-122	
D3S2459	3q12.3	175-203	81,5
D3S3045	3q13.2	175-199	100
D3S1546	3q13.11	124-	56,3
D3S2313	3q13.11	231-	
D3S3029	3q13.13	148-	
D3S3044	3q13.13	161-342	85,2
D3S2443	3q13.12	173-	
D3S2308	3q13.12	184-	87,5
D3S4017	3q13.13	173-189	
D3S1518	3q13.31	211-	56,3
D3S1769	3q13.31-q13.32	249-277	78,1
D3S2457	3q13.31	109-117	57,1
D3S2460	3q13.31-q13.32	143-171	78,6

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D3S2324	3q21.3	182-	57,1
D3S1349	3q22	118-124	80,5
D3S1765	3q21.2	192-216	55,1
D3S2322	3q22.1	149-	68,8
D3S2435	3q23	131-167	79,4
D4S2378	3q24	241-	57,1
D3S2440	3q24	131-163	78,6
D3S2439	3q24	159-	
D3S1746	3q25.1	248-284	77,8
D3S2391	3q25.2	187-	64,3
D3S2463	3q25.1	233-	
D3S2464	3q25.2	218-	
D3S1545	3q26.1	204-	75
D3S2404	3q25.32-q25.33	106-158	87
D3S3052	3q26.1	156-180	72
D3S1543	3q26.1	246-	80
D3S2458	3q26.1	197-	76,9
D3S3035	3q26.1	161-	
D3S1754	3q26.32	162-194	92,3
D3S2328	3q26.31	154-	68,8
D3S2433	3q26.31	197-213	74,1
D3S3051	3q24-q26.1	162-	
D3S1525	3q26.31	124-	62,5
D3S3053	3q26.31	226-238	68
D3S2312	3q26.33	250-	66,7
D3S2427	3q26.31-q26.32	203-245	94,3
D3S3037	3q26.32	189-221	89,3
D3S1521	3q27.1	205-	50
D3S2314	3q26.3	214-	62,5
D3S2455	3q28	180-204	66,7
D3S2436	3q27.3	164-180	63
D3S3043	3q28	155-175	50
D3S2305	3q29	177-	87,5
D3S2306	3q29	211-	50

Marcadors seleccionats en el cromosoma 4

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D3S2441	4p13	198-	
D4S1639	4p13	72-75	
D4S1640	4q31.23	200-228	
D4S2298	4q21.23	215-	57,1
D4S2316	4p15.33	150-	83,3
D4S2416	4q27	208-	
D4S2435	4q21.21	115-	
D4S2618	4q31.22	168-	
D4S2619	4p15.1	194-	
D4S3243	4q21.21	170-	
D4S3245	4q22.1	116-	
D4S3246	4q34.1	148-	

Annex

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D4S3249	4q13.3-q21.1	215-	
D4S3252	4q31.3	250-	
D4S2423	4q28.3	105-121	63
D4S1631	4q13.1	151-	91,7
D4S1510	4q28.3	179-	66,7
D4S1515	4q31.21	245-	80
D4S1621	4p14	120-136	66,98
D4S2374	4q34.3	220-	88,9
D4S2366	4p16.1	120-144	80,7
D4S1511	4p15.33	142-212	62,5
D4S2642	4p15.32	228-244	
D4S1525	4p15.32	250-	87,5
D4S2633	4p15.32-p15.31	200-233	81,5
D4S2639	4p15.32-p15.31	160-192	81,5
D4S1533	4p15.31	188-	90
D4S2310	4p15.1	180-	73,3
D4S1643	4p15.1	181-	76,9
D4S2632	4p15.1	122-162	82,4
D4S2400	4p15.1-p14	219-	
D4S2313	4p14	250-	68,8
D4S1508	4p14	177-237	68,8
D4S2382	4p14	230-248	75
D4S1627	4p13	177-201	70,4
D4S2369	4p13	241-	71,4
D4S3251	4p13	134-150	
D4S3255	4q11-q12	168-184	
D4S3254	4q12	204-236	
D4S1630	4q12	139-155	53,7
D4S1645	4q13.1	225-257	88,5
D4S3248	4q13.1	233-257	
D4S3247	4q13.1	239-240	
D4S2432	4q13.1-q13.2	245-269	71,4
D4S2367	4q13.2	127-147	79
D4S2421	4q13.3	199-	
D4S2641	4q13.3	245-285	64,3
D4S2405	4q13.3	157-	
D4S1517	4q13.3	225-285	100
D4S2314	4q21.1	215-	62,5
D4S2363	4q21.1	121-129	58,3
D4S2640	4q21.1-q21.21	233-257	66,7
D4S2410	4q21.33	236-265	60
D4S2630	4q21.21	194-214	70,4
D4S2402	4q21.22	125-	
D4S2627	4q21.23	127-143	
D4S2409	4q21.23-q21.3	248-268	76
D4S2371	4q22.1	184-	50
D4S2364	4q22.1	120-128	59,3
D4S2433	4q22.3	209-241	75
D4S2404	4q22.1	130-148	53,6
D4S2380	4q22.3	192-224	83,9
D4S2407	4q22.3	128-148	65,4
D4S1628	4q22.3	149-165	69,4
D4S2634	4q23	231-267	77,8

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D4S1647	4q23	132-156	80,8
D4S3256	4q25	228-	
D4S2623	4q25	200-241	
D4S2309	4q25	207-	75
D4S1522	4q26	180-	75
D4S2401	4q28.2	191-	
D4S2307	4q28.2	154-	86,7
D4S2625	4q28.2	207-239	76,9
D4S2424	4q28.2	198-	
D4S2420	4q28.3	152-172	64,3
D4S2318	4q28.3	125-185	91,7
D4S2429	4q28.3	247-	
D4S1644	4q31.21	186-206	82,1
D4S1625	4q31.21	182-210	76,7
D4S2376	4q31.22	201-	50
D4S2631	4q32.1	202-222	
D4S1629	4q32.1	137-157	66,7
D4S2411	4q32.1	195-219	72
D4S2621	4q31.1-q31.3	231-251	60,7
D4S1654	4q32.1	147-167	62,5
D4S1626	4q32.2	166-190	73,3
D4S1653	4q32.2	216-228	71,4
D4S2306	4q32.3	236-	88,9
D4S2414	4q32.3	192-254	92,9
D4S2373	4q33	134-	85,7
D4S243	4q33	173-	57,2
D4S2426	4q33	242-269	76,9
D4S2292	4q32.3	140-200	75
D4S1502	4q32.3	145-	68,8
D4S2637	4q34.1	146-162	71,4
D4S2431	4q34.1	234-258	78,6
D4S2617	4q34.2	186-	
D4S1529	4q34.3	207-	87,5
D4S2635	4q34.3	237-249	63,6
D4S2287	4q35.1	250-	56,3
D4S2688	4q35.2	246-	75
D4S2299	4q35.2	209-	93,3
D4S1652	4q35.2	138-150	75

Marcadors seleccionats en el cromosoma 5

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D5S1518	5p15.1	208-	
D5S1492	5p15.33	114-126	68
D5S580	5p15.31-p15.2	147-187	66,7
D5S807	5p15.2	168-208	76,9
D5S1473	5p14.3	246-262	64
D5S813	5p14.2	220-249	84,2
D5S560	5q34	151-169	
D5S578	5q13.2	110-	66,7

Annex

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D5S581	5p13.1	249-	66,7
D5S612	5q11.2	189-213	64,7
D5S613	5q32	142-162	79,5
D5S1489	5p13.3	122-	
D5S1493	5q23.2	154-	
D5S1498	5q14.3	199-	
D5S2496	5q21.3	144-	
D5S1713	5q35.1	160-208	92,9
D5S1714	5q23.2	204-216	57,1
D5S1469	5q33.1	180-	57,1
D5S601	5p12	113-	80
D5S1385	5p-5q	128-188	81,3
D5S821	5p14.1	161-170	65
D5S814	5p14.1	174-190	66,7
D5S1502	5p14.1	238-254	77,8
D5S1497	5p13.1	227-	
D5S1457	5p13.1	97-127	71
D5S1470	5p13.3	173-209	85,2
D5S1350	5p13.3	246-	81,3
D5S583	5p13.3	250-	71,4
D5S455	5p13.2	170-190	80,4
D5S1490	5p13.1	146-161	57,1
D5S2494	5p13.1	152-184	
D5S2504	5q11.1	187-	
D5S577	5p13.1	175-	56,3
D5S1395	5q11.2	212-	50
D5S1405	5q11.1-q211.2	176-	53,3
D5S1508	5q11.2	234-	
D5S2500	5q11.2	149-181	75
D5S1715	5q11.2	244-268	54,2
D5S2507	5q11.2	224-244	
D5S2796	5q12.3	241-	64,3
D5S1491	5q13.2	202-218	
D5S1404	5q13.3	230-	81,3
D5S1397	5q14.1	176-	75
D5S1719	5q14.3	81-109	76,3
D5S806	5q14.2	196-	75
D5S1726	5q14.3	79-106	88,9
D5S1459	5q14.3	90-110	67,2
D5S1487	5q14.3	194-222	
D5S2495	5q14.3	220-240	
D5S1509	5q14.3	242-	
D5S1722	5q14.3	219-239	78,6
D5S1725	5q14.3	188-212	85,7
D5S1463	5q14.3	168-196	
D5S1462	5q15	194-241	77,1
D5S1467	5q21.1	157-	91,7
D5S2498	5q15	167-256	
D5S1393	5q21.1	155-	70
D5S1496	5q21.1	83-115	
D5S1503	5q21.1	97-110	81,5
D5S1721	5q21.2-q21.3	190-204	76,9
D5S1461	5q21.3	201-	63,6

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D5S820	5q33.3	190-218	66,7
D5S1720	5q22.3	212-232	78,6
D5S592	5q23.1	145-205	85,7
D5S1384	5q23.1	145-205	75
D5S1505	5q23.1	243-275	74,2
D5S818	5q23.2	138-162	68,1
D5S804	5q23.2	228-248	71,4
D5S2497	5q31.1	117-146	
D5S816	5q31.1-q31.2	225-257	82,6
D5S2508	5q31.3	163-191	
D5S812	5q33.1	154-162	50
D5S1499	5q33.3	165-189	
D5S1403	5q33.3	205-	86,7
D5S1392	5q33.2	149-	88,2
D5S1475	5q34	153-	63,3
D5S1471	5q34	152-172	68
D5S805	5q34	156-	73,3
D5S1458	5q35.1	178-190	70,5
D5S1456	5q35.1	191-211	70
D5S1402	5q35.1	248-	81,3
D5S614	5q35.2	153-	66,7
D5S1354	5q35.3	122-	53,3

Marcadors seleccionats en el cromosoma 6

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D6S380	6p21.31	230-	50
D6S390	6q21	152-	66,7
D6S477	6p25.1	213-237	90
D6S957	6q23.2	229-	64,3
D6S1344	6p12.2	176-	62,5
D6S1057	6q22.1	189-	
D6S1268	6p21.31	107-	
D6S1955	6p24.3	146-280	
D6S1963	6p12.3	178-	
D6S495	6q25.1	177-183	67,4
D6S395	6q12	210-	75
D6S962	6q16.3	147-	87,5
D6S942	6p25.3	214-	50
D6S1279	6p24.1	162-182	85,7
D6S1267	6p22.3	138-	
D6S1959	6p22.3	182-198	
D6S1050	6p22.3	175-203	88,5
D6S1281	6p22.2	176-212	77,8
D6S1016	6p22.1	231-256	75
D6S478	6p22.1-p21.33	234-334	
D6S394	6p22.1	108-338	86,7
D6S2260	6p22.1	132-152	78,6
D6S1061	6p21.3	244-	
D6S1285	6p21.31	154-	

Annex

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D6S1051	6p21.31-p21.2	223-239	79,2
D6S389	6p21.2	237-343	81,3
D6S1019	6p21.2	212-234	68,3
D6S400	6p21.1	182-	75
D6S1017	6p21.1	151-171	61,1
D6S1280	6p12.3	172-191	85,2
D6S1276	6p12.1	184-200	
D6S1048	6q11.2-q12	128-148	57,1
D6S1275	6q12	124-148	67,9
D6S965	6q12	246-	100
D6S493	6q13	236-	65,4
D6S1036	6q13	147-	
D6S1052	6q14.1	215-239	77,8
D6S1045	6q14.3	111-137	66,7
D6S1043	6q16.1	103-143	83,1
D6S1013	6q16.1	167-179	63,6
D6S1056	6q16.1	237-273	69,2
D6S1041	6q16.1	172-192	68,3
D6S1054	6q16.1	138-154	60,7
D6S492	6q16.1	200-212	52,1
D6S501	6q16.1	166-182	67,9
D6S475	6q16.3	139-167	88,9
D6S1044	6q16.1	129-	
D6S1060	6q16.1	242-266	55,6
D12S1054	6q21	184-	
D6S474	6q21	151-167	68,8
D6S499	6q22.1	183-	
D6S1954	6q22.2	168-	
D6S1278	6q22.31	150-249	61,5
D6S979	6q22	214-	87,5
D6S1039	6q22.32	245-	
D6S937	6q21	245-	100
D6S1038	6q23.2	178-190	51,9
D6S1272	6q23.2	104-120	
D6S1009	6q23.3	237-273	69,2
D6S1055	6q24.2	123-139	66,7
D6S383	6q24.2	209-	75
D6S958	6q24.1-q24.2	145-	68,8
D6S970	6q24.2	178-	56,3
D6S1269	6q24.2	164-	
D6S1010	6q24.2	228-	75
D6S1049	6q24.2-q24.3	234-	
D6S971	6q24.3	249-	50
D6S494	6q25.1	169-193	50
D6S960	6q25.1	154-	87,5
D6S393	6q25.2	180-	62,5
D5S1724	6q25.2	184-	
D6S972	6q25.3	247-	87,5
D6S969	6q25.3	110-	73,3
D6S955	6q26	153-	50
D6S1273	6q27	145-165	75
D6S1008	6q26	246-	76,9
D6S386	6q27	168-	56,3
D6S503	6q27	248-260	77,8

Marcadors seleccionats en el cromosoma 7

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D7S619	7p11.1	212-	50
D7S622	7p12.1	123-247	80
D7S625	7q31.33	160-175	66,7
D7S809	7q11.23	241-289	
D7S1513	7q21.3	177-	56,3
D7S1528	7q21.11	247-	56,3
D7S1825	7q21.13	124-	
D7S2195	7q35	237-301	87,6
D7S2199	7q36.1	207-	
D7S2843	7p14.2	249-	
D7S2844	7p14.3	111-	
D7S2197	7q32.2-q32.3	225-245	57,1
D7S3021	7q35	219-275	76,9
D7S795	7p14.3	230-	66,7
D7S1520	7q11.22	125-	93,8
D7S1819	7p22.2-p22.1	168-192	50
D7S2201	7p22.1	101-117	60,7
D7S1527	7p21.3	246-	75
D7S1487	7p15.3	177-	66,7
D7S815	7p21.1-p15.3	149-169	55,6
D7S1802	7p15.3	166-188	66,7
D7S2210	7p15.3	141-165	70,4
D7S1795	7p15.3	195-211	52,4
D7S1810	7p15.3	225-	57,1
D7S1838	7p15.3	149-	
D7S2848	7p15.1	192-	
D7S1806	7p15.1	190-198	57,7
D7S817	7p14.3	157-177	73
D7S460	7p14.3	180-196	84,3
D7S2206	7p14.2-p14.1	230-246	66,7
D7S2209	7p14.2-p14.1	239-263	53,6
D7S2846	7p14.1	172-196	
D7S1526	7p14.1	140-252	50
D7S1488	7p13	237-347	87,5
D7S1508	7p12.3-p12.2	113-	50
D7S1818	7p12.3	183-199	73
D7S1830	7p12.1	159-228	83,3
D7S1831	7p12.1	186-	
D7S1485	7p11.2-p11.1	192-223	77,4
D7S793	7p11.2	149-	87,5
D7S1839	7q11.22	206-254	
D7S611	7q11.22	210-	50
D7S1519	7q11.22	208-	56,3
D7S1816	7q11.22	218-250	81,5
D7S613	7q11.23	85-147	63
D7S1843	7q11.22	174-206	
D7S2204	7q21.11	217-269	80,6
D7S1797	7q21.11	220-244	62,9
D7S2212	7q21.11	192-216	73,1
D7S2845	7q21.11	198-215	
D7S820	7q21.11	204-240	84,6

D7S2205	7q21.11	203-227	
D7S627	7q21.13	248-	75
D7S623	7q21.2-q21.3	247-	49
D7S1820	7q21.3	236-260	75,9
D7S821	7q21.3	238-270	82,1
D7S1503	7q22.1	250-	57,1
D7S618	7q21.3	120-180	87,5
D7S792	7q22.1	154-	
D7S796	7q22.1	162-198	87,2
D7S818	7q22.1	154-	
D7S1799	7q22	175-187	76,1
D7S1530	7q22.1-q22.2	214-	81,3
D7S1841	7q22.2	206-	
D7S1817	7q31.1	121-141	82,7
D7S1516	7q31.1	243-	87,5
D7S2214	7q31.1	165-	
D7S3039	7q32.1	121-225	99,5
D7S2847	7q31.1	174-201	
D7S1517	7q31.3	176-	90
D7S1809	7q31.32	200-228	74,2
D7S1842	7q31.32	114-154	
D7S1801	7q31.33	227-	75
D7S1822	7q31.33	243-271	81
D7S2215	7q33	88-92	
D7S1518	7q34	248-	73,3
D7S1824	7q34	163-203	86,9
D7S2202	7q34	149-169	
D7S794	7q35	161-177	68,3
D7S2207	7q35	185-	
D7S1798	7q35	245-257	54
D7S1836	7q36	187-	58,3
D7S1805	7q36.1	197-223	
D7S1510	7q36.1	208-	
D7S1827	7q36.1	142-162	73,1
D7S1815	7q36.1	184-194	
D7S1807	7q36.2	236-	78,6
D7S1823	7q36.2	207-235	

Marcadors seleccionats en el cromosoma 8

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D11S1280	8p23.1	184-	66,7
D13S622	8p21.11	248-	
D8S325	8p12	220-	75
D8S301	8p23.1	121-	75
D8S562	8q22.1	198-222	70
D8S440	8q21.12	228-	50
D8S441	8q21.2	176-	50
D8S452	8q24.3	218-	50
D8S467	8q21.3	210-	50
D8S475	8q22.3	222-373	66,7

Marçador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D8S1024	8q24.3	249-	68,8
D8S1045	8q23.3	122-	75
D8S1478	8p21.2	189-	
D8S1986	8q12.2	234-	
D8S1987	8q13.1	210-	
D8S386	8q24.23	146-206	60
D8S409	8q22.1	232-	50
D8S429	8p21.3	196-	50
D8S454	8p-8q	210-	50
D8S468	8q24.23	210-	50
D8S573	8q24.22	220-232	63
D8S580	8q24.12	187-	
D8S1029	8p-8q	207-	
D8S1031	8q12.1	244-	
D8S1469	8p23.1	218-230	82,1
D8S1130	8p23.1	132-156	77,8
D8S1106	8p22	127-158	72,8
D8S1109	8p22	234-253	79,2
D8S474	8p21.3	240-373	71
D8S322	8p21.3	224-	75
D8S1989	8p21.2	223-247	
D8S1048	8p21.2	206-	75
D8S500	8p21.1	177-	66,7
D8S1463	8p12	111-	
D8S499	8p12	155-	87,5
D8S1477	8p12	139-179	
D8S1104	8p11.21	129-145	77,8
D8S302	8q11.23	212-	66,7
D8S587	8q11.22	154-186	70,7
D8S1051	8p11.21	206-	53,3
D8S567	8q11.23	200-	
D8S591	8q11.23	154-	80
D12S1060	8q11.23	200-216	
D8S593	8q12.1	195-	94,2
D8S566	8q12.1	153-	87
D8S1464	8q12.1	218-234	
D8S1102	8q12.1	184-200	66,7
D8S374	8q12.1	212-248	86,7
D8S1113	8q12.1	215-245	80
D8S1136	8q13.1	241-261	74,2
D8S1473	8q12.3	206-222	78,6
D8S1141	8q12.3	137-153	74,1
D8S381	8q13.2-q13.3	230-280	50
D8S1105	8q21.12	241-257	63,5
D8S1144	8q21.11	141-169	
D8S1474	8q21.11	179-	
D8S1134	8q21.11	139-159	58,3
D8S594	8q21.11-q21.12	203-	77,8
D8S1468	8q21.12	250-	77,8
D8S569	8q21.13	179-	75,9
D8S1475	8q21.13	168-193	78,6
D8S1137	8q21.12	170-194	88,5
D20S201	8q21.3	230-250	

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D8S1146	8q21.3	232-	
D8S412	8q21.3	248-383	50
D8S346	8q24.23-q24.3	232-291	55
D8S323	8q24.12	200-	60
D8S1049	8q22.3	153-	75
D8S385	8q22.3	147-	75
D8S1127	8q22.1	153-176	60
D8S470	8q22.2	220-227	50
D8S1131	8q23.1	144-180	82,1
D8S1132	8q23.1	139-171	90,3
D8S1047	8q23.2	181-	81,3
D8S1147	8q23.3	167-183	
D8S1472	8q23.2	240-	
D8S588	8q23.3	177-197	75
D8S1139	8q23.3	212-232	71
D8S1465	8q23.3	192-	
D8S1142	8q23.3	238-388	69,2
D8S384	8q24.11	206-226	56,3
D8S592	8q24.11	148-162	53,6
D8S1112	8q24.12	206-234	68
D8S586	8q24.12	242-290	86,2
D8S1138	8q24.13	181-	
D8S1128	8q24.21	240-268	75,8
D8S378	8q24.22	122-158	82,9
D8S1462	8q24.22	155-165	75
D8S1466	8q24.22	110-134	
D8S1111	8q24.23	146-	81,8
D8S1050	8q24.23	184-	
D8S1520	8q24.3	214-	93,8
D8S373	8q24.3	184-213	77,5
D8S315	8q24.23	142-384	91,7

Marcadors seleccionats en el cromosoma 9

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D9S941	9p23	205-	
D9S1125	9q31.3	179-	
D9S2025	9p21.1	217-	
D9S932	9p21.3	146-	84,6
D9S937	9p24.1	197-	
D9S324	9p24.1	237-	78,6
D9S921	9p23	175-232	87
D9S775	9p23	180-	62,5
D9S925	9p22.2	165-199	81,5
D9S251	9p21.1	250-	62,5
D9S1121	9p21.3	184-216	71,4
D9S746	9p21.2	233-265	76,4
D9S319	9p21.1	163-179	56
D9S1118	9p21.1	141-177	
D9S304	9p21.1	135-175	86,2

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D9S229	9p13.1	247-	90
D9S238	9q12	184-	66,7
D9S739	9q21.13	234-274	82,6
D9S745	9q21.11	144-161	75
D9S301	9q21.12	209-241	83,7
D9S936	9q21.2	224-	
D9S927	9q21	118-138	53,6
D9S1115	9q21.13	177-	
D9S967	9q21.2-q21.31	163-187	66,7
D9S1122	9q21.13	186-210	
D9S303	9q21.32	148-168	86,2
D9S933	9q21.31	248-296	
D9S768	9q21.31	250-	81,8
D9S1119	9q21.32	151-175	92,3
D9S924	9q21.32	198-218	
D9S252	9q21.33	212-	75
D9S776	9q21.33	119-	58,3
D9S249	9q21.33	151-	50
D9S777	9q22.1	249-	86,7
D9S253	9q22.1-q22.2	183-	50
D9S906	9q22.2	132-	64,3
D9S299	9q31.2	192-	70
D9S748	9q31.2	242-254	55,6
D9S300	9q31.2	203-	
D9S2026	9q31.3	107-131	
D9S931	9q33.1	146-	
D9S747	9q31.3	182-202	66,7
D9S2128	9q31.3	123-151	89,3
D9S907	9q33.1	242-290	88,5
D9S1126	9q33.1	160-178	81,8
D9S926	9q33.1	198-226	78,6
D9S241	9q33.1	208-	87,5
D9S934	9q33.1	206-230	64,3
D9S242	9q33.3	148-208	87,5
D9S778	9q33.3	209-	85,7
D9S1113	9q33.3	186-	
D9S2160	9q34	84-124	75
D9S2161	9q34	152-180	79
D9S2173	9q34	165-	65,3
D9S752	9q34.11	180-	73,3

Marcadors seleccionats en el cromosoma 10

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D10S1212	10p15.3	175-	57,9
D10S526	10p15.3	186-270	77,1
D10S1234	10p15.3	223-243	
D10S511	10p11.23	248-	75
D10S516	10q22.3	220-280	72,2
D10S1150	10q26.11	208-	62,5

Annex

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D10S1162	10q21.2	208-	68,8
D10S1163	10p11.21	179-	62,5
D10S1166	10p11.22	175-	75
D10S1440	10p13	136-164	61,5
D10S1157	10q24.1	180-	
D10S1431	10p14	140-164	58,3
D10S1420	10p14	148-	
D10S1216	10p14	207-235	68
D10S2325	10p13	119-154	
D10S1430	10p13	145-168	50
D10S1159	10p14	184-	50
D10S674	10p13	218-254	69,4
D10S1423	10p12.33	236-238	83,3
D10S1417	10p12.1	106-	
D10S611	10p12.1	146-158	63,3
D10S1160	10p12.1	181-	62,5
D10S1426	10p11.23	152-180	70,4
D10S2326	10p11.23	108-172	
D10S507	10p11.23	148-	75
D10S1243	10p11.22	181-229	92,6
D10S675	10p11.22	102-122	60,7
D10S1424	10p11.1-q11.2	172-187	58,3
D10S1247	10p11.2	191-203	71,4
D10S1217	10p11.21	143-179	56,5
D10S508	10p11.21	186-	62,5
D10S513	10p11.21	214-	81,3
D10S1244	10q21.1	186-199	
D10S609	10q21.2	232-252	69,2
D10S1241	10q21.3	145-161	78,6
D10S1422	10q21.3	237-256	85,7
D10S1428	10q21.3	238-262	82,4
D10S1211	10q21.3	141-	66,7
D10S1418	10q21.3	157-208	71,4
D10S676	10q22.1	175-199	89,8
D10S1432	10q22.1	157-185	92,6
D10S1146	10q22.1	164-246	87,2
D10S1437	10q22.3	180-	
D10S2327	10q22.3	200-228	
D10S523	10q22.1	212-	75
D10S1242	10q23.31	139-	85,7
D10S1419	10q23.31	243-271	
D10S677	10q23.33	197-225	85,7
D10S520	10q23.33	145-190	89,2
D10S1171	10q23.31	207-	68,8
D10S1173	10q23.32	212-	81,3
D10S1433	10q24.2	149-	
D10S1239	10q24.32	160-184	77,8
D10S1240	10q24.32	197-221	
D10S521	10q25.1	155-215	83,3
D10S1245	10q25.1	222-	
D10S1434	10q25.1	146-178	64,3
D10S1246	10q25.1	213-245	73,1
D10S1429	10q25.2	248-260	

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D10S1425	10q26.11	168-184	52,2
D10S1236	10q26.11	121-137	55,6
D10S1213	10q26.13	93-133	83,6
D10S1439	10q26	173-193	
D10S1248	10q26.3	241-261	
D10S505	10q26.3	247-	53,3

Marcadors seleccionats en el cromosoma 11

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D2S1263	11q13.3-q13.4	152-	50
D11S1984	11p15.5-p15.1	170-202	81,5
D11S1908	11q12.3	154-	87,5
D11S1918	11p-11q	179-	86,7
D11S2016	11p11.2	231-290	86,4
D11S4461	11p-11q	244-	
D11S4462	11p-11q	206-	
D11S4905	11p15.4	157-	81,8
D11S2013	11p-11q	250-	33,3
D11S2369	11p-11q	230-	96,4
D11S1020	11p15	227-249	
D11S1997	11p15.4	201-229	
D11S4465	11p15.5	143-175	
D11S1999	11p15.5	109-137	78
D11S1921	11p15.5	213	57,1
D11S1397	11p15.5-p15.2	142-150	65,3
D11S1981	11p15.5-p15.2	134-178	84,6
D11S2364	11p15.5-p14.1	112-140	
D11S1977	11p14.2	111	89,7
D11S2001	11p14.2-11p13	126-158	96,4
D11S2014	11p14.2-11p13	159-183	61,5
D11S2010	11p14.2-11p13	110-126	66,1
D11S1392	11p14.2-11p13	200-220	88,9
D11S2008	11p14.2-11p13	134-135	87,3
D11S1980	11p14.2-11p12	198	78,6
D11S1393	11p12	198-210	60,4
D11S1385	11p12-11cen	197-217	73,5
D11S1395	11p11.12	220-232	62,5
D11S2365	11p11-q12	241-242	71,4
D11S1983	11q12-q13.1	208-251	83,6
D11S1985	11q12.1	142-286	82,3
D11S1368	11q12	190	64
D11S956	11q12-q13.1	247	88,3
D11S1298	11q12	180	85,7
D11S1286	11q12	122-	50
D11S1369	11q13.4-q13.5	180	83,3
D11S2371	11q13.4-q21	193-213	64,3
D11S2011	11q14.1	162-163	
D11S1976	11q14.1-q23.3	172-173	56,7
D11S2002	11q14.1	220-252	80,9

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D11S1396	11q14.2	136-176	77,8
D11S1979	11q14.3	238-262	78,6
D11S1367	11q14.3-q21	224-244	70,2
D11S2009	11q14.3-q24.1	214	
D18S864	11q14.1	136-141	
D11S1366	11q22.1	241-242	71,4
D11S898	11q22.1	140-156	71,4
D11S1394	11q22.1-q22.3	222-238	67,9
D11S1982	11q22.1-q25	134	63,6
D11S2000	11q22.3	199-235	92,3
D11S2017	11q22.3	109-133	67,9
D11S2366	11q22.3	185-	
D11S2004	11q22.3	205-	
D11S1391	11q22.3-q23.1	158-178	75
D11S1986	11q23.1	176-252	88,1
D11S1284	11q24.1	177-	50
D11S1987	11q23.1	185-209	68,3
D11S1998	11q23.2-q24	129-165	69
D11S4460	11q23.3	200-201	
D11S4464	11q23.3-11q24	225-249	
D11S488	11q24-q25	243	87,6
D11S2018	11q24	83-84	
D11S4463	11q24	123	
D11S1304	11q24-11q25	209	73,3

Marcadors seleccionats en el cromosoma 12

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D4S2372	12q24.31	165-	
D12S1285	12p-12q(12p13.3)	248-322	
D12S388	12p13.33	89-131	75
D12S389	12p13.33	139-159	78,3
D12S293	12q21.2	247-	66,7
D12S294	12p-12q(12q21)	150	56,3
D12S392	12q24.33	137-154	66,7
D12S826	12p-12q	113	68,8
D12S836	12p-12q(12q23.1)	182	63,6
D12S1073	12q23.1	240-	
D12S1287	12p-12q	186	
D12S1295	12p-12q	201	
D12S2074	12p-12q	153	
D12S1024	12p-12q	148	53,9
D12S1068	12p-12q(12q21)	199	64,3
D12S300	12p-12q	250	72,7
D12S825	12p-12q(12p13.3)	149	75
D12S833	12p-12q(12q12)	154	64,3
D12S839	12p-12q	178	50
D12S1050	12p13.33	246-270	76,2
D12S372	12p13.33	174-190	50
D12S1062	12p13.33	181-182	

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D12S808	12p13.32-p13.31	167	86,7
D12S397	12p12.3	210	93,3
D3S2395	12p13.31	177-217	
D12S391	12p12.3	211-251	92,2
D12S1303	12p12.3	185-207	66,7
D12S373	12p12.3	208-224	82,1
D12S1027	12p12.3	244-245	78,6
D12S1066	12p12.3	208-224	81,5
D12S1057	12p12.3-p11.21	218-238	66,7
D12S823	12p12.1	119	80
D12S1299	12p11.23-q12	213-214	
D12S1292	12p11.2	147-184	61,5
D12S290	12p11.2	149	68,8
D12S2080	12p11-q11	172-200	
D12S1029	12q12	134-135	
D12S1301	12q12	100-120	
D12S297	12q13.11	205	87,5
D12S813	12q13.11	249	56,3
D12S390	12q13.12-q13.13	148	80
D12S398	12p11.2-q14	120-144	70,4
D12S298	12q13.13-q14.1	245	68,8
D12S1294	12q14.1-q14.2	197-198	85,7
D12S375	12q14.2-q14.3	175-176	90,9
D12S1291	12q14.2-q14.3	177-213	57,1
D12S1069	12q15	188-	
D12S1025	12q14.3-12q15	186-187	83,3
D12S1052	12q14.3-12q15	149-165	64,5
D12S299	12q14.3-12q15	184	68,8
D12S1049	12q14.3-12q15	198-199	
D12S376	12q14.3-12q15	147-148	72,7
D12S1061	12q21.2	246-	
D12S1297	12q15-q21.3	235-247	63
D12S824	12q21.31	245-	81,3
D12S379	12q21.2-q21.3	196-212	94,9
D12S853	12q21.32	123-	75
D12S1064	12q21.31	173-197	96,3
D12S1071	12q21.33	209-	
D12S1286	12q21.31	175-176	
D12S2076	12q21.32	186-202	
D12S829	12q21.33	151	86,7
D12S1055	12q23.1	225-	93,8
D12S296	12q22	215	62,5
D12S302	12q22	148	75
D12S2081	12q22	113-126	
D12S1051	12q22	249-281	77,6
D12S1300	12q22	120-121	68
D12S393	12q22	242-262	70,4
D12S1058	12q22	116-117	
D12S1063	12q22	195-227	85,2
D12S1059	12q22	186-206	68,3
D12S2392		250-	
D12S1030	12q22-q23.1	243-271	60,4
D12S1075	12q23	188-205	

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D12S2072	12q23.1-q24	190-218	
D12S814	12q33.1	212-	56,3
D12S1335	12q23	208	62,5
D12S1023	12q24.1-q24.2	149-161	65,1
D12S395	12q24.3	223-247	66
D12S378	12q24.3	156-172	67,9
D12S834	12q24.33	117	62,5

Marcadors seleccionats en el cromosoma 13

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D13S787	13p11-q11	250-267	70,8
D13S243	13cen-13q12.2	147	50
D13S893	13q12.3-q13.1	181-182	64,3
D13S1493	13q12.3	223-248	
D13S256	13q13.3-q22.3	154	75
D13S257	13q13.3-q21.1	250	75
D13S788	13q13.3-q21.1	240-270	83,5
D13S632	13q13.3-q22.3	246	68,8
D13S894	13q14.11	189-190	70,4
D13S1491	13q14.11	149-150	
D13S765	13q14.11	193	75
D13S325	13q14.12-q14.2	195-231	73,1
D13S297	13q14.13-13q14.2	115-127	69
D13S294	13q14.3	94	82,4
D13S295	13q14.3	75	68,3
D13S296	13q14.3	123-142	77
D13S298	13q14.3	110-124	72,7
D13S300	13q14.3	212-234	76,4
D13S301	13q14.3	138-158	77
D13S887	13q14.3	196-211	51,9
D13S326	13q14.3	150-162	52,4
D13S784	13q21.1	186-210	
D13S321	13q21.1	201-202	66,7
D13S803	13q21.1	139-163	
D13S1492	13q21.1	129-165	
D13S768	13q21.1	144-156	59
D13S242	13q21.1-q22.3	151	69,2
D13S801	13q21.31	170-194	77,8
D13S258	13q21.33	180	87,5
D13S303	13q21.33-q31.3	179	75
D13S789	13q22.3	147-171	
D13S317	13q22.3-13q32	175-199	84,1
D13S921	13q22.3	214	68,8
D13S251	13q22.3-q31.1	212	50
D13S790	13q22.3	183-211	77,1
D13S628	13q31.1	247	68,8
D13S767	13q31.1	160-161	
D13S794	13q31.1	159-171	57,1
D13S795	13q31.1-13q32	100-112	63,6

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D13S785	13q31.3	243-263	
D13S631	13q31.3-13q32	209	93,8
D13S1494	13q31.3	177-193	
D13S892	13q31.3-13q32.1	193-213	82,1
D13S797	13q31.3-q33.1	195-196	64,3
D13S322	13q31.3-13q32.1	147-148	
D13S254	13q32.1	214	87,5
D13S786	13q32.1	189-205	74,6
D13S888	13q32.3-13q34	175-176	
D13S796	13q33.3	152-168	66,1
D13S248	13q33.3	214	81,3
D13S895	13q34	155-167	64

Marcadors seleccionats en el cromosoma 14

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D14S243	14pter-14qter	121	
D14S559	14pter-14qter	247	56,3
D14S561	14pter-14qter	120	68,8
D14S609	14pter-14qter	167	
D14S619	14pter-14qter	148	
D14S736	14pter-14qter	191	
D14S743	14pter-14qter	141	
D14S604	14pter-14qter	206	90
D14S241	14pter-14qter	183	
D14S245	14pter-14qter	155	
D14S585	14p12	248	50
D14S582	14p11.2-14q11.2	205	61,5
D14S122	14p11.1	193-229	100
D14S615	14q11.2	158-174	64,3
D14S608	14q11.2	188-224	77,8
D14S740	14q11.2	227-228	69,2
D14S297	14q12	96-116	59,6
D14S121	14q12-q13.3	146	81,3
D14S741	14q12	250-276	57,1
D14S587	14q12-q22.3	250-278	80,5
D14S562	14q12-q22.1	206	68,8
D14S306	14q13.1	190-210	87,2
D14S556	14q13.1-14q13.2	210	68,8
D14S613	14q21.3	150-151	
D14S304	14q21.3	249-250	
D14S566	14q21.3	109-149	76,2
D14S1401	14q22.2	177-189	60,7
D14S747	14q22.3	192-220	70,4
D14S139	14q22.3	231-270	87,5
D14S607	14q22.3	151-152	
D14S750	14q22.3	164-165	91,7
D14S586	14q22.3	215	53,9
D14S307	14q22.3-q24.1	181-182	
D14S298	14q22.3-q24.1	202	64

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D14S125	14q22.3-q24.1	188-212	68,8
D14S119	14q24.1	169	87,5
D14S620	14q24.1	114-122	
D14S588	14q24.1-q24.2	117-141	68
D14S603	14q24.2	116-136	60,3
D14S120	14q24.3-14qter	245	50
D14S555	14q24.3	211	62,5
D14S739	14q24.3	181-205	
D14S616	14q24.3	207-231	75
D14S612	14q31.1	210-237	69,4
D14S618	14q31.1	249-250	
D14S749	14q31.3	158-182	74,1
D14S617	14q31.3	140-173	76,7
D14S553	14q31.3	247-294	81,3
D14S737	14q32.13	223-	
D14S611	14q32.11	151-171	63,6
D14S543	14q32.2	246-272	56,3
D14S118	14q32.2	248-274	80

Marcadors seleccionats en el cromosoma 15

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D15S661	15p-15q	184	
D15S815	15p-15q	113	
D15S820	15p-15q	250	
D15S660	15p-15q(15q24)	207	71,4
D15S520	15q24.1	170-195	65,7
D15S532	15p-15q	176	68,8
D15S1365	15q12	230-326	87,1
D15S817	15q11.2-q12	144-172	78,6
D15S217	15q11.2-q12	191-192	91,7
D15S1233	15q12	176-196	
D15S144	15q12	101	64,3
D15S221	15q14	149-173	85
D15S537	15q13.2-q14	185	62,5
D15S659	15q14-q15.1	174-206	100
D15S172	15q15.2-q15.3	123	68
D15S143	15q21.1	189-199	64
D15S195	15q21.3	153	75
D15S190	15q21.3-15qter	247	50
D15S643	15q21.3	195-223	85,2
D15S644	15q22.2	203-204	74,1
D15S534	15q22.2	207	56,3
D15S814	15q22.33	212-213	42,9
D15S818	15q23-q24.1	150-170	74,1
D15S823	15q25.1	240-241	
D15S821	15q25.3	250-251	
D15S189	15q25.3	209	81,3
D15S819	15q25.3	158-159	
D15S816	15q26.1	128-148	55,6

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D15S230	15q26.1	197	89,5
D15S642	15q26.2-qter	195-218	73

Marcadors seleccionats en el cromosoma 16

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D4S2413	16p11.2	222-	
D16S676	16p-16q	177	68,85
D16S475	16p16.3	160-189	83,8
D16S2622	16p-16q	134	70,4
D16S468	16p16.3	198	
D16S674	16p-16q	208	
D16S751	16p-16q	224	
D16S761	16p-16q	147	
D16S763	16p-16q	228	
D16S765	16p-16q	165	
D16S767	16p-16q	158	
D16S3404	16p13.3	90-122	80
D16S467	16p-16q	135	58
D16S675	16p13.3	238	86,7
D16S768	16p13.3	133-134	57,1
D16S678	16p13.2	177-	75
D16S687	16p13.3	210	61,5
D16S2619	16p13.2	142-162	78,6
D16S766	16q12.1	150-151	
D16S541	16q11.2-q13	160	70,8
D16S2623	16q11.2-q13	221-251	66,7
D16S771	16q11.2-q21	245-273	78,6
D16S685	16q12.1	123	87,5
D16S540	16q12.1-q13	232-248	59,6
D16S770	16q13-q21	127-139	60,7
D16S492	16q21	213	73,3
D16S3253	16q21	167-187	
D16S3255	16q21	177-201	
D16S526	16q21	205	100
D16S310	16q21	162	75
D16S2624	16q21-q23.1	132-148	84,6
D16S688	16q21	182	50
D16S3254	16q22.3	238	
D16S752	16q22.2	101-129	92,9
D16S2625	16q23.1	171-191	
D16S539	16q23.1	148-172	76,9
D16S2621	16q22.3-qter	239-263	82,6
D16S476	16q24.1-q24.2	144-181	87,5

Marcadors seleccionats en el cromosoma 17

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D17S1533	17p13.3	210-226	
D17S1298	17pter-17qter	246-254	55,6
D17S914	17pter-17qter	210	83,3
D17S967	17pter-17qter	93	75
D17S1156	17pter-17qter	139	
D17S1170	17pter-17qter	156	
D17S976	17pter-17qter	234	89,6
D17S1153	17pter-17qter	178	75
D17S1163	17pter-17qter	154	75
D17S1169	17pter-17qter	116	50
D17S1305	17pter-17qter	213	
D17S1307	17pter-17qter	209	
D17S1537	17p13.3	190-191	78,6
D17S974	17p13.1-p12	201-217	82,1
D17S1289	17p13.1	149-	
D17S1303	17p13.1	225-245	75
D17S969	17p13.1	116-140	72,6
D17S71	17p12-p11.2	192	63
D17S1294	17q11.1-q12	248-272	65,6
D17S1333	17q11.2-q21.33	142	70
D17S1343	17q11.2-q21.33	143	60
D17S1139	17q12-q21.33	145	54
D17S846	17q12-q21.33	215	82,9
D17S1540	17q12	182-194	53,6
D17S1158	17q12-q21.1	247	12,5
D17S1299	17q21.1-q21.31	188-208	71
D17S902	17q21.31	155-	83,5
D17S965	17q21.31	185	80
D17S1302	17q21.33-q22	147-148	
D17S1306	17q22	179-180	100
D17S1161	17q22	175	87,5
D17S1290	17q22	170-210	81,5
D14S307	17q32.2	181-	
D17S1300	17q24,.2-q24.1	242-243	
D17S1534	17q24,.2-q24.1	236-237	85,7
D17S1304	17q24.3	144-164	60
D17S2059	17q24.3	239-263	
D17S968	17q24.3	164	75
D17S1535	17q24.3	176-192	
D17S1301	17q24.3	147-163	57,1
D17S674	17q25.3	124-	75

Marcadors seleccionats en el cromosoma 18

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D18S867	18pter-qter(18q21.3)	159	
D18S818	18p11.31	176	66,7
D18S976	18p11.31	171-198	91,7

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D18S973	18p11.31	213-214	75
D18S391	18p11.31	182	75
D18S967	18p11.31	227-239	63
D18S542	18p11.21	191-192	75
D18S869	18p11.21-q11.2	178-198	
D18S877	18p11.21-q11.2	117-137	75
D18S1001	18pcen-q11.2	228	58
D18S866	18q11.2	200-212	57,1
D18S974	18q12.1	245-246	66,7
D18S847	18q12.1	212-232	66,7
D18S536	18q12.1	146-166	69,6
D18S535	18q12.3	131-155	92,6
D18S978	18q12.3	250-251	92,9
D18S865	18q12.3	183-199	74,2
D18S972	18q12.3	190-210	
D18S548	18q12.3	209-228	62,2
D18S872	18q12.3	128-144	63,3
D18S539	18q21.1	248-268	63
D18S868	18q21.2-q21.33	189-190	
D18S499	18q21.2-q21.33	150	71
D18S537	18q21.33	190-191	75
D18S538	18q21.33-q22.1	201-202	
D18S968	18q22.1	147-148	
D18S817	18q22.2	249-	58,3
D18S544	18q22.1	149-150	
D18S878	18q22.1	169-170	
D18S876	18q22.1	171-172	
D18S979	18q22.3	153-169	71,4
D18S848	18q22.3	87-103	50
D18S812	18q22.3	246	62,5
D18S882	18q22.3	250-251	
D18S874	18q22.3-q23	177-191	53,9
D18S870	18q22.3-q23	151-167	
D18S850	18q22.3-q23	202-203	69,2
D18S871	18q23	136-156	56

Marcadors seleccionats en el cromosoma 19

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D19S581	19pter-qter(19p13.2)	246	90
D19S560	19pter-qter	152	73,3
D19S727	19pter-qter	205	50
D19S595	19pter-qter	190	
D19S710	19pter-qter(19p13.11)	147-148	
D19S712	19pter-qter(19q13.31)	168	
D19S717	19pter-qter	145	
D19S714	19pter-qter	228-229	71,4
D19S591	19p13.3	96-112	63,5
D20S90	19p13.3	200-	68
D19S549	19p13.3	185	62,5

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D19S594	19p13.3	210	
D19S1034	19p13.3	222-242	
D19S403	19p13.3	234	56
D19S586	19p13.2	222-250	79,7
D19S394	19p13.2	227-267	90
D19S558	19p13.3-p13.2	151	81,3
D19S564	19p13.2	169	87,5
D19S588	19p13.2	153-185	82,1
D19S432	19p13.12	182-204	60,7
D19S252	19p13.2-p13.11	108-128	64,2
D19S579	19p13.11	184-	66,7
D19S1195	19p13.2-p13.11	155	
D19S1037	19p12	117-141	
D19S1035	19q11	220-221	
D19S1036	19q12	204-216	
D19S433	19q12	199-221	71,4
D19S555	19q12-q13	212	62,5
D19S719	19q12-q13	249-276	66,7
D19S587	19q13.11	143-155	52
D19S713	19q13.13	199-200	57,1
D19S582	19q13.13-q13.2	136	60
D19S557	19q13.2	145	
D19S552	19q13.2	176	58,3
D19S554	19q13.2	176	68,8
D19S400	19q13.2	190-223	81,3
D19S559	19q13.2	182	87,5
D19S1181	19q13.3	147-159	
D19S397	19q13.32	245	68,8
D19S601	19q13.32	137-228	
D19S589	19q13.41	161-181	64,9

Marcadors seleccionats en el cromosoma 20

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D20S155	20p-20q	124	50
D20S164	20q13.32	205-	66,7
D20S166	20p-20q	198	86,7
D20S168	20p-20q	209	58,3
D20S432	20p-20q	152	80
D20S435	20p-20q	179	56,3
D20S476	20p-20q	145	78,3
D20S600	20p-20q	146	
D20S1084	20p-20q	157	
D20S477	20p-20q	249-250	74,1
D20S485	20p-20q	148	50
D20S603	20p-20q	162	81
D20S81	20p-20q	250	50
D20S90	chr19	200	68
D20S154	20p-20q	149	50
D20S165	20p-20q	100	81,3

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D20S482	20p13	152-153	75
D20S156	20p13-p12.3	147-177	87,5
D20S82	20p12.3	246	75
D20S162	20p12.3	246	66,7
D20S599	20p12.2-p12.1	224-225	
D20S604	20p12.2-p12.1	131-147	85,7
D20S605	20p12.1-p11.23	114-126	
D20S152	20p12.1	208	62,5
D20S161	20p12.1	160-190	75
D20S87	20p12.1-p11.23	185	87,5
D20S148	20p11.23-q11.22	240-357	75
D20S484	20p11.1-q11.22	181-209	92,9
D20S486	20p11.1-q11.21	231-251	68,2
D20S601	20q11.22	125-145	
D20S478	20q12	243-275	67,9
D20S206	20q12	163-164	68,2
D20S85	20q12	123	87,5
D20S607	20q12	188-228	82,1
D4S2434	20q13.2	90-114	
D20S89	20q13.12-q13.13	120	93,8
D20S481	20q13.13	217-253	84,1
D20S428	20q13.31	237	93,8
D20S1083	20q13.31	141-157	
D20S606	20q13.31	144-159	
D20S1085	20q13.31	177-191	
D20S468	20q13.31	194-212	
D20S469	20q13.31	207-235	53,6
D20S430	20q13.31	215-	72,7
D20S94	20q13.32-qter	140	100

Marcadors seleccionats en el cromosoma 21

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D21S1411	21q22.3	239-	93,3
D21S1268	21q21.3	178-198	77,1
D21S1808	21q22.11	147-	
D21S1432	21q21.1	127-155	52,4
D21S1433	21q21.1	240-272	84,6
D21S11	21q21.1	172-264	90
D21S1261	21q21.1	185-211	82,5
D21S1264	21q21.2	119-129	78,8
D21S1436	21q21.1	164-192	87,2
D21S1434	21q21.1	187-188	
D21S1437	21q21.1	119-143	77,8
D21S1240	21q21.1	249-	93,3
D21S1994	21q21.1	236-264	
D21S1409	21q21.2	173-233	81,3
D21S1244	21q21.2	247-	62,5
D21S1435	21q21.3	163-191	70,4
D21S226	21q21.3	151-159	59,3

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D21S1442	21q21.3	237-269	87,5
D21S1413	21q22.11	180-	87,5
D21S1444	21q22.13	232-260	
D21S1809	21q22.2	207-222	75
D21S1446	21q22.3	209-223	77,8

Marcadors seleccionats en el cromosoma 22

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D22S694	22q12.1	124-	
D22S685	22q12.3	172-196	73,6
D22S691	22q12.3	226-270	88,9
D22S445	22q12.3-q13.2	110-130	61,5
D22S692	22q13.1	155-171	77,8
D22S431	22q11.23	249	62,5
D22S417	22p-22q(22q11.2-q13.2)	183	93,3
D22S442	22p-22q	210	
D22S530	22p-22q	212	50
D22S531	22p-22q(22q12.1-qter)	178	62,5
D22S532	22p-22q(22q13.31)	175	62,5
D22S533	22p-22q(22q11.2-q12.1)	185	68,8
D22S536	22p-22q	149	53,3
D22S683	22q12.3	168-214	89,3
D22S689	22p-22q(22q12.1)	202-226	80,4
D22S684	22p-22q	230-231	100
D22S693	22q12.1	232-	92,3
D22S686	22p-22q(22q11.1-q11.2)	180-220	85,7

Marcadors seleccionats en el cromosoma X

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
D2S1401	Xp22.31	150-	
D21S1807	Xq11.1	123-	
DXS6807	Xp22.32	250-273	60,4
DXS1356	Xq28	195-233	
DXS6784	Xp11.23	212-	87,5
DXS1188	Xq22.3-q23	246-	87,5
DXS1252	Xq22.3-q23	101-104	
DXS2505	Xp11.22	212-	75
DXS6808	Xq26.2	250-	
DXS6811	Xq25	215-	
DXS6812	Xq13.1	136-	
DXS7130	Xq24	191-	
DXS8378	xp22.31	211-	
DXS2504	Xp22.12	176-	62,5
DXS6810	Xp11.3	208-223	71,7

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
DXS8379	Xp11.3	187-199	
DXS10067	Xp11.4	175-215	
DXS337	Xp11.3-p11.23	163-193	55
DXS6785	Xq11.1	143-163	87,5
DXS7128	Xq11.1	196-	
DXS981	Xq13.1	182-220	
DXS6800	Xq21.1	197-221	74,5
D12S396	Xq21.1	220-	
DXS10069	Xq21.2	123-163	
DXS7129	Xq21.2	180-	
DXS6803	Xq21.31	110-126	100
DXS6801	Xq21.32	126-134	
DXS6809	Xq21.33	241-273	
DXS6789	Xq21.33	118-150	
DXS6799	Xq21.33	241-261	71,9
DXS6797	Xq22.3	250-270	100
DXS7133	Xq22.3	115-127	85,7
DXS6804	Xq23	172-196	
DXS6791	Xq25	166-	
DXS1187	Xq26.2	124-	75
DXS10068	Xq26.1	231-271	
DXS6854	Xq25-q26.1	93-119	73
DXS6855	Xq25	170-184	68,4
DXS7127	Xq27.3	246-260	69,2
D3S2390	Xq27.1-q27.2	226-254	
DXS10066	Xq27.3	85-175	
DXS6806	Xq27.3	172-	100
DXS7423	Xq28	161-181	73
DXS10049	Xq28	234-300	
DXS10053	Xq28	217-271	
DXS1176	Xq28	247-263	62

Marcadors seleccionats en el cromosoma Y

Marcador	Localització	Mida (pb)	Heterozigositat (%)
DYS389	Yq11.21	247-	
DYS394		245-	
DYS19	Yp11.2	186-202	66,12
DYS390	Yq11.22	212-	