

ESTUDI I DIAGNÒSTIC D'ANEUPLOÏDIES EN OÒCITS HUMANS

MARIONA RIUS, ALBERT OBRADORS, MARIA OLIVER, JORDI BENET I JOAQUIMA NAVARRO

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

Adreça per a la correspondència: Joaquina Navarro. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra, edifici M. 08193 Bellaterra.
Adreça electrònica: joaquina.navarro@uab.cat.

RESUM

La disponibilitat de material biològic descartat de cicles de fecundació *in vitro* (FIV) ha estat molt valuós per a l'estudi d'aneuploidies en els primers estadis del desenvolupament embrionari. L'estudi citogenètic d'oòcits humans requereix l'anàlisi per separat de l'oòcit en estadi de meiosi II i el corresponent primer corpuscle polar amb dotació cromosòmica complementària. La hibridació *in situ* fluorescent i les seves variants, com el cariotipatge espectral, l'encebador *in situ* o la FISH de centròmers multicolor, han estat molt útils, tot i que requereixen la fixació prèvia de la cèl·lula. Com a alternativa, la hibridació genòmica comparada no requereix la fixació de la cèl·lula i, a més, permet estudiar el complement cromosòmic sencer. La freqüència d'aneuploidia dels oòcits humans és força variable segons els autors. Bàsicament és degut al fet que s'analitzen amb diferents tècniques diferents tipus d'oòcits: els resultats amb CGH en oòcits (envellits o no) de dones incloses en cicles de FIV i en oòcits frescos de donants oscil·len entre el 22 % i el 65 %. Els mecanismes d'origen proposats són principalment alteracions produïdes a l'anafase I, com la no-disjunció d'homòlegs o la separació precoç de cromàtides germanes, encara que també s'han vist fallades en la segregació mitòtica d'oogònies en etapes inicials del desenvolupament embrionari. L'aplicació translacional dels estudis ha afavorit el desenvolupament del diagnòstic genètic preimplantacional, mitjançant FISH o CGH, per al diagnòstic d'aneuploidies d'origen femení. Un dels reptes actuals és incrementar la taxa d'implantació dels embrions transferits.

Paraules clau: aneuploidia, DGP, primer corpuscle polar, FISH, CGH.

STUDY AND DIAGNOSTIC OF ANEUPLOIDIES IN HUMAN OOCYTES

SUMMARY

The availability of biologic material discarded from IVF cycles has been pretty valuable for the study of aneuploidies in the first stages of embryonic development. The cytogenetic study of human oocytes requires the analysis of the MII oocyte and the corresponding 1stPB separately. Fluorescent in situ hybridization and its variants, such as SKY, PRINS or cenM-FISH, have been very useful, although these techniques require a previous cell fixation. As an alternative, CGH does not require cell fixation and furthermore, it allows for the study of the whole chromosomal complement. Aneuploidy rate from published CGH results show a great variability. It ranges from 22% to 65%. This variability is mainly due to the use of different material: oocytes from women undergoing IVF and fresh oocytes from donors. The mechanisms proposed for aneuploidy production are mainly alterations produced in anaphase I, such as homologous non-disjunction and premature separation of sister chromatids. Mitotic segregation failure in the oogonies produced during the early stages of embryonic development has also been reported. The translational application of studies has favoured the development of PGD, by means of FISH or CGH, for the aneuploidy diagnostic of female origin. At this moment, one of the challenges is to increase the implantation rate of the transferred embryos.

Key words: aneuploidy, PGD, first polar body, FISH, CGH.

Llistat d'abreviacions

1rCP: primer corpuscle polar.

AS: cribratge d'aneuploidies (*aneuploidy screening*).

CenM-FISH: FISH de centròmers multicolor.

CGH: hibridació genòmica comparada (*comparative genome hybridisation*).

DGP: diagnòstic genètic preimplantacional.

DGP-BL: DGP en blastòmer.

DGP-1rCP: DGP en primer corpuscle polar.

DF-DGP: DGP per a doble factor de risc genètic.

DOP-PCR: PCR amb encebadors degenerats (*degenerated oligonucleotide primer-primed chain reaction*).

FIV: fecundació *in vitro*.

FISH: hibridació *in situ* fluorescent (*fluorescent in situ hybridisation*).

ICSI: injecció citoplasmàtica d'esperma (*intracytoplasmatic sperm injection*).

MII: oòcit en estadi de meiosi II.

MDA: mètode isotèrmic d'amplificació de múltiple desplaçament (*multiple displacement amplification*).

ND: no-disjunció de cromosomes homòlegs.

PRINS: encebador *in situ* (*primer in situ*).

PSSC: separació prematura de cromàtides germanes (*premature separation of sister chromatids*).

SKY: cariotipatge espectral (*spectral karyotyping*).

TRA: tècniques de reproducció assistida.

INTRODUCCIÓ

L'aneuploidia és un fenomen extremament freqüent en l'espècie humana. Amb les tècniques de reproducció assistida (TRA) i de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) s'ha vist que el 90 % dels embrions aneuploides, o amb dotacions cromosòmiques anòmales, ho són a causa d'errors de segregació en la meiosi i materna (Nicolaidis i Petersen, 1998). Això concorda amb el fet que la primera divisió meiótica materna comença en els estadis prenatals i no es completa fins al moment de l'ovulació, durant el període fèrtil femení, que s'inicia als onze anys i finalitza uns quaranta anys més tard (Hassold *et al.*, 1996). El coneixement de l'origen femení de la majoria de les aneuploïdies ha fet que l'estudi citogenètic dels oòcits hagi adquirit una considerable importància.

De fet, gràcies al desenvolupament de les TRA i el DGP s'ha generat la disponibilitat de material biològic descartat (gàmetes i embrions humans no aptes per transferir a l'úter matern), que és molt valuós per a l'estudi de la freqüència d'aneuploïdies en els primers estadis del desenvolupament embrionari.

El material d'anàlisi habitual en el DGP és un o dos blastòmers (DGP-BL) de l'embrió en estadi de 6-8 cèl·lules o bé el primer corpuscle polar (1rCP) de cada oòcit (DGP-1rCP). Recentment també s'han començat a estudiar les cèl·lules del trofèctoderma d'embrions en estadi de blastocist. Els resultats de l'aplicació del DGP per al cribratge d'aneuploïdies (*aneuploidy screening*, AS) són compilats periòdicament per la Societat Europea de Reproducció Humana (European Society of Human Reproduction, ESHRE).

L'últim recull de l'ESHRE (Goossens *et al.*, 2008) inclou un total de 9.153 cicles de DGPAS realitzats fins a l'octubre de 2006, en

1.007 dels quals s'estudia el 1rCP, i en 7.816 un o dos blastòmers. D'un total de 109.832 complexos oòcit-cúmulus (COC) obtinguts, 90.501 van ser inseminats i 64.086 (70,8 %) es van fecundar. El diagnòstic citogenètic es va obtenir en 46.589 (92 %) de 50.622 cèl·lules biopsiades amb èxit. D'un total de 12.131 embrions transferits es van aconseguir 2.165 embarassos bioquímics i 2.165 embarassos detectats per batec cardíac, fet que representa una taxa d'implantació del DGP-AS (embaràs bioquímic/transferits) del 17,8 %.

El desenvolupament del DGP-1rCP va sorgir com un repte per detectar anomalies genètiques en els gàmetes, és a dir, abans de la fecundació. Això només és possible plantejar-ho quan el risc genètic prové de la mare i es deu a les característiques diferencials que existeixen en la gametogènesi femenina. Mentre que els espermatozoides són cèl·lules haploides que resulten de dues divisions meiótiques, els oòcits en el moment de l'ovulació no han completat la meiosi II i queden aturats en la metafase de la segona divisió meiótica (vegeu la figura 1). D'aquesta manera, el gàmeta femení està format per dues cèl·lules: l'oòcit en metafase II (MII), que conté tot el citoplasma de l'oogònia predecessora, i el 1rCP, que conté quasi exclusivament una dotació cromosòmica haploide, que és complementària a la de l'oòcit en MII. Només l'oòcit en MII té capacitat reproductiva per desenvolupar un embrió en cas de ser fecundat per un espermatozoide. El 1rCP, sense funció reproductiva, i que degenera, pot ser extret per biòpsia sense que això representi cap efecte negatiu en la capacitat fecundant del corresponent oòcit. El resultat obtingut de l'anàlisi del 1rCP permet conèixer, de manera indirecta, la dotació cromosòmica del corresponent oòcit en MII.

METODOLOGIES D'ESTUDI DE LES ANEUPLOÏDIES EN OÒCITS HUMANS: ANÀLISI CITOGENÈTICA DEL PRIMER CORPUSCLE POLAR I LA METAFASE II DE L'OÒCIT

Per estudiar la incidència d'aneuploïdies d'origen femení s'ha d'estudiar tant el complement cromosòmic del 1rCP com el de la MII. És més, el resultat de l'anàlisi del 1rCP constitueix un control intern de la segregació dels cromosomes, la qual cosa és essencial.

Els mètodes més àmpliament utilitzats per a l'estudi d'aneuploïdies en 1rCP i MII requereixen fixar sobre un portaobjectes cada cèl·lula. Tot i que es poden fixar les dues cèl·lules conjuntament, és molt recomanable fixar-les per separat. En aquest cas se separen eliminant la zona pellúcida amb àcid de Tyrode o bé perforant la zona pellúcida.

El 1rCP es pot obtenir, sense malmetre l'oòcit en MII, per diferents procediments de biòpsia, com el sistema mecànic, pel qual amb una pipeta punxeguda es talla la zona pellúcida i s'extreu el 1rCP amb una pipeta de biòpsia, o un sistema físic, basat en un làser que perfora la zona pellúcida (Mal-

ter i Cohen, 1989; Durban *et al.*, 2001) (vegeu la figura 2).

Un cop aïllada cada cèl·lula, es procedeix a la fixació per obtenir extensions cromosòmiques de bona qualitat en un portaobjectes. Els mètodes de fixació més utilitzats són: el de Tarkowsky, que utilitza una solució fixadora d'etanol i àcid acètic, 1:1 *v/v*, i el de Mikamo i Kamiguchi, que es tracta d'una fixació gradual. Per al 1rCP, els dos mètodes de fixació aplicats són el de Tarkowsky i el de Durban (Durban *et al.*, 1998). Aquest últim és especialment indicat per a la fixació del 1rCP i es realitza sota control estereomicroscòpic. El 1rCP, prèviament hipotonitzat, és fixat en un portaobjectes tractat amb trimetoxisilà. El fixador s'addiciona creant un flux suau de solució fixadora (etanol i àcid acètic, 1:1 *v/v*) dirigit cap al 1rCP, que dissol la membrana citoplasmàtica. Aquest mètode, aplicat als 1rCP d'oòcits frescos, en el 88 % dels casos aconseguen extensions de bona qualitat i ha proporcionat la millor concordança entre el complement cromosòmic del 1rCP i la MII després de l'aplicació de les tècniques d'hibridació

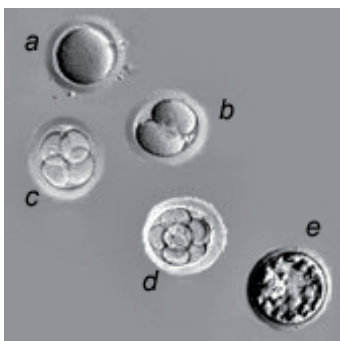


FIGURA 1. Oòcit en MII i primers estadis del desenvolupament embrionari. a) oòcit, b) embrió en estadi de dues cèl·lules, c) embrió en estadi de quatre cèl·lules, d) embrió en estadi de vuit cèl·lules i e) blastocist.

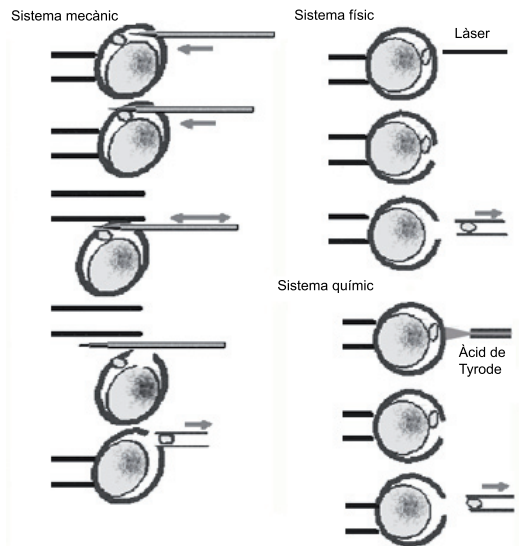


FIGURA 2. Mètodes de biòpsia del 1rCP.

in situ fluorescent (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) (vegeu la figura 3).

Després de la fixació alguns grups apliquen les tècniques de tinció per aconseguir bandes cromosòmiques, com les bandes R (Pellestor *et al.*, 2003), però les tècniques d'identificació cromosòmica més recomanables són les de FISH. Amb la FISH es poden emprar sondes fluorescents per pintar els cromosomes sencers o bé sondes puntuals com les específiques de locus, centromèriques o telomèriques, entre d'altres. En un principi, es va començar analitzant dos cromosomes, 18 i X (Dailey *et al.*, 1996) i posteriorment en més d'una ronda d'hibridació s'ha anat augmentant el nombre final de cromosomes predeterminats que s'estudien, fins a tres cromosomes per ronda, amb nou cromosomes (1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X) (Pujol *et al.*, 2003a). Aquests inclouen els cromosomes implicats en les aneuploïdies viables. A més, alguns d'aquests cromosomes estan implicats en aneuploïdies causants d'avortaments espontanis; a més, en blastòmers d'embrions de dones d'edat avançada (Bahce *et al.*, 1999; Gianaroli *et al.*, 1999; Egozcue *et al.*, 2002) podrien també estar implicats en la reducció de la taxa d'im-

plantació (Dailey *et al.*, 1996; Verlinsky *et al.*, 1999; Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003a).

Una variant de la FISH és el cariotipatge espectral (*spectral karyotyping*, SKY) (Márquez *et al.*, 1998; Sandalinas *et al.*, 2002; Clyde *et al.*, 2003), que permet l'estudi de tot el complement cromosòmic. Aquest sistema utilitza vint-i-quatre sondes de pintura específiques per a cada cromosoma. Cada sonda està marcada amb una proporció diferent de cinc fluorocroms separats que, en ser observats mitjançant el sistema d'imatge espectral amb el programari adient, mostren colors diferents per a cada cromosoma, cosa que permet identificar correctament cada parella de cromosomes en el cariotip.

Una altra variant de la FISH és la CenM-FISH, o una FISH multicolor en què s'empren sondes específiques per a centròmers marcades directament o indirectament amb un, dos, tres o quatre fluorocroms diferents (Nietzel *et al.*, 2001). Aquest sistema, quan s'aplica a bones extensions cromosòmiques d'oòcits en MII suposa un bon sistema d'anàlisi, ja que en una sola ronda d'hibridació es poden analitzar tots els centròmers del complement cromosòmic.

Una altra tècnica anomenada *encebador in situ* (*primer in situ*, PRINS), s'ha testejat amb èxit en extensions cromosòmiques de 1rCP fixats. Es tracta d'un mètode ràpid i poc costós que permet el marcatge dels cromosomes 13, 16, 21 o X, implicats freqüentment en aneuploïdies (Petit *et al.*, 2000). En una PCR sobre portaobjectes, els cromosomes es marquen mitjançant la unió *in situ* d'encebadors oligonucleòtids específics per a cada cromosoma, seguit de l'extensió amb nucleòtids marcats, feta per l'enzim Taq-DNA-polimerasa. Cada extensió cromosòmica del 1rCP passa per tres reaccions successives de marcatge doble i en menys de 40 min s'obtenen senyals intensos, la qual cosa

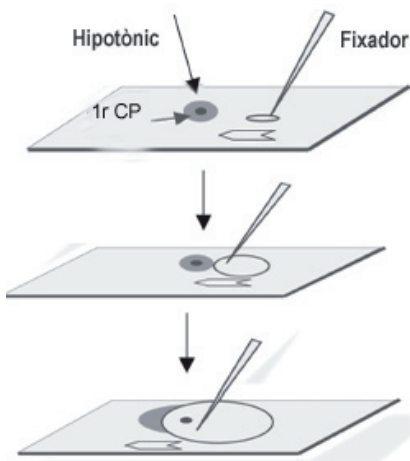


FIGURA 3. Mètode de fixació del 1rCP.

és de gran interès en l'aplicació del DGP per al cribratge d'aneuploidies.

Però totes les metodologies esmentades anteriorment tenen la mateixa limitació: s'apliquen en extensions cromosòmiques de cèl·lules fixades en portaobjectes i, per tant, mai no és possible descartar que les hipohaploidies detectades siguin pèrdues artefactuals produïdes durant el procés de fixació.

La hibridació genòmica comparada (*comparative genomic hybridisation*, CGH) aplicada a cèl·lules aïllades (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999) és una alternativa molt favorable per a l'estudi d'aneuploidies en oòcits humans. Aquest mètode permet l'estudi simultani de tots els cromosomes de cada cèl·lula per separat (1rCP i el corresponent oòcit en MII). La possibilitat de pèrdues cromosòmiques artefactuals no existeix, ja que les cèl·lules, senceres i aïllades, s'introdueixen en tubs de PCR i es lisen i processen ja dins del tub. Aquest sistema requereix amplificar el material genètic cel·lular, ja que una cèl·lula té una quantitat limitada de DNA (6 pg). La tècnica aplicada per a l'amplificació és la DOP-PCR (*degenerated oligonucleotide primer-primed chain reaction*) (Telenius *et al.*, 1992). Amb el DNA producte de l'amplificació ja es pot realitzar la CGH. Aquest mètode es basa en una hibridació competitiva sobre extensions de limfòcits euploides entre el DNA de la cèl·lula test (marcada amb fluorocrom vermell) i el DNA d'una cèl·lula control (euploide) (marcada amb fluorocrom verd), que es troben en quantitats equimolars. Les pèrdues cromosòmiques de la cèl·lula test es visualitzen al microscopi de fluorescència en verd, mentre que els guanys cromosòmics es veuen en vermell. Les regions que presenten igual proporció de cada sonda es visualitzen en groc-taronja. La limitació d'aquesta metodologia és que no és informativa per les regions d'heterocromatina i telomèriques i alguns cops els cromosomes 17,

19 i 22 poden mostrar perfils difícils d'interpretar.

RESULTATS DE L'ESTUDI D'ANEUPLOÏDIES EN EL PRIMER CORPUSCLE POLAR I EN METAFASE II D'OÒCITS HUMANS

La disponibilitat dels oòcits descartats dels cicles de FIV, com hem dit, ha permès un avenç considerable en el coneixement de les anomalies de l'oòcit i de l'embrió i els mecanismes que les produeixen. En el millor dels casos, tot i que es dona poques vegades, s'han pogut estudiar oòcits frescos que no han estat inseminats, però generalment es tracta d'oòcits no fecundats un cop inseminats *in vitro* o oòcits immadurs madurats *in vitro*. En les dues últimes opcions, com que s'analitzen oòcits ja envellits, els resultats no es podrien considerar totalment representatius dels oòcits de la població general.

Els resultats publicats de l'estudi de l'aneuploidia en oòcits humans són força variables a causa, bàsicament, del fet que s'analitzen amb diferents tècniques diferents tipus d'oòcits.

En una revisió de l'any 2005 (Pellestor *et al.*, 2005), la freqüència mitjana d'alteracions cromosòmiques vistes en estudis del cariotip que empren la tècnica de fixació de Tarkowsky és del 35,98 %, xifra que inclou un 26,5 % d'aneuploidies (15,5 % d'hipohaploidies, 7,3 % d'hiperhaploidies i 3,6 % d'aneuploidies complexes) i un 6,02 % d'alteracions estructurals (delecions, fragmentacions cromosòmiques de fragments acèntrics). Però, globalment, s'ha vist una gran variabilitat en la incidència d'aneuploidies, del 2 % al 59,6 %, així com resultats contradictoris en l'efecte de l'edat materna. En aquesta revisió les divergències van ser

atribuïdes a la reduïda mida de la mostra d'oòcits analitzada i a la dificultat d'analitzar cromosomes en els oòcits en MII, ja que la majoria dels estudis utilitzen únicament la tinció uniforme o bé, en un nombre menor (Martin *et al.*, 1986; Djalali *et al.*, 1988; Pellestor i Sele, 1988; Kola *et al.*, 1990), tècniques de bandeig de dubtosa qualitat.

No s'han vist diferències significatives entre els resultats citogenètics d'oòcits inseminats descartats de cicles de FIV i els no inseminats, o bé els obtinguts sense estimulació hormonal (Gras *et al.*, 1992). Tampoc no s'han vist diferències entre els oòcits inseminats mitjançant la injecció intracitoplasmàtica d'esperma (*intracitoplasmatic sperm injection*, ICSI) i els inseminats *in vitro* de manera convencional (Edirisinghe *et al.*, 1997; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a).

La freqüència d'aneuploïdies varia enormement segons els diversos estudis: entre el 4,7 % i el 47,5 %, amb una mitjana del 27,7 %, incloent-hi els estudis de bandes R (Pellestor, 1991; Pellestor *et al.*, 2003), els de FISH amb sondes per a nou cromosomes (Dailey *et al.*, 1996; Verlinsky *et al.*, 1999; Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003a), els de SKY i els de FISH multicolor (M-FISH) (Cheng *et al.*, 1998). Mentre que alguns autors (Zenzes *et al.*, 1992; Nakaoka *et al.*, 1998; Pellestor *et al.*, 2003) observen que el 16 % dels oòcits són aneuploides, la taxa d'aneuploïdia trobada mitjançant els sistemes de SKY (Márquez *et al.*, 1998; Sandalinas *et al.*, 2002) o bé M-FISH (Clyde *et al.*, 2003) varia entre el 16,7 % i el 39 %, amb un valor mitjà del 31,3 %. De la mateixa manera, els estudis de FISH amb un nombre limitat i predeterminat de sondes mostren encara més variació: mentre que alguns grups troben freqüències de 3,2 %, 9,5 % i 4,3 % analitzant dos, sis i set cromosomes, respectivament (cromosomes 18 i X; 9, 13, 16, 18, 21 i 22, o 1, 9, 13, 16, 18, 21 i X) (Dyban *et al.*, 1996; Anahory *et al.*, 2003;

Cupisti *et al.*, 2003), altres grups troben freqüències més altes d'aneuploïdia. Analitzant cinc, sis o nou cromosomes (13, 16, 18, 21 i 22; 1, 7, 13, 18, 21 i X o 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X) s'ha trobat freqüències del 41,7 %, 44 % i 47,5 %, respectivament (Martini *et al.*, 2000; Kuliev *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003a).

La taxa d'aneuploïdia està clarament lligada a l'edat materna. En aquest sentit, s'han estimat taxes d'aneuploïdia del 4 %, 9 %, 11,5 % i 29,8 % en oòcits de dones de 25-34, 35-39 i 40-45 anys, respectivament. De la mateixa manera, en una sèrie de 3.042 oòcits no fecundats procedents de 792 pacients amb edats compreses entre els dinou i els quaranta-sis anys, incloses en un programa de FIV, es van correlacionar les alteracions cromosòmiques originades per fenòmens de no-disjunció de la parella de cromosomes homòlegs amb l'edat materna avançada (Pellestor *et al.*, 2003).

Tot i que s'ha pogut establir que únicament el 25 % de les hipohaploïdies observades quan s'aplica FISH sobre complements cromosòmics de 1rCP podrien correspondre a artefactes produïts pel procés de fixació o bé per fallades de la tècnica (Pujol *et al.*, 2003a), quan s'analitza una sola cèl·lula (1rCP o MII) és difícil saber si l'absència d'un cromosoma hauria de ser considerada real o no. Així, en general, la taxa d'aneuploïdies és calculada de manera conservativa, com el doble de la d'hiperhaploïdies (Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003). La taxa d'aneuploïdies observada aplicant una combinació de mètodes, com per exemple CGH en el 1rCP i FISH per a nou cromosomes en el corresponent oòcit en MII, és del 57,1 % (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a). Aquesta elevada freqüència podria estar relacionada amb el fet que emprant aquestes tècniques s'analitza un gran nombre de cromosomes (tots en el cas de la CGH) i també perquè l'edat materna de les pacients d'aquest estudi estava al voltant dels trenta-cinc anys. Una

freqüència molt similar, el 57,2 %, s'ha estimat per als vint-i-tres cromosomes del complement a partir dels resultats obtinguts amb la FISH de nou cromosomes (Pujol *et al.*, 2003a). Considerant els resultats obtinguts amb l'anàlisi de 1rCP amb CGH (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a, b) i el corresponent oòcit en MII amb FISH en seixantaset parelles 1rCP-MII, la freqüència d'aneuploidies trobada és del 53,7 %, amb una incidència del 30,5 % en dones de menys de trenta-cinc anys, i del 69,5% en dones de trenta-cinc o més anys. La fiabilitat de l'estudi d'aneuploidies mitjançant les diverses variants de la FISH podria estar limitada per la qualitat de l'extensió de cromosomes i l'existència de superposicions. Per aquesta raó la utilització de la CGH i la FISH per a l'estudi d'aneuploidies en 1rCP i MII és un mètode molt adequat per al càlcul correcte d'alteracions cromosòmiques numèriques. Encara però, aplicant la CGH (en 1rCP o la MII) els valors d'aneuploidia darrerament publicats són força variables: des d'un valor del 65 % en oòcits de quaranta donants de vint-i-tres a vint-i-nou anys (Sher *et al.*, 2007) fins a valors del 22 % en oòcits immadurs madurats *in vitro* de quaranta-sis pacients de divuit a quaranta-dos anys, i valors del 43,5 % en oòcits no fecundats de quinze pacients de vint-i-nou a trenta-nou anys (Fragouli *et al.*, 2006a, b). Aquests resultats mostren encara una gran variabilitat en les taxes d'aneuploidia trobades. Tot i que l'edat de les pacients influeix en la incidència d'alteracions, es troben aneuploidies en pacients de totes les edats.

Pel que fa als cromosomes implicats en les aneuploidies, s'ha pogut comprovar que tots els grups cromosòmics hi estan representats. I pràcticament tots els cromosomes del cariotip humà s'han trobat implicats en aneuploidies (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a, b). Els més freqüentment implicats són l'1 i el 4, seguits del 22 i l'X, després el 15, 16 i 21,

després el 2, 3, 6, 7, 8, 9, 13 i 19 i, finalment, el 10, 14, 17, 18 i 20. Tot i que la resta de cromosomes no s'ha trobat en aquestes sèries, sí que s'han vist alterats en alguns casos de DGP-AS (Wells *et al.*, 2002; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2005; Obradors *et al.*, 2008).

L'estudi d'aneuploidies amb la CGH ha permès identificar fins a un 38,1 % més d'alteracions de les que s'haurien identificat mitjançant la FISH per a nou cromosomes (1, 13, 15, 16, 17, 18, 21 i X). Cal tenir en compte que la resta d'aneuploidies en els cromosomes 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, i 19 haurien quedat sense identificar. Si bé els oòcits amb múltiples aneuploidies potser s'haurien identificat com a tals amb la FISH amb nou sondes, si fossin aneuploides per a un sol dels cromosomes no analitzats amb la FISH, un 28 % dels oòcits (1rCP/MII) passaria desapercbut (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a). Aquests resultats concorden amb el fet que el 25 % dels blastòmers aneuploides identificats amb la CGH haurien estat erròniament diagnosticats com a normals amb la FISH estàndard (Wilton *et al.*, 2003).

Els cromosomes 16 i 22 s'han trobat freqüentment involucrats en aneuploidies en 1rCP i oòcits en MII, així com en embrions (Sandalinas *et al.*, 2002; Kuliev *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003a; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a; Munné *et al.*, 2004). De fet, s'ha vist que els cromosomes 14, 15, 16 i 22 estan implicats en avortaments espontanis (Munné *et al.*, 1998a; Munné *et al.*, 1998b). També els cromosomes 1, 4 i 7 mostren una taxa d'aneuploidia força important (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004b). Les aneuploidies en cromosomes que no estan involucrats en trisomies viables en la descendència o en avortaments espontanis (Simpson, 1990) són probablement freqüents en les etapes més inicials després de la fecundació i podrien ser responsables de la manca d'implantació o viabilitat d'aquests embrions.

Mecanismes de producció d'aneuploidies

D'acord amb les dades d'aneuploidia recollides en la literatura, els oòcits humans semblen particularment predisposats als errors de segregació meiótica, i s'han proposat diversos mecanismes que portarien a aquestes alteracions. El primer mecanisme descrit va ser la no-disjunció (ND) de cromosomes homòlegs (Pellestor, 1991; Zenzes *et al.*, 1992). En la ND els dos cromosomes homòlegs del bivalent meiótic no se separen. Durant la primera divisió meiótica, en segregat junts ambdós homòlegs, una de les cèl·lules té un guany cromosòmic, mentre que l'altra té una pèrdua per al mateix cromosoma.

Ja amb l'anàlisi de tinció uniforme de complements cromosòmics d'extensions de MII i 1rCP d'oòcits humans es va poder identificar un altre mecanisme de producció d'anomalies: la separació prematura de cromàtides germanes (*premature separation of sister chromatids*, PSSC). Aquest es produiria durant la primera divisió meiótica, amb una freqüència força elevada (Angell, 1991, 1997). La PSSC pot ser equilibrada o bé desequilibrada. En la PSSC equilibrada no hi ha ni guany ni pèrdua de cromàtides i, per tant, no es considera responsable d'aneuploidies, tot i que s'ha considerat indicativa d'una major predisposició a la ND (Pellestor, 1991; Munné *et al.*, 1995; Sandalinas *et al.*, 2002). En la PSSC no equilibrada hi ha guanys i pèrdues de cromàtides, és a dir, s'ha produït separació prematura de cromàtides i segregació desequilibrada d'aquestes en un o més cromosomes i, per tant, constitueix una anomalia citogenètica numèrica.

Mentre en alguns estudis s'ha observat gairebé exclusivament el mecanisme de PSSC, en altres en què s'ha utilitzat la tècnica de FISH per a alguns cromosomes (Pellestor, 1991; Munné *et al.*, 1995; Ver-

linsky *et al.*, 1999; Pujol *et al.*, 2003a) o bé la CGH (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004b), que analitza simultàniament tots els cromosomes, s'ha descrit que tant la PSSC com la ND són mecanismes responsables d'aneuploidia.

D'altra banda, alguns treballs que analitzen oòcits no fecundats i oòcits madurats *in vitro* suggereixen que la PSSC i la ND no augmenten significativament durant el temps de cultiu (Munné *et al.*, 1995; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004b), però altres estudis suggereixen el contrari (Pickering *et al.*, 1988; Pellestor, 1991).

Un estudi de 1.397 oòcits, fixats mitjançant el mètode gradual, va fer evident un augment significatiu de les PSSC respecte les ND (Pellestor *et al.*, 2002), i s'han obtingut resultats similars emprant diferents mètodes d'anàlisi (Sandalinas *et al.*, 2002; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004b). Al mateix temps, en oòcits frescos no inseminats i en no fecundats de dones de trenta-cinc anys o més, el fenomen de PSSC és més freqüent que la ND (Sandalinas *et al.*, 2002). Els autors van observar en aquestes dones, respecte a les de 24-34 anys, una freqüència superior de PSSC equilibrada respecte a la no equilibrada. Aquest estudi, a més, mostrava que en la PSSC hi ha implicats més cromosomes de mida petita.

La PSSC podria ser conseqüència d'una degradació prematura, abans de l'anafase I, de les cohesines, proteïnes que mantenen unides les cromàtides germanes (Michaelis *et al.*, 1997). Alguns autors han relacionat la presència de PSSC en l'edat materna avançada (Sandalinas *et al.*, 2002; Pellestor *et al.*, 2003). Les dones d'edat avançada tindrien una acumulació de mutacions en el DNA mitocondrial no solament dels oòcits, sinó també de les cèl·lules foliculars (Bartmann *et al.*, 2004). Aquest fet podria reduir la funció mitocondrial (Schon *et al.*, 2000) i, ja que la funció de les cohesines depèn de l'ATP

(Uhlmann, 2004), una deficiència en el metabolisme energètic oxidatiu podria resultar en un increment de PSSC en dones d'edat avançada. També s'ha suggerit (Hunt *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1998) que la presència de tres cromàtides durant la primera divisió podria afectar la segregació d'altres cromosomes.

El 1996 es va interpretar que els errors produïts durant la segona divisió meiótica podien ser conseqüència d'anomalies en la primera divisió meiótica, degudes a l'increment en la taxa de recombinació, fet que podria portar a errors en la separació dels bivalents (Lamb *et al.*, 1996). Però, de fet, es creu també que una reducció de la recombinació de focus en cromosomes petits podria resultar en un risc incrementat de disjunció inadequada i, per tant, en la producció d'oòcits aneuploides (Koehler *et al.*, 1996; Hassold *et al.*, 2000; Martini *et al.*, 2000).

Tant la recombinació alterada com l'edat materna avançada han estat identificats com a factors etiològics essencials, però els mecanismes causants d'errors en la segregació meiótica es coneixen poc.

Finalment, s'ha descrit un tercer mecanisme causant d'aneuploidies en oòcits gràcies a l'estudi simultani amb FISH del 1rCP i l'oòcit en MII. Aquest estudi provava la presència d'oòcits aneuploides procedents d'oogònies amb trisomies, en ovaris de dones amb cariotip normal (46, XX) (Mahmood *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2003a). Aquest fet, posat de manifest per l'absència de complementarietat entre el 1rCP i la MII, s'ha detectat en un 10 % d'oòcits descartats de cicles de FIV, combinant l'anàlisi del 1rCP amb CGH i la MII amb FISH (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004b). El mecanisme s'ha explicat per la presència d'un mosaïcisme gonadal (Moore *et al.*, 1997; Mahmood *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2003a; Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004a). El seu origen estaria lligat a l'etapa mitòtica de proliferació de les oogòni-

es, que té lloc en les primeres setmanes del desenvolupament embrionari. Una segregació mitòtica errònia podria originar oogònies amb guanys per a un cromosoma i amb pèrdua per al mateix cromosoma, que coexistirien amb oogònies euploides, citogenèticament normals. Aquest comportament, dependent d'individu i impredecible, fa necessari realitzar el diagnòstic prenatal en cas d'embaràs obtingut després de realitzar DGP.

DGP EN PRIMER CORPUSCLE POLAR EN EL CRIBRATGE D'ANEUPLOÏDIES

El DGP dels oòcits mitjançant l'estudi del corresponent 1rCP, proposat com una variant del DGP en blastòmers l'any 1990, sembla molt adequat, ja que el 90 % dels errors cromosòmics s'originen en la meiosi i materna. A més, aquesta anàlisi no es veu afectada per l'existència de mosaïcisme que, en canvi, és molt freqüent durant les primeres divisions embrionàries i dificulta el DGP realitzat en blastòmers (Munné *et al.*, 1994; Munné *et al.*, 2002). Un altre avantatge que cal remarcar és que la interpretació dels senyals de FISH sobre el 1rCP no presenta les dificultats que s'han fet evidents en blastòmers, ja que no és una cèl·lula proliferant sinó aturada en MII. De totes maneres, l'anàlisi del 1rCP té algunes limitacions, i la principal és el fet que no proporciona informació de la contribució paterna. Aquest problema, però, pot ser solucionat analitzant també un o dos dels blastòmers de l'embrió de 6-8 cèl·lules generat després de la inseminació del corresponent oòcit (Pujol *et al.*, 2003b; Magli *et al.*, 2004).

El DGP amb l'anàlisi d'aneuploidies (*aneuploidy screening*, AS) s'aplica en diversos casos en què hi ha una indicació clara, com és l'edat materna avançada, avortaments

de repetició, fallades de FIV o bé infertilitat masculina severa. El DGP en 1rCP aplicat a dones d'edat avançada és la indicació més útil, ja que s'estudia la contribució materna, que és la que comporta el major risc d'aneuploïdia a la descendència.

Una de les primeres aplicacions del DGP en 1rCP per AS es va portar a terme en deu pacients amb risc d'aneuploïdia en la descendència a causa de l'edat materna i per raons ètiques (Munné *et al.*, 2000). Es van analitzar, mitjançant FISH, els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22. De noranta-tres 1rCP analitzats, vuitanta-tres van donar resultats positius de FISH i d'aquests, cinquanta-quatre oòcits van ser euploides i vint-i-nou aneuploides per a algun dels cromosomes analitzats. Tots els oòcits euploides més dotze no diagnosticats es van inseminar i finalment es van transferir vint-i-vuit embrions, que van donar lloc a embaràs. Tres dels embarassos van acabar en avortament i un es va interrompre a causa de la detecció del cariotip 45, XO (síndrome de Turner) en el diagnòstic prenatal.

D'altra banda, des de 1995, un grup de Chicago (Magli *et al.*, 2004) aplica el DGP analitzant simultàniament el 1rCP i el 2nCP, que es forma després de la fecundació, en la segona divisió meiótica. Això permet detectar aneuploïdies originades en les dues divisions meiótiques. En aquest DGP-AS s'estudien cinc cromosomes mitjançant FISH (13, 16, 18, 21 i 22). La taxa d'aneuploïdia trobada és similar en el 1rCP (41,8 %) i el 2nCP (37,3 %), a diferència d'altres estudis, que proposen una major taxa d'aneuploïdia en la primera divisió que en la segona (Sherman *et al.*, 1994).

Aquest mateix grup (Kuliev *et al.*, 2003) ha compilat 1.551 cicles de DGP per a 1.027 pacients d'edat mitjana 38,5 anys. Els seus resultats mostren que un 48 % dels 8.293 oòcits analitzats eren citogenèticament normals per als cromosomes analitzats. En

cent deu dels cicles de FIV es van transferir un total de 2.587 embrions, i es va aconseguir finalment el naixement de 176 nadons sans, de manera que la taxa d'embaràs és del 21,9 %.

Un fet a tenir en compte és que en alguns països com Alemanya o Suïssa el DGP en blastòmers d'embrions està legalment prohibit. El DGP, doncs, només es pot portar a terme en el 1rCP, ja que aquest mètode està considerat com un diagnòstic preconceptiu. El 2004 es va publicar un estudi amb naixements després del DGP amb sondes per als cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 (Imthurn *et al.*, 2004).

La majoria de grups que fan el DGP-1rCP per AS analitzen un nombre limitat de cromosomes, fet que suposa una limitació important. L'aplicació l'any 2002 de la CGH en 1rCP d'una pacient de quaranta anys (Wells *et al.*, 2002) va representar un avenç considerable en l'avaluació de les aneuploïdies. En aquest estudi es van diagnosticar deu oòcits, dels quals nou van mostrar guanys o pèrdues per a un o dos cromosomes, i tan sols un va ser euploide. Els cromosomes involucrats en aneuploïdies eren el 2, 5, 14, 16, 20, 21 i 22, dels quals quatre (2, 5, 14 i 20) no s'analitzen normalment per FISH. Es va transferir l'embrió procedent de l'oòcit euploide, però no es va obtenir embaràs. Les aneuploïdies es van confirmar mitjançant FISH en els nou embrions restants.

Recentment, el nostre grup està aplicant una variant de DGP que pretén incrementar la taxa d'implantació dels embrions transferits després d'un DGP per a malalties monogèniques hereditàries. Es realitza de manera combinada en un mateix cicle de FIV l'anàlisi de les aneuploïdies d'origen matern mitjançant la CGH en 1rCP i l'anàlisi de mutacions familiars de malalties monogèniques greus incurables com la FQ (Obradors *et al.*, 2008) o la síndrome de VHL (Obradors *et al.*, 2009). L'anomenem

DF-DGP (doble factor de risc genètic) (vegeu la figura 4). Amb aquest procediment, encara que amb un nombre reduït de casos realitzats, ja s'ha aconseguit incrementar la taxa d'embaràs i de naixements fins a un 33,3 %, fet que representa doblar la taxa d'embaràs descrita fins ara (Harper *et al.*, 2008).

FUTUR DEL DGP EN PRIMER CORPUSCLE POLAR

L'aplicació de la CGH és una eina molt

potent per al diagnòstic d'aneuploidies, que pot ser aplicada a l'estudi del 1rCP, però de moment encara no en blastòmers sense evitar la criopreservació i transferència en el cicle següent. A més, aquesta tècnica requereix la dedicació extensa d'un especialista i la disponibilitat d'un bon equip de citogenètics moleculars ben coordinat amb un equip d'embriòlegs. Recentment, però, s'han aconseguit avenços metodològics que podrien ajudar a escurçar el temps requerit per a aquest procediment. S'ha proposat la utilització de variants de DOP-PCR amb diferents Taq-polimerases i mètodes de mar-

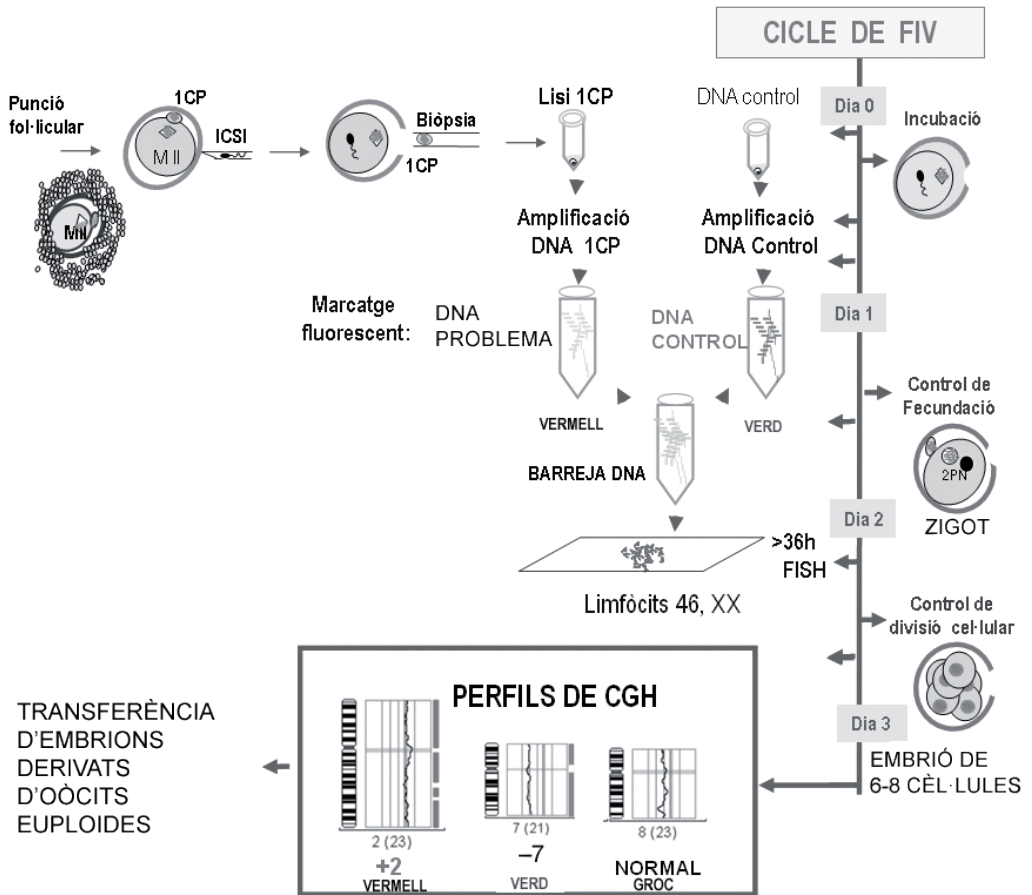


FIGURA 4. Esquema de la CGH-1rCP aplicada al DF-DGP. En l'esquema es mostra el procediment de la CGH-1rCP coordinat amb el cicle de FIV en un cas de DF-DGP.

catge que, més que escurçar el procediment, permeten obtenir un producte de DOP-PCR de millor qualitat. (Wells, 2004).

Una de les últimes propostes per a l'anàlisi d'aneuploidies és el xip CGH. Està basat en el mateix principi que la CGH sobre metafases, però difereix en el fet que s'utilitza un suport on hi ha enganxats clons genòmics de regions seleccionades en lloc de cèl·lules en metafase com a DNA diana. Aquest mètode té una resolució molt més elevada i permet l'automatització. De moment, el xip CGH s'ha portat a terme majoritàriament amb DNA procedent d'una reserva cel·lular (Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998). Les proves per reduir la quantitat de DNA necessari per al xip CGH han resultat en la detecció acurada de les variacions del nombre de còpies en 1 ng de DNA (Guillaud-Bataille *et al.*, 2004). Per passar a l'aplicació d'aquesta tècnica en cèl·lules aïllades s'afegeix la dificultat de l'amplificació del material genètic sense biaix en la seqüència. Recentment, s'han pogut amplificar mostres petites de DNA amb un mètode isotèrmic d'amplificació de múltiple desplaçament (*multiple displacement amplification*, MDA) amb una mínima representació de biaix en la seqüència. En els últims anys s'han pogut amplificar limfoblasts, fibroblasts i blastòmers aïllats individualment, amb un mètode isotèrmic d'amplificació de múltiple desplaçament (*multiple displacement amplification*, MDA) amb una mínima representació de biaix en la seqüència (Le Caignec *et al.*, 2006). La primera aplicació clínica del xip CGH amb embarassos s'ha fet el 2008 (Hellani *et al.*, 2008), utilitzant aquesta tècnica en el DGP per al cribratge d'aneuploidies de blastòmers. Així doncs, de moment existeixen diverses aproximacions encoratjadores que poden obrir les portes d'una nova era en el PGD.

AGRAÏMENTS

Projecte FIS-ISCIII: PI 051395; ajut SGR de la Generalitat de Catalunya: 2005SGR00495; beca FPU del Ministeri d'Educació i Ciència: AP2006-02211 i Càtedra de Recerca Eugén 2008.

BIBLIOGRAFIA

- ANAHORY, T.; ANDREO, B.; REGNIER-VIGOUROUX, G.; SOULIE, J. P.; BAUDOUIN, M.; DEMAÏLLE, J.; PELLESTOR, F. (2003). «Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labeling and whole chromosome painting». *Mol. Hum. Reprod.*, 9: 577-585.
- ANGELL, R. (1991). «Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man». *Hum. Genet.*, 86: 383-387.
- (1997). «First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes». *Am. J. Hum. Genet.*, 61: 23-32.
- BAHCE, M.; COHEN, J.; MUNNÉ, S. (1999). «Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes?». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 16: 176-181.
- BARTMANN, A. K.; ROMAO, G. S.; RAMOS, S.; FERRIANI, R. A. (2004). «Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 21: 79-83.
- CLYDE, J. M.; HOGG, J. E.; RUTHERFORD, A. J.; PICTON, H. M. (2003). «Karyotyping of human metaphase II oocytes by multicolor fluorescence in situ hybridization». *Fertil. Steril.*, 80: 1003-1011.
- CUPISTI, S.; CONN, C. M.; FRAGOULI, E.; WHALLEY, K.; MILLS, J. A.; FAED, M. J.; DELHANTY, J. D. (2003). «Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms». *Prenat. Diagn.*, 23: 663-668.
- CHENG, E. Y.; CHEN, Y. J.; BONNET, G.; GARTLER, S. M. (1998). «An analysis of meiotic pairing in trisomy 21 oocytes using fluorescent in situ hybridization». *Cytogenet. Cell. Genet.*, 80: 48-53.
- DAILEY, T.; DALE, B.; COHEN, J.; MUNNÉ, S. (1996). «Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes». *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 176-184.
- DJALALI, M.; ROSENBUSCH, B.; WOLF, M.; STERZIK, K. (1988). «Cytogenetics of unfertilized human oocytes». *J. Reprod. Fertil.*, 84: 647-652.

- DURBAN, M.; BENET, J.; BOADA, M.; FERNANDEZ, E.; CALAFELL, J. M.; LAILLA, J. M.; SANCHEZ-GARCIA, J. F.; PUJOL, A.; EGOZCUE, J.; NAVARRO, J. (2001). «PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis». *Hum. Reprod. Update.*, 7: 591-602.
- DURBAN, M.; BENET, J.; SARQUELLA, J.; EGOZCUE, J.; NAVARRO, J. (1998). «Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes». *Hum. Reprod.*, 3: 583-587.
- DYBAN, A.; FREIDINE, M.; SEVEROVA, E.; CIESLAK, J.; IVAKHNENKO, V.; VERLINSKY, Y. (1996). «Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent in situ hybridization». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 13: 73-78.
- EDIRISINGHE, W. R.; MURCH, A.; JUNK, S.; YOVICH, J. L. (1997). «Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double-blind study». *Hum. Reprod.*, 12: 2784-2791.
- EGOZCUE, J.; SANTALO, J.; GIMENEZ, C.; DURBAN, M.; BENET, J.; NAVARRO, J.; VIDAL, F. (2002). «Preimplantation genetic screening and human implantation». *J. Reprod. Immunol.*, 55: 65-72.
- FRAGOULI, E.; WELLS, D.; THORNHILL, A.; SERHAL, P.; FAED, M. J.; HARPER, J. C.; DELHANTY, J. D. (2006a). «Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies». *Hum. Reprod.*, 21: 2319-2328.
- FRAGOULI, E.; WELLS, D.; WHALLEY, K. M.; MILLS, J. A.; FAED, M. J.; DELHANTY, J. D. (2006b). «Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MII oocytes and first polar bodies». *Cytogenet. Genome Res.*, 114: 30-38.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, M. C.; FERRARETTI, A. P.; MUNNÉ, S. (1999). «Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed». *Fertil Steril.*, 72: 837-844.
- GOOSSENS, V.; HARTON, G.; MOUTOU, C.; SCRIVEN, P. N.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; SERMON, K.; HARPER, J. C. (2008). «ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006». *Hum. Reprod.*, 23: 2629-2645.
- GRAS, L.; MCBAIN, J.; TROUNSON, A.; KOLA, I. (1992). «The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) unseminalized human oocytes». *Hum. Reprod.*, 7: 396-401.
- GUILLAUD-BATAILLE, M.; VALENT, A.; SOULARUE, P.; PEROT, C.; INDA, M. M.; RECEVEUR, A.; SMAILL, S.; ROEST CROLLIUS, H.; BENARD, J.; BERNHEIM, A.; GIDROL, X.; DANGLLOT, G. (2004). «Detecting single DNA copy number variations in complex genomes using one nanogram of starting DNA and BAC-array CGH». *Nucleic. Acids. Res.*, 32: e112.
- GUTIÉRREZ-MATEO, C.; BENET, J.; WELLS, D.; COLLS, P.; BERMUDEZ, M. G.; SANCHEZ-GARCIA, J. F.; EGOZCUE, J.; NAVARRO, J.; MUNNÉ, S. (2004a). «Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis». *Hum. Reprod.*, 19: 2859-2868.
- GUTIÉRREZ-MATEO, C.; GADEA, L.; BENET, J.; WELLS, D.; MUNNÉ, S.; NAVARRO, J. (2005). «Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report». *Hum. Reprod.*, 20: 1256-1260.
- GUTIÉRREZ-MATEO, C.; WELLS, D.; BENET, J.; SANCHEZ-GARCIA, J. F.; BERMUDEZ, M. G.; BELLÍ, I.; EGOZCUE, J.; MUNNÉ, S.; NAVARRO, J. (2004b). «Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes». *Hum. Reprod.*, 19: 2118-2125.
- HASSOLD, T.; ABRUZZO, M.; ADKINS, K.; GRIFFIN, D.; MERRILL, M.; MILLIE, E.; SAKER, D.; SHEN, J.; ZARAGOZA, M. (1996). «Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology». *Environ. Mol. Mutagen.*, 28: 167-175.
- HASSOLD, T.; SHERMAN, S.; HUNT, P. (2000). «Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals». *Hum. Mol. Genet.*, 9: 2409-2419.
- HELLANI, A.; ABU-AMERO, K.; AZOURI, J.; EL-AKOUM, S. (2008). «Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening». *Reprod. Biomed. Online*, 17: 841-847.
- HUNT, P.; LEMAIRE, R.; EMBURY, P.; SHEEAN, L.; MROZ, K. (1995). «Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis». *Hum. Mol. Genet.*, 4: 2007-2012.
- IMTHURN, B.; ACHERMANN, J.; KLUG ARTER, M.; MACAS, E. (2004). «Preimplantation diagnosis in Switzerland-birth of a healthy child after polar body biopsy». *Swiss Med. Wkly.*, 134: 254-258.
- KOEHLER, K. E.; HAWLEY, R. S.; SHERMAN, S.; HASSOLD, T. (1996). «Recombination and nondisjunction in humans and flies». *Hum. Mol. Genet.*, 5: 1495-1504.
- KOLA, I.; LACHAM, O.; JANSEN, R. P.; TURNER, M.; TROUNSON, A. (1990). «Chromosomal analysis of human oocytes fertilized by microinjection of spermatozoa into the perivitelline space». *Hum. Reprod.*, 5: 575-577.
- KULIEV, A.; CIESLAK, J.; ILKEVITCH, Y.; VERLINSKY, Y. (2003). «Chromosomal abnormalities in a series of

- 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies». *Reprod. Biomed. Online*, 6: 54-59.
- LAMB, N. E.; FREEMAN, S. B.; SAVAGE-AUSTIN, A.; PETTAY, D.; TAFT, L.; HERSEY, J.; GU, Y.; SHEN, J.; SAKER, D.; MAY, K. M.; AVRAMOPOULOS, D.; PETERSEN, M. B.; HALLBERG, A.; MIKKELSEN, M.; HASSOLD, T. J.; SHERMAN, S. L. (1996). «Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II». *Nat. Genet.*, 14: 400-405.
- LECAIGNEC, C.; SPITS, C.; SERMON, K.; RYCKE, M. DE; THIENPONT, B.; DEBROCK, S.; STAESSEN, C.; MOREAU, Y.; FRYNS, J. P.; STEIRTEGHEM, A. VAN; LIEBAERS, I.; VERMEESCH, J. R. (2006). «Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH». *Nucleic. Acids. Res.*, 34: e68.
- MAGLI, M. C.; GIANAROLI, L.; FERRARETTI, A. P.; TOSCHI, M.; ESPOSITO, F.; FASOLINO, M. C. (2004). «The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability». *Hum. Reprod.*, 19: 1163-1169.
- MAHMOOD, R.; BRIERLEY, C. H.; FAED, M. J.; MILLS, J. A.; DELHANTY, J. D. (2000). «Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception». *Hum. Genet.*, 106: 620-626.
- MALTER, H. E.; COHEN, J. (1989). «Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration». *Fertil. Steril.*, 51: 139-148.
- MÁRQUEZ, C.; COHEN, J.; MUNNÉ, S. (1998). «Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping». *Cytogenet. Cell. Genet.*, 81: 254-258.
- MARTIN, R. H.; MAHADEVAN, M. M.; TAYLOR, P. J.; HILDEBRAND, K.; LONG-SIMPSON, L.; PETERSON, D.; YAMAMOTO, J.; FLEETHAM, J. (1986). «Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes». *J. Reprod. Fertil.*, 78: 673-678.
- MARTINI, E.; FLAHERTY, S. P.; SWANN, N. J.; MATTHEWS, C. D.; RAMAEKERS, F. C.; GERAEDTS, J. P. (2000). «FISH analysis of six chromosomes in unfertilized human oocytes after polar body removal». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17: 276-283.
- MICHAELIS, C.; CIOSK, R.; NASMYTH, K. (1997). «Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids». *Cell*, 91: 35-45.
- MOORE, D. H., 2ND; PALLAVICINI, M.; CHER, M. L.; GRAY, J. W. (1997). «A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles». *Cytometry*, 28: 183-190.
- MUNNÉ, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G.; GRIFO, J.; COHEN, J. (1995). «Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities». *Fertil. Steril.*, 64: 382-391.
- MUNNÉ, S.; BAHCE, M.; SANDALINAS, M.; ESCUDERO, T.; MÁRQUEZ, C.; VELILLA, E.; COLLS, P.; OTER, M.; ALIKANI, M.; COHEN, J. (2004). «Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester». *Reprod. Biomed. Online*, 8: 81-90.
- MUNNÉ, S.; COHEN, J.; SABLE, D. (2002). «Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications». *Fertil. Steril.*, 78: 234-236.
- MUNNÉ, S.; GRIFO, J.; COHEN, J.; WEIER, H. U. (1994). «Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study». *Am. J. Hum. Genet.*, 55: 150-159.
- MUNNÉ, S.; MAGLI, C.; BAHCE, M.; FUNG, J.; LEGATOR, M.; MORRISON, L.; COHERT, J.; GIANAROLI, L. (1998a). «Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22». *Prenat. Diagn.*, 18: 1459-1466.
- MUNNÉ, S.; MÁRQUEZ, C.; MAGLI, C.; MORTON, P.; MORRISON, L. (1998b). «Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21». *Mol. Hum. Reprod.*, 4: 863-870.
- MUNNÉ, S.; SEPULVEDA, S.; BALMACEDA, J.; FERNANDEZ, E.; FABRES, C.; MACKENNA, A.; LOPEZ, T.; CROSBY, J. A.; ZEGERS-HOCHSCHILD, F. (2000). «Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI». *Prenat. Diagn.*, 20: 582-586.
- NAKAOKA, Y.; OKAMOTO, E.; MIHARU, N.; OHAMA, K. (1998). «Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after in-vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate». *Hum. Reprod.*, 13: 419-424.
- NICOLAIDIS, P.; PETERSEN, M. B. (1998). «Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies». *Hum. Reprod.*, 13: 313-319.
- NIETZEL, A.; ROCCHI, M.; STARKE, H.; HELLER, A.; FIEDLER, W.; WŁODARSKA, I.; LONCAREVIC, I. F.; BEENSEN, V.; CLAUSSEN, U.; LIEHR, T. (2001). «A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH)». *Hum. Genet.*, 108: 199-204.
- OBRADORS, A.; FERNANDEZ, E.; OLIVER-BONET, M.; RIUS, M.; FUENTE, A. DE LA; WELLS, D.; BENET, J.; NAVARRO, J. (2008). «Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report». *Hum. Reprod.*, 23: 1949-1956.
- OBRADORS, A.; FERNÁNDEZ, E.; RIUS, M.; OLIVER-BONET, M.; MARTÍNEZ-FRESNO, M.; BENET, J.; NAVARRO, J. (2009). «Outcome of twin babies free of Von Hip-

- pel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening». *Fertil. Steril.* [En prensa]
- PELLESTOR, F. (1991). «Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes». *Hum. Genet.*, 86: 283-288.
- PELLESTOR, F.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S. (2005). «The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures». *Hum. Reprod. Update*, 11: 15-32.
- PELLESTOR, F.; ANDREO, B.; ARNAL, F.; HUMEAU, C.; DEMAILLE, J. (2002). «Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes». *Hum. Reprod.*, 17: 2134-2145.
- (2003). «Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes». *Hum. Genet.*, 112: 195-203.
- PELLESTOR, F.; SELE, B. (1988). «Assessment of aneuploidy in the human female by using cytogenetics of IVF failures». *Am. J. Hum. Genet.*, 42: 274-283.
- PETIT, C.; MARTEL-PETIT, V.; FLEURENTIN, A.; MONNIER-BARBARINO, P.; JONVEAUX, P.; GERARD, H. (2000). «Use of PRINS for preconception screening of polar bodies for common aneuploidies». *Prenat. Diagn.*, 20: 1067-1071.
- PICKERING, S. J.; JOHNSON, M. H.; BRAUDE, P. R.; HOULISTON, E. (1988). «Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes». *Hum. Reprod.*, 3: 978-989.
- PINKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; COLLINS, C.; KUO, W. L.; CHEN, C.; ZHAI, Y.; DAIRKEE, S. H.; LJUNG, B. M.; GRAY, J. W.; ALBERTSON, D. G. (1998). «High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays». *Nat. Genet.*, 20: 207-211.
- PUJOL, A.; BOISO, I.; BENET, J.; VEIGA, A.; DURBAN, M.; CAMPILLO, M.; EGOZCUE, J.; NAVARRO, J. (2003a). «Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies». *Eur. J. Hum. Genet.*, 11: 325-336.
- PUJOL, A.; DURBAN, M.; BENET, J.; BOISO, I.; CALAFELL, J. M.; EGOZCUE, J.; NAVARRO, J. (2003b). «Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body». *Reproduction*, 126: 701-711.
- SANDALINAS, M.; MÁRQUEZ, C.; MUNNÉ, S. (2002). «Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes». *Mol. Hum. Reprod.*, 8: 580-585.
- SCHON, E. A.; KIM, S. H.; FERREIRA, J. C.; MAGALHAES, P.; GRACE, M.; WARBURTON, D.; GROSS, S. J. (2000). «Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection?». *Hum. Reprod.*, 15: 160-72.
- SHER, G.; KESKINTEPE, L.; KESKINTEPE, M.; GINSBURG, M.; MAASSARANI, G.; YAKUT, T.; BALTAÇI, V.; KOTZE, D.; UNSAL, E. (2007). «Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybridization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study». *Fertil. Steril.*, 87: 1033-1040.
- SHERMAN, S. L.; PETERSEN, M. B.; FREEMAN, S. B.; HERSEY, J.; PETTAY, D.; TAFT, L.; FRANTZEN, M.; MIKKELSEN, M.; HASSOLD, T. J. (1994). «Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination». *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1529-1535.
- SIMPSON, J. L. (1990). «Incidence and timing of pregnancy losses: relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis». *Am. J. Med. Genet.*, 35: 165-173.
- SOLINAS-TOLDO, S.; LAMPEL, S.; STILGENBAUER, S.; NICKOLENKO, J.; BENNER, A.; DOHNER, H.; CREMER, T.; LICHTER, P. (1997). «Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances». *Genes Chromosomes Cancer*, 20: 399-407.
- TELENIUS, H.; CARTER, N. P.; BEBB, C. E.; NORDENSKJOLD, M.; PONDER, B. A.; TUNNAcliffe, A. (1992). «Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer». *Genomics*, 13: 718-725.
- UHLMANN, F. (2004). «The mechanism of sister chromatid cohesion». *Exp. Cell. Res.*, 296: 80-85.
- VERLINSKY, Y.; CIESLAK, J.; IVAKHNENKO, V.; EVSIKOV, S.; WOLF, G.; WHITE, M.; LIFCHEZ, A.; KAPLAN, B.; MOISE, J.; VALLE, J.; GINSBERG, N.; STROM, C.; KULIEV, A. (1999). «Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 16: 165-169.
- VOULLAIRE, L.; WILTON, L.; SLATER, H.; WILLIAMSON, R. (1999). «Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization». *Prenat. Diagn.*, 19: 846-851.
- WELLS, D. (2004). «Advances in preimplantation genetic diagnosis». *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 115: S97-101.
- WELLS, D.; ESCUDERO, T.; LEVY, B.; HIRSCHHORN, K.; DELHANTY, J. D.; MUNNÉ, S. (2002). «First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy». *Fertil. Steril.*, 78: 543-549.

- WELLS, D.; SHERLOCK, J. K.; HANDYSIDE, A. H.; DELHANTY, J. D. (1999). «Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation». *Nucleic Acids Res.*, 27: 1214-1218.
- WILTON, L.; VOULLAIRE, L.; SARGEANT, P.; WILLIAMSON, R.; MCBAIN, J. (2003). «Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure». *Fertil. Steril.*, 80: 860-868.
- ZENZES, M. T.; WANG, P.; CASPER, R. F. (1992). «Evidence for maternal predisposition to chromosome aneuploidy in multiple oocytes of some in vitro fertilization patients». *Fertil. Steril.*, 57: 143-149.