

HIBRIDACIÓ GENÒMICA COMPARADA EN OÒCITS: APLICABILITAT AL DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

Memòria presentada per Cristina Mercedes Gutiérrez Mateo per aspirar al grau de doctor en Biologia Cel.lular per la Universitat Autònoma de Barcelona

Cristina Gutiérrez

Bellaterra, abril de 2005

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

CERTIFIQUEN

Que Cristina Mercedes Gutiérrez Mateo ha fet sota la nostra direcció el treball d'investigació titulat **“Hibridació genòmica comparada en oòcits: aplicabilitat al diagnòstic genètic preimplantacional”**, per optar al títol de doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball ha estat fet a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Joaquina Navarro
Directora

Dr. Jordi Benet
Director

Bellaterra, abril de 2005

A mi madre, a mi padre

Al Jorge

Als que no hi són

En una de les primeres converses que vaig tenir respecte al meu projecte de tesi algú em va dir que la CGH en cèl·lules úniques era impossible i que no acabaria la tesi ni en sis ni en set anys.... Bé, no diré que ha estat fàcil, de fet, no ho ha estat gens. No diré tampoc que no he tingut moments de: "ho deixo tot", sobretot en aquell primer any i mig en que no sortia res. Es va seguir endavant, però, i el 12 d'abril de 2002 varem analitzar per primera vegada la CGH d'un corpuscle, on es veia el resultat d'una segregació desequilibrada d'una translocació 1;5. Jo ja no crec en impossibles. M'agradaria agrair a tota la gent que, d'una manera o altra, ha contribuït a que aquesta tesi s'hagi pogut realitzar:

A la Quima i al Jordi, per donar-me l'oportunitat de treballar en reproducció i fer la tesi d'un tema que m'apassiona. Per dirigir aquest treball i recolzar-me en moments difícils, fins i tot quan vaig marxar als Estats Units. Per creure tant en aquest projecte i per aquest últim mes tan dur de correccions, gràcies.

A mis padres, por su sacrificio para poder darme una buena educación (aunque a veces ya sabéis que soy una maleducada). Por ayudarnos tanto este último año. Porque aunque escuchar una charla mía debe ser un tostón, siempre os presentáis voluntarios y no os dormís!!! Por confiar en mi y apoyar las decisiones que he tomado. Por animarme en mi nuevo proyecto aunque se que os dejo con el corazón triste... y yo me voy igual... Os quiero muchísimo.

A mi hermano David, por intentar solucionar mi caos informático, criticar constructivamente mis diapos y mis figuras. Por ser cómo eres (un monstruo, por supuesto), te doy las gracias de una manera especial: albaricoque.

Al meu Jorge, que et tinc davant, revisant per enèsima vegada el manuscrit, amb els ulls infladets de totes les hores que no hem dormit aquesta setmana. I tot i així encara em somrius. Per fer-me riure, per ensenyar-me tantes coses, per aquell 8 de Juliol, per totes les coses que hem fet i farem, per ajudar-me tant i aguantar els meus grunyits (sí, aquesta paraula existeix...), per Estats Units, per estimar-me... perquè sense tu no ho hagués aconseguit...

A mi prima, mis tios y mi abuelito, por ayudarnos con la mudanza y por las risas del karaoke.

A la Cristina Hernando i a l'Esther Prat per ensenyar-me a fer CGHs i a cariotipar.

A l'Imma Ponsa per tenir sempre un moment per ajudar als altres, per la teva generositat i per aquelles converses tècniques que van tan bé.

A la Montse Codina per aguantar-me aquests darrers mesos d'escriptura. Per agafar-te amb filosofia els meus nombrosos dubtes ortogràfics i els meus esbufecs quan el *word* feia alguna de les seves i havia de començar de nou.

A la Mònica per la teva manera d'agafar-te les coses, per les converses de ciència i del que no és ciència, per passar amb mi els nervis de la suficiència i per ensenyar-me les barraques de Girona.

A l'Anna, per la teva solidaritat i per ajudar-me sempre que em veies un pel alterada.

Al Javi, por hacerme reir tanto, por tus tortillas de patatas estupendas y por tu ayuda con el photoshop. Gracias por llamar aquella noche del caso clínico a las 2 de la mañana para dar ánimos.

A la Laia, per ser tan bona "alumna", per fer preguntes intel·ligents i per fer-nos companyia tota la nit del cas clínic. Gràcies als teus DVD's no ens varem adormir!!!

A l'Àngels Niubó, per la nevera, per les comandes i per les receptes de les solucions. Però sobretot per recolzar tant la nostra aventura americana i per les nostres converses per arreglar el món.

A l'Ignasi i al Jordi, per ajudar-me sempre que els hi ho demanat.

A Pedro, por hacerme más llevadera las comidas y por nuestras charlas con la boca llena.

A tota la resta: Ariadna, Yolanda, Rosana, Aïda, Gemma, Raquel, Albert, Elsa, Meri, Vanesa, Maria i Mercè gràcies per la vostra companyia.

A l'Ana Castellano i Tania Espin per haver-vos implicat tant en aquesta tesi, per animar-me en els moments d'histèria amb els encapçalaments i sobretot per la vostra amabilitat. Així dona gust treballar!!!

A la Irene Boiso por preparar y codificar los ovocitos utilizados inicialmente en este trabajo.

To Dagan Wells for being my supervisor in the United States, for knowing so many things and, what is more important, for knowing how to explain them so well. Thanks for your kindness, your enthusiasm and for your valuable contributions in the papers.

Al Santi Munnè, per acceptar-me en el teu laboratori, per la teva visió científica i per revisar tan acuradament els articles. Gràcies per l'apartament, per descobrir-me la cuina japonesa i per l'oportunitat que ens has donat de poder tornar als EUA i treballar del que ens agrada.

Gracias Mercedes, Jesús, Inma y Chuso, por ofrecerme vuestra casa y hacerme sentir cómo uno más de la familia. No se si nunca podré agradeceros bastante todo lo que hicisteis por mi. Gracias por Halloween, por el "Color me mine" y por aquellas cenas en el Office. Gracias Mercedes por apoyarme en las horas bajas, y por contagiarme tu dinamismo en el trabajo. Os deseo lo mejor.

A Livia, mi amiga, por dejarme compartir contigo buenos y malos momentos, por tu fortaleza y tu visión de la vida, por hacerme reír con el "estimado" y con la pinga, chingao y el bollo cubano. Por dejarme conducir tu carro, aunque yo con el cambio automático no me aclaraba, por tus consejos y tus chismes. Gracias por tu amistad. Espero verte pronto, fofa.

Al Pere, per ajudar-me amb la pèrdua de les maletes, per oferir-nos el teu pis aquell primer mes, per ensenyar-me els misteris de la fixació i la FISH i per aguantar i respondre totes les preguntes que t'he arribat a fer. Gràcies per aquell 4 de Juliol i aquell cafetò a Figueres.

A Tomás por guiarnos en los primeros momentos de desconcierto, por enseñarnos Nueva York y por descubrirnos el Yaffa Café del Village.

To John, Giles and Kipi for your friendship.

Gràcies al Dominique Gallardo i al Francisco Vidal per tot el que han fet pel Jorge i per extensió, per mi. Gràcies per aquell congrés a València. Fran, gracias por ayudarme con los PDFs y por dejarme rondar por el laboratorio. Dominique i Eva, gràcies per aquell fantàstic cap de setmana al Cap de Creus, i pel sopar al far i les històries de por a la caravana.

A Loli i a Jana, por aceptarme como una más de la familia y por acojerme en vuestra casa aquel mes de Agosto tan duro... muchas gracias.

A la Gemma, per aquells cap de setmanes reparadors a Blanes i per ser la meva amiga tants anys. També al Pep, a la Marilen i al Quim per aquells estius inoblidables.

Al Cristobal, la Mònica, el Xavi, la Sònia i tota la gent de defensa, així com al Chuck Simmons, que m'han fet recobrar forces i desconnectar de la feina cada dimarts i dijous. Us dec gran part de la meva salut mental.

A tots, moltes gràcies!!!!

"The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living".

Jules Henri Poincaré (1854-1912)

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. FERTILITAT EN L'ESPÈCIE HUMANA	3
1.1.1. Anomalies cromosòmiques i letalitat	3
1.1.2. Origen parental de les anomalies cromosòmiques	4
1.1.3. Edat materna avançada i aneuploïdia	5
1.2. MECANISMES INVOLUCRATS EN L'ANEUPLOÏDIA D'ORIGEN MATERN	7
1.2.1. Mecanismes de no-disjunció	7
1.2.1.1. No-disjunció de bivalents en meiosi I	7
1.2.1.2. Separació precoç de cromàtides germanes (predivisió, PSSC)	7
1.2.2. Patrons d'aneuploïdia específics per cromosomes	8
1.2.3. Edat materna, no-disjunció i recombinació: un model de dues etapes	9
1.2.4. Cohesió entre cromàtides i aneuploïdia	10
1.3. TÈCNiques PER A L'ESTUDI CITOGENÈTIC DE MIIs D'OÒCITS I CORPUSCLES POLARS	11
1.3.1. Citogenètica convencional i cariotipatge	11
1.3.2. Tècniques de citogenètica molecular	12
1.3.2.1. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	12
1.3.2.2. <i>Primed in-situ labelling</i> (PRINS)	14
1.3.2.3. <i>Peptide nucleic acids</i> (PNAs)	14
1.3.2.4. Tècniques de FISH multicolor: M-FISH, SKY i cenM-FISH	14
1.3.2.4.1. M-FISH i SKY	15
1.3.2.4.2. CenM-FISH	17
1.3.2.5. Hibridació genòmica comparada (CGH)	18
1.3.2.6. Microarray-CGH (M-CGH)	19
1.4. AMPLIFICACIÓ TOTAL DEL GENOMA D'UNA CÈL·LULA	21
1.4.1. <i>Primer extension preamplification</i> PCR (PEP-PCR)	22
1.4.2. <i>Degenerate Oligonucleotide Primed</i> PCR (DOP-PCR)	22
1.4.3. <i>Multiple displacement amplification</i> (MDA)	23
1.4.4. <i>Tagged-PCR</i> (T-PCR)	24
1.4.5. Alu-PCR	25
1.4.6. <i>Linker adapter-PCR</i> (LA-PCR)	25
1.5. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL (PGD)	26
1.5.1. Tipus de PGD	26
1.5.1.1. Anàlisi de corpuscles polars	26
1.5.1.2. Anàlisi de blastòmers	27
1.5.1.3. Anàlisi de blastocist	28
1.5.2. Indicacions del PGD	28
1.5.2.1. Cribatge o <i>screening</i> d'aneuploidies (PGD-AS)	29
1.5.2.2. Portadors de translocacions equilibrades	29
1.5.2.3. Malalties monogèniques	30
1.5.3. Contribució i eficiència del PGD	31
1.5.3.1. PGD-AS	31
1.5.3.2. PGD de translocacions	33
1.5.4. Anàlisi de la totalitat dels cromosomes: aplicació de la CGH en el PGD	34

2. OBJECTIUS	37
3. MATERIALS I MÈTODES	41
3.1. REACTIUS I SOLUCIONS	43
3.1.1. Aïllament	43
3.1.2. Lisi	43
3.1.3. DOP-PCR	43
3.1.4. Electroforesi	44
3.1.5. Marcatge amb <i>Nick Translation</i>	44
3.1.6. Hibridació competitiva	45
3.1.7. Fixació de MII d'òocits	46
3.1.8. Pepsina i postfixació	46
3.1.9. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	46
3.1.10. <i>Spectral Karyotyping</i>	48
3.1.11. CenM-FISH	49
3.2. MATERIAL BIOLÒGIC	50
3.3. MÈTODES	50
3.3.1. Hibridació genòmica comparada en cèl.lules aïllades	50
3.3.1.1. Obtenció i aïllament de cèl.lules	51
3.3.1.2. Mesures per evitar la contaminació	53
3.3.1.3. Lisi cel·lular	54
3.3.1.4. Amplificació total del genoma de la cèl.lula mitjançant DOP-PCR	54
3.3.1.5. Electroforesi de comprovació	55
3.3.1.6. Preparació del DNA control de la CGH	56
3.3.1.7. Marcatge de la sonda	56
3.3.1.8. Preparació de la sonda	58
3.3.1.9. Avaluació dels portaobjectes amb preparacions metafàsiques	58
3.3.1.10. Hibridació competitiva	59
3.3.1.11. Rentats posthibridació	59
3.3.1.12. Observació i captura mitjançant un microscopi de fluorescència	60
3.3.1.13. Anàlisi de les imatges	60
3.3.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH) en extensions cromosòmiques de MII d'òocits	62
3.3.2.1. Aïllament i fixació de les MIIs d'òocits	63
3.3.2.2. Tractament amb pepsina i postfixació	64
3.3.2.3. Contratació amb DAPI	65
3.3.2.4. Hibridació i rentats posthibridació de la barreja A	65
3.3.2.5. Hibridació i rentats posthibridació de la barreja B	66
3.3.2.6. Hibridació i rentats posthibridació de la barreja C	66
3.3.2.7. Observació i captura	67
3.3.2.8. Rentats postvisualització	68
3.3.2.9. Criteris d'anàlisi	68
3.3.3. <i>Spectral Karyotyping</i> (SKY) en extensions cromosòmiques de MII d'òocits	70

3.3.3.1. Fixació de MIIs d'òocits i tractaments previs a la hibridació	70
3.3.3.2. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	70
3.3.3.3. Rentats posthibridació i detecció	71
3.3.3.4. Observació i captura	71
3.3.4. CenM-FISH en extensions cromosòmiques de MII d'òocits	73
3.3.4.1. Fixació de MIIs d'òocits i tractaments previs a la hibridació	74
3.3.4.2. Preparació de les sondes	74
3.3.4.3. Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	74
3.3.4.4. Rentats posthibridació i detecció	75
3.3.4.5. Observació i captura	75
3.3.5. Anàlisi estadística	76
3.3.6. PGD en primer corpuscle polar mitjançant CGH	76
4. RESULTATS	81
4.1. ARTICLE 1: Reliability of Comparative Genomic Hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes C. Gutiérrez-Mateo, D. Wells, J. Benet, JF. Sánchez-García, MG. Bermúdez, I. Belil, J. Egozcue, S. Munné i J. Navarro. Human Reproduction 2004; 19:2118-2125	83
4.2. ARTICLE 2: Aneuploidy study of human oocytes by 1PB-CGH and MII-FISH analysis. C. Gutiérrez-Mateo, J. Benet, D. Wells, P. Colls, MG. Bermúdez, JF. Sánchez-García, J. Egozcue, J. Navarro, S. Munné. Human Reproduction 2004; 19:2859-2868	93
4.3. ARTICLE 3: Aneuploidy 12 in a Rob(13;14) carrier: Case report. C. Gutiérrez-Mateo, L. Gadea, J. Benet, D. Wells, S. Munné, J. Navarro. Human Reproduction 2005; 20:1256-1260	105
4.4. ARTICLE 4: Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH. C. Gutiérrez-Mateo, J. Benet, H. Starke, M. Oliver-Bonet, S. Munné, T. Liehr, J. Navarro. Enviat a publicar	113
4.5. RESULTATS GLOBALS	137
4.5.1. Posada a punt de la CGH en cèl·lules aïllades	137
4.5.2. Optimització, validació i eficiència dels protocols desenvolupats	138
4.5.2.1. Optimització de la lisi cel·lular i la DOP-PCR	138
4.5.2.2. Optimització de la CGH aplicada a cèl·lules aïllades	139
4.5.2.3. Eficiència dels protocols utilitzats	139
4.5.2.4. Determinació de falsos positius	140
4.5.2.5. Detecció d'errors de cromosoma i de cromàtida	140
4.5.3. Anàlisi d'anomalies cromosòmiques	142
4.5.3.1. Oòcits provinents de dones amb cariotip normal	143
4.5.3.2. Oòcits provinents de dones portadores de translocacions equilibrades	148
4.6. PGD EN PRIMER CORPUSCLE POLAR MITJANÇANT CGH	149

5. DISCUSSIÓ	151
5.1. POSADA A PUNT I OPTIMITZACIÓ DE LA CGH PER A L'ANÀLISI DE CÈL·LULES AÏLLADES	153
5.1.1. Amplificació total del genoma de la cèl·lula	153
5.1.2. Hibridació genòmica comparada en material amplificat	156
5.2. VALIDACIÓ DE LA CGH APLICADA A CÈL·LULES AÏLLADES	157
5.2.1. Sensibilitat de la CGH per a detectar guanys i pèrdues i alteracions de cromosomes i cromàtides	158
5.2.2. Falsos positius	160
5.2.3. Absència de complementarietat entre parelles 1CP-MII	162
5.2.4. Eficiència de les tècniques utilitzades	163
5.2.4.1. CGH en 1CPs i MIIs d'òcits	163
5.2.4.2. FISH en MIIs d'òcits	164
5.2.4.3. CenM-FISH en MIIs d'òcits	164
5.3. ANÀLISI D'ANOMALIES CROMOSÒMIQUES	165
5.3.1. Oòcits de dones amb cariotip normal	165
5.3.1.1. Incidència d'aneuploidia	165
5.3.1.2. Hipohaploïdies i hiperhaploïdies	167
5.3.1.3. Mecanismes implicats en l'origen de les aneuploïdies	168
5.3.1.4. Aneuploidia relacionada amb l'edat materna, el temps en cultiu i l'origen dels oòcits descartats	169
5.3.1.4.1. Aneuploidia i edat materna	169
5.3.1.4.2. Aneuploidia, inducció hormonal, temps en cultiu i origen dels oòcits	170
5.3.1.5. Cromosomes més involucrats en aneuploidia	171
5.3.1.6. Implicacions dels resultats obtinguts en el PGD utilitzant FISH	174
5.3.2. Oòcits de dones portadores de translocacions equilibrades	176
5.3.2.1. Detecció de segregacions desequilibrades de translocacions	176
5.3.2.2. Investigació d'efectes intercromosòmics en la segregació de translocacions	176
5.4. PGD MITJANÇANT CGH EN DONES D'EDAT AVANÇADA	178
5.4.1. Casos de PGD en 1CP mitjançant CGH	178
5.4.2. Limitacions del PGD en 1CP amb CGH	178
5.4.3. Avantatges del PGD en 1CP amb CGH	180
6. CONCLUSIONS	183
7. BIBLIOGRAFIA	187
ANNEX	205

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. FERTILITAT EN L'ESPÈCIE HUMANA

1.1.1. Anomalies cromosòmiques i letalitat

S'ha estimat que una parella fèrtil per sota dels 35 anys que intenta tenir descendència té tan sols un 25% de probabilitats d'embaràs per cicle menstrual (Wilcox *et al.* 1988). Les taxes de implantació dels embrions humans (relació entre el nombre d'embrions evolutius i el nombre d'embrions transferits) en centres de reproducció assistida és només de un 25-30% (Wilton 2005). Això vol dir que un 70-75% dels embrions transferits no s'implanten; per això molts centres de reproducció assistida transfereixen més d'un embrió a l'úter matern. Una altra dada que cal tenir en compte és que entre el 12 i el 15% dels embarassos reconeguts clínicament acaben en un avortament espontani (Stirrat 1990).

És important destacar, doncs, que comparat amb altres espècies, els humans tenen una taxa de fecunditat baixa (Wells i Delhanty 2000), que és majoritàriament deguda a una elevada taxa de mort embrionària en els primers estadis del desenvolupament (Bahçe *et al.* 1999; Sandalinas *et al.* 2001).

En estudis d'avortaments induïts, la incidència d'alteracions cromosòmiques baixa del 9 al 5% en avortaments de 3 o de 10 setmanes, respectivament (Boué *et al.* 1985). Cal afegir que més del 60% dels avortaments espontanis de menys de 12 setmanes són aneuploides (Boué *et al.* 1985). Així doncs, sembla que hi ha una selecció negativa de les anomalies cromosòmiques durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari (Taula 1.1) (Jacobs i Hassold 1995).

Taula 1.1. Freqüències d'anomalies cromosòmiques numèriques en diversos estadis del desenvolupament embrionari humà. Adaptada de Jacobs i Hassold (1995).

Població	Freqüència (%)						Total
	Trisomia	Poliploidia	XO	XXY	XXX	XYY	
Avortaments espontanis*	26,8	9,8	8,6	0,2	0,1	-	45,5
Morts perinatals	3,8	0,6	0,25	0,4	0,3	-	5,35
Nascuts vius	0,3	-	0,01	0,05	0,05	0,05	0,41
Probabilitat de sobreviure	5,8	0	0,3	55	70	100	-

*Pèrdua embrionària espontània abans de la 20a setmana de gestació.

Una altra dada que avala aquesta hipòtesi és que la incidència d'aneuploidies en embrions (Munné *et al.* 1995a; Márquez *et al.* 2000) és molt més alta que la incidència d'anomalies en avortaments induïts i en nascuts vius (Hassold i Hunt 2001). Això es deu al fet que la majoria d'aquestes pèrdues embrionàries es produeixen per una fallada de la implantació i, per tant, no són detectades. En canvi, només una minoria es produeixen en forma d'avortament espontani (Norwitz *et al.* 2001).

En conjunt, aquests treballs indiquen que tot i que hi ha altres factors que poden contribuir en les fallades de implantació i en la pèrdua embrionària, el factor més important és la presència d'anomalies cromosòmiques, sovint letals i originades *de novo*, en els embrions (Los *et al.* 2004).

Estudis citogenètics utilitzant la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) (Delhanty *et al.* 1997; Munné *et al.* 1998a) han mostrat que més d'un 50% dels embrions preimplantacionals, provinquin o no de parelles fèrtils, contenen cèl·lules aneuploides i moltes d'aquestes aneuploidies s'observen rarament en estadis fetals més tardans.

1.1.2. Origen parental de les anomalies cromosòmiques

El tipus d'anomalia més freqüentment trobada en avortaments espontanis és la monosomia pel cromosoma X (10%) i la trisomia de qualsevol cromosoma, especialment les trisomies 16, 21 i 22 (que sumen el 50% del total) (Hassold *et al.* 1980). La resta de monosomies són rarament detectades en embarassos clínicament reconeguts (Boué *et al.* 1985) probablement perquè la majoria són letals i es perden molt primerencament.

Estudis citogenètics amb FISH d'embrions mostren que les alteracions cromosòmiques *de novo* poden ser originades durant la meiosi o bé postzigòticament (Harper *et al.* 1995). Per deduir l'origen d'aquestes anomalies s'han estudiat avortaments espontanis utilitzant marcadors polimòrfics del DNA (pròxims als centròmers), i també gàmetes humans (especialment oòcits) mitjançant anàlisis citogenètiques (Kuliev *et al.* 2003). Aquests estudis han indicat que la majoria d'aneuploidies humanes constitucionals, viables o no i detectades en embarassos de primer trimestre i en nascuts vius, estan classificades com a originades en la meiosi I materna (Antonarakis 1991; Nicolaidis i Petersen 1998; Hassold i Hunt 2001). Tal i com es mostra en la Taula 1.2, les excepcions són la Síndrome de Turner en la qual el gàmeta nul·lisòmic pel cromosoma X prové de l'espermatozoide en el 80% dels casos, i la trisomia 18, que s'origina, majoritàriament, en la segona divisió meiòtica femenina (Fisher *et al.* 1995; Jacobs i Hassold 1995; Savage *et al.* 1998).

Taula 1.2. Origen parental de les diferents aneuploïdies (en percentatges) i afectació de la freqüència de recombinació. Adaptada de Jacobs i Hassold (1995), de Savage *et al* (1998) i de Fisher *et al* (1995).

Cariotip	Patern	Matern	Matern			Recombinació
			Meiosi I	Meiosi II	Postzigòtic	
45, X0	80	20	-	-	-	-
47, XXX	10	90	66	18	16	reduïda
47, XXY	46	54	70	25	5	reduïda
Trisomia 2	44	56	-	-	-	-
Trisomia 13, 14, 15, 22	12	88	68	32	-	reduïda
Trisomia 16	0	100	100	0	-	reduïda
Trisomia 18	3	97	29	65	6	reduïda
Trisomia 21	10	90	73	25	2	reduïda

Una possible explicació d'aquest fenomen és que en la meiosi materna, el punt de control entre metafase I i anafase I, que regula la correcta alineació dels cromosomes en el fus, no és tan estricta com en l'espermatogènesi (LeMarie-Adkins *et al.* 1997). Per tant, quan es produeix un error en aquesta alineació (per exemple, la presència d'un univalent), la meiosi masculina es bloqueja mentre que la meiosi femenina tolera aquests errors i continua (Hunt *et al.* 1995), produint gàmetes aneuploides. A més, com veurem a continuació l'edat materna avançada és el factor més lligat a la incidència d'aneuploïdies. L'edat materna només afecta la durada de la primera divisió meiótica (que dura de 10 a 45 anys), però no la durada de la segona. Això explicaria perquè la majoria d'errors es produeixen durant la primera divisió meiótica (Miller i Therman 2001).

1.1.3. Edat materna avançada i aneuploïdia

El major factor predisposant a la no-disjunció és l'edat materna avançada, mentre que l'edat paterna té un efecte molt petit en la incidència de no-disjunció. La incidència de disomies en espermatozoides incrementa linealment amb l'edat paterna (Bosch *et al.* 2003), mentre que la incidència de trisomies augmenta exponencialment amb l'edat materna a partir dels 30 anys. Per exemple, una dona de 20 anys té un risc de tenir un fill afectat per trisomia 21 de 0,4 per cada 1000 nascuts. Per a dones de 45 anys o més, aquest risc s'incrementa unes 42 vegades, a 17 per cada 1000 nascuts (Hassold i Jacobs 1984). Un efecte similar de l'edat materna s'ha trobat per a la trisomia 18, per la trisomia 13 i per la majoria de les trisomies autosòmiques en avortament espontanis (Miller i Therman 2001).

D'una altra banda, s'ha vist que a mesura que augmenta la edat materna, disminueixen les taxes de implantació i embaràs. Els diferents factors causals podrien ser una baixa

receptivitat de l'úter matern (Meldrum 1993) o bé l'afectació de l'edat materna als oòcits. La primera hipòtesi es podria descartar ja que s'han trobat unes taxes elevades d'embaràs i baixes taxes d'avortament en dones postmenopausiques després de sotmetre's a un tractament de reproducció assistida amb oòcits de donants (Abdalla *et al.* 1993). A més a més, un altre treball (Navot *et al.* 1991) mostra unes taxes d'embaràs similars en dones de diferents edats quan reben oòcits de donants. Així doncs, les baixes taxes d'implantació i d'embaràs no sembla que siguin causa d'un factor endometrial sinó de l'efecte de l'edat materna en l'oòcit.

La connexió més òbvia entre edat materna i la competència embrionària és l'aneuploïdia (Bahçe *et al.* 1999). L'augment de les aneuploïdies amb l'edat materna ha estat descrita en oòcits, embrions, avortament espontanis i nascuts vius (Plachot *et al.* 1988; Navot *et al.* 1991; Munné *et al.* 1995a; Dailey *et al.* 1996; Nicolaidis i Petersen 1998; Márquez *et al.* 2000; Sandalinas *et al.* 2001; Pellestor *et al.* 2003).

L'edat materna, doncs, està correlacionada amb un risc augmentat de patir avortaments (que involucra freqüentment els cromosomes 15, 16, 22 i X) o de tenir fills amb anomalies cromosòmiques (que involucra freqüentment els cromosomes 13, 18, 21, X i Y) (Wardburton *et al.* 1986)(Figura 1.1). També està relacionada amb una disminució de les taxes d'implantació, probablement per la letalitat de moltes anomalies cromosòmiques, i, per tant, amb una disminució de la fertilitat.

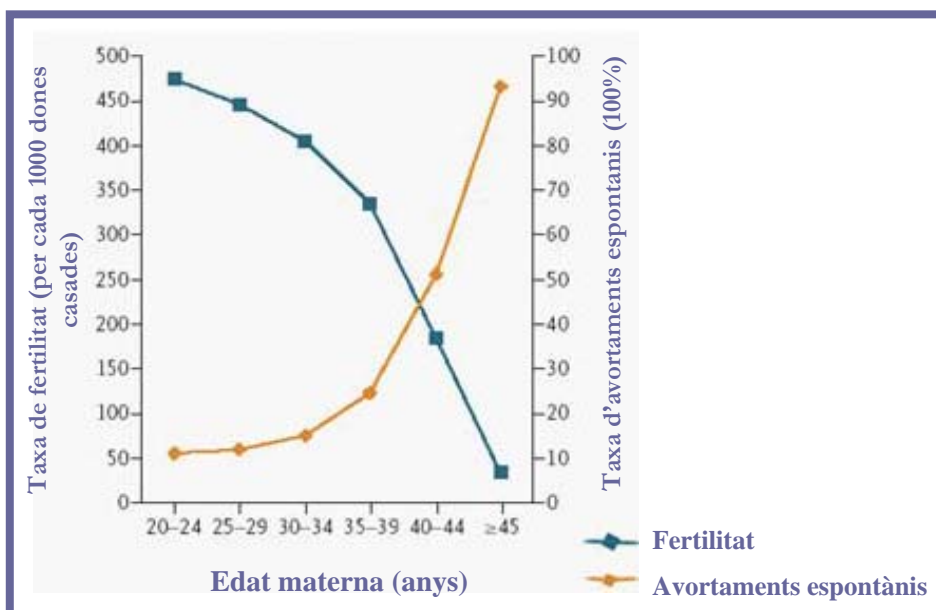


Figura 1.1. Fertilitat i avortaments espontanis en funció de l'edat en poblacions que no practiquen la contracepció. Adaptada de Menken i Anderson *et al.* (Menken *et al.* 1986; Anderson *et al.* 2000).

L'efecte de l'edat materna té grans implicacions en la nostra societat ja que en 10 anys (del 1991 al 2001) el tant per mil de dones amb la primera maternitat entre els 35 i els 39 anys s'ha incrementat un 36% (Jeffner 2004).

1.2. MECANISMES INVOLUCRATS EN L'ANEUPLOÏDIA D'ORIGEN MATERN

1.2.1. Mecanismes de no-disjunció

S'han descrit principalment dos mecanismes causants d'aneuploïdies:

1.2.1.1. No-disjunció de bivalents en meiosi I

És el model clàssic. Comporta el guany o la pèrdua d'un univalent (cromosomes amb dues cromàtides) (Zenzes *et al.* 1992; Kamiguchi *et al.* 1993; Dailey *et al.* 1996) (Figura 1.2).

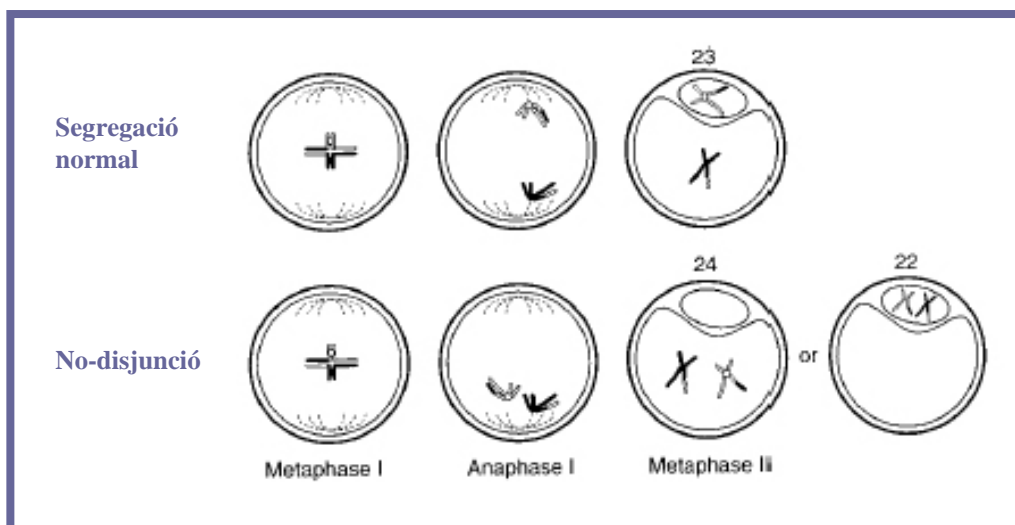


Figura 1.2. Comportament dels cromosomes en una segregació normal i durant la no-disjunció. Adaptada d'Angell (1997)

1.2.1.2. Separació precoç de cromàtides germanes (predivisió, PSSC)

Comporta el guany o pèrdua de cromàtides. Aquest model va ser proposat per Roslyn Angell el 1993 en observar cromàtides extres en extensions de d'oòcits en metafase II (MIIs). Una sèrie posterior efectuada per la mateixa autora va confirmar aquesta observació (Angell *et al.* 1993; Angell 1997). Com es pot veure a la Figura 1.3, la predivisió de

cromàtides germanes pot ser desequilibrada o equilibrada, on no hi ha ni guany ni pèrdua de material.

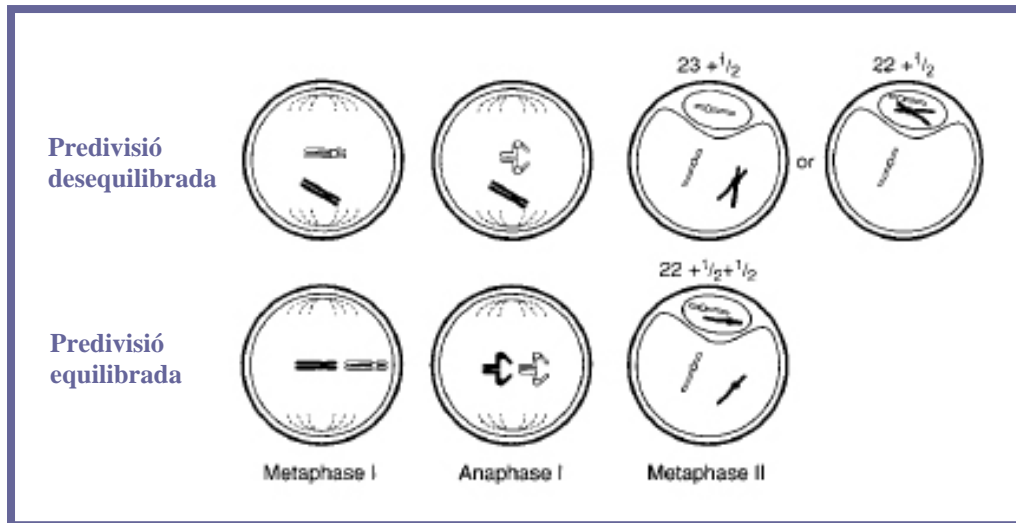


Figura 1.3. Separació precoç de cromàtides germanes. Adaptada d'Angell (1997)

1.2.2. Patrons d'aneuploidia específics per cromosomes

En estudis de blastòmers s'han trobat aneuploidies afectant tots els cromosomes del cariotip (Wilton 2005). Una revisió d'estudis citogenètics en espermatozoides, mostra una distribució similar d'aneuploidies per a tots els cromosomes exceptuant-ne les aneuploidies pels cromosomes 21, X i Y, que es troben augmentades respecte la resta (Templado *et al. in press*). En embrions i oòcits l'existència de patrons d'aneuploidies específics és encara més evident, de manera que aneuploidies per a certs cromosomes són molt més freqüents que anomalies trobades per altres (Pellestor 1991b; Munné *et al.* 2004). Per exemple, la trisomia 16 correspon aproximadament a un quart del total de trisomies presents en embarassos clínicament reconeguts (Miller i Therman 2001) i és la trisomia més freqüent en avortaments espontanis (7,5%) (Hassold i Jacobs 1984). En canvi, altres trisomies autosòmiques (amb l'excepció de les trisomies 13, 18 i 21, que són les observades en nascuts vius) com per exemple la trisomia 1, s'observen amb molta menor freqüència en aquests estadis del desenvolupament (Munné *et al.* 2004).

La sobrerrepresentació d'aneuploidies per a determinats cromosomes pot ser deguda a una major incidència d'aneuploidies que afecten a aquests cromosomes (cromosomes "susceptibles" a errors) però també a una major tolerància a les anomalies d'aquests cromosomes en les primeres etapes del desenvolupament embrionari (Miller i Therman

2001; Munné *et al.* 2004). Així doncs són necessaris estudis directes dels gàmetes humans, especialment de l'oòcit, ja que els estudis més tardans en avortaments i en nascuts vius estan esbiaixats per la viabilitat o letalitat de les aneuploidies (Pellestor *et al.* 2003), i subestimen la incidència d'anomalies per a certs cromosomes que causarien la degeneració de l'embrió en un estadi molt més primerenc (Miller i Therman 2001). La introducció de les tècniques de reproducció assistida han permès estudiar la contribució de l'oogènesi, l'espermatogènesi, la fecundació i les primeres etapes de l'embriogènesi en la producció d'anomalies cromosòmiques (Martini *et al.* 2000).

1.2.3. Edat materna, no-disjunció i recombinació: un model de dues etapes

Tant la no-disjunció com la divisió precoç de cromàtides germanes estan altament correlacionades amb l'edat materna (Sandalinas *et al.* 2002; Pellestor *et al.* 2003) i amb una reducció de la recombinació meiòtica (Sherman *et al.* 1994; Hassold *et al.* 1995).

La recombinació meiòtica estableix els bivalents al final de la profase I. Mentre els centròmers dels dos cromosomes homòlegs es repel·len, aquests es mantenen junts fins la metafase gràcies als quiasmes. Sense quiasmes és possible que els dos cromosomes homòlegs s'aliniïn individualment en la placa metafàsica segregant-se a l'atzar al mateix pol, enlloc de fer-ho a diferents pols (Lamb i Hassold 2004). Diversos estudis han proposat que els bivalents amb menys quiasmes o amb els quiasmes localitzats de manera no apropiada, són els que estan més predisposats a patir no-disjunció (Koehler *et al.* 1996; Angell 1997). Per exemple, el cromosoma 16 té una longitud genètica de 172 cM en controls, però només de 120 cM en individus de pedigrís amb trisomia 16 (Miller i Therman 2001).

Tanmateix, una dona de 40 anys tindrà el mateix percentatge de cromosomes "susceptibles" a la no-disjunció (cromosomes sense quiasmes o amb un posicionament no apropiat dels quiasmes) que una dona de 20 anys ja que la recombinació meiòtica es produeix en l'oòcit del fetus, abans del bloqueig de la primera divisió meiòtica de l'oòcit en metafase I (Cohen 2002). Es tracta, doncs, d'una primera etapa independent de l'edat, en la qual s'estableixen cromosomes "susceptibles" als errors (Lamb *et al.* 1996).

Per tant, tot i que s'ha vist que l'absència de recombinació és un factor predisposant a la no-disjunció, calen altres factors per explicar la relació entre l'aneuploidia i l'edat materna. Fins a l'actualitat s'han descrit diversos mecanismes involucrats en aquesta segona etapa

depenent de l'edat. Aquests mecanismes causarien una disminució en l'eficiència de segregació dels cromosomes "susceptibles" establerts en la primera etapa. Entre aquests podem incloure desequilibris hormonals en edats avançades que afecten a l'ambient ovàric (Wardburton *et al.* 1986) o una disminució en l'habilitat per formar un fus meiótic normal (Battaglia *et al.* 1996).

Així doncs, el model de dues etapes pot explicar l'increment d'errors en la primera divisió meiótica. Tanmateix, hi ha certes evidències que indiquen la implicació d'altres mecanismes. Per exemple, els errors en la segregació del cromosoma 18 se solen produir en la segona divisió meiótica i, en aquest cas, no hi ha evidències d'una reducció de recombinació en la primera divisió meiótica (Cohen 2002).

1.2.4. Cohesió entre cromàtides i aneuploïdia

El complex de cohesines està constituït per un mínim de quatre subunitats que formen un anell proteic. Aquest complex de proteïnes nuclears es situa a la regió centromèrica i també al llarg dels braços de les cromàtides germanes (Michaelis *et al.* 1997) i tenen la funció de mantenir-les unides oposant-se a la força fada pels microtúbuls units al cinetocors dels cromosomes que intenten separar els cromosomes homòlegs.

Les subunitats que formen l'anell proteic (Smc1 i Smc3) dimeritzen gràcies a la unió amb l'ATP. Dues subunitats més (Scc1 i Scc3) s'uneixen a aquest dímer i formen un tetràmer. Aquest complex llavors s'unirà al DNA hidrolitzant l'ATP (Uhlmann 2004), envoltarà les cromàtides germanes i les mantindrà unides. Just abans de l'anafase II una proteïna anomenada separasa és alliberada de la proteïna que l'estava inhibint, la securina, que és degradada pel complex promotor de l'anafase (APC). Llavors la separasa s'uneix a la subunitat Scc1 i obre l'anell proteic, amb la qual cosa es permet la separació de les cromàtides germanes.

Així doncs, un altre mecanisme que podria estar implicat en l'origen de les aneuploïdies seria la degradació de determinades cohesines amb l'edat, cosa que produiria una pèrdua gradual de cohesió entre les dues cromàtides germanes. Aquests bivalents podrien tornar-se inestables i adoptar una configuració lineal en la placa metafàsica I, fet que afavoriria una segregació equatorial de cromàtides en lloc de cromosomes, causant la separació precoç de cromàtides germanes abans de l'anafase II (Wolstenholme i Angell 2000).

1.3. TÈCNiques PER A L'ESTUDI CITOGENÈTIC DE MIIs D'OÒCITS I CORPUSCLES POLARS

Atés que la majoria d'aneuploïdies constitucionals tenen el seu origen en la meiosi materna (Antonarakis 1991; Nicolaidis i Petersen 1998; Hassold i Hunt 2001), és molt important obtenir informació citogenètica directa a partir de l'estudi de MIIs d'oòcits (MIIs) i corpuscles polars. Això ens permetrà avaluar la incidència d'anomalies cromosòmiques i investigar els mecanismes responsables d'aquestes anomalies. El major problema per fer anàlisis citogenètiques dels oòcits va ser la seva poca disponibilitat. A la dècada dels 80, però, el desenvolupament de les tècniques de reproducció assistida va permetre disposar d'un nombre d'oòcits suficient per fer estudis citogenètics de petites sèries. Cal destacar, però, que els oòcits analitzats són un grup seleccionat d'oòcits: oòcits que no són fecundats correctament, que molts cops són cultivats *in vitro* i que provenen de pacients infèrtils que han estat sotmeses a una estimulació hormonal. Per tant, és important destacar que aquests oòcits no reflecteixen necessàriament la població general.

1.3.1. Citogenètica convencional i cariotipatge

En l'any 1966 es va desenvolupar una tècnica per a la fixació del material cromosòmic de l'oòcit de mamífers (Tarkowski 1966). En la dècada dels 80, l'adaptació d'aquesta tècnica va permetre la realització i publicació d'un gran nombre d'estudis citogenètics d'oòcits humans. Tanmateix, les dades resultants d'aquests estudis mostren 3 vegades més hipohaploïdies que hiperhaploïdies, fet que indica una elevada incidència de pèrdues artefactuals de cromosomes amb aquest mètode de fixació. L'any 1983 es va descriure una nova tècnica que va permetre la fixació gradual del complement cromosòmic de les MIIs i una reducció del nombre de pèrdues artefactuals (Mikamo i Kamiguchi 1983). S'ha de tenir en compte, però, que l'eficiència d'aquestes tècniques es manté molt baixa i que per causa de problemes tècnics a l'hora de fixar el material, aproximadament el 50% dels oòcits inicials són exclosos de l'anàlisi (Pellestor *et al.* 2005). Les extensions cromosòmiques han de tenir els cromosomes prou separats per poder comptar-los, però també prou junts per no incrementar la taxa de pèrdues artefactuals. A més a més, la particular morfologia dels cromosomes de les MIIs, amb la cromatina molt condensada i les dues cromàtides germanes més separades, fan que la identificació individual dels cromosomes resulti molt difícil, fins i tot després d'intentar bandejar els cromosomes (Pellestor *et al.* 1993; Pellestor

et al. 2002). Això explica per què la majoria d'estudis s'han basat en un simple comptatge cromosòmic i/o a identificar els cromosomes seguint únicament la classificació de Denver (classificació en set grups dels cromosomes en funció de la seva mida i de la posició del seu centròmer: A, B, C, D, E, F i G) (Figura 1.4).

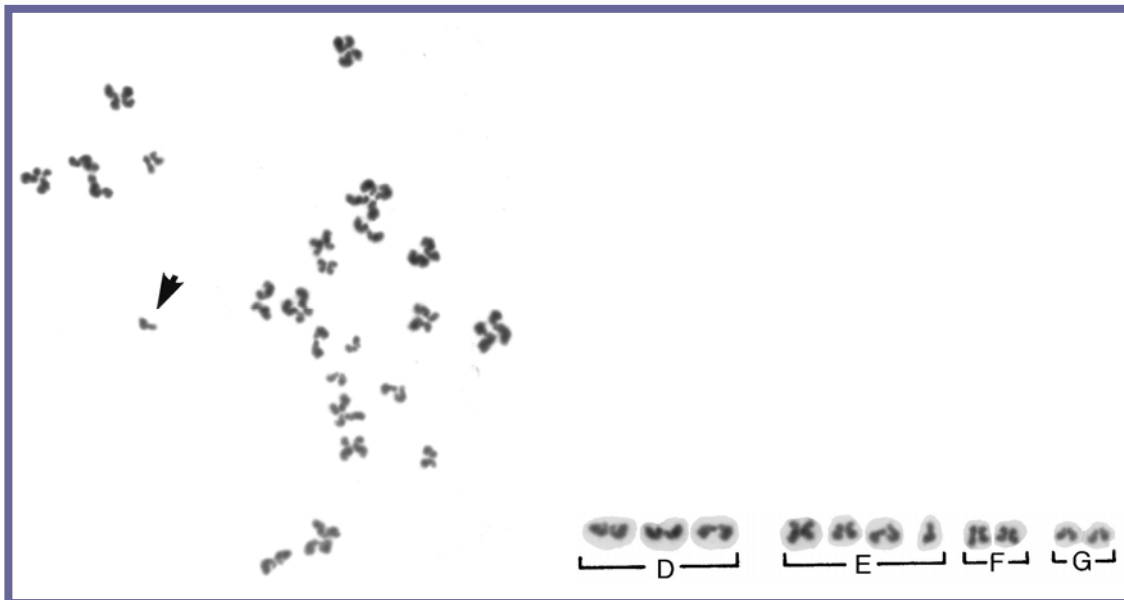


Figura 1.4. Dotació cromosòmica d'una MII d'oòcit amb tinció uniforme mostrant el guany d'una cromàtida d'un cromosoma del grup E. Adaptació d'Angell *et al* (1997)

1.3.2. Tècniques de citogenètica molecular

1.3.2.1. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La hibridació *in situ* fluorescent utilitzant sondes marcades fluorescentment (Pinkel *et al.* 1988) s'ha convertit en la tècnica estàndard per a l'avaluació de les aneuploidies. S'han utilitzat de dues a nou sondes específiques de cromosoma repartides en una, dues i fins a tres rondes d'hibridació (Dyban *et al.* 1996; Anahory *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a).

Les sondes utilitzades han estat de quatre tipus (Figura 1.5) (Kearney 2001):

- Sondes centromèriques (CEP, *chromosome enumeration probe*): són sondes específiques per cada cromosoma que identifiquen els diferents centròmers. Són sondes petites però molt eficients ja que proporcionen un senyal gran i intens en ser complementàries a seqüències repetides en tàndem (seqüències α , d'una mida d'un 171 pb que es van repetint). Tots els centròmers presenten un mateix tipus de seqüència de DNA centromèric i només es diferencien en el 2-3% de la seva seqüència (excepte els centròmers 13/21 i 14/22, que són pràcticament idèntics).

- Sondes locus específiques (LSI, *locus specific identifier*): sondes complementàries a una seqüència única del genoma corresponent a seqüències gèniques. El senyal resultant és més puntual que en el cas de les sondes centromèriques. Tenen mides variables, d'1-10 kb (plàsmids) a 80 kb-1 Mb (si són BACs, *Bacterial Artificial Chromosomes*, o YACs, *Yeast Artificial Chromosomes*).
- Sondes telomèriques (TEL): sondes complementàries a seqüències subteloemèriques, molt riques en gens i específiques dels cromosomes. Donen senyals encara més petits que les locus-específiques. Tenen una mida aproximada de 30 a 100 kb.
- Sondes de pintatge cromosòmic (WCP, *whole chromosome painting*): són sondes obtingudes a partir de cromosomes microdisseccionats o aïllats mitjançant citometria de fluxe. Aquests s'amplifiquen i es marquen amb DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed PCR) i hibriden amb múltiples seqüències al llarg d'un únic cromosoma.

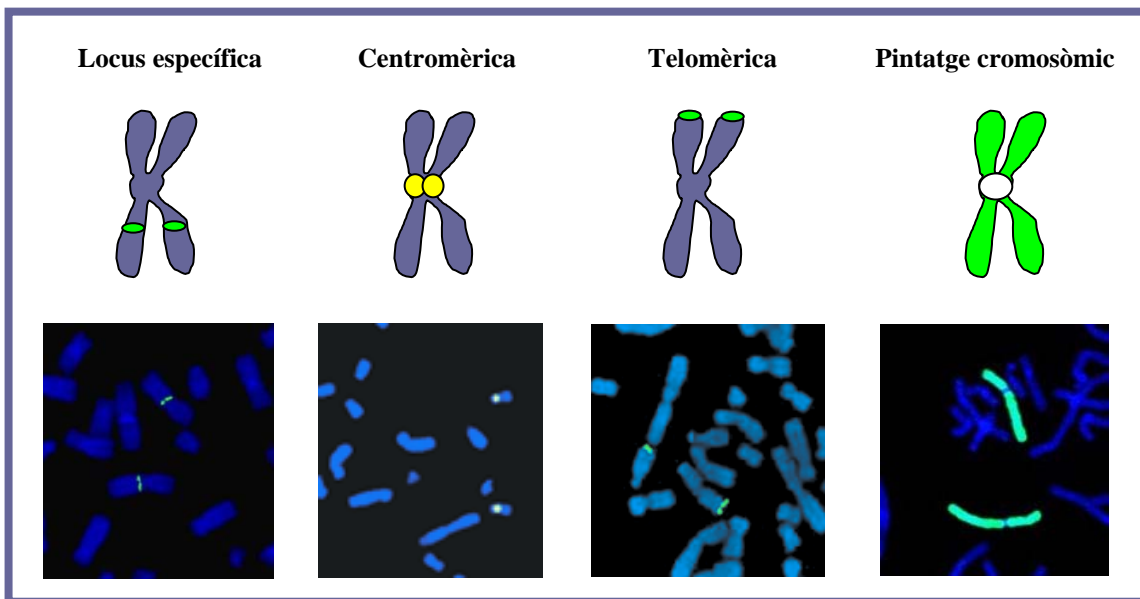


Figura 1.5. Tipus de sondes utilitzades en FISH

La FISH, a diferència de les tècniques citogenètiques convencionals, permet identificar cromosomes preseleccionats en l'oòcit. Tanmateix, també depèn de la fixació del complement cromosòmic de la MII i, per tant, podem trobar pèrdues artefactuals de cromosomes. Cal destacar que el nombre de cromosomes que poden ser analitzats en cada ronda d'hibridació està lligat al nombre limitat de fluorocroms disponibles i a les probabilitats de solapament dels senyals (Wells i Levy 2003; Wilton 2005). Això fa que, en

el millor dels casos, no es puguin analitzar més de cinc cromosomes en cada ronda. A més a més, el nombre de rondes que es poden aplicar també és limitat ja que s'ha descrit que una tercera ronda d'hibridació comporta una degeneració important del DNA motlle i una disminució en l'eficiència de l'hibridació (Liu *et al.* 1998). Una altra limitació de la FISH és que només proporciona informació sobre la zona específica on hibrida la sonda, però no de la resta del cromosoma.

1.3.2.2. *Primed in-situ labelling* (PRINS)

És una variant de la FISH convencional i la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) i s'ha aplicat al diagnòstic genètic preimplantacional utilitzant el primer corpuscle polar (Petit *et al.* 2000). Es basa en la fixació del material cromosòmic del corpuscle polar i en la utilització de *primers* específics pels centròmers dels cromosomes 13, 16, 18, 21 o X. Aquests *primers* s'uniran al DNA motlle fixat en el portaobjectes i gràcies a una Taq Polimerasa, es produirà una polimerització *in situ* del DNA on s'incorporaran els nucleòtids marcats fluorescentment. El portaobjectes se situa sobre un termociclador HYBAID Omnislide® i es fan fins a tres reaccions de marcatge per detectar aquests cinc cromosomes. Tot i que la durada del procediment és tan sols de 40 minuts, el nombre de cromosomes analitzats segueix sent molt limitat.

1.3.2.3. *Peptide nucleic acids* (PNAs)

Van ser descrits l'any 1991 (Nielsen *et al.* 1991). Es tracta d'unes sondes sintetitzades mimetitzant l'estructura del DNA. Consten de 15-25 bases de DNA complementàries a la seqüència que es vol detectar però unides a un esquelet pèptidic sense càrrega (en lloc de fer-ho a l'esquelet de desoxiriboses fosfatades i carregades del DNA). Aquesta absència de càrregues en la sonda permet augmentar l'eficiència, l'especificitat i l'afinitat de la sonda pel DNA diana. Han estat recentment aplicats a l'estudi citogenètic de MIIs, corpuscles polars i embrions per analitzar fins a 8 cromosomes (Paulasova *et al.* 2004; Agerholm *et al.* 2005) i, a igual que en el cas de la FISH convencional o el PRINS, els estudis utilitzant PNAs estan limitats per la necessitat de fixació del material i pel nombre de cromosomes analitzats.

1.3.2.4. Tècniques de FISH multicolor: múltiple-FISH (M-FISH), *Spectral Karyotyping* (SKY) i cenM-FISH

El principi bàsic i l'avantatge d'aquestes tècniques és l'obtenció de més colors que els fluorocroms disponibles. És a dir, els fluorocroms es barregen en proporció 1:1 per

donar colors diferents de manera que el nombre teòric de colors (i per tant, de cromosomes) que podem diferenciar és $2^n - 1$, on $n =$ nombre de fluorocroms disponibles. Tot això fa que amb tan sols combinacions de cinc fluorocroms sigui possible identificar tots els cromosomes mitjançant 24 colors.

Així doncs, aquestes tècniques permeten superar la limitació de la FISH convencional, del PRINS i dels PNAs quant al nombre de cromosomes analitzats. Tanmateix, són tècniques que requereixen de molt bones extensions cromosòmiques, a igual que les tècniques de citogenètica convencional. Això fa que una gran proporció dels oòcits inicials no puguin ser analitzats. A més a més, en ser tècniques dependents de la fixació del material cromosòmic estan exposades a pèrdues artefactuals de cromosomes durant la fixació.

1.3.2.4.1. M-FISH i SKY

La M-FISH (Speicher *et al.* 1996) i l'SKY (Schröck *et al.* 1996) han estat aplicades en els darrers anys per a l'estudi del material cromosòmic de l'oòcit (Márquez *et al.* 1998; Clyde *et al.* 2001). Totes dues són variants tecnològiques de la FISH basades en la utilització de sondes de pintat cromosòmic que cobreixen la totalitat del genoma i que es marquen combinatòriament permetent la identificació pel seu color dels 22 cromosomes homòlegs i dels cromosomes sexuals.

Ambdues tècniques tenen una resolució d'una Mb i les sondes estan disponibles comercialment. En ambdós casos s'utilitza la citometria de flux per separar els 24 cromosomes humans (cromosomes 1-22, X i Y). Aquests cromosomes es marquen combinatòriament utilitzant d'una a quatre molècules diferents (d'un total de cinc). Les diferents combinacions d'aquestes molècules (fluorocroms, biotina o digoxigenina) creen un color específic i únic per cada parella d'homòlegs. Les diferents alíquotes dels pintats cromosòmics marcats amb les diferents molècules es barregen amb un excés de Cot-1-DNA, que servirà per bloquejar les seqüències repetitives del genoma.

Ambdues tècniques es diferencien en el fet que el M-FISH utilitza múltiples filtres per excitar els diferents fluorocroms i s'obtenen, per tant, diferents imatges amb una càmera CCD (*charge couple device*). Un programa especial superposa aquestes imatges i s'obté una imatge composta en la que a cada cromosoma se li assigna un *pseudocolor* (colors artificials que permeten distingir cromosomes amb colors similars difícilment diferenciables a ull nu). Això permet ajustar els paràmetres del programa al resultat de cada experimental en concret (variant el temps d'exposició d'un o més fluorocroms). En canvi, en l'SKY es captura una sola imatge a través d'un filtre de triple banda dissenyat específicament per excitar els cinc

fluorocroms simultàniament (Figura 1.6). A continuació es mesura l'espectre total de llum emesa (des de l'espectre visible fins a pràcticament l'espectre infraroig) emprant un interferòmetre (SpectraCube®) que genera per cada píxel una corba òptica específica, en funció del fluorocrom o de la combinació de fluorocroms determinada, mitjançant la transformació de Fourier. La classificació espectral assigna llavors un color determinat a tots els píxels amb el mateix espectre i s'obté una imatge RGB, així com uns *pseudocolors* que permeten un cariotipatge semiautomàtic.

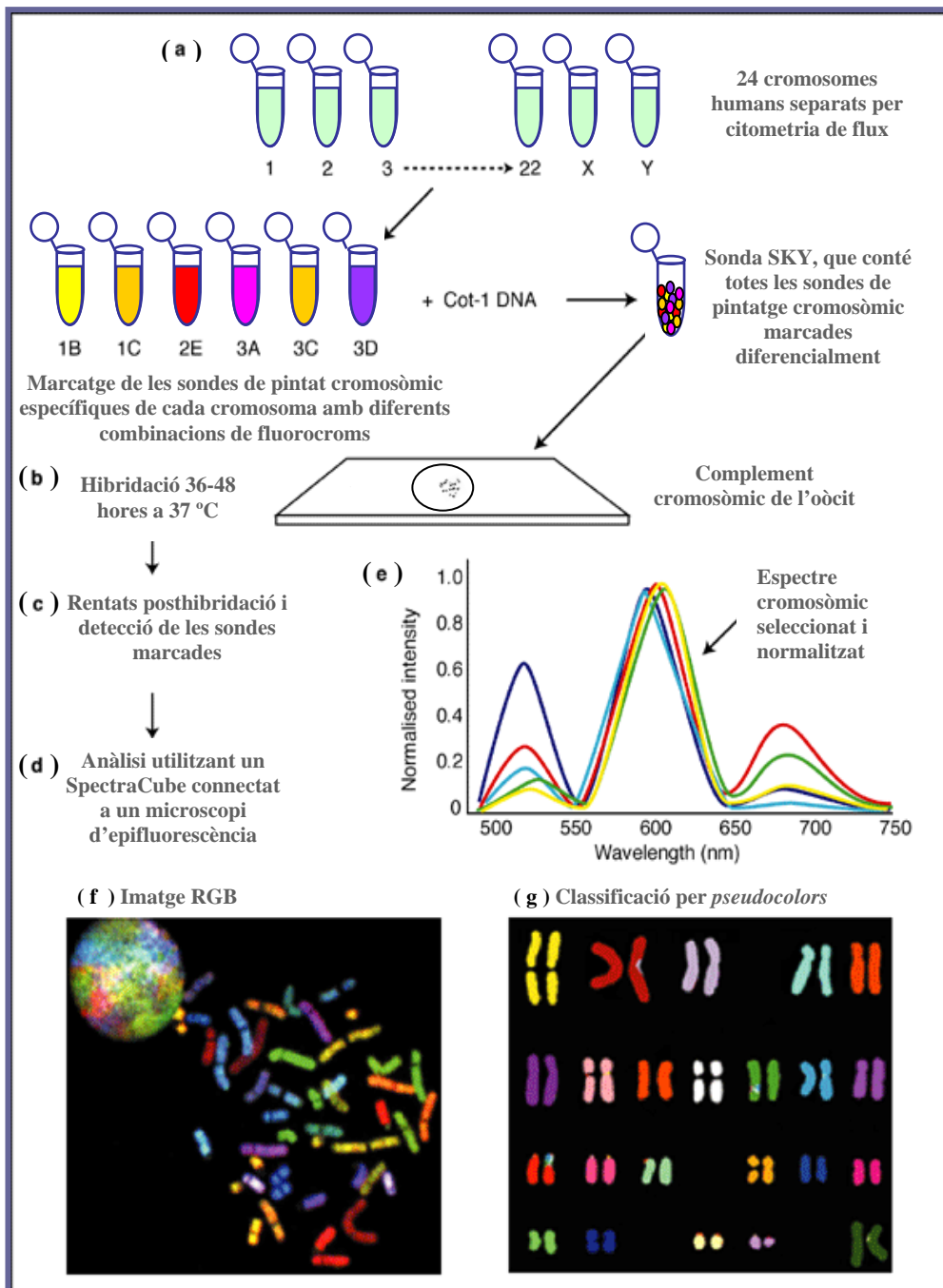


Figura 1.6. Esquema del funcionament i etapes de l'*Spectral Karyotyping* (SKY).

1.3.2.4.2. CenM-FISH

Es tracta d'una altra variant tecnològica de la FISH que també permet la identificació simultània de tots els cromosomes (exceptuant-ne els cromosomes 13 i 21) mitjançant 24 colors basant-se en la utilització de sondes específiques de les regions alfasatèlit dels centròmers (Nietzel *et al.* 2001).

En aquest cas, les sondes no estan disponibles comercialment però poden ser facilitades amb una finalitat no lucrativa pel laboratori que les ha desenvolupat. També s'utilitzen diferents combinacions d'un a quatre fluorocroms (d'un total de cinc) per marcar els diferents centròmers i l'anàlisi es fa amb un programa de M-FISH (Figura 1.7).

És una tècnica molt útil per identificar cromosomes marcadors (*small supernumerary marker chromosomes*, sSMC) ja que molts d'ells pràcticament no contenen eucromatina i per tant, són difícils de detectar amb altres tècniques com l'SKY, el M-FISH o la CGH (Liehr *et al.* 2004). És una tècnica susceptible de ser aplicada en bones extensions cromosòmiques de MIIs i, a més a més, es pot fer sobre portaobjectes prèviament bandejats.

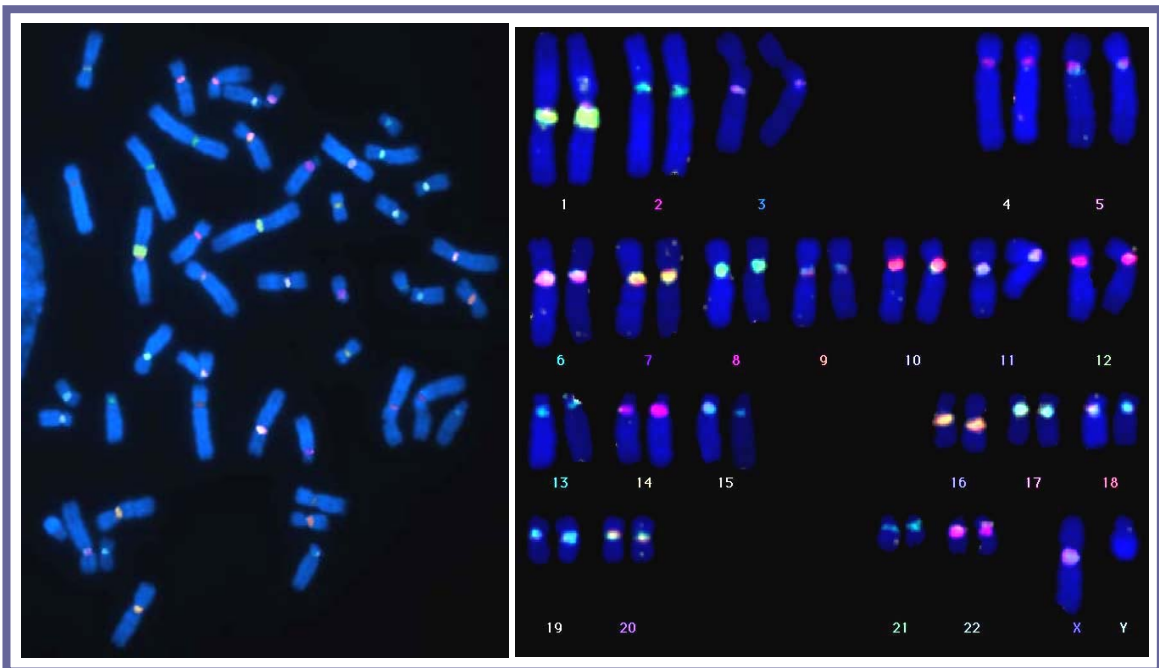


Figura 1.7. Anàlisi mitjançant cenM-FISH d'una metafase de limfòcit d'un individu control 46, XY

1.3.2.5. Hibridació genòmica comparada (CGH)

Aquesta tècnica permet detectar desequilibris en el nombre de còpies de qualsevol cromosoma, en una sola hibridació i sense la necessitat de fixar el material ni de tenir els cromosomes en metafase. Tot i que inicialment es va descriure per detectar canvis en el nombre de còpies del DNA en tumors (Kallioniemi *et al.* 1992), actualment també és molt útil per a l'anàlisi de desequilibris cromosòmics constitucionals en gairebé qualsevol tipus de mostra.

La CGH es basa en la hibridació competitiva d'un DNA control marcat en verd (control) amb el DNA de la mostra a estudiar marcat en vermell (test o problema), sobre una extensió cromosòmica de limfòcits d'un individu control. Durant l'anàlisi, un programa especial fa una comparació entre la quantitat de fluorescència vermella i verda, calcula una mitjana al llarg de cada cromosoma i li assigna un perfil. Així, a les regions on la quantitat relativa de DNA del test i del control és equivalent, la relació vermell:verd serà 1.0 i la regió es veurà groga. En el cas que la mostra a estudiar tingui un guany d'un cromosoma respecte el DNA control, aquest cromosoma tindrà una relació vermell-verd superior a 1,25 i es veurà relativament més vermell. Pel contrari, si hi ha una pèrdua o nul·lisomia d'un cromosoma concret en el DNA problema, la relació vermell/verd serà inferior al 0,75 i aquest cromosoma apareixerà més verd i (Figura 1.8).

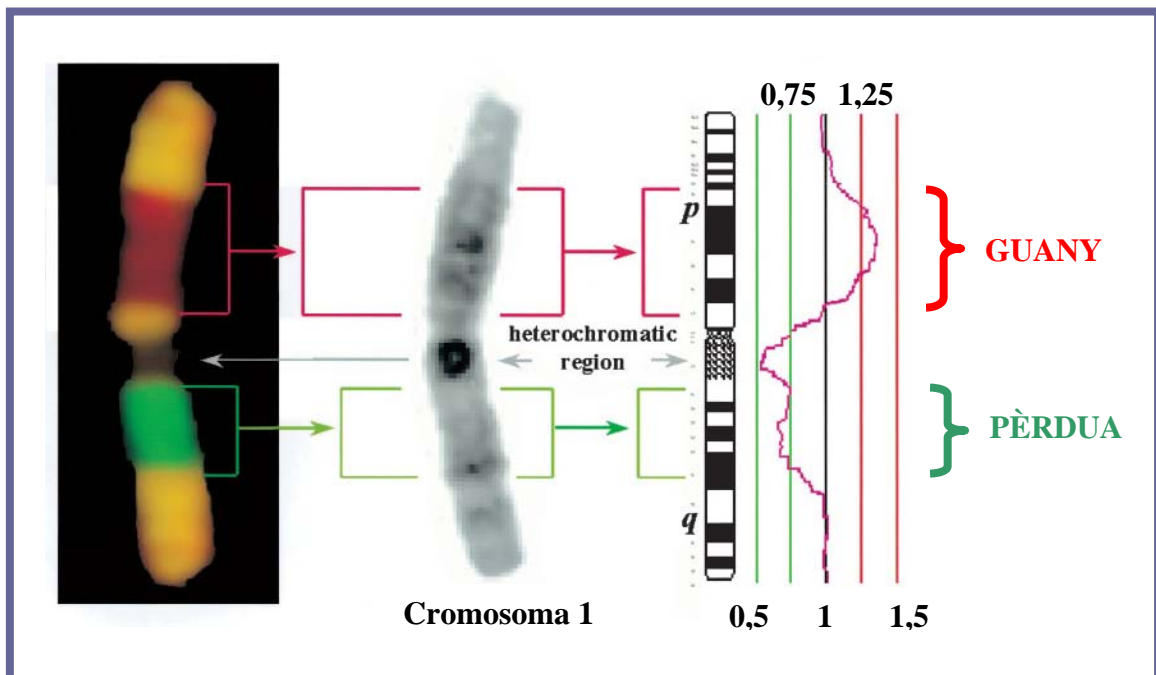


Figura 1.8. Guanys i pèrdues per a regions del cromosoma 1 detectats amb CGH (Adaptació de Wells i Levy 2003)

Una limitació que presenta aquesta tècnica és que només pot detectar guanys i pèrdues de DNA (per exemple trisomies i monosomies parcials) quan les regions implicades són >10-20 Mb (Kallionemi *et al.* 1994; Bentz *et al.* 1998; Griffin *et al.* 1998). En casos d'amplificació de tumors, la resolució pot arribar a ser de 2-4 Mb (Piper *et al.* 1995). A més a més, és incapaç de detectar canvis en la ploïdia (triploidies, tetraploidies...), alteracions cromosòmiques equilibrades i presenta regions conflictives com per exemple regions centromèriques, heterocromàtiques, telomèriques i cromosomes 17, 19 i 22, que solen mostrar desviacions artefactuals dels perfils.

La CGH s'ha aplicat recentment per a l'estudi simultani dels 23 parells de cromosomes en cèl.lules aïllades (Voullaire *et al.* 1999; Wells *et al.* 1999)(Figura 1.9). Desafortunadament, la quantitat de DNA necessari per fer una CGH és de 200 ng-1 µg i una sola cèl.lula conté tan sols de 5 a 10 pg de DNA. És necessari, doncs, una amplificació de 40.000 vegades el DNA total de la cèl.lula (Wells i Levy 2003).

1.3.2.6. Microarray-CGH (M-CGH)

Aquesta tècnica, igual que la CGH convencional requereix l'amplificació total del genoma cel.lular i també es basa en la hibridació competitiva d'un DNA control marcat de verd (control) amb el DNA de la mostra a estudiar marcat de vermell (test) però en lloc d'empregar-se una extensió de limfòcits d'un individu control s'utilitza un *array*, és a dir, un portaobjectes de vidre on s'han disposat un seguit de clons de 100-200 Kb (BAC o PACs) derivats de diferents seqüències de tots els cromosomes humans. La relació (ràtios) entre els dos DNAs es comparen en imatges computeritzades mitjançant un programa específic (Pinkel *et al.* 1998) (Figura 1.10).

Aquesta tècnica permet augmentar la resolució fins a 45 Kb-1Mb segons la mida dels clons de l'*array*. Tot i així, aquest no seria el principal avantatge en l'anàlisi de cèl.lules aïllades ja que per detectar aneuploidies de cromosomes sencers la resolució de la CGH convencional ja és suficient. El principal avantatge seria la durada del procediment ja que la hibridació en aquest cas dura de 16 a 18 hores i l'anàlisi dels resultats es pot automatitzar.

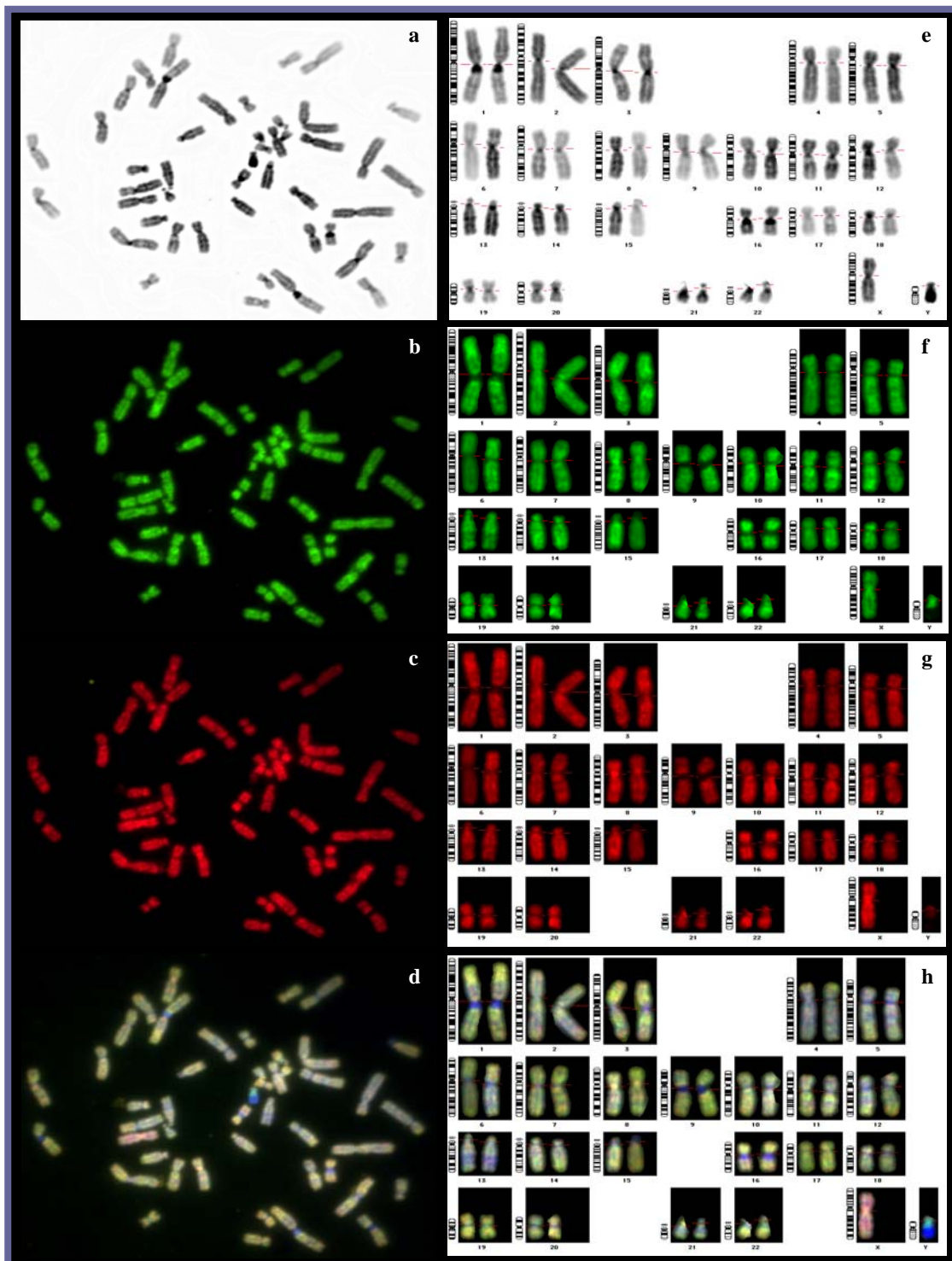


Figura 1.9. Imatges seqüencials d'una hibridació genòmica comparada (a), (b), (c) i (d) Imatges corresponents a una metafase amb DAPI revers, a la hibridació del DNA control, del DNA problema i a la hibridació competitiva, respectivament. (e), (f), (g) i (h) Imatges corresponents al cariotipatge de les imatges de l'esquerra a partir de les bandes DAPI reverses.

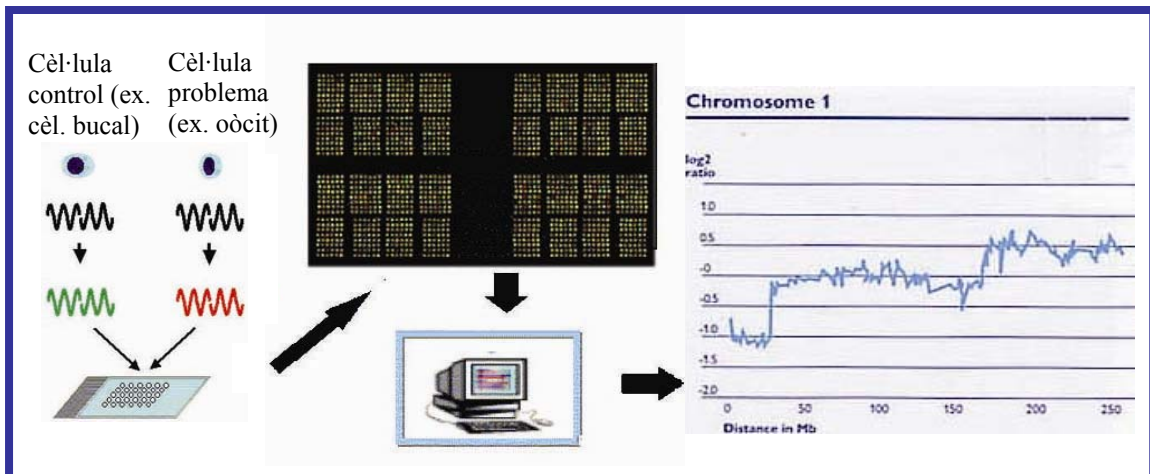


Figura 1.10. Esquema de la tècnica M-CGH en cèl·lules aïllades

Recentment, s'ha aconseguit detectar trisomies 13 i 15 en cèl·lules aïllades després de la seva amplificació amb DOP-PCR i la utilització d'una tecnologia basada en *microarrays* on cada clon del *array* correspon a un cromosoma sencer (Hu *et al.* 2004). Aquesta estratègia però, no incrementa la resolució de la CGH convencional sinó que fins i tot la disminueix, impossibilitant la detecció d'hiperhaploïdies o d'hipohaploïdies parcials. Encara més recentment s'ha descrit una altra estratègia per analitzar aneuploïdies en cèl·lules aïllades mitjançant M-CGH. En aquest cas, el *array* consta de clons derivats dels telòmers dels cromosomes, i els resultats preliminars mostren la detecció de diverses aneuploïdies (incloent-hi la trisomia 21) en el 100% dels casos (Wells *et al.* 2004) Aquesta estratègia, permetria, a més, detectar desequilibris parcials i detectar segregacions desequilibrades de translocacions cromosòmiques (Wilton 2005).

1.4. Amplificació total del genoma d'una cèl·lula

L'amplificació total de la cèl·lula rep el nom de WGA (Whole Genome Amplification). La majoria d'estratègies descrites es basen en la utilització de *primers* degenerats o parcialment degenerats en combinació amb temperatures d'*annealing* molt baixes per tal d'aconseguir una amplificació totalment inespecífica. Això fa que calgui pendre grans precaucions enfront de la contaminació amb altres DNAs que no siguin els de la cèl·lula. S'han descrit varies alternatives per a l'amplificació total de la cèl·lula.

1.4.1. *Primer extension preamplification* PCR (PEP-PCR)

És una tècnica descrita el 1992 per Zhang *et al.* Es basa en la utilització d'una barreja heterogènia de *primers* de 15 nucleòtids degenerats. La temperatura d'*annealing* és molt baixa, d'uns 37°C, per permetre la unió dels primers en qualsevol punt del genoma. Es fan uns 40-50 cicles de PCR i l'amplificació obtinguda és força modesta ja que segueix una cinètica més o menys lineal i, per tant, les seqüències originals només s'amplifiquen de l'ordre d'unes 30 vegades.

Ha estat utilitzada per a l'anàlisi de malalties monogèniques en cèl·lules aïllades (com per exemple la fibrosi quística, l'hemofília A o el Tay-Sachs) (Snabes *et al.* 1994; Sánchez-García *et al. in press*) però no per l'anàlisi d'aneuploidies.

1.4.2. *Degenerate Oligonucleotide Primed* PCR (DOP-PCR)

És una tècnica de WGA descrita al 1992 per Telenius *et al.* que ha tingut un gran ventall d'aplicacions. El *primer* de DOP també és un conjunt heterogeni de *primers* de 20 nucleòtids de longitud (seqüència 5'-GACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'), amb una seqüència específica de 8 nucleòtids a l'extrem 5', una seqüència degenerada de 6 nucleòtids al mig, i una seqüència específica de 6 nucleòtids a l'extrem 3' (Figura 1.11). Per amplificar la totalitat del genoma interessa una PCR el més inespecífica possible, i per això, durant els primers 8 cicles la temperatura d'*annealing* és molt baixa (30°C) i els *primers* podran unir-se a l'atzar a diferents punts del genoma (quedant la cua 5', més específica, penjant). Així les cadenes de nova síntesi incorporaran en el seu extrem 5' la seqüència específica d'aquell *primer* en concret. En un següent cicle, un *primer* s'unirà a l'altre extrem del fragment i, per tant, la nova cadena estarà flanquejada també en l'extrem 5' per una seqüència específica d'un dels *primers* de DOP i el que és més important, en l'extrem 3' tindrà una seqüència complementària a un dels *primers* de DOP. Durant la segona etapa d'amplificació es fan 40 cicles amb una temperatura d'*annealing* molt més astringent (56°C). Ara, les cadenes sintetitzades en l'etapa anterior estan flanquejades en l'extrem 3' per seqüències complementàries a *primers* de DOP i, per tant, això permet augmentar l'especificitat de la reacció i aconseguir una amplificació exponencial del DNA. Utilitzant aquesta tècnica s'aconsegueix obtenir uns 20 µg a partir de l'amplificació del DNA d'una sola cèl·lula, quantitat suficient per fer posteriorment una CGH i, a més, fer múltiples amplificacions per detectar malalties monogèniques (Voullaire *et al.* 1999; Wells *et al.* 1999).

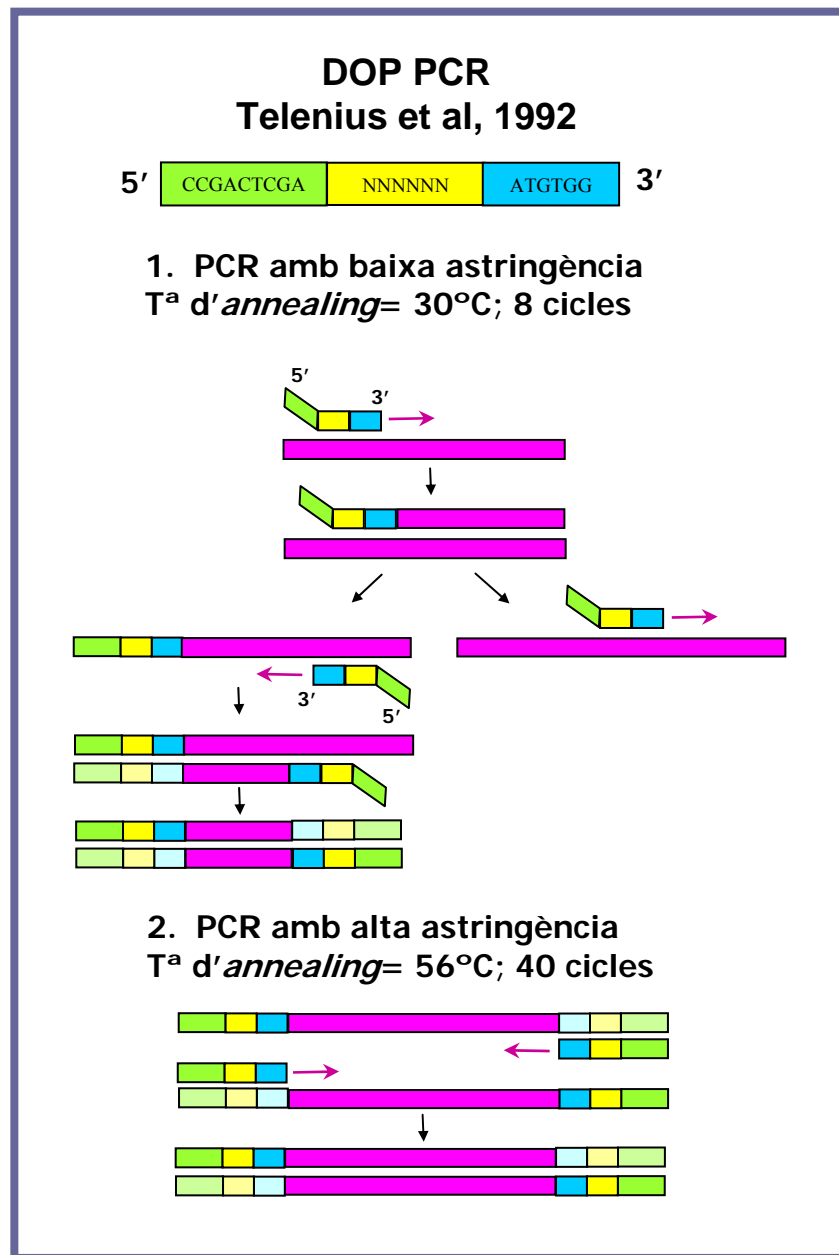


Figura 1.11. Esquema de la tècnica de DOP-PCR aplicada a l'amplificació total del genoma d'una sola cèl·lula.

1.4.3. *Multiple displacement amplification (MDA)*

Aquesta tècnica va ser descrita el 2002 (Dean *et al.* 2002) i s'ha aplicat molt recentment per analitzar cèl·lules aïllades (Handyside *et al.* 2004; Hellani *et al.* 2004). Es basa en la utilització d'hexanucleòtids degenerats com a *primers* i una única temperatura d'*annealing* i polimerització (30°C) (Figura 1.12.). Utilitzant aquesta tècnica s'han aconseguit amplifícacions de l'ordre d'1.000.000 de vegades la seqüència original, és a dir, es poden

obtenir uns 35 µg de DNA a partir de l'amplificació d'una sola cèl.lula. Aquesta tècnica de WGA permet analitzar cèl.lules aïllades de malalties monogèniques, permet l'anàlisi de marcadors polimòrfics de tipus STR (*short tandem repeats*) i fins i tot l'anàlisi d'aneuploidies mitjançant un *array* de CGH. Tanmateix, els resultats de l'anàlisi d'aneuploidies (ex. trisomia 21) utilitzant l'*array* de CGH no acaba de ser conclouent degut a problemes tècnics (Hellani *et al.* 2004).

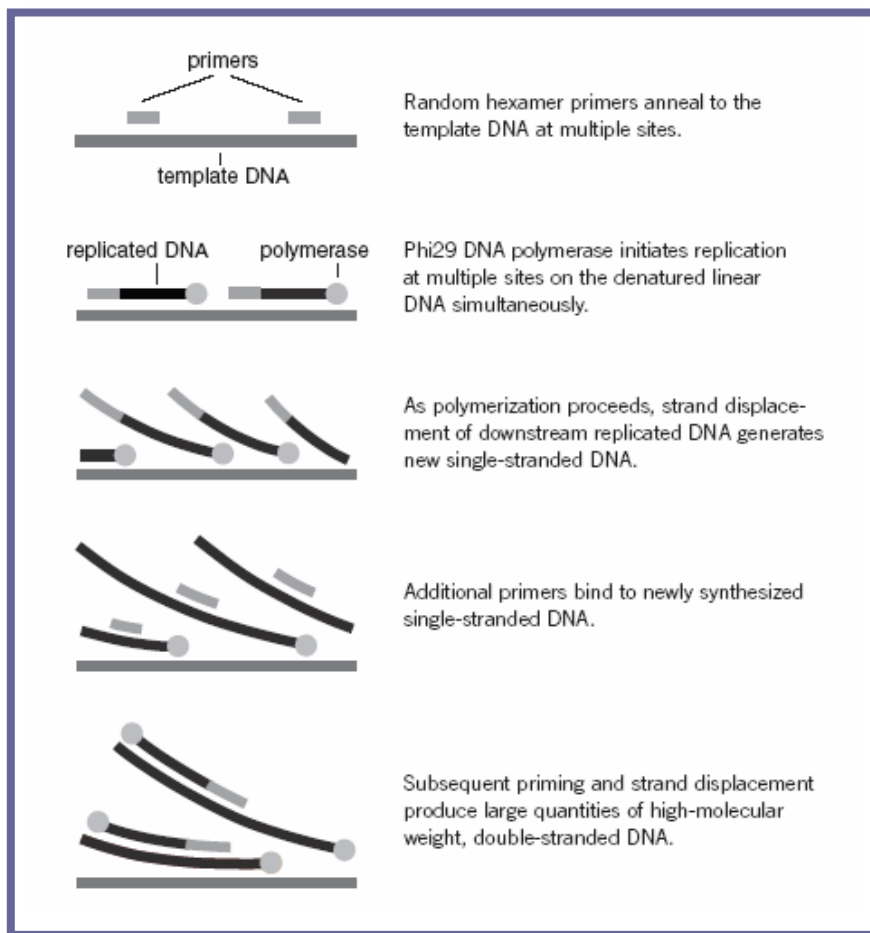


Figura 1.12. Esquema del *multiple displacement amplification*. Adaptació de: ©Amersham Biosciences Corp. Catàleg 2004.

1.4.4. *Tagged-PCR* (T-PCR)

Aquesta tècnica de WGA és una variant de la DOP-PCR ja que també utilitza una barreja heterogènia de *primers* amb una seqüència específica en l'extrem 5' anomenada *tag*, seguida de diversos nucleòtids degenerats i unes poques bases de seqüència coneguda en l'extrem 3' (Grothues *et al.* 1993). La primera etapa de l'amplificació es produeix a una temperatura

d'*annealing* molt baixa, per permetre la unió dels *primers* a qualsevol punt del genoma. En la segona etapa, la temperatura d'*annealing* és més alta perquè s'utilitza un sol *primer* de seqüència idèntica a la del *tag* en l'extrem 5', i s'aconsegueix també una amplificació exponencial. Tanmateix, aquesta tècnica amplifica certes seqüències més eficientment que altres i, per tant, caldria redissenyar el *primer* perquè fos aplicable a l'estudi d'aneuploidies en cèl.lules aïllades (Wells *et al.* 1999).

1.4.5. Alu-PCR

Aquesta tècnica de WGA, a diferència de les anteriors, no utilitza *primers* degenerats sinó que es basa en utilitzar *primers* complementaris a les 900.000 seqüències Alu repartides en el genoma (Lengauer *et al.* 1992). Un avantatge d'aquesta tècnica és que com que les seqüències Alu són específiques d'humans, només el DNA humà podrà ser amplificat. Malgrat això, les seqüències Alu no estan distribuïdes homogèniament en el genoma i això fa que certes regions del genoma siguin amplificades més eficientment que altres, igual que en el cas de la T-PCR. Això explica la poca aplicabilitat d'aquesta tècnica per a l'anàlisi d'aneuploidies a partir d'una sola cèl.lula (Wells *et al.* 1999).

1.4.6. *Linker adapter-PCR* (LA-PCR)

Igual que en el cas de l'Alu-PCR aquesta tècnica tampoc es basa en la utilització de *primers* degenerats. El DNA genòmic es talla amb una endonucleasa, que produeix fragments de diferents mides amb extrems en monocadena. Hi ha un oligonucleòtid anomenat *adapter* que s'unirà a ambdós extrems de cada fragment, a les monocadenes de DNA. Aquests *adapters* seran lligats a ambdós extrems de cada fragment i llavors es farà una PCR amb un *primer* complementari a aquests *adapters* que flanquegen els fragments. S'aconsegueix una amplificació exponencial. La mida dels fragments obtinguts pot ajustar-se utilitzant enzims de restricció que tallin més o menys freqüentment.

Aquesta tècnica va ser aplicada a l'anàlisi amb CGH de cèl.lules aïllades (Klein *et al.* 1999) i recentment s'ha descrit la seva superioritat respecte la DOP-PCR per a l'anàlisi amb CGH de mostres amb poca quantitat de DNA (Pirker *et al.* 2004). Tanmateix, l'eficiència en l'anàlisi amb CGH de blastòmers aïllats utilitzant aquesta tècnica va ser força inferior a l'eficiència demostrada per la DOP-PCR (Malmgren *et al.* 2002).

1.5. Diagnòstic genètic preimplantacional (PGD)

Estudis citogenètics utilitzant FISH han mostrat que més d'un 50% dels embrions preimplantacionals contenen cèl·lules aneuploides (Munné *et al.* 1998a). Com que moltes d'aquestes anomalies són letals, la identificació i selecció d'embrions citogenèticament normals és crucial ja que aquests són els que tenen el major potencial de desenvolupament i els més idonis per produir un embaràs viable (Wells i Levy 2003).

Inicialment, les estratègies utilitzades per identificar *in vitro* embrions cromosòmicament anòmals van ser la selecció segons la seva morfologia embrionària (Plachot *et al.* 1990) o segons la seva capacitat d'assolir l'estadi de blastocist (Menezo *et al.* 1992). Tanmateix, un 70% d'embrions morfològicament normals presenten alteracions cromosòmiques (Iwarsson *et al.* 1999; Sandalinas *et al.* 2001) i aproximadament un 40% dels embrions en estadi de blastocist són cromosòmicament anòmals (Magli *et al.* 1999).

Actualment, la identificació fiable d'embrions aneuploides només es pot fer mitjançant el diagnòstic genètic preimplantacional (PGD). El PGD és una forma molt primerenca de diagnòstic prenatal ja que es fa abans de la implantació de l'embrió (Sermon 2002). Això té un avantatge important, ja que en el diagnòstic prenatal, després de detectar un fetus afectat, els progenitors tenen tan sols dues alternatives: seguir endavant amb l'embaràs o l'avortament terapèutic. En canvi, en el PGD el que es pretén és detectar aquestes anomalies abans de la transferència de l'embrió a l'úter matern i impedir d'aquesta manera que s'hagi d'arribar posteriorment a la difícil decisió d'acabar amb un embaràs. El PGD només es pot fer en parelles sotmeses a un cicle de fecundació *in vitro*, a les quals sel's practica una estimulació hormonal dels fol·licles, una punció fol·licular, una inseminació *in vitro* dels oòcits i un cultiu *in vitro* dels embrions resultants.

1.5.1. Tipus de PGD

1.5.1.1. Anàlisi de corpuscles polars

En la gametogènesi femenina, durant la primera divisió meiótica, un dels cromosomes homòlegs de cada bivalent se segrega al primer corpuscle polar (1CP) i l'altre a la MII de l'oòcit (MII). L'1CP té, doncs, la dotació cromosòmica complementària a la MII i qualsevol desequilibri en la MII implicarà l'existència del desequilibri recíproc en el primer corpuscle polar. Com que l'1CP, un cop extrusionat, no té cap funció reproductiva, la biòpsia i l'anàlisi de l'1CP permet la caracterització indirecta de la constitució cromosòmica de la MII i la identificació dels oòcits aneuploides (Gitlin 2003) així com la transferència dels

embrions derivats de la fecundació d'oòcits diagnosticats com a normals pels cromosomes analitzats (Verlinsky *et al.* 1990; Munné *et al.* 1995b; Durban *et al.* 2001; Montag *et al.* 2004). Aquest anàlisi presenta certs avantatges: en primer lloc, la biòpsia de l'1CP es fa el mateix dia que la punció fol·licular i això implica tenir de tres a quatre dies per donar un diagnòstic abans de la transferència embrionària. L'anàlisi de l'1CP amb FISH, a més, és més fàcil d'interpretar perquè l'1CP està aturat en l'estadi de metafase I, en canvi, els blastòmers són cèl·lules proliferatives que es poden trobar en qualsevol fase del cicle cel·lular, dificultant la interpretació dels senyals de FISH (Pujol *et al.* 2004). Addicionalment, l'anàlisi de l'1CP, a diferència de l'anàlisi de blastòmers no es veu afectada per la presència de mosaïcisme embrionari, amb més d'una línia cel·lular en el mateix embrió.

Tanmateix, l'anàlisi de l'1CP també presenta una sèrie de limitacions: en primer lloc, la contribució paterna no podrà ser analitzada. No obstant, la majoria d'aneuploidies detectades en el primer trimestre del embaràs s'originen en la meiosi materna, mentre que les originades en la meiosi paterna són molt menys freqüents. L'anàlisi de l'1CP tampoc no permet detectar errors de la segona divisió meiótica. És ben conegut, però, que la gran majoria d'errors es produeixen en la primera divisió meiótica (Sherman *et al.* 1994; Fisher *et al.* 1995; Hassold *et al.* 1995; Peterson i Mikkelsen 2000). Tot i així, hi ha autors que indiquen que una proporció considerable d'errors es produeixen també en la meiosi II o, al menys, en l'àmbit cromosòmic s'expressen en la segona divisió meiótica (Kuliev *et al.* 2003). És per això que aquest grup analitza seqüencialment tant l'1CP com el segon corpuscle polar (2CP), que es biopsien simultàniament el dia següent a la fecundació (Verlinsky i Evsikov 1999).

1.5.1.2. Anàlisi de blastòmers

És la tècnica més utilitzada (Handyside *et al.* 1990; Griffin *et al.* 1991; Sermon *et al.* 2005). Requereix la biòpsia d'un blastòmer de l'embrió a 6-8 cèl·lules que es fa el dia +3 del desenvolupament. En aquest estadi l'embrió es comença a compactar (les unions cel·lula cel·lula comencen a establir-se) i, per tant, s'utilitza un medi lliure de calci i magnesi per desestabilitzar les unions intercel·lulars i evitar el dany cel·lular a l'hora de fer la biòpsia. L'avantatge més evident és que s'analitza tant la contribució paterna com la materna ja que en aquest estadi, la constitució genètica de l'embrió està completament formada i és comparable a la detectada en el diagnòstic prenatal. D'altra banda, el desavantatge d'aquesta tècnica és la coexistència de diverses línies cel·lulars en els embrions (línies cromosòmicament normals i línies aneuploides), fenomen anomenat mosaïcisme

embrionari, que es produeix postzigòticament i que ha estat detectat en un percentatge considerable d'embrions (Munné *et al.* 1994b; Harper *et al.* 1995; Munné *et al.* 1995a; Voullaire *et al.* 2000; Wells i Delhanty 2000; Malmgren *et al.* 2002). La presència d'aquest mosaïcisme embrionari dificulta el diagnòstic genètic preimplantacional en blastòmers (Munné *et al.* 1994b; Munné *et al.* 2002) sobretot si només es biòpsia i s'analitza un dels blastòmers de l'embrió, ja que es pot donar un diagnòstic incorrecte (Baart *et al.* 2004; Los *et al.* 2004). Caldria fer un estudi prospectiu aleatoritzat per veure si existeixen diferències en la viabilitat d'embrions sotmesos a la biòpsia d'un o dos blastòmers i disminuir la incidència d'errors en el diagnòstic biòpsiant dos blastòmers (Sermon *et al.* 2004). Un altre desavantatge és que com que la biòpsia es fa el dia +3, el temps que queda pel diagnòstic és més reduït que en el cas de l'anàlisi de l'1CP.

Cal destacar que ni la biòpsia dels corpuscles ni la dels blastòmers semblen produir un efecte negatiu sobre el desenvolupament de l'embrió (Kuliev i Verlinsky 2004a; Magli *et al.* 2004).

1.5.1.3. Anàlisi del blastocist

Aquest tipus de biòpsia és la més tardana que es pot fer. Consisteix a cultivar l'embrió in vitro fins l'estadi de blastocist (aproximadament dia +5) i llavors fer la biòpsia de 10-30 cèl.lules. Els avantatges són que es disposa de més d'una cèl.lula per fer l'anàlisi i que el cultiu fins a blastocist ja permet seleccionar els embrions més viables (Sandalinas *et al.* 2001). Els desavantatges són que es disposa només d'unes poques hores per obtenir un diagnòstic ja que la transferència embrionària es pot fer com a màxim el dia +6, tal com s'indica en el últim informe de l'ESHRE PGD Consortium Steering Comitee (Sermon *et al.* 2005). A més a més, molts centres tenen problemes per cultivar in vitro els embrions fins a l'estadi de blastocist i per això hi ha pocs centres al món que practiquin aquests tipus de biòpsies (Boada *et al.* 1998; de Boer *et al.* 2004).

1.5.2. Indicacions del PGD

Tot i que el PGD es pot recomanar a parelles classificades en diverses categories, les indicacions més freqüents del PGD són les que es detallen a continuació.

1.5.2.1. Cribatge o *screening* d'aneuploidies (PGD-AS)

És l'aplicació més estesa del PGD (Sermon *et al.* 2004). Les anomalies cromosòmiques numèriques estan relacionades amb fallades d'implantació i amb letalitat i pèrdua embrionària en forma d'avortaments espontanis. La incidència d'anomalies cromosòmiques és d'1,4% en embrions de dones de 34 anys o menys, mentre que aquesta incidència puja al 52,4% en dones entre 40-47 anys (Márquez *et al.* 2000). Aquestes xifres indiquen que, com ja s'ha dit, les dones d'edat avançada tenen un risc incrementat de concebre embrions aneuploides (Munné *et al.* 1995a). De la mateixa manera, també s'ha detectat una elevada incidència d'anomalies cromosòmiques en els embrions de parelles joves amb més de tres fallades d'implantació (>55% dels embrions són aneuploides) i en parelles que han patit més de dos avortaments espontanis (>68%) (Gianaroli *et al.* 2001).

La utilització del PGD-AS per identificar anomalies cromosòmiques en gàmetes i embrions pot ajudar a augmentar les taxes d'implantació i embaràs en parelles amb una edat materna avançada, en parelles amb fallades d'implantació recurrents, en dones amb avortaments espontanis de repetició i també en parelles portadores d'una translocació equilibrada per detectar anomalies de cromosomes no involucrats en la reorganització (Munné *et al.* 1999; Gianaroli *et al.* 2002; Munné 2002; Kuliev *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003b; Navarro *et al. in press*).

Tot i que s'han utilitzat diferents tècniques d'anàlisi per detectar aneuploidies en cèl·lules aïllades, la tècnica més utilitzada en el PGD-AS és la hibridació *in situ* fluorescent (FISH) per a l'estudi de 5 a 9 cromosomes (Munné *et al.* 1998a; Kuliev *et al.* 2003; Wilton *et al.* 2003a; Montag *et al.* 2004).

1.5.2.2. Portadors de translocacions equilibrades

Les translocacions recíproques es caracteritzen per l'intercanvi de fragments de DNA entre cromosomes, mentre que en les translocacions robertsonianes dos braços *q* de cromosomes acrocèntrics es fusionen centromèricament. Els portadors de translocacions equilibrades, tot i ser individus sans, tenen un major risc de tenir fills amb cariotips desequilibrats, anomalies congènites i retard mental. A més a més, molt freqüentment presenten avortaments recurrents i infertilitat.

L'objectiu del PGD en aquests casos és reduir la incidència d'avortaments espontanis i òbviament, minimitzar el risc de tenir un fill amb un cariotip desequilibrat. Inicialment, l'estratègia utilitzada per al PGD de translocacions ha estat utilitzar la FISH amb sondes de pintatge cromosòmic sobre extensions de 1CPs (Munné *et al.* 1998c; Durban *et al.* 2001).

Aquesta estratègia, però, s'indica només per a l'anàlisi de translocacions d'origen matern. Actualment, el PGD de translocacions es fa majoritàriament amb FISH sobre blastòmers fixats (Munné 2002). En el cas de les translocacions robertsonianes, l'estratègia és senzilla ja que n'hi ha prou amb dues sondes locus específiques de diferents colors, una per cada cromosoma implicat, per donar un diagnòstic. En el cas de les translocacions recíproques, el PGD és més complex ja que cada translocació presenta punts de trencament específics i únics per a aquella família. En cada cas, per tant, cal estudiar cada translocació per separat per identificar les tres sondes (per exemple, dues de centromèriques i una de telomèrica al punt de trencament) de colors diferents que es necessiten per al diagnòstic (Sermon *et al.* 2004). A més a més, la combinació d'aquestes sondes, tot i permetre distingir els embrions desequilibrats dels equilibrats, no permet distingir entre els embrions portadors de la translocació equilibrada i els normals, que serien transferits preferentment per impedir la perpetuació de la translocació en la família (Munné *et al.* 1998b).

1.5.2.3. Malalties monogèniques

El primer PGD publicat es va basar en el sexat d'embrions per transferir únicament embrions identificats com a femelles (Handyside *et al.* 1990) ja que les dones portadores d'una malaltia recessiva associada al cromosoma X tenen, a priori, un risc d'un 25% de tenir un fill afectat per la malaltia. Aquesta estratègia, però, implica la no-transferència d'embrions masculins tot i que el 50% no estaran afectats per la malaltia, i la transferència només d'embrions femenins tot i que el 50% seran portadors de la mutació (Sermon *et al.* 2004).

Més recentment, les millores tecnològiques han permès la detecció directa de les mutacions causants de malalties associades al cromosoma X (hemofília A, distròfia muscular de Duchenne, fràgil X, retinitis pigmentosa...) però també de mutacions causants de malalties autosòmiques recessives (fibrosi quística, β -talasèmia, Tay-Sachs, anèmia de Fanconi...) i de malalties autosòmiques dominants, que comporten un risc del 50% de tenir un fill afectat (per exemple, síndrome de Marfan, distròfia miotònica, corea de Huntington...) (Shahine i Caughey 2005).

La tècnica més utilitzada per a la detecció directa de les mutacions (conjuntament o no amb la detecció de STRs que permet un diagnòstic indirecte a més d'un control intern de la contaminació) ha estat la PCR. El PGD en general, i la PCR en cèl·lules aïllades en particular, són tècniques que requereixen un treball molt especialitzat (Sermon *et al.* 2004).

Únicament els centres de PGD més punters tenen recursos suficients per investigar i desenvolupar tests necessaris per les diferents malalties, el que explica que fins ara s'han descrit només 33 malalties monogèniques per a les quals s'ha aplicat un PGD (Sermon *et al.* 2005). Tot i així, la llista de malalties en què es desenvolupen tests diagnòstics va augmentant a poc a poc (www.reproductivegenetics.com).

1.5.3. Contribució i eficiència del PGD

1.5.3.1. PGD-AS

S'ha mencionat que la característica comuna que presenten els diferents grups de pacients sotmesos a un PGD-AS és l'elevada incidència d'anomalies cromosòmiques en els embrions i la baixa taxa de implantació. Així doncs, ja sigui mitjançant l'anàlisi de blastòmers o de corpuscles polars, l'objectiu principal del PGD és incrementar les taxes d'implantació i embaràs d'aquestes pacients, identificant els embrions amb anomalies cromosòmiques i seleccionant i transferint a l'úter matern tan sols els embrions diagnosticats com euploïdes, que són els que mostraran una major potencialitat per assolir un embaràs viable.

La tècnica més utilitzada en el PGD és la FISH per detectar aneuploïdies de 5 a 9 cromosomes, normalment aquelles trobades més freqüentment en nascuts vius (que afecten els cromosomes 13, 18, 21, X i Y) en avortaments espontanis (que afecten principalment els cromosomes 14, 15, 16 i 22) (Munné *et al.* 1998a; Bahçe *et al.* 1999; Wells *et al.* 2002; Wilton *et al.* 2003a). Tanmateix, s'ha demostrat que un gran ventall d'aneuploïdies, mai vistes en mostres prenatales, són, de fet, tolerades en estadis preimplantacionals (Wells i Levy 2003). Com que utilitzant la FISH aproximadament només una tercera part dels cromosomes són analitzats, s'ha estimat que aquesta estratègia només permet detectar un 70% de les alteracions cromosòmiques (Munné *et al.* 1998a). Dit d'una altra manera, d'un 25 a un 30% dels embrions cromosòmicament desequilibrats són erròniament diagnosticats com a normals i transferits a l'úter matern utilitzant PGD-AS-FISH (Voullaire *et al.* 2002). Aquestes aneuploïdies no detectades són en la seva gran majoria letals i responsables de la baixa taxa d'implantació d'aquests pacients. A més a més, la utilització de la FISH en el PGD no ens permet detectar aneuploïdies parcials d'un cromosoma ni distingir entre pèrdues cromosòmiques reals o artefactuals degudes a la hibridació deficient de les sondes, el solapament dels senyals de FISH o la pèrdua de micronuclis durant la fixació (Harper *et al.* 1995).

Tot i la limitació del nombre de cromosomes analitzats, el PGD-AS utilitzant FISH per a l'anàlisi de 5 a 9 cromosomes ha permès augmentar la taxa d'embarassos (Gianaroli *et al.* 1999a), així com disminuir la taxa d'avortaments espontanis en dones d'edat avançada (Munné *et al.* 1999). L'últim recull de dades del ESHRE PGD consortium (Sermon *et al.* 2005) mostra que en el 25% (199 d'entre 799) dels cicles de parelles que prèviament no han tingut èxit en cicles de FIV (parelles amb edat materna avançada, amb avortaments recurrents o amb fallades repetides d'implantació) s'aconsegueix un embaràs després de fer un PGD. Aquesta taxa és molt similar a l'obtinguda en cicles de FIV sense PGD.

Recentment, però, en un estudi prospectiu aleatoritzat no s'han trobat diferències significatives quan es comparen les taxes d'embaràs de parelles amb edat materna avançada d'un grup control (sense PGD-AS) i d'un grup sotmès a PGD-AS per a l'anàlisi de set cromosomes, quan no hi ha limitació en el nombre d'embrions transferits (Staessen *et al.* 2004).

Altres autors han mostrat que després d'un PGD-AS en un grup de parelles amb avortament espontanis recurrents, la incidència d'aquests avortaments disminueix (Rubio *et al.* 2003). Tot i així, en algunes publicacions tampoc no s'ha pogut demostrar un increment significatiu en les taxes d'implantació i embaràs després del PGD-AS en aquest grup de pacients (Rubio *et al.* 2003; Platteau *et al.* 2005). És important destacar que en aquests dos treballs els autors indiquen la necessitat d'una anàlisi de la totalitat de cromosomes per detectar aneuploidies no rutinàriament analitzades amb FISH.

Finalment, els beneficis de l'aplicació del PGD en l'heterogeni grup de pacients amb més de tres fallades d'implantació és menys clar. Mentre que alguns autors no troben una millora en les taxes d'implantació i embaràs després del PGD (Gianaroli *et al.* 1999a), d'altres sí que troben unes taxes d'implantació similars a les d'un grup control (Pehlivan *et al.* 2003). Munné i col.laboradors no van trobar cap benefici després d'aplicar el PGD-AS en dones d'edat avançada amb dos o més fallades prèvies d'implantació (Munné *et al.* 2003). Hi ha diverses explicacions a aquest fet. Pot ser que les causes d'infertilitat d'aquestes parelles no estiguin relacionades amb la presència d'anomalies cromosòmiques, o bé, si ho estan, que no afectin els cromosomes analitzats rutinàriament amb FISH (Voullaire *et al.* 2002).

La futura realització de més estudis prospectius aleatoritzats serà imprescindible per avaluar l'eficiència real del PGD per augmentar la taxa d'implantació i embaràs en els diferents grups de pacients (Sermon *et al.* 2004). Tot i així, i a la vista de tots aquests resultats, alguns autors ja han formulat la hipòtesi que per incrementar realment la taxa d'èxit del PGD-AS

cal establir una estratègia per identificar embrions amb una dotació normal no només dels cromosomes analitzats per FISH, sinó també de la resta de cromosomes (Munné 2002; Wells i Levy 2003; Wilton 2005).

1.5.3.2. PGD de translocacions

Atés que l'extensió del cultiu *in vitro* dels embrions de parelles portadores de translocacions no impedeixen la implantació d'embrions cromosòmicament desequilibrats ni redueixen els avortaments espontanis (Evsikov *et al.* 2000), la única estratègia fiable és el PGD de translocacions. En general, la taxa d'embaràs aconseguida en aquest grup de pacients és inversament proporcional al nombre de gàmetes o embrions anòmals (Munné *et al.* 2000). Això explica per què les taxes de implantació i embaràs en portadors de translocacions robertsonianes són majors a les obtingudes en portadors de translocacions recíproques, en les quals es detecta una gran proporció d'embrions cromosòmicament desequilibrats (Gianaroli *et al.* 2002).

El PGD en translocacions ha aconseguit reduir la incidència d'avortaments espontanis que és un dels majors problemes en aquestes pacients (Munné *et al.* 1998b). Tanmateix, la taxa d'embarassos clínics per cada cicle de PGD es manté baixa, de l'ordre d'un 17% segons les dades publicades al darrer informe de l'ESHRE PGD Consortium (Sermon *et al.* 2005). A més, és important destacar que molts portadors de translocacions no aconsegueixen un embaràs ni després de la transferència d'embrions diagnosticats com a normals en el PGD i fins i tot poden seguir patint avortaments espontanis (Escudero *et al.* 2000; Durban *et al.* 2001; Munné 2002; Pujol *et al.* 2003b). Aquest fet es podria explicar per la presència d'altres anomalies de cromosomes no involucrats en les translocacions, que no s'analitzen en el PGD.

La presència d'una reorganització cromosòmica s'ha vist que pot induir alteracions en la segregació meiótica d'altres cromosomes no involucrats en la reorganització. Aquest fenomen és conegut com efecte intercromosòmic (ICE) i la seva existència resulta controvertida (Benet *et al.* in press) ja que alguns autors han trobat evidències d'aquest (Gianaroli *et al.* 2002; Pujol *et al.* 2003b) mentre que altres no n'han trobat (Munné *et al.* 2005).

Existeixi o no un ICE, la incidència d'anomalies cromosòmiques que afectin a cromosomes diferents dels involucrats en la translocació faria que aquests embrions aneuploides, poguessin ser transferits en ser classificats erròniament com a normals i causar una fallada d'implantació o un avortament espontani. L'anàlisi només dels cromosomes implicats en la

reorganització segurament ens permet disposar de més embrions transferibles. Tot i això, la presència d'anomalies no detectades en aquests embrions aparentment normals o equilibrats serien les responsables dels avortaments espontanis i de les baixes taxes d'implantació d'aquests pacients.

Així doncs, la detecció no tan sols de desequilibris dels cromosomes involucrats en la translocació sinó també de la resta de cromosomes és recomanable per intentar augmentar les taxes d'implantació i embaràs en aquest grup de pacients.

1.5.4. Anàlisi de la totalitat dels cromosomes: aplicació de la CGH en el PGD

La CGH és una tècnica molt laboriosa que requereix de 4 a 5 dies per obtenir resultats. Ja s'ha vist que el ventall de temps disponible per obtenir un diagnòstic en el PGD és molt reduït ja que els embrions es poden mantenir en cultiu com a molt fins al dia +6 (considerant el dia 0 el dia de la punció fol·licular). Així doncs, s'han proposat dues estratègies diferents per aplicar la CGH al PGD.

La primera estratègia ha estat l'aplicació de la CGH per a l'anàlisi de blastòmers (Voullaire *et al.* 2002). En aquest cas, la biòpsia es fa el dia +3 i, per tant, és imprescindible la criopreservació dels embrions biòpsiats abans de disposar dels resultats de CGH. Un cop es tenen els resultats, els embrions es descongelen i es transfereixen a l'úter matern en un cicle posterior. L'aplicació d'aquest procediment en dones amb fallades repetides d'implantació ja ha aconseguit el naixement de nadons sans (Wilton *et al.* 2001) i ha mostrat unes taxes d'implantació i embaràs superiors a les obtingudes en aquest grup de pacients mitjançant el PGD-FISH (Wilton *et al.* 2003a). Tot i així, aquesta estratègia ha produït una controvèrsia considerable (Hill 2003; Munné i Wells 2003; Verlinsky i Kuliev 2003; Wilton *et al.* 2003a; Wilton *et al.* 2003b) ja que tot i utilitzar un medi de congelació millorat i especial per a embrions biòpsiats (Edgar *et al.* 2000; Wilton *et al.* 2001), el 46% dels embrions no sobreviuen el procés de congelació-descongelació (Wilton *et al.* 2003a) i, per tant, els avantatges de l'anàlisi de tots els cromosomes queden emmascarats per la pèrdua de pràcticament la meitat dels embrions disponibles.

La segona estratègia ha estat aplicar la CGH pel PGD en primer corpuscle polar (Wells *et al.* 2002). Aquest estudi es va fer en una dona de 40 anys que tenia esterilitat secundària com a resultat d'una disfunció ovàrica. Tot i que no es va obtenir embaràs, els resultats de CGH van mostrar que nou dels 10 1CPs analitzats eren aneuploides, i que aneuploidies per

alguns dels cromosomes afectats (cromosomes 2, 5, 24, 16, 20, 21 i 22) haurien passat inadvertides utilitzant FISH. El millor avantatge d'aquesta estratègia és que en aquest cas l'1CP es biòpsia el mateix dia 0. A més a més, el desenvolupament d'un protocol de CGH accelerat, que reduïxi considerablement el temps necessari per a la hibridació pot permetre obtenir resultats de CGH en un temps compatible amb una transferència embrionària a dia +4 o dia +5, sense la necessitat de congelar els embrions.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Aquest treball té quatre objectius generals, que comprenen una sèrie d'objectius més concrets:

2.1. Posada a punt i optimització de la tècnica de CGH aplicada a l'anàlisi de cèl.lules aïllades.

- Posada a punt i optimització de la tècnica de lisi i amplificació total de la cèl.lula mitjançant DOP-PCR.
- Posada a punt i optimització de la CGH aplicada a cèl.lules aïllades.

2.2. Validació de la CGH aplicada a cèl.lules aïllades mitjançant l'estudi de complementarietat entre parelles 1CP-MII.

- Avaluació de l'eficiència de la CGH i comparació amb altres mètodes utilitzats per a l'estudi d'aneuploidies, incloent el cenM-FISH.
- Determinació de falsos positius i de la fiabilitat del protocol desenvolupat a l'hora de detectar guanys i pèrdues de qualsevol cromosoma.
- Avaluació de la sensibilitat de la CGH per detectar guanys i pèrdues i anomalies de cromosomes i de cromàtides.

2.3. Anàlisi d'aneuploidies en MIIs i 1CPs provinents de dones amb cariotip normal.

- Determinació de la taxa d'aneuploidia analitzant la totalitat de cromosomes de la cèl.lula. Percentatges de hipohaploïdies i de hiperhaploïdies.
- Comparació de la incidència d'aneuploidia en oòcits madurats in vitro o en oòcits inseminats no fecundats. Avaluació de la relació entre aneuploidia i edat materna.
- Estudi dels mecanismes que intervenen en l'origen de les aneuploidies.
- Establiment de la implicació de cada cromosoma en aneuploidia i identificació dels cromosomes que més freqüentment presenten errors en la seva segregació.
- Determinació de les implicacions dels resultats obtinguts en el diagnòstic genètic preimplantacional utilitzant FISH.

2.4. Anàlisi d'anomalies cromosòmiques en MIIs i 1CPs provinents de dones portadores d'una translocació cromosòmica equilibrada.

- Valoració del protocol desenvolupat a l'hora de detectar segregacions desequilibrades de translocacions.
- Investigació de possibles efectes intercromosòmics en la segregació de translocacions.

2.5. Aplicació de la CGH per a l'estudi de l'1CP en el diagnòstic genètic preimplantacional en dones d'edat avançada.

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. REACTIUS I SOLUCIONS

3.1.1. Aïllament

Solució d'aïllament: tampó fosfat salí (PBS)-0,1% polyvinyl alcohol (PVA)

Es prepara el 10xPBS sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} (80 g de NaCl, 25,08 g de Na_2HPO_4 dihidratada, 2 g de KCl, i 1,5 g de KH_2PO_4 dissolt en 1 l d'aigua miliQ). S'autoclava i s'ajusta el pH a 7,2. Es fa una dilució 1/10 barrejant 100 ml de 10xPBS i 900 ml d'aigua miliQ. S'afegeix 1 g de PVA. Es filtra i s'aliquota en tubs d'1,5 ml. El PVA evita que les cèl.lules s'enganxin a la superfície de la placa i el PBS sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} desestabilitza les unions intercel.lulars i fa que les cèl.lules es disgreguin més fàcilment.

Tripsina

La tripsina (Sigma) es dilueix a 30 mg/ml amb PBS (pH 7,2).

3.1.2. Lisi

Solució de lisi: 1 µl de SDS (17 µM) + 2 µl de proteïnasa K (125 µg/ml)

La proteïnasa K (Roche) s'adquireix a una concentració aproximada de 20 mg/ml (depèn del lot). Aquesta proteïnasa K s'aliquota en condicions d'esterilitat i es conserva a 4°C. Just abans del seu ús s'ha de diluir fins 125µg/ml amb aigua miliQ estèril i filtrada (p. ex. 1 µl de proteïnasa K i 160 µl d'aigua).

El SDS (sodium dodecyl sulphate, Sigma) s'adquireix diluït al 10%. S'aliquota en condicions d'esterilitat i es desa a temperatura ambient. Per aconseguir una concentració 17 µM s'ha de fer una dilució 1/100, vortejar bé i, a continuació, fer una dilució 1/200.

Es prepara una barreja de SDS/proteïnasa K en proporció 1:2 i es manté en gel fins a la seva utilització. Després del seu ús es descarta la solució sobrant.

3.1.3. DOP-PCR

Primer de DOP

És important que els *primers* siguin a més de desalinitzats i liofilitzats, purificats amb RP-HPLC (cromatografia líquida d'alt rendiment i de fase reversa). Això farà que *primers*

incomplets, amb bases errònies o despurinitzades siguin eliminats de la barreja. Segons l'escala de síntesi (com més gran, més *primer* sintetitzen) el primer liofilitzat s'haurà de dissoldre amb més o menys volum d'aigua tridestil·lada (aigua miliQ), estèril i filtrada per obtenir la concentració de treball de 100 µM.

3.1.4. Electroforesi

50xTAE

Es preparen 100 ml d'EDTA 0,5 M amb un pes de 18,61 g d'EDTA (suministrat per Sigma) i s'hi afegeixen 95 ml d'aigua miliQ. S'ajusta el pH a 8 perquè és dissolgui i s'enrasa el volum a 100 ml. Als 100 ml d'EDTA s'hi afegeixen 242 g de Tris base i 57,1 ml d'àcid acètic glacial (pur). S'enrasa fins a 1000 ml amb aigua miliQ.

Gel d'agarosa al 2%

Rutinàriament s'han fet minigels de 65x80 mm (30 ml de volum final). Es pesen 0,6 g d'Agarosa (Bio-rad) i s'hi afegeixen 30 ml de 1xTAE (20 ml de 50xTAE i 980 ml d'aigua miliQ). S'escalfa la solució 1,5 minuts a 450 W de potència amb el microones (aturant-lo i remenant-lo de tant en tant) i quan l'agarosa s'ha dissolt (la solució és transparent), s'aboca dins la cubeta i es deixa polimeritzar.

El patró de bandes que s'ha utilitzat és de 100 pb (Invitrogen).

3.1.5. Marcatge amb *Nick Translation*

MIX dNTPs (1A:1C:1G)

Les solucions mares són de 0,3 mM per cada dNTP. Cal fer una dilució 1:1:1 de cada dNTP i obtenir així una concentració 0,1 mM/dNTP.

dTTP

La solució mare és de 0,3 mM per tant cal fer una dilució 1:3 amb aigua miliQ sense DNAsa i obtenir una concentració de 0,1 mM.

dUTP-Spectrum Red o dUTP-Spectrum Green

La solució mare té una concentració d'1 mM, per tant, cal diluir el dUTP-Spectrum Green 1/5 i el dUTP-Spectrum Red 1/10 amb aigua miliQ sense DNAsa per obtenir una concentració de 0,2mM o 0,1 mM, respectivament.

3.1.6. Hibridació competitiva

20xSSC

Es pesen 88 g de citrat trisòdic dihidratat i 175 g de clorur sòdica que es dissolen en 950 ml d'aigua miliQ. S'ajusta el pH a 5,5 i s'enrasa a 1000 ml amb aigua miliQ.

Solució d'hibridació: 50% formamida/ 10% dextrà sulfat/ 2xSSC

Es prepara a partir d'una solució mare que conté 2 g de dextrà sulfat, 2 ml de 20xSSC i 8 ml d'aigua miliQ. La solució de hibridació és 50% formamida desionitzada i 50% de solució mare. S'ha de conservar a -20°C a la foscor.

Solució de desnaturalització: 70% formamida/2xSSC

En una campana extractora de seguretat es barregen 35 ml de formamida, 5 ml de 20xSSC i 8 ml d'aigua miliQ. Es barreja bé i s'ajusta el pH a 7-7,5. Finalment s'enrasa amb aigua miliQ fins als 50 ml.

Solució 1: 0,4xSSC/ 3% NP-40

Barrejar 20 ml 20xSSC, 950 ml d'aigua miliQ i 3 ml de NP-40. Cal ajustar el pH a 7-7,5 amb NaOH i ajustar el volum final a 1 l.

Solució 2: 2xSSC/ 0,1% NP-40

Barrejar 100 ml 20xSSC, 850 ml d'aigua miliQ i 1 ml de NP-40. Ajustar el pH a 7-7,5 amb NaOH i ajustar el volum final a 1 l.

Solució DAPI

Es prepara a partir d'una concentració del 4'6-diamidin-2-fenilindol (DAPI, Sigma) de 2,5 µg/ml (la concentració inicial és d'1mg/ml i, per tant, s'ha de fer una dilució 1/10 i després 1/40 amb aigua miliQ). L'*antifade* (1,4-fenildiamina, Vectashield) és de Vector Labs. La concentració final del DAPI és de 125 ng/ml (50 µl DAPI de concentració 2,5 µg/ml, 50 µl d'aigua miliQ i 900 ml d'*antifade*). Es conserva a 4°C en la foscor.

3.1.7. Fixació de MIIs d'òcits

Hipotònic (KCl 0,075 M o 1% citrat sòdic)

S'ha utilitzat el KCl 0,075 M (cal dissoldre 5,592 g de KCl en 1 l. d'aigua miliQ) o, alternativament, el citrat sòdic 1% que en ser més suau és millor per evitar la lisi de les cèl.lules (cal dissoldre 10 g de citrat sòdic en 1 l. d'aigua miliQ).

Fixador (Carnoy)

S'ha utilitzat el Carnoy (tres parts de metanol i una part d'àcid acètic glacial). És important que estigui a 4°C. L'àcid acètic precipita les proteïnes. S'ha de preparar just abans de la seva utilització i descartar un cop utilitzat.

3.1.8. Pepsina i postfixació

Pepsina: 50 mg/ml en HCl 10 mM

Es prepara HCl 10 mM barrejant 0,5 ml de HCl 1 M (100 ml de 37% HCl fumant més 900 ml d'aigua miliQ) amb 49,5 ml d'aigua miliQ. La solució s'atempera en un bany a 37°C. Quan s'ha de fer el tractament amb pepsina, es posen 25 µl de pepsina (100 ng/ml, és a dir, 0,1 g de pepsina en 1 l. d'aigua miliQ) en un *coplin* i s'afegeixen els 50 ml de HCl 10 mM atemperat a 37°C (si pel contrari la pepsina s'afegeix directament a la solució àcida, la pepsina precipita i costa molt dissoldre-la adequadament). Cal barrejar-ho bé.

Postfixació: PBS/ MgCl₂ 50 mM

Es barregen 2,5 ml de MgCl₂ 1M (20,33 gr de MgCl₂ i aigua miliQ fins als 100 ml) i 47,5 ml de PBS.

Postfixació: PBS/ MgCl₂ 50 mM/ 1% FDH

Es barregen 2,5 ml de MgCl₂ 1M, 1,5 ml de formaldehid i 46 ml de PBS. Aquesta solució es prepara en una campana de seguretat.

3.1.9. Hibridació *in situ* fluorescent

Barreja A

És una barreja de sondes per a l'anàlisi de cinc cromosomes (cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22) (MultivisionPB kit, Vysis). S'adquireix resuspensa amb el seu tampó d'hibridació.

Barreja B

És una barreja de cinc sondes centromèriques (Vysis) per a l'anàlisi de quatre cromosomes (cromosomes 1, 15, 17 i X). Per detectar el cromosoma X cal hibridar amb dues sondes de colors diferents ja que les sondes només estan disponibles en tres colors.

En una hibridació *in situ* amb sondes comercials, les proporcions sempre són tres parts de sonda : set parts de tampó d'hibridació. En aquest cas s'utilitza una barreja de cinc sondes i, per tant, s'ha d'evaporar aigua i concentrar les sondes centrifugant-les al buit (mitjançant un *Speed vac*). Per preparar 100 µl de la barreja B s'han d'afegir 10 µl de sonda per al cromosoma 1 (Spectrum Orange), 10 µl de sonda per al cromosoma 15 (Spectrum Green), 10 µl de sonda per al cromosoma 17 (Spectrum Aqua), 6 µl de sonda Spectrum Aqua per al cromosoma X i 4 µl de sonda Spectrum Orange per al cromosoma X per fer un volum total de 40 µl. El tub es posa al *Speed vac* i al cap de 5 minuts se'n comprova el volum. Quan el volum de la barreja s'ha reduït als 30 µl, s'ha d'afegir a la barreja els 70 µl de tampó d'hibridació (tampó CEP, per a sondes centromèriques).

Barreja C

És una barreja variable en funció dels cromosomes que volem analitzar. En aquest cas les proporcions que cal seguir són també tres parts de sonda : set parts de tampó d'hibridació. Aquesta barreja generalment inclou entre dues i tres sondes. Per tant, per preparar 5 µl de la barreja C s'han d'afegir alternativament els volums següents:

- 0,5 µl de cada sonda centromèrica (fins a 3) i 3,5 µl de tampó d'hibridació CEP. En el cas que siguin només dues sondes centromèriques s'ha d'afegir 0,5 µl de cada sonda, 0,5 µl d'aigua miliQ i 3,5 µl de tampó d'hibridació.
- 1 µl de sonda telomèrica (dóna un senyal més puntual, per tant, la concentrem més), 0,5 µl de sonda centromèrica i 3,5 µl de tampó d'hibridació TEL.

Rentat del DAPI: 2xSSC/ 0,1% Tween 20

Barrejar 100 ml de 20xSSC, 1 ml de Tween 20 i 850 ml d'aigua miliQ. Cal ajustar el pH a 7-7,5 i enrasar amb aigua miliQ fins a 1 l.

Solució de rentat: 0,7xSSC/ 0,3% NP-40

Barrejar 35 ml de 20xSSC, 3 ml de NP-40 i 950 ml d'aigua miliQ. Cal ajustar el pH a 7-7,5 i enrasar amb aigua miliQ fins a 1 l.

3.1.10. Spectral Karyotyping

Sonda SKY: Human Spectral Karyotyping Reagent (Vial 1, Applied Spectral Imaging, Inc.)

Aquestes sondes estan marcades utilitzant diferents proporcions de cinc molècules diferents (tres de marcatge directe: Spectrum Orange, Texas Red i Rhodamina 110 i dos de marcatge indirecte: biotina i digoxigenina, a les quals s'uniran unes altres molècules amb els fluorocroms Cy5 i Cy5.5 conjugats). El codi de marcatge és específic per a cadascun dels 24 cromosomes.

Solució de rentat 1: 0,5xSSC

Barrejar 25 ml de 20xSSC i 950 ml d'aigua miliQ. Cal ajustar el pH a 7-7,5 i enrasar amb aigua miliQ fins a 1 l.

Solució de rentat 2: 4xSSC/0,1% Tween 20

Barrejar 200 ml de 20xSSC, 750 ml d'aigua miliQ i 1 ml del detergent Tween 20. Cal barrejar-ho bé, ajustar el pH a 7-7,5 i enrasar amb aigua miliQ fins a 1 l.

1% BSA/4xSSC

Afegir 0,1 g de *Bovine Serum Albumin* (BSA) a 2 ml de 20xSSC i 7 ml d'aigua miliQ. Barrejar-ho bé amb un vòrtex, i enrasar amb aigua miliQ fins als 10 ml. Fer un pols de centrífuga i recuperar el sobrenedant. Cal preparar-ho el mateix dia i descartar-lo després del seu ús.

Cy5 staining reagent: Vial 3 (Applied Spectral Imaging, Inc)

El vial 3 conté un anticòs (avidina-Cy5, que s'uneix amb la biotina) que s'ha de diluir 1/100 amb 1% BSA/4xSSC. Cal homogeneïtzar bé el vial i barrejar 10 µl de vial 3 i 1 ml de 1% BSA/4xSSC. S'ha de preparar el mateix dia (es desa a 4°C) i cal descartar-lo al final.

Cy5.5 staining reagent: Vial 4 (Applied Spectral Imaging, Inc)

El vial 4 conté un anticòs (antidigoxigenina-Cy5.5, que reconeix i s'uneix amb la digoxigenina) que s'ha de diluir 1/200 amb 1% BSA/4xSSC. Cal homogeneïtzar bé el vial i barrejar 5 µl de vial 4 i 1 ml de 1% BSA/4xSSC. Cal preparar-lo el mateix dia i desar-lo a 4°C. Al final es descarta el que ha sobrat.

Anti-Fade-Dapi Reagent: Vial 5 (Applied Spectral Imaging, Inc)

És una solució de DAPI i *antifade* de concentració desconeguda.

3.1.11. CenM-FISH**Solució de rentat A: 50% formamida/2xSSC**

Cal preparar 150 ml barrejant 75 ml de formamida, 15 ml de 20xSSC i 60 ml d'aigua miliQ. S'ha d'ajustar el pH a 7-7,5.

Solució de rentat B: 2xSSC

Es preparen 100 ml de 20xSSC i s'enrasen amb aigua miliQ fins a 1 l.

Solució de rentat C: 4xSSC/0,05% Tween 20

Cal barrejar 200 ml de 20xSSC, 0,5 ml de Tween 20 i enrasar amb aigua miliQ fins a 1 l.

Solució antibiotin Cy5

Cal barrejar 1,2 µl d'estreptoavidina conjugada amb Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech Limited, Inc.) amb 68,8 µl d'agent bloquejant (0,05 g de llet en pols dissolta en 1 ml de solució de rentat C).

Solució DAPI

Es prepara a partir d'una concentració de DAPI de 2,5 µg/ml, que es dilueix amb *antifade* i aigua miliQ fins a obtenir una concentració final de 62,5 ng/ml. Es conserva a 4°C en la foscor.

3.2. MATERIAL BIOLÒGIC

S'han utilitzat cèl.lules de la mucosa bucal d'individus control així com oòcits descartats de donants o pacients sotmeses a un tractament de infertilitat a l'Institut Universitari Dexeus (Barcelona, Espanya) o al Institute for Reproductive Medicine and Science del Saint Barnabas Medical Center (West Orange, Nova Jersey, EUA). Els oòcits donats van ser descartats dels cicles de FIV per dos motius: i) oòcits immadurs en el moment de la punció, que van madurar-se in vitro un màxim de 24 hores fins a assolir l'estadi de metafase II; ii) oòcits en metafase II que no es van fecundar després de ser inseminats, ja sigui amb fecundació in vitro convencional (FIV) o amb injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) i que, per tant, presentaven solament un corpuscle polar i cap pronucli 24 hores després de la inseminació.

S'han analitzat un total de 81 parelles 1CP-MII, 23 1CPs i 2 MIIs sense parella. Els oòcits provenen de 71 dones amb una mitjana d'edat de 33,9 anys (rang 21-42). L'etiologia de la infertilitat de les pacients era variada incloent-hi disfunció ovàrica, endometriosi, estenosi cervical, ovaris poliquístics, malaltia pelviana adhesiva, síndrome d'Asherman, origen tubular, translocacions equilibrades i infertilitat idiopàtica.

Els oòcits s'han obtingut seguint la normativa establerta pels comitès de bioètica dels diferents centres. S'ha obtingut consentiment informat escrit dels pacients i el projecte ha estat aprovat pel comitè de bioètica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.3. MÈTODES

3.3.1. Hibridació genòmica comparada en cèl.lules aïllades

Tècnica basada en la hibridació competitiva de dos DNAs, un DNA control i un DNA problema, marcats amb colors diferents sobre cromosomes metafàsics normals (Figura 3.1).

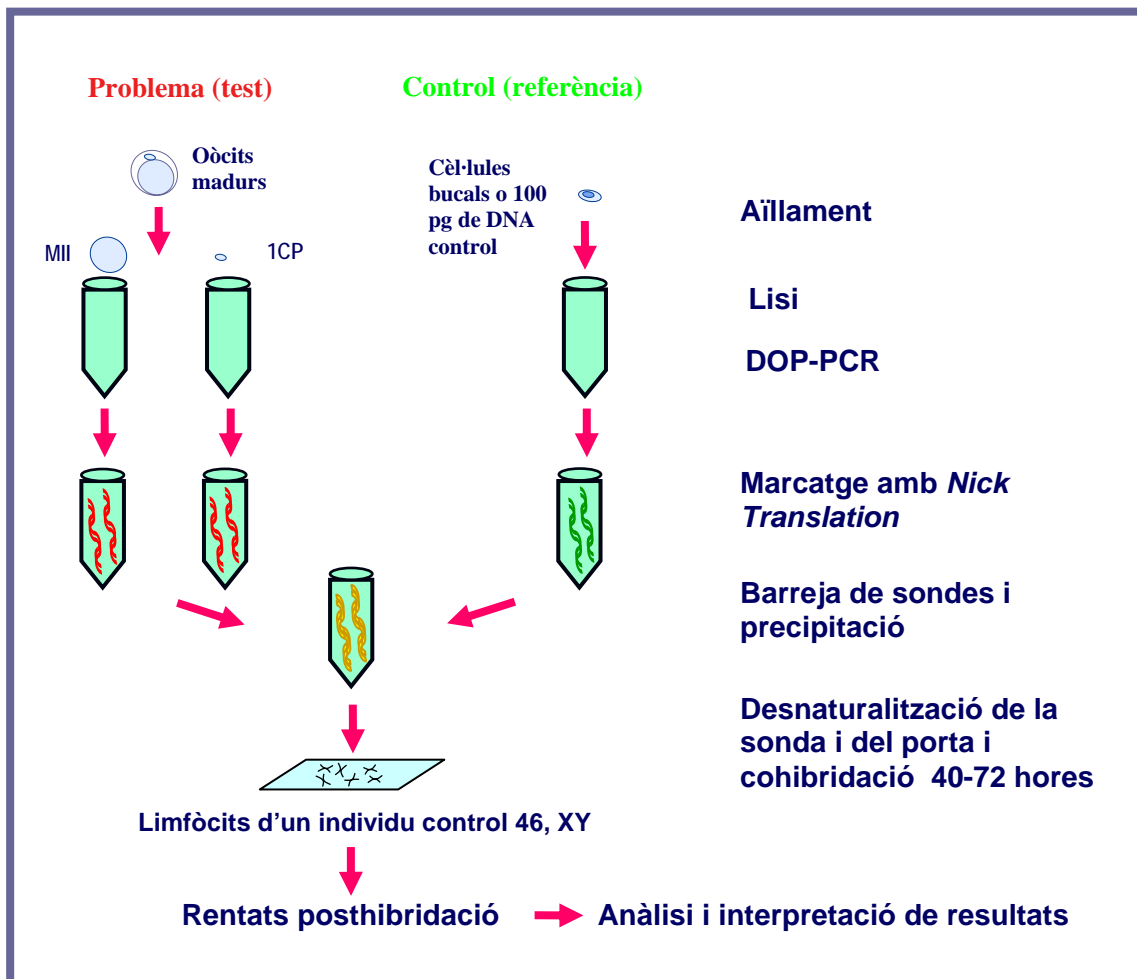


Figura 3.1. Etapes bàsiques que cal seguir per a la realització de la hibridació genòmica comparada en cèl·lules aïllades.

3.3.1.1. Obtenció i aïllament de cèl·lules

S'han aïllat cèl·lules de la mucosa bucal, MIIs d'oòcits (MIIs) i primers corpuscles polars (1CPs). El protocol d'aïllament s'ha modificat partint d'un protocol bàsic descrit inicialment per Wells *et al* (2000).

En el cas de les cèl·lules de la mucosa bucal s'ha partit d'una suspensió cel·lular que s'obté glopejant aigua destil·lada durant alguns segons. Sense necessitat de centrifugar la concentració de cèl·lules és molt elevada. Les cèl·lules s'aïllen fent dilucions successives en diverses gotes de solució d'aïllament situades en una placa de Petri (Figura 3.2). Un cop les cèl·lules estan individualitzades cal assegurar-se de veure-hi un nucli ben diferenciat. A continuació es renten individualment les cèl·lules en tres o quatre "gotes d'aïllament"

noves. És important carregar la pipeta amb un petit volum de solució d'aïllament nova ("gotes de càrrega") cada cop que es passen les cèl.lules d'una "gota d'aïllament" a una altra. Finalment es transfereixen les cèl.lules a un tub de PCR. Les cèl.lules es deixen en un volum petit de solució d'aïllament, preferentment, a la paret del tub. D'aquesta manera es pot mirar el tub a 50X sota la lupa i assegurar-se que les cèl.lules estan dins del tub, tot i que això no sempre és possible amb cèl.lules buccals i 1CPs a causa de la seva mida reduïda. També és recomanable buidar la pipeta en una gota de solució d'aïllament i comprovar que no surt cap cèl.lula de la pipeta, la qual cosa vol dir que la cèl.lula probablement és dins del tub tot i que no puguem veure-la. Tot aquest procediment es fa utilitzant pipetes pasteur estirades a mà sota una flama i sota control d'estereomicroscopi.

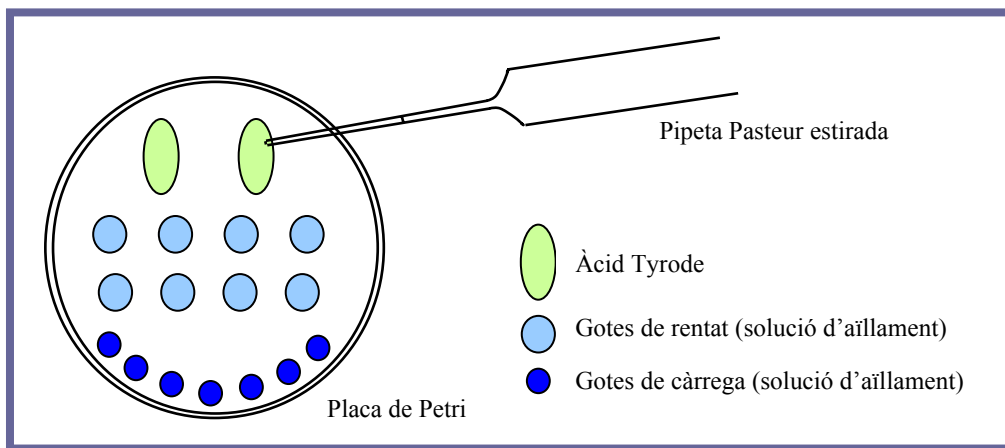


Figura 3.2. Esquema de la placa de Petri utilitzada per a l'aïllament cel.lular.

En el cas dels oòcits el primer que cal fer és digerir la zona pel.lúcida a fi de separar la MII de l'1CP o de separar els blastòmers d'un embrió. Per digerir la zona pel.lúcida s'han utilitzat dos protocols diferents:

- Tripsina: la digestió té lloc amb la incubació a 37°C, en una placa calefactora, durant uns 3 minuts.

- Àcid Tyrode (Sigma, pH 2,5): té força avantatges ja que és molt més ràpid que la tripsina (triga 20-30 segons a digerir la zona pel.lúcida) i com que actua a temperatura ambient no és necessari tenir una placa calefactora dins de la cabina de flux. A més, s'adquireix estèril i filtrat.

Un cop digerida la zona pel·lúcida, s'agafen les cèl·lules amb una pipeta amb solució d'aïllament nova i es transfereixen a una gota de solució d'aïllament nova. Normalment un cop la zona pel·lúcida està digerida, les cèl·lules (1CP i MII o blastòmers) se separen fàcilment degut a l'absència de Ca^{2+} i Mg^{2+} en el medi. Tot i així, hi ha vegades, sobretot quan els oòcits han madurat in vitro i tot just s'ha acabat d'extrusionar l'1CP, que hi ha un pont citoplasmàtic entre l'1CP i la MII. En aquestes ocasions, la separació de les cèl·lules s'haurà de fer de manera mecànica. El pipeteig prou vigorós de la MII junt amb l'1CP, amb una pipeta normal o de menor diàmetre perquè hi hagi més fregament, farà que totes dues cèl·lules se separin, tot i que s'ha de tenir cura ja que hi ha el risc que les cèl·lules s'acabin lisant.

Un cop es tenen els blastòmers o la MII i l'1CP separats, les cèl·lules es renten i es transfereixen per separat a un tub de PCR seguint el mateix procediment explicat per a les cèl·lules bucal.

Els tubs de PCR amb les cèl·lules aïllades s'han de mantenir en gel fins al moment d'afegir la solució de lisi.

3.3.1.2. Mesures per evitar la contaminació

La contaminació, ja sigui amb cèl·lules pròpies del personal manipulador, amb DNA bacterià/fúngic, o amb productes de PCR, és un dels principals problemes a l'hora de treballar amb cèl·lules aïllades i amplificar el seu DNA. Algunes de les mesures utilitzades (Wells i Sherlock 1998) per evitar la contaminació són:

- El laboratori ha de disposar d'una àrea de PCR/aïllament lliure de productes de PCR o de DNA i apartat de zones de pas de la gent.
- Tot el procediment s'ha de fer dins d'una cabina de flux laminar prèviament desinfectada amb solucions sabonoses i/o 10% de lleixiu i esterilitzada amb llum ultraviolada com a mínim 30 minuts abans de ser utilitzada.
- Els guants, preferentment sense talc, són d'ús obligatori durant tot el procediment. Cal canviar-se els guants freqüentment, sobretot si hi ha sospites que s'hagin pogut contaminar en tocar superfícies o objectes fora de l'àrea de treball.
- Tot el material utilitzat (plaques de Petri, xeringues, pipetes Pasteur, tubs de PCR...) ha de ser estèril i d'un sol ús i s'ha de tractar amb llum ultraviolada 30 minuts abans de començar l'experimental. També s'han de posar sota la llum ultraviolada els reactius i les solucions que ho permetin. Això exclou l'oli mineral.

- Les pipetes i gradetes han d'estar etiquetades (p.e. amb "PCR") i han de mantenir-se sempre dins de la cabina de flux laminar. En el cas de treure-les de la cabina s'han de desinfectar abans de tornar-les a deixar dins. Aquest material ha de ser d'ús exclusiu per a l'aïllament de cèl.lules i per a l'amplificació del seu DNA.
- Les puntes de les pipetes han de tenir un filtre per evitar l'emissió d'aerosols.
- Els reactius s'han de preparar en condicions d'esterilitat i aliquotar en volums petits, per tal de minimitzar el nombre de vegades que els tubs són oberts i, per tant, exposats a possibles contaminants.
- En cada experiment s'han de incloure diversos controls de contaminació, ja sigui per detectar la contaminació dels reactius (PCR buffer, dNTPs, aigua, primers...) o bé de la solució necessària per a l'aïllament de les cèl.lules (PBS). Rutinàriament, els controls negatius de la solució d'aïllament s'efectuen agafant un volum (equivalent al que es transfereix als tubs de PCR) de l'última gota de rentat de les cèl.lules aïllades.

3.3.1.3. Lisi cel.lular

El protocol triat ha estat la lisi amb proteïnasa K/SDS. A cada tub s'afegeixen 3 µl de solució de lisi i es recobreix la mostra amb oli mineral. La lisi cel.lular es fa incubant 1 h a 37°C seguit de 10 minuts a 95°C a fi d'inactivar la proteïnasa K.

3.3.1.4. Amplificació total del genoma de la cèl.lula mitjançant DOP-PCR

Atés que el protocol de CGH requereix un mínim de 200 ng de DNA i una sola cèl.lula conté només 5-10 pg és imprescindible fer prèviament una amplificació del genoma de la cèl.lula. L'amplificació es fa mitjançant la tècnica d'amplificació total del genoma anomenada DOP-PCR descrita per Telenius *et al* l'any 1992. Aquesta tècnica va ser modificada posteriorment per amplificar cèl.lules aïllades que havien de ser analitzades amb CGH (Wells *et al.* 1999). A la Taula 3.1 es mostren els components i concentracions de cada reacció de PCR per sumar un volum final de 50 µl.

Taula 3.1. Reactius utilitzats per a la DOP-PCR.

Reactiu	Composició i concentració per reacció	Volum	Comentaris
Aigua	Aigua miliQ estèril i filtrada	32 µl	Aliquotada i d'un sol ús
10x Long PCR Buffer - MgSO ₄ (Ambion)	1x	5 µl	La solució 10x conté Tris-HCl 100 mM pH 9; 500 mM KoAC
dNTPs MIX (1C:1G:1A:1T) (Ambion)	0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dATP i 0,2 mM de dTTP	4 µl	La solució mare conté 2,5 mM de cada nucleòtid.
MgSO ₄ (Ambion)	1,75 mM	3,5 µl	La solució mare és de 25 mM
Primer de DOP 6MW (Roche)	2 µM de primer de DOP 5'-GACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'	1 µl	La solució mare és de 100 µM
SuperTaq Plus (Ambion)	2,5 U	0,5 µl	La solució mare és de 5 U/µl. S'ha d'afegir al final i s'ha de mantenir sempre en gel.
Mostra	Cèl.lula + aprox. 1 µl de solució d'aïllament + 3 µl de solució de lisi	4 µl	

El programa de PCR és el següent: la mostra es desnaturalitza a 94°C durant 4,5 minuts i es fan 8 cicles de 95°C durant 0,5 minuts, 30°C durant 1,5 minuts i 68°C durant 3 minuts amb una rampa de 0,2°C/sg des de la temperatura d'*annealing* fins a la d'extensió; a continuació es fan 40 cicles més de 95°C 0,5 minuts, 56°C 1 minut i 68°C 3 minuts amb una extensió final a 68°C durant 8 minuts.

Com ja s'ha dit, és essencial prendre grans precaucions enfront la contaminació. Cal afegir controls negatius en cada experiment per descartar una possible contaminació dels reactius de la PCR així com de la solució d'aïllament.

3.3.1.5. Electroforesi de comprovació

L'amplificació del genoma total de la cèl.lula aïllada s'avalua mitjançant una electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (Figura 3.3). El gel es tenyeix amb bromur d'etidi i s'observa en un transiluminador. Els productes de l'amplificació del genoma de les cèl.lules aïllades i del DNA extret de sang perifèrica es visualitzen com una pinzellada corresponent a fragments de diferent mida, normalment compreses entre 100 i 15000 pb (en funció de la Taq polimerasa que utilitzem).

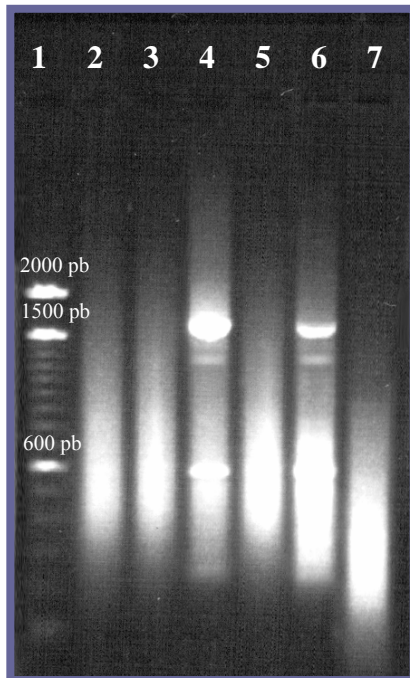


Figura 3.3. Productes de DOP-PCR de cèl.lules aïllades (1) Patró de bandes de 100 parells de bases. (2) Amplificació d'una cèl.lula de la mucosa bucal. (3) i (5) Productes de DOP-PCR de dos 1CPs. (4) i (6) Amplificació dels oòcits complementaris. Les bandes situades a 600, 1250 i 1700 pb corresponen a l'amplificació del DNA mitocondrial. (7) Negatiu de la PCR mostrant una pinzellada de menor pes molecular.

3.3.1.6. Preparació del DNA control de la CGH

Els controls utilitzats per a la CGH són, o bé DNA d'un individu control (46,XX o 46,XY) diluït a una concentració de 100 pg/ μ l, o bé 2-3 cèl.lules aïllades de la mucosa bucal. L'extracció de DNA de sang perifèrica es fa seguint un protocol estàndard d'extracció. Breument, la sang es renta i es centrifuga, seguidament la membrana dels eritròcits es trenca utilitzant una solució de lisi i es centrifuga de nou per eliminar-ne les restes cel.lulars. Els limfòcits es lisen amb un altre tampó que conté proteïnasa K i SDS i el DNA es precipita amb etanol absolut i, finalment, es resuspèn en tampó Tris-EDTA (TE). La concentració del DNA es calcula mesurant l'absorbància a 260 nm en un espectrofotòmetre. Tant si s'utilitza DNA diluït com cèl.lules bucals, aquestes mostres de DNA controls també han de ser amplificades amb DOP-PCR.

3.3.1.7. Marcatge de la sonda

Els productes d'amplificació de les cèl.lules problema (ja siguin cèl.lules bucals, 1CPs, MIIs o blastòmers) i de la mostra control (generalment cèl.lules bucals) es marquen amb la tècnica de *Nick Translation*. L'enzim DNAsa I fa talls en el DNA i l'enzim DNA polimerasa I s'uneix al tall i va polimeritzant desplaçant així el tall. Durant aquesta polimerització es

van incorporant els diferents nucleòtids normals (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) i també nucleòtids marcats (dUTP) amb una molècula fluorescent conjugada. En el cas del marcatge del DNA problema aquesta molècula fluorescent és Spectrum Red (Vysis) i en el cas del DNA control, la molècula fluorescent és Spectrum Green (Vysis). S'utilitza el *Nick Translation* Kit de Vysis i els components de la barreja de marcatge es detallen a la Taula 3.2.

Taula 3.2. Reactius utilitzats per al marcatge amb *Nick Translation*

Reactiu	Composició i/o concentració per reacció	Volum	Comentaris
Nick Translation enzyme	25 U de DNAsa I i DNA polimerasa I	5 µl	La solució mare té una concentració de 5 U/µl. S'afegeix a la barreja al final i es manté sempre en gel
10x Nick Translation buffer	1x	5 µl	La solució 10x conté Tris-HCl 500 mM pH 7,2; 10 mM MgSO ₄ ; 1 mM DDT
dNTPs MIX (1C:1G:1A)	0,02 mM de dCTP, 0,02 mM de dGTP i 0,02 mM de dATP	10 µl	Es treballa a partir d'una solució de 0,1 mM de dCTP, 0,1 mM de dGTP i 0,1 mM de dATP
dTTP	0,01 mM de dTTP	5 µl	La solució mare conté 0,1 mM dTTP
dUTP marcats amb FITC o TR	0,01 mM de Spectrum Green i 5 µM de Spectrum Red	2,5 µl	Les solucions mares contenen 0,2 mM de Spectrum Green o 0,1 mM de Spectrum Red (en ser més intens es compensa diluint-lo a la meitat)
Producte d'amplificació	500-800 ng de DNA	22,5 µl	

El volum final de la reacció és de 50 µl. La reacció té lloc a 15°C i s'atura incubant la barreja 10 minuts a 70°C. D'aquesta manera s'inactiven els enzims.

La durada del marcatge es determina cada vegada que arriba un nou lot d'enzim. Generalment, un marcatge de dues hores dona resultats òptims, amb un rang de fragments ideals per a la hibridació posterior (300-3000 pb). Fragments massa curts o massa llargs poden donar lloc a soroll de fons i hibridacions granuloses que es traduiran en fluctuacions dels perfils de CGH.

La mida dels productes de marcatge es comproven carregant 9 µl de la mostra en un gel d'agarosa al 2% i fent una electroforesi (Figura 3.4). Si s'exposa el gel a la llum ultraviolada del transil.luminador abans de tenyir el gel amb bromur d'etidi, es pot veure una pinzellada, corresponent a la incorporació dels fluorocroms en el nostre DNA (només s'incorporen aproximadament un 20% del total de fluorocroms). També es poden observar els nucleòtids marcats que no s'han incorporat al DNA. Un cop es tenyeix el gel amb bromur

d'etidi, s'observa una pinzellada que correspon al DNA total de la reacció. En aquest cas la fotografia ens permetrà determinar la longitud dels fragments.

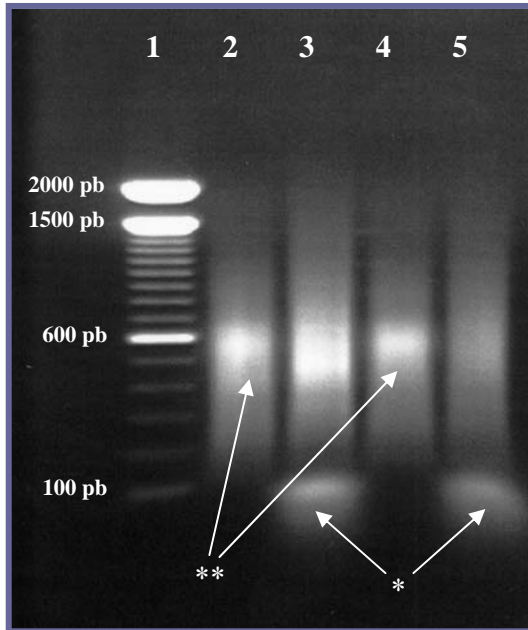


Figura 3.4. Marcatge amb *Nick translation* dels productes de PCR de cèl·lules aïllades. Aproximadament, el 80% dels dUTPs marcats no s'incorporen al DNA. Els dUTPs sobrants es visualitzen en diferents regions del gel en funció de si es tracta de dUTPs marcats amb Spectrum Green (*) o amb Spectrum Red (**). La migració dels fluorocroms depèn de la seva estructura química així com de la seva càrrega. (1) Patró de bandes de 100 parells de bases. (2) i (4) Marcatge en vermell del producte d'amplificació d'un 1CP i d'un oòcit, respectivament (mostra problema en la CGH). (3) i (5) Marcatge en verd dels productes d'amplificació de tres cèl·lules bucals (mostra control en la CGH).

3.3.1.8. Preparació de la sonda

El producte de marcatge de les cèl·lules amplificades (marcades en vermell) es barregen amb els productes de l'amplificació del DNA control (marcats en verd). A la barreja s'afegeixen 5 µl de Human Cot-1-DNA (concentració 1µg/µl) que bloqueja les seqüències repetitives. A continuació s'afegeixen 0,1 volums d'acetat sòdic (NaAc) 3 M (pH 5,5) i 2,5 volums d'etanol absolut i es deixa precipitar el DNA com a mínim 1 h a -80°C. La precipitació permet eliminar els dNTPs sobrants de la reacció de marcatge. Passat aquest temps, els tubs es centrifuguen durant 30 min a 12000 rpm, se n'elimina el sobrenedant i es deixa assecar el botó. A continuació, el botó es resuspen amb 10 µl de solució d'hibridació. Finalment es fa un pols de centrifuga i el tub es deixa a 37°C a fi que el botó es dissolgui completament.

3.3.1.9. Avaluació dels portaobjectes amb preparacions metafàsiques

Els portaobjectes amb extensions cromosòmiques es poden preparar en el mateix laboratori a partir de cultius de sang perifèrica d'individus control 46, XY. Malauradament, aquest protocol comporta temps (l'envelliment dels portes, el tractament amb pepsina i RNAasa i la postfixació pot portar unes tres hores) i no hi ha garanties que les extensions

cromosòmiques dels portaobjectes preparats siguin de millor qualitat que en els portaobjectes subministrats per Vysis, que són els utilitzats en aquest treball. Aquests portaobjectes es desen a -20°C fins a la seva utilització. Després de descongelar els portaobjectes i abans de fer la CGH és molt convenient avaluar les extensions cromosòmiques en el microscopi de contrast de fases a fi d'escollir una àrea d'hibridació, que s'encercla amb un llapis de diamant. Les metafases d'aquesta àrea han de complir una sèrie de requeriments, com ara, tenir els cromosomes llargs però ben estesos (amb un màxim de tres superposicions), tenir els cromosomes foscos o negres i presentar poques restes citoplasmàtiques.

3.3.1.10. Hibridació competitiva

Les preparacions cromosòmiques es deshidraten en una sèrie d'etanols (70, 85 i 100%) durant un minut. A continuació, la desnaturalització de les metafases té lloc en una solució 70% formamida/2XSSC durant 5 minuts a 73°C . És important desnaturalitzar un màxim de quatre portaobjectes per cada *coplin*, per evitar que la temperatura baixi massa. Finalment, els portaobjectes són deshidratats en una sèrie d'etanols freds (70, 85 i 100%, 1 minut cadascun) i es deixen assecar a l'aire. D'altra banda i simultàniament, la sonda de CGH es desnaturalitza durant 10 minuts a 73°C en solució de desnaturalització i a continuació s'aplica sobre el portaobjectes ja sec, que prèviament s'ha desnaturalitzat i deshidratat. Es cobreix amb un cobreobjectes (20x20 mm), se segella amb cola i es deixa hibridant en una cambra humida i fosca a 37°C entre 40 i 72 hores. Alternativament també es pot fer la hibridació incubant el portaobjectes en un microones 1 h a 70 W (junt amb un recipient amb aigua per mantenir les condicions d'humitat) i 36-40 hores més en una cambra humida a 37°C .

3.3.1.11. Rentats posthibridació

Es treballa en la foscor. S'extreu amb cura el cobreobjectes segellat, i les preparacions cromosòmiques són rentades durant 2 minuts en la solució 1 a 73°C agitant diversos cops. A continuació, es fa un rentat en la solució 2 a temperatura ambient durant 2 minuts més. Els portaobjectes són deshidratats en una sèrie d'etanols a temperatura ambient i es deixen assecar. Aquests rentats permetran eliminar qualsevol unió inespecífica entre DNAs (que donaria soroll de fons) i eliminar residus de la preparació.

Seguidament les preparacions es munten amb 15 µl de solució DAPI (cobreobjectes de 24x60 mm) per contra tenyir els cromosomes i els nuclis. L'*antifade* de la solució inhibeix el *photobleaching* del DAPI i dels fluorocroms (Texas Red TR[®], rodamina, fluoresceïna...) i per tant, ajuda a mantenir la fluorescència de la hibridació al llarg del temps. Els portaobjectes es desen a 4°C a la foscor fins a la seva observació.

3.3.1.12. Observació i captura mitjançant un microscopi de fluorescència

L'observació i la captura de les metafases híbrides s'han fet amb un microscopi Olympus BX60 d'epifluorescència connectat a una càmera CCD (*charge-coupled device*) d'alta sensibilitat (Photometrics Sensys/Olympus U-SPT) acoblada a un Power Macintosh G3 amb programa per SmartCapture (Digital Scientific Cambridge, Regne Unit). En aquest cas l'anàlisi d'imatges s'ha fet amb el programa Vysis Quips CGH. Alternativament, també s'ha utilitzat un segon microscopi Olympus AX70 d'epifluorescència connectat a un ordinador amb el sistema d'anàlisi Cytovision (Applied Imaging).

Per a l'excitació dels diferents fluorocroms s'utilitza una bombeta de mercuri de 100 W.

Tots dos microscopis estan equipats amb filtres que permeten excitar i captar la llum emesa pels fluorocroms utilitzats (visualització), és a dir:

- Filtre U-MNIBA per captar emissions verdes (Spectrum Green, que s'excita a 497 nm i emet llum a una longitud d'ona de 524 nm).
- Filtre U-MWIY per captar emissions vermelles (Spectrum Red, que s'excita amb llum de longitud d'ona 592 nm i emet llum a 612 nm).
- Filtre U-MNU per captar emissions blaves (DAPI, s'excita a 367 nm i emet llum de longitud d'ona 452 nm).

3.3.1.13. Anàlisi de les imatges

S'analiza una mitjana de 10 metafases per cada cèl.lula problema. Les metafases que s'inclouen en l'anàlisi s'han de triar utilitzant diversos criteris:

- Metafases amb cromosomes llargs, separats i poques superposicions.
- Metafases amb intensitats altes i equivalents de fluorescència vermella i verda.
- Hibridació uniforme i homogènia (no granulosa) al llarg dels cromosomes.
- Gens o molt poc soroll de fons al voltant dels cromosomes.

La captura és seqüencial: primerament es captura el senyal corresponent a la contratinció (DAPI), després el senyal corresponent a la fluorescència verda i, finalment, el senyal de la

fluorescència vermella. A continuació la determinació de les ràtios per als diferents cromosomes es fa seguint els passos següents:

- Segmentació: separació dels cromosomes del soroll de fons que els envolta.
- Cariotip: la imatge DAPI s'inverteix i s'utilitzen les bandes DAPI reverses (similars a les bandes G) per cariotipar la metafase.
- Normalització: normalització dels factors que condicionen la intensitat de la fluorescència. Correcció del soroll de fons.
- Determinació dels perfils d'intensitat de fluorescència: s'integren les intensitats a intervals d'un píxel al llarg de les línies perpendiculars a l'eix longitudinal del cromosoma (des del telòmer *p* fins al telòmer *q*).
- Determinació de la ràtio al llarg de cada cromosoma: calculat dividint el perfil d'intensitat de la fluorescència vermella (DNA problema) pel perfil d'intensitat de la fluorescència verda (DNA control).

Quan la relació entre la fluorescència vermella i verda és equivalent, aquesta ràtio s'ajusta a 1. Desviacions en aquesta ràtio indicaran guany, si la relació entre fluorescència vermella:verda és $>1,2:1$, o pèrdua, si la relació entre les fluorescències és $<0,8:1$ (Figura 3.5).

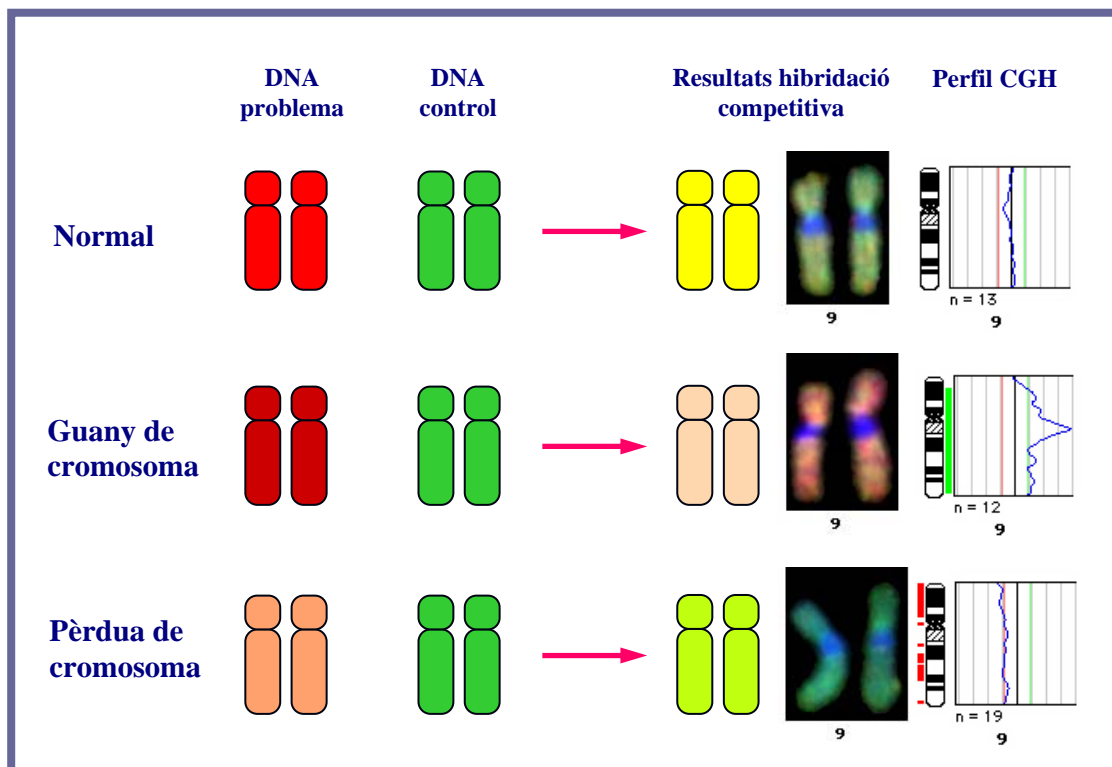


Figura 3.5. Representació esquemàtica de la CGH i la interpretació dels seus perfils.

3.3.2. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH) en extensions cromosòmiques de MIIs d'oòcits

Per a cada MII es fa un mínim de dues rondes d'hibridació emprant dos conjunts de sondes (barreja A+ barreja B) que permeten analitzar 9 cromosomes preseleccionats. En les MIIs en què s'ha de confirmar alguna aneuploidia que involucra un cromosoma diferent als quals s'analitzen amb les barreges A i B, s'aplica una tercera ronda d'hibridació (barreja A+ barreja B+ barreja C).

La barreja A inclou 5 sondes específiques: tres sondes locus específiques, per al cromosoma 13 en Spectrum Red, per al cromosoma 21 en Spectrum Green i per al cromosoma 22 en Spectrum Gold i dues sondes centromèriques per al cromosoma 16 en Spectrum Aqua i per al cromosoma 18 en Spectrum Blue.

La barreja B inclou 4 sondes centromèriques: per al cromosoma 1 en Spectrum Orange, per al cromosoma 15 en Spectrum Green, per al cromosoma 17 en Spectrum Aqua i per al cromosoma X en una barreja de sonda Spectrum Aqua i Spectrum Orange.

La barreja C inclou una sonda centromèrica (normalment per al cromosoma X) que s'utilitza com a control de la hibridació, més una o dues sondes utilitzades per confirmar les aneuploidies trobades en l'1CP. Aquestes sondes preferentment són centromèriques però en alguns casos, com per als cromosomes 14 o 19, com que no hi ha sondes centromèriques disponibles s'han utilitzat sondes telomèriques.

L'ordre d'aplicació de les diferents barreges (A, B i C) depèn de l'oòcit i de l'aneuploidia que cal confirmar. A la Taula 3.3 s'esquematitzen les tres estratègies utilitzades en funció dels tipus de sondes necessàries per a detectar les aneuploidies. En general, les barreges que contenen sondes telomèriques i/o locus específiques (barreges A i C) s'utilitzen en una primera ronda d'hibridació ja que donen un senyal molt més petit i puntual que les sondes centromèriques i, per tant, és millor que el material estigui en millor estat. Les sondes centromèriques es poden utilitzar en l'última ronda d'hibridació. Per exemple, l'ordre d'aplicació seguit per la FISH d'una MII a la qual a part dels cromosomes inclosos en la barreja A i B, se li ha d'hibridar una sonda telomèrica per a la detecció d'una aneuploidia concreta va ser hibridar primerament la barreja C (sonda telomèrica més centromèrica), seguit de la barreja A (sondes centromèriques i locus-específiques) i la B (només sondes centromèriques). Contràriament, quan la barreja C incloïa només sondes centromèriques l'ordre seguit va ser A, C i B (Taula 3.3).

Taula 3.3. Ordre d'aplicació de les barrejes d'hibridació

Ordre			Indicacions
1a ronda d'hibridació	2a ronda d'hibridació	3a ronda d'hibridació	
Barreja A (sondes LSI i CEP)	Barreja B (sondes CEP)		Si l'1CP és euploide o té una aneuploïdia que afecta algun cromosoma inclòs en la barreja A o B
Barreja C (sondes CEP i TEL)	Barreja A (sondes LSI i CEP)	Barreja B (sondes CEP)	Si per confirmar en la MII l'aneuploïdia trobada en l'1CP es requereix la hibridació de la barreja C que inclou una sonda telomèrica més una o dues sondes centromèriques (una de les quals funciona com a control)
Barreja A (sondes LSI i CEP)	Barreja C (sondes CEP)	Barreja B (sondes CEP)	Si per confirmar en la MII l'aneuploïdia trobada en l'1CP és necessari hibridar la barreja C, que inclou sondes centromèriques (un control i les sondes de confirmació)

3.3.2.1. Aïllament i fixació de les MIIs d'òocits

Un cop s'ha digerit la zona pellúcida tal com s'ha explicat anteriorment, cada MII es fixa utilitzant la tècnica de Tarkowski (Tarkowski 1966) amb certes modificacions.

En general, la fixació depèn de tres factors:

- Tractament hipotònic: com més dur el tractament amb l'hipotònic, més aigua passarà dins la cèl.lula i més s'inflarà aquesta, i quedaran els cromosomes més estesos en trencar-se la membrana.
- Temperatura ambient: com més temperatura, més ràpidament s'evaporarà el fixador i més agrupats quedaran els cromosomes.
- Humitat ambiental: també hi influeix l'evaporació del fixador, per tant, com més humitat, més trigarà el fixador a evaporar-se i més estesos quedaran els cromosomes.

Un cop aïllada, la MII es transfereix a una gota d'hipotònic. La durada del tractament depèn de la temperatura i de la humitat ambiental. Les condicions òptimes són 5-6 minuts d'hipotònic en una habitació a 23°C de temperatura i 50% d'humitat relativa. Durant el tractament hipotònic, que es fa a temperatura ambient, s'ha d'anar controlant l'estat de la MII perquè en haver estat sotmesos prèviament a un tractament amb àcid Tyrode's, algunes MIIs són més sensibles a l'hipotònic i acaben lisant-se.

A continuació la MII es transfereix (en un volum mínim d'hipotònic) a la superfície d'un portaobjectes prèviament desengreixat (en metanol durant una nit com a mínim). A mesura

que la gota d'hipotònic es va evaporant (la gota es va fent més petita i plana), el perfil de la MII resulta cada cop més evident. Quan es comença a definir el perfil de la MII és el moment de deixar caure sobre la MII una gota de fixador. La MII tendeix a moure's i, per tant, cal seguir-la observant fins que s'atura. Un cop aturat el fixador, s'evapora de nou i es fa visible el perfil de la MII. Quan aquest torna a ser evident, es deixa caure una segona gota de fixador sobre la MII (probablement aquest cop la cèl·lula roman al seu lloc) i es repeteix el mateix dues o tres vegades més. Finalment, després de la quarta o cinquena gota de fixador, quan el perfil de la MII es fa evident, s'ha d'incorporar-hi l'alè per augmentar la humitat i fer que el fixador evapori més a poc a poc i els cromosomes s'estenguin bé a sobre del portaobjectes. Quan el perfil de la MII desapareix i ja no s'aprecia cap relleu (la gota s'ha fet plana) vol dir que la membrana s'ha trencat i el complement cromosòmic s'ha alliberat. Amb un llapis de diamant s'encercla la zona on era la MII i es deixa evaporar completament el fixador.

Un cop el porta s'ha assecat a l'aire, es fa un control en el microscopi de contrast de fases, per veure que efectivament dins del cercle es troba present el complement cromosòmic. En aquest control també s'observa si hi ha restes citoplasmàtiques. Finalment, els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'etanols i es desen a -20°C fins al moment en què es realitzi la hibridació.

3.3.2.2. Tractament amb pepsina i postfixació

Les restes de citoplasma envoltant els cromosomes dificulta l'accés de les sondes. També pot fer difícil el diagnòstic en produir hibridacions inespecífiques. Per eliminar restes citoplasmàtiques es fa un tractament amb pepsina a 37°C . En funció de la quantitat de citoplasma i de l'envelliment de la preparació, la durada del tractament variarà de 0,5 a 3 minuts. El tractament també és més llarg si la preparació té més de sis mesos. Després, el portaobjectes es renta durant 5 minuts en PBS a temperatura ambient i, finalment, la mostra es postfixa amb formaldehid (5 minuts en PBS/ MgCl_2 , 9 minuts en PBS/ MgCl_2 / FDH i 5 minuts en PBS). Els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'etanols i es deixen assecar a l'aire.

3.3.2.3. Contratació amb DAPI

Es fa una tinció del complement cromosòmic amb solució DAPI (6 µl de solució DAPI en un cobreobjectes de 20x20 mm). Les imatges es capturen utilitzant el microscopi Olympus BX60 i el sistema de captura SmartCapture. Les imatges DAPI es poden invertir (DAPI revers) (Figura 3.6).

La tinció amb DAPI, prèviament a la hibridació, ens ajuda a interpretar senyals de FISH d'una segona o tercera ronda d'hibridació on el material s'ha desnaturalitzat ja dos o tres cops i on part de la morfologia cromosòmica es pot perdre.

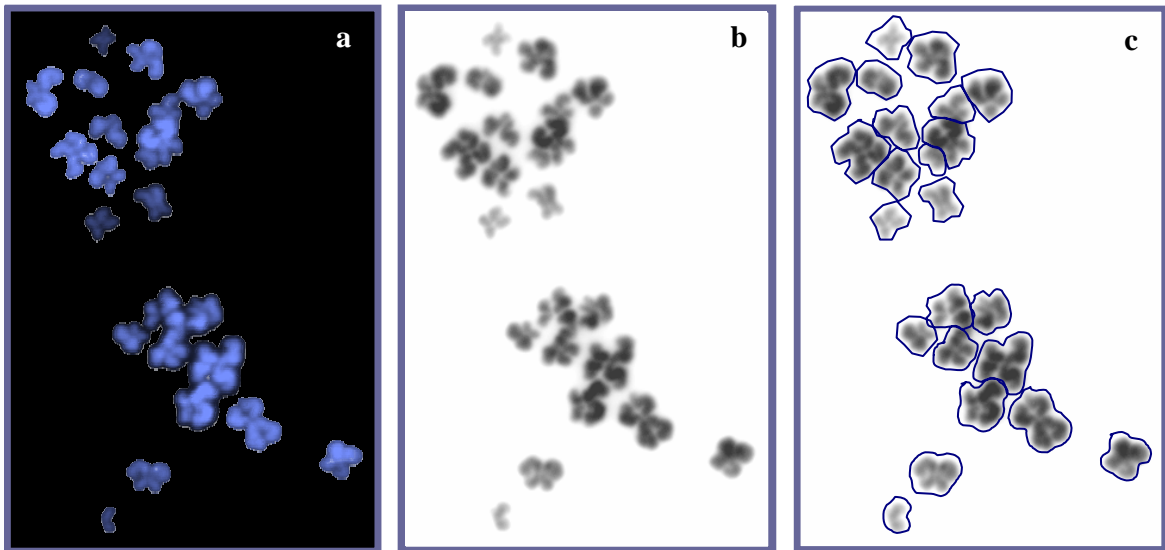


Figura 3.6. Complement cromosòmic d'una MII d'oòcit euploide (amb 23 cromosomes). La tinció DAPI prèvia a la hibridació permet comptar el nombre d'univalents i ajuda a interpretar els senyals de FISH posteriors. (a) Tinció dels cromosomes amb la solució DAPI. (b) DAPI revers, que dona una imatge similar a la que s'observa en un microscopi de contrast de fases. (c) DAPI revers amb els cromosomes (de dos cromàtides cadascun) individualitzats.

Un cop es tenen les imatges DAPI capturades, el DAPI s'elimina rentant els portaobjectes durant 5 minuts a temperatura ambient en 2xSSC/ 0,1% Tween 20. Després els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'etanols.

3.3.2.4. Hibridació i rentats posthibridació de la barreja A

Apliquem de 0,5 a 1 µl de sonda MultivisionPB (Vysis) en cobreobjectes tallats en quadrats d'uns 8x8 mm. Es posa el cobreobjectes sobre la zona marcada amb el cercle, on és el

complement cromosòmic, i se segella amb cola. Llavors el portaobjectes (un màxim de 12 cada cop) es posa damunt d'una placa d'hibridació (*HYBrite*, Vysis) i es desnaturalitza el DNA durant 5 minuts a 73°C. La hibridació es pot fer a 37°C durant 3 hores o bé a 42°C durant 30 minuts i a 37°C durant 90 minuts. Alternativament, la preparació es pot deixar també hibridant tota la nit. És important mantenir les condicions d'humitat durant tota la hibridació situant tovallons de paper mullats amb aigua en els dos pouets laterals de la placa d'hibridació.

Un cop finalitzada la hibridació, s'enretira la cola i el cobreobjectes del portaobjectes amb molt de compte. Els rentats posthibridació es fan en la solució de rentat a 71°C durant 4 minuts. A continuació els portaobjectes s'introdueixen en la solució de rentat durant 2 minuts més a temperatura ambient. Finalment, els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'etanols i es deixen assecar. Com que la solució DAPI emmascara els senyals Spectrum Blue (cromosoma 18) d'aquesta barreja, la preparació es munta tan sols amb 6 µl d'*antifade* (Vectashield) en un cobreobjectes de 20x20 mm.

3.3.2.5. Hibridació i rentats posthibridació de la barreja B

Es tallen nous cobreobjectes en quadrats d'uns 8x8 mm i s'aplica de 0,5 a 1 µl de barreja B. Es posa el cobreobjectes sobre el cercle i se segella amb cola. Per a la desnaturalització i hibridació també s'utilitza la placa d'hibridació *HYBrite*. La mostra es desnaturalitza durant 5 minuts a 73°C i la hibridació es fa a 42°C durant 30 minuts o alternativament, la preparació es deixa també hibridant tota la nit.

Un cop finalitzada la hibridació, s'enretirarà la cola i el cobreobjectes a la foscor. Els rentats posthibridació es fan en solució de rentat a 71°C durant 30 segons. A continuació els portaobjectes s'introdueixen en cubetes amb la solució de rentat durant 2 minuts més a temperatura ambient. Finalment els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'etanols i es deixen assecar. En aquest cas, la contratació dels cromosomes es fa amb 6 µl de solució DAPI en un cobreobjectes de 20x20 mm.

3.3.2.6. Hibridació i rentats posthibridació de la barreja C

La barreja C també s'aplica en els cobreobjectes tallats en quadrats (8x8 mm). S'afegeix el cobreobjectes sobre la zona encerclada i se segella amb cola. Per a la desnaturalització i hibridació també s'utilitza la placa d'hibridació *HYBrite*. La mostra es desnaturalitza també 5 minuts a 73°C i la hibridació es fa a 42°C durant 30 minuts (si les sondes són totes

centromèriques) o alternativament, un mínim de 6 hores o fins i tot tota la nit a 37°C si hi ha alguna sonda telomèrica inclosa a la barreja.

Un cop finalitzada la hibridació s'enretirarà la cola i el cobreobjectes. Els rentats posthibridació es fan en solució de rentat a 71°C durant 30 segons, si les sondes són centromèriques, o durant 2 minuts si hi ha alguna sonda telomèrica. Els portaobjectes s'introdueixen en la solució de rentat durant 2 minuts més a temperatura ambient i, finalment, es deshidraten en una sèrie d'etanols i es deixen assecar. La contratinció dels cromosomes es fa amb 6 µl de solució DAPI en un cobreobjectes de 20x20 mm.

3.3.2.7. Observació i captura

L'observació i la captura s'han fet en un microscopi Olympus BX60 d'epifluorescència connectat a una càmera CCD d'alta sensibilitat acoblada a un Power Macintosh G3 amb programa per SmartCapture i IPLab (Scanalytics, Inc, Vysis, USA).

El microscopi està equipat amb filtres que permeten excitar i captar la llum emesa pels fluorocroms utilitzats, és a dir:

- Filtre U-MNIBA: capta emissions verdes (Spectrum Green de Vysis) i, per tant, permet visualitzar els senyals del cromosoma 21 (barreja A) o del cromosoma 15 (barreja B).
- Filtre U-MNG: capta emissions taronges (Spectrum Gold o Spectrum Orange de Vysis, que s'exciten a uns 530 nm i emeten llum de longitud d'ona a uns 555 nm). Permet visualitzar els senyals del cromosoma 22 (barreja A) i del cromosoma 1 (barreja B).
- Filtre U-MWIY: capta emissions vermelles (Spectrum Red de Vysis). Amb aquest filtre es visualitzen els senyals del cromosoma 13 (barreja A).
- Filtre Aqua: serveix per visualitzar les emissions del fluorocrom Spectrum Aqua de Vysis (s'excita a uns 433 nm i emet llum de longitud d'ona d'uns 480 nm). El Spectrum Aqua marca les sondes del cromosoma 16 (barreja A), del cromosoma 17 i del cromosoma X (barreja B).
- Filtre Blue: capta emissions blaves (Spectrum Blue de Vysis, que s'excita a uns 375 nm i emet llum a uns 423 nm) i permet visualitzar els senyals del cromosoma 18 (barreja A)
- Filtre U-MNU. filtre per captar emissions blaves (DAPI). Serveix per localitzar el complement cromosòmic després de la hibridació amb la barreja B o C.

- Filtre U-M61001: permet visualitzar l'Spectrum Green, l'Spectrum Orange i l'Spectrum Aqua al mateix temps. Serveix per localitzar el complement cromosòmic després de la hibridació amb la barreja A (no es pot contratenyir amb DAPI perquè emmascara els senyals de l'Spectrum Blue).

3.3.2.8. Rentats postvisualització

Per a la hibridació seqüencial de les diferents barreges de sondes, després de la visualització i captura dels corresponents senyals, els portaobjectes es posen sota l'aixeta i es deixa lliscar l'aigua per la superfície del portaobjectes fins a fer caure el cobreobjectes. Llavors els portaobjectes es deshidraten en una sèrie d'etanols i quan estan secs se'ls aplica la següent barreja de sondes tal com s'ha explicat anteriorment.

3.3.2.9. Criteris d'anàlisi

Totes les sondes utilitzades en les barreges esmentades (barreja A, barreja B i les diferents barreges C) són testades prèviament en nuclis interfàsics i metafases de limfòcits de sang perifèrica utilitzant les mateixes condicions d'hibridació que en el cas de les MIIs.

En les MIIs, generalment les sondes centromèriques donen un senyal gran o dos senyals de mides més petites (cada un la meitat d'un senyal gran) corresponents a les dues cromàtides de cada cromosoma homòleg. És important destacar que la sonda CEP del cromosoma 1 dona uns senyals més grans perquè la sonda és complementària a la regió d'heterocromatina d'aquest cromosoma que és una regió molt gran.

Les sondes locus específiques i telomèriques hibriden en regions intersticials o terminals dels cromosomes, on les cromàtides estan més separades i, per tant, en un cas de normalitat (presència d'un cromosoma homòleg amb dues cromàtides en la MII), generalment s'observen dos senyals més o menys separats, de mides equivalents (Figura 3.7). De vegades, però, les senyals LSI de les dues cromàtides poden estar superporposades (Munné *et al.* 1995b). En aquests casos, la imatge DAPI prèvia a la hibridació ens ajudarà en la interpretació dels resultats (vegeu la Figura 4.3 de Resultats).

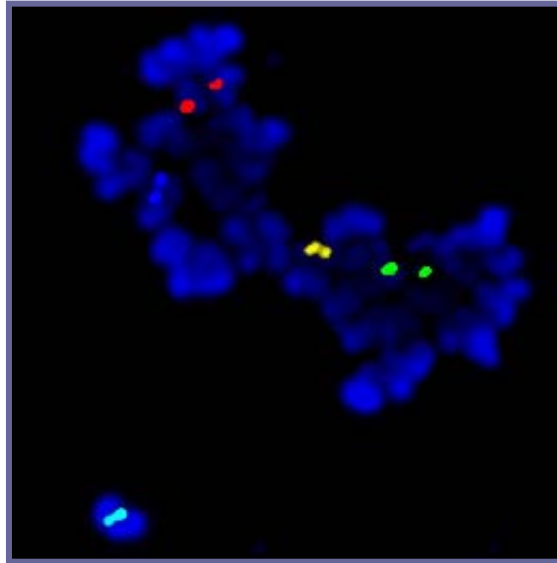


Figura 3.7. Hibridació de la barreja A en una MII amb una dotació euploide per als cromosomes inclosos en aquesta barreja.

La presència de senyals de més es considera sempre com a aneuploidia. L'absència de senyals només es considera una aneuploidia quan s'acompanya del guany de material complementari en l'1CP corresponent analitzat amb CGH.

Cal anar amb compte amb els senyals Aqua de la barreja A, ja que amb el filtre Aqua podem veure els senyals tant de sondes marcades amb Spectrum Aqua com les marcades amb Spectrum Blue. Per tant, si després de la hibridació de la barreja A veiem quatre senyals aqua això no necessàriament ha de voler dir que hi ha quatre cromàtides del cromosoma 16 (marcat amb Spectrum Aqua). Si dos d'aquests senyals apareixen també amb el filtre Blue, aquests es consideren senyals Blue i, per tant, corresponen al cromosoma 18 (marcat amb Spectrum Blue).

Quan els oòcits provenen d'una fallada de fertilització (sobretot després d'una fecundació in vitro però també després de la injecció intracitoplasmàtica) de vegades s'observen nuclis d'espermatozoide o complements cromosòmics d'espermatozoide. Els cromosomes d'espermatozoide es diferencien fàcilment dels cromosomes de les MII perquè són cromosomes molt més llargs, estesos i amb una sola cromàtida (contingut haploide). En canvi, els cromosomes de la MII són molt més curts, menys estirats en ziga zaga i sovint

apareixen amb les dues cromàtides parcialment separades. Els complements masculins s'exclouen de l'anàlisi.

3.3.3. *Spectral Karyotyping* (SKY) en extensions cromosòmiques de MIIs d'oòcits

L'*Spectral Karyotyping* (SKY) és una tècnica que es basa en la hibridació d'un seguit de sondes de pintat cromosòmic. Les sondes tindran colors específics i únics per a cada parell de cromosomes homòlegs i, per tant, en permetran la identificació (Schröck *et al.* 1996).

El protocol d'SKY utilitzat és el descrit prèviament per identificar aneuploidies en oòcits (Márquez *et al.* 1998) però amb certes modificacions que es detallen a continuació.

3.3.3.1. Fixació de les MIIs d'oòcits i tractaments previs a la hibridació

La digestió de la zona pel·lúcida i la fixació de les MIIs es fa seguint el protocol indicat anteriorment. Com que l'SKY es basa en la hibridació de sondes de pintat cromosòmic, només les extensions que presentin els cromosomes prou separats i sense superposicions podran ser analitzades d'una manera fiable amb aquesta tècnica.

Un cop fixats, els complements cromosòmics s'observen amb el microscopi de contrast de fases amb l'objectiu de 20x a fi d'avaluar la qualitat de l'extensió així com la presència de restes de citoplasma. El citoplasma s'elimina amb un tractament de pepsina i la mostra es torna a fixar amb formaldehid tal com s'ha explicat anteriorment. Llavors es pot procedir immediatament amb la hibridació o desar les preparacions a -20°C.

3.3.3.2. Hibridació *in situ* fluorescent

La sonda SKY es barreja bé i s'alíquota un volum determinat en un tub eppendorf (1 µl de sonda per cada porta que es vulgui hibridar). La sonda es desnatura en un bany a 80°C durant 7 minuts i llavors es deixa prehibridant 1 hora en un bany a 37°C. Per desnaturar els portaobjectes (un màxim de 4 per cada *coplin*), aquests s'han d'introduir en solució de desnaturalització (70% formamida/2xSSC) durant 1 minut a 70°C. Els portaobjectes es deshidraten a continuació en una sèrie d'etanols freds i es deixen assecar. Un cop el portaobjectes està sec i la sonda a punt, un microlitre de sonda s'aplica sobre un cobreobjectes tallat en quadrats de 8x8 mm. Es posa el cobreobjectes sobre la zona encerclada del portaobjectes on és el complement cromosòmic i se segella amb cola.

La hibridació té lloc en la foscor, en una cambra humida a 37°C durant un mínim de 36 hores.

3.3.3.3. Rentats posthibridació i detecció

Un cop finalitzada la hibridació, amb molt de compte s'enretira la cola i el cobreobjectes del portaobjectes en condicions de foscor. A continuació, es fan alguns rentats per eliminar unions inespecífiques i sondes o nucleòtids no hibridats i es produeix la detecció de la biotina i la digoxigenina mitjançant anticossos marcats fluorescentment. Es fa un rentat de 4 minuts a 72°C en solució de rentat 1 i de 2 minuts a 45°C en solució de rentat 2. Sense deixar que el portaobjectes s'assequi, s'aplica sobre la regió hibridada un rectangle de parafilm (d'uns 24x40 mm) amb 60 µl de *Cy5 staining reagent*. El portaobjectes s'incuba en una cambra humida a 37°C durant 45 minuts. S'enretira amb compte el parafilm i es fan tres rentats a 45°C de tres minuts cadascun en solució nova de rentat 2. A continuació, sense deixar que el portaobjectes s'assequi, es posa sobre la regió hibridada un altre rectangle de parafilm amb 60 µl de *Cy5.5 staining reagent*. De nou s'incuba el portaobjectes en una cambra humida a 37°C durant 45 minuts. S'enretira amb compte el parafilm i es fan tres rentats més a 45°C de tres minuts en solució nova de rentat 2. Finalment els portaobjectes es renten breument en aigua i es deixen assecar.

La contratinció de la cromatina es fa amb 6 µl d'*Anti-Fade-Dapi Reagent* en un cobreobjectes de 20x20 mm.

3.3.3.4. Observació i captura

El complement cromosòmic de les MIIs s'observa amb un microscopi d'epifluorescència Olympus BX 60. L'excitació dels cinc fluorocroms es fa gràcies a una bombeta de xenó de 150 W i un filtre de triple banda dissenyat específicament per analitzar SKY (SKY-1, Chroma Technology). El filtre U-MNU serveix per visualitzar la contratinció DAPI. Per a la captura s'utilitza l'equipament *SKYVision spectral imagine system* (Applied Spectral Imaging), que està acoblat al microscopi de fluorescència. La llum emesa simultàniament pels cinc fluorocroms és filtrada per un interferòmetre (SpectraCube® SD-200, també acoblat al microscopi de fluorescència) que envia les dades a una càmera CCD. El programa *SKYVision spectral karyotyping* crea una imatge RGB a partir dels diferents rangs d'espectres emesos pels fluorocroms (Figura 3.8). Així, emissions en l'espectre pròxim a l'infraroig

seran transformades en color vermell, les emissions d'espectre vermell passaran a verd i, finalment, les emissions d'espectre verd seran de color blau en la imatge RGB.

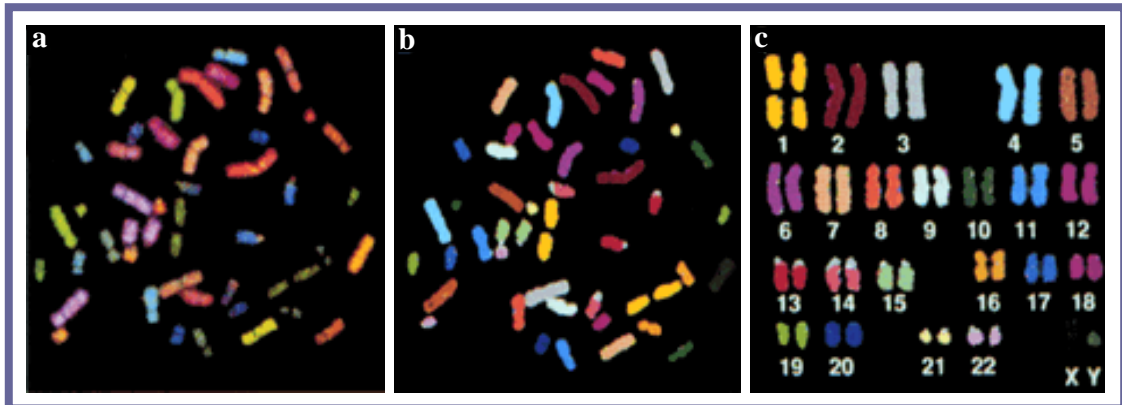


Figura 3.8. *Spectral Karyotyping* d'un limfòcit d'un individu control. (a) Imatge RGB obtinguda a partir dels espectres d'emissió de les diferents combinacions de fluorocroms. (b) *Pseudocolors* assignats als 24 parells de cromosomes homòlegs. (c) Cariotip dels cromosomes en funció del seu color assignat.

La funció de l'interferòmetre és mesurar l'espectre de cada píxel de la imatge i ser capaç de discriminar dos cromosomes d'espectres similars (Figura 3.9). Llavors el programa assigna un nou color artificial (*pseudocolor*) als cromosomes per poder distingir-los de la resta i fer el cariotipatge més fàcil.

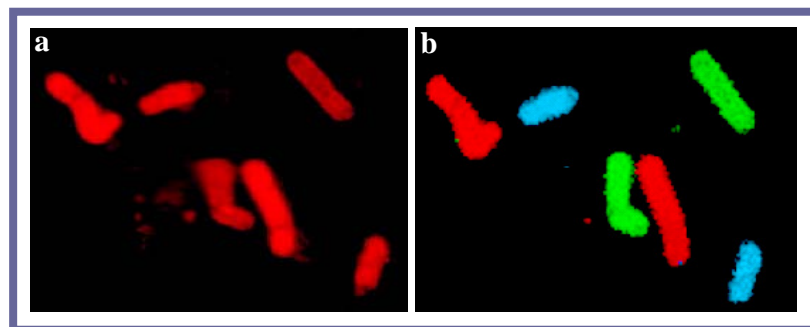


Figura 3.9. Solapament d'espectres entre tres homòlegs diferents. (a) Encara que per a l'ull humà aquests cromosomes poden semblar del mateix color a la imatge RGB (tenen espectres d'emissió solapats), diferències subtils (fins a 15 nm) entre les longituds d'ona poden ser detectades per l'interferòmetre (SpectraCube®). (b) Les característiques espectrals mesurades per l'interferòmetre permeten al programa diferenciar els cromosomes i assignar-los un nou color, aquest cop únic i fàcilment diferenciable dels altres.

3.3.4. CenM-FISH en extensions cromosòmiques de MIIs d'oòcits

El cenM-FISH és una tècnica que, igual que la M-FISH i l'SKY, permet identificar els cromosomes mitjançant 24 colors diferents però emprant sondes centromèriques. En aquest cas les sondes també es marquen amb una combinació d'un a quatre dels cinc fluorocroms disponibles (Taula 3.4) i a diferència de l'SKY, s'utilitzen diversos filtres per excitar els diferents fluorocroms i s'obtenen diferents imatges que després se superposen.

El protocol utilitzat és el descrit per Nietzel *et al.* (2001), amb algunes modificacions que es detallen a continuació.

Taula 3.4. Marcatge de les diferents sondes centromèriques utilitzades en cenM-FISH

Cromosoma	Spectrum Red	Spectrum Orange	Spectrum Green	Diethyl-amino coumarin	Byotin-Cyanine 5
1		Orange	Green		
2			Green		
3		Orange	Green		Cyanine 5
4	Red				
5	Red			Cyanine 5	Cyanine 5
6	Red	Orange		Cyanine 5	Cyanine 5
7	Red	Orange	Green		
8		Orange	Green	Cyanine 5	
9	Red		Green	Cyanine 5	
10	Red	Orange			Cyanine 5
11		Orange		Cyanine 5	Cyanine 5
12	Red				Cyanine 5
13/21			Green	Cyanine 5	
14					Cyanine 5
15			Green	Cyanine 5	Cyanine 5
16	Red	Orange			
17		Orange		Cyanine 5	
18	Red			Cyanine 5	
19				Cyanine 5	
20	Red		Green		
22		Orange			Cyanine 5
X				Cyanine 5	Cyanine 5
Y			Green		Cyanine 5

3.3.4.1. Fixació de les MIIs d'oòcits i tractaments previs a la hibridació

La digestió de la zona pel·lúcida, la fixació de les MIIs, el control sota el microscopi de contrast i la captura del DAPI previ es fan seguint el protocol descrit anteriorment. De la mateixa manera que en el cas de l'SKY només les extensions que presentin els cromosomes prou separats i sense superposicions podran ser analitzades d'una manera fiable amb aquesta tècnica.

3.3.4.2. Preparació de les sondes

Les sondes no són comercials però es poden demanar per fer-ne ús en recerca al Dr. M. Rocchi (<http://www.biologia.uniba.it/rmc/>). La seqüència centromèrica se separa del plàsmid que la conté i s'amplifica mitjançant DOP-PCR utilitzant un protocol prèviament descrit (Senger *et al.* 1998). A continuació es barreja el DNA centromèric d'aquells cromosomes que comparteixen un color (Spectrum Red, Spectrum Orange, Spectrum Green, Diethyl-amino coumarin i Biotina-Cy5) i es fan les cinc reaccions de marcatge amb DOP-PCR. A continuació es barregen les cinc reaccions de marcatge, s'aliquoten i es barregen amb 2 µg de Cot-1-DNA i 25 µg de t-RNA. Aquesta barreja es precipita amb 0,1 volums d'acetat sòdic (NaAc) 3 M (pH 5,5) i 2,5 volums d'etanol absolut un mínim d'una hora a -80°C. Llavors se centrifuga i es deixa assecar el botó de DNA, que es manté a -20°C en la foscor fins al moment de la seva utilització.

3.3.4.3. Hibridació *in situ* fluorescent

El botó es resuspèn en 10 µl de solució d'hibridació i es desnatura 5 minuts en un bany a 75°C. A continuació la sonda es deixa prehibridar 10 minuts a 37°C.

Per desnaturalitzar els portaobjectes (un màxim de 4 per cada *coplin*), aquests s'han d'introduir en solució de desnaturalització (70% formamida/2xSSC) durant 1 minut a 70°C. Els portaobjectes a continuació es deshidraten en una sèrie d'etanols freds i es deixen assecar. Un cop el portaobjectes està sec i la sonda a punt, aproximadament 1 µl de sonda s'aplica sobre un cobreobjectes tallat en quadrats de 8x8 mm. Es posa el cobreobjectes sobre la zona encerclada del portaobjectes on és el complement cromosòmic i se segella amb cola. La hibridació té lloc en la foscor, en una cambra humida a 37°C durant tota la nit.

3.3.4.4. Rentats posthibridació i detecció

Un cop finalitzada la hibridació, amb molt de compte s'enretira la cola i el cobreobjectes del portaobjectes en condicions de foscor. Es fan tres rentats de 10 minuts cadascun en la solució de rentat A a 45°C. Llavors es fa un altre rentat de 10 minuts en la solució de rentat B també a 45°C i, finalment, els portaobjectes es renten 5 minuts a 45°C en la solució de rentat C. Sense deixar que el portaobjectes s'assequi, s'aplica sobre la regió hibridada un rectangle de parafilm (d'uns 24x40 mm) amb 80 µl de la solució anti-Biotin Cy5 que servirà per detectar la biotina. El portaobjectes s'incuba en una cambra humida a 37°C durant 40 minuts. S'enretira el parafilm amb compte i es fa un rentat de 10 minuts a temperatura ambient en la solució de rentat C i, finalment, els portaobjectes es renten breument en aigua destil·lada i es deixen assecar. La contratinció de la cromatina es fa amb 6 µl de solució DAPI en un cobreobjectes de 20x20 mm.

3.3.4.5. Observació i captura

L'observació i la captura de les MIIs s'han fet en un microscopi Olympus BX60 d'epifluorescència connectat a una càmera CCD d'alta sensibilitat acoblada a un Power Macintosh G3 amb el programa *SmartCapture*. L'anàlisi i cariotipatge es poden fer amb un programa per analitzar M-FISH (SpectraVysion, Vysis) (Figura 3.10).

El microscopi està equipat amb filtres que permeten excitar i captar la llum emesa pels fluorocroms utilitzats, és a dir:

- Filtre U-MNIBA: capta emissions verdes (Spectrum Green).
- Filtre U-MNG: capta emissions taronges (Spectrum Orange).
- Filtre U-MWIY: capta emissions vermelles (Spectrum Red).
- Filtre Aqua: serveix per visualitzar les emissions del fluorocrom Diethyl-amino coumarin de Applied Biosystems (Warrington, UK) que s'excita a uns 436 nm i emet llum de longitud d'ona d'uns 480 nm.
- Filtre Far Red: capta emissions del fluorocrom Cy5 que s'excita a uns 640 nm i emet llum a prop de l'infraroig (llum no visible, a uns 680 nm).
- Filtre U-MNU: filtre per captar emissions blaves (DAPI).

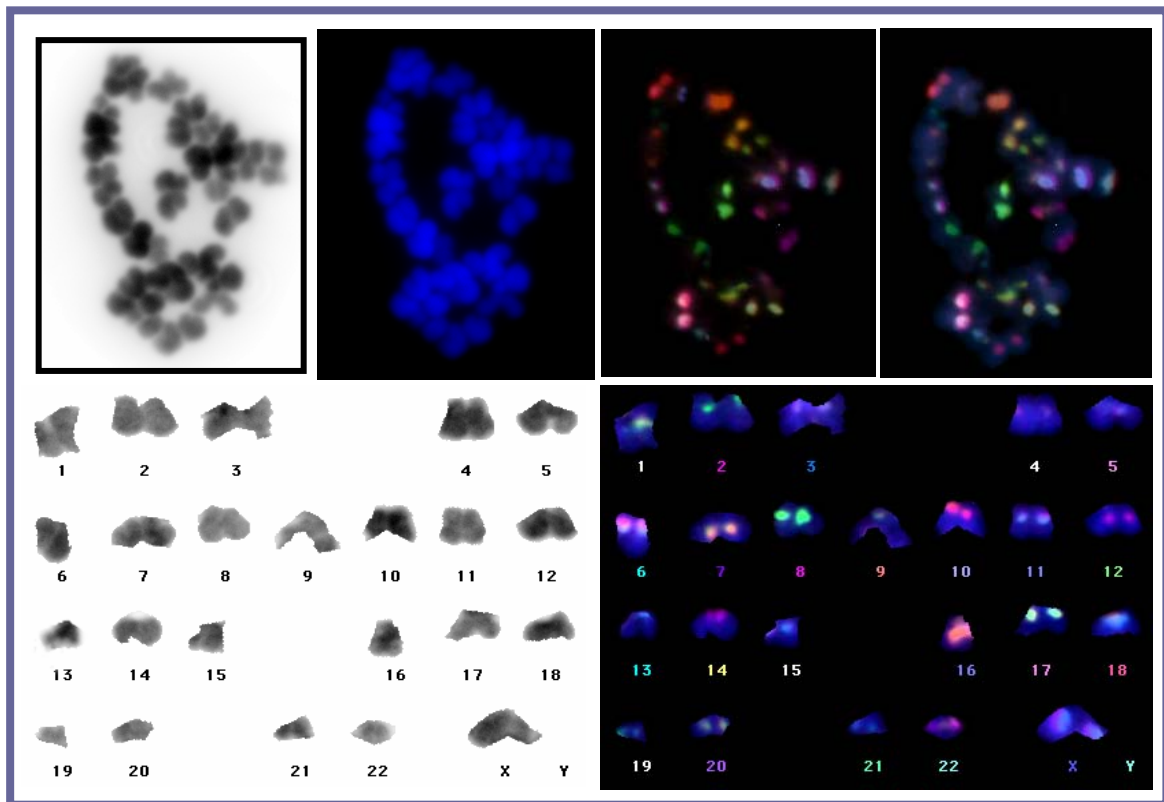


Figura 3.10. Captura i anàlisi del cenM-FISH d'una MII 23, X

3.3.5. Anàlisi estadística

Les determinacions de la significància de la incidència d'aneuploidies en els dos grups d'edat i en els grups d'oòcits de diferents orígens va ser fet amb el test de chi-quadrat. La comparació de freqüències d'aneuploidia entre els cromosomes grans i els petits es va fer també mitjançant el test de chi-quadrat, utilitzant el programa SPSS versió 12.5.

3.3.6. PGD en primer corpuscle polar mitjançant CGH

El PGD requereix una estreta col·laboració i coordinació amb el centre de reproducció assistida on es fa el cicle de fecundació in vitro a la pacient. La pacient se sotmet a un protocol d'estimulació hormonal determinat i establert pel centre en funció de les seves característiques. Això permet obtenir un nombre suficient d'oòcits per analitzar i tenir més probabilitats de trobar algun oòcit normal que, un cop fecundat, pugui ser transferit a l'úter matern.

Un cop s'ha fet l'estimulació fol·licular s'administra l'hCG (gonadotropina coriònica humana) per induir la maduració *in vivo* dels oòcits (extrusió del primer corpuscle polar). Aproximadament al cap de 34 hores, en el dia 0 (D+0), es fa la punció fol·licular mitjançant aspiració transvaginal guiada per ecografia i els oòcits es recullen en un medi especial. Els oòcits llavors es deixen en un incubador amb unes condicions determinades d'humitat, proporcions de gasos i temperatura (95% humitat; 5% O₂, 5% CO₂ i 90% N₂; 37°C). Dues o tres hores després de la punció, els oòcits són deanudats retirant les cèl·lules de la granulosa mitjançant un tractament amb hialuronidasa. En aquest moment, els oòcits es numeren i se situen en plaques en una gota individual de medi. Llavors es fa la inseminació mitjançant injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI). Seguint un protocol prèviament descrit (Durban *et al.* 2001), la biòpsia de l'1CP té lloc immediatament després de l'ICSI per evitar oscil·lacions en el pH o en la temperatura del medi (Figura 3.11). L'obertura en la zona pellúcida es pot fer mitjançant un mètode mecànic (PZD) o mitjançant un làser (1.48 µm non contact diode laser; Fertilase, Medical Technologies, Montreux, Switzerland). La pipeta de biòpsia ha de ser prou ampla per deixar passar l'1CP (diàmetre 20-30 µm).

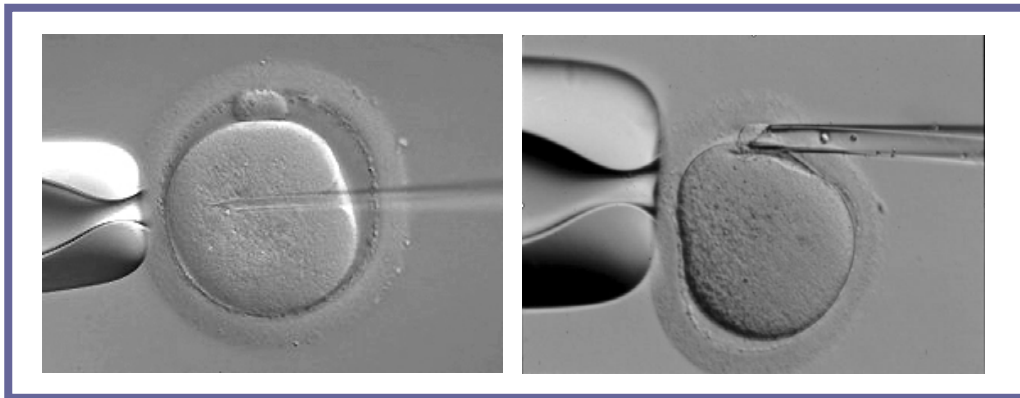


Figura 3.11. (a) Injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide (ICSI) en un oòcit madur amb el primer corpuscle polar (1CP) situat a les 12. (b) Biòpsia de l'1CP.

Un cop biopsiat l'1CP, aquest es deixa apartat de la MII en una regió concreta de la gota per localitzar-lo fàcilment. L'1CP s'agafa amb una pipeta especial (pipeta Drummond) i es transfereix a una placa de Petri nova, on s'han preparat prèviament les gotes de solució d'aïllament on es renten. Immediatament després la MII es transfereix a una gota de 50 µl de medi de cultiu tamponat per a embrions de tipus MOPS (Vitrolife, Göteborg) i la placa es deixa a l'incubador. A continuació es fan els rentats de l'1CP en condicions d'esterilitat i

finalment aquest es transfereix a un tub de 0,2 ml. L'etapa de lisi i CGH es du a terme tal com s'ha descrit anteriorment.

La durada del procediment complet, des del moment de la lisi dels 1CPs fins a posar en marxa la hibridació és d'unes 14 o 15 hores en funció del nombre de 1CPs i tenint en compte que els controls de la CGH es preparen durant la setmana prèvia al cas clínic (Figura 3.12).

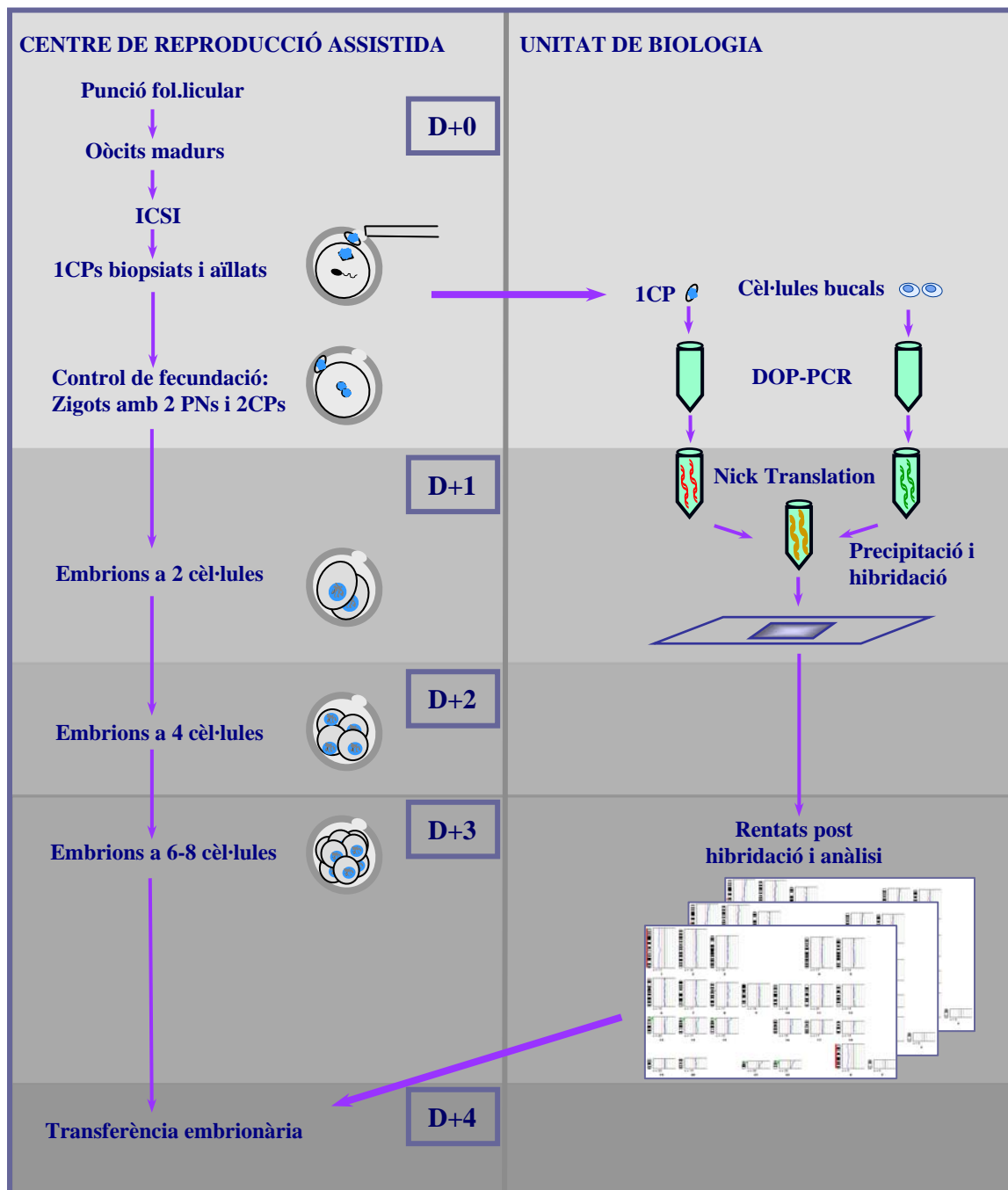


Figura 3.12. Protocol del diagnòstic genètic preimplantacional en primer corpuscle polar mitjançant CGH

El temps d'hibridació per a un cas clínic dependrà del nombre de 1CPs que s'hagin d'analitzar però ha de ser d'una hora en microones a 75 W de potència i un mínim de 36 hores a l'estufa a 37°C. El dia +3 al matí es fan els rentats posthibridació i s'analitzen els 1CPs. L'anàlisi de la CGH de cada 1CP comporta escollir i capturar 10 metafases, cariotipar-les i interpretar dels perfils de CGH obtinguts. Considerant que la durada aproximada d'aquest procediment és de dues hores per cada 1CP, els resultats del cas poden donar-se cap a finals del dia +3 o el dia +4 en funció del nombre de 1CPs que s'hagin d'analitzar. Cal començar primer a analitzar els 1CPs dels oòcits que van ser correctament fecundats el dia +0 (presentaven dos pronuclis i un segon corpuscle polar al final del dia) i, a part, que els embrions originats a partir d'ells estiguin en estadi de 5-8 cèl.lules el dia +3 (que no mostrin signes d'aturada en la seva divisió o de degeneració).

RESULTATS

4.1. Reliability of Comparative Genomic Hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes

C. Gutiérrez-Mateo, D. Wells, J. Benet, JF. Sánchez-García, MG. Bermúdez, I. Belil, J. Egozcue, S. Munné and J. Navarro

Human Reproduction 2004; 19:2118-2125

Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes

Cristina Gutiérrez-Mateo^{1,4}, Dagan Wells², Jordi Benet¹, Jorge F.Sánchez-García¹, Mercedes G.Bermúdez², Itziar Belil³, Josep Egozcue¹, Santiago Munné² and Joaquina Navarro¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain, ²The Institute for Reproductive Medicine and Science, St Barnabas Medical Center, 101 Old Short Hills Road, Suite 501, West Orange, NJ 07052, USA and ³Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Pg. Bonanova 89-91, E-08017, Barcelona, Spain

⁴To whom correspondence should be addressed at: Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Tel: +34 935811175; Fax: + 34 935811025; E-mail: cristina.gutierrez@uab.es; joaquina.navarro@uab.es

BACKGROUND: Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) using FISH to analyze up to nine chromosomes to discard chromosomally abnormal embryos has resulted in an increase of pregnancy rates in certain groups of patients. However, the number of chromosomes that can be analyzed is a clear limitation. We evaluate the reliability of using comparative genomic hybridization (CGH) to detect the whole set of chromosomes, as an alternative to PGD using FISH. **METHODS and RESULTS:** We have analysed by CGH both, first polar bodies (1PBs) and metaphase II (MII) oocytes from 30 oocytes donated by 24 women. The aneuploidy rate was 48%. Considering two maternal age groups, a higher number of chromosome abnormalities were detected in the older group of oocytes (23% versus 75%, $P < 0.02$). About 33% of the 1PB-MII oocyte doublets diagnosed as aneuploid by CGH would have been misdiagnosed as normal if FISH with nine chromosome probes had been used. **CONCLUSION:** We demonstrate the reliability of 1PB analysis by CGH, to detect almost any chromosome abnormality in oocytes as well as unbalanced segregations of maternal translocations in a time frame compatible with regular *in vitro* fertilization (IVF). The selection of euploid oocytes could help to increase implantation and pregnancy rates of patients undergoing IVF treatment.

Key words: aneuploidy/comparative genomic hybridization/first polar body/oocyte/preimplantation genetic diagnosis

Introduction

Implantation and pregnancy rates decrease with maternal age. Some authors have suggested that uterine factors could explain this decline in fertility (Meldrum, 1993) but high pregnancy and low miscarriage rates have been found in post-menopausal women after IVF cycles with donated oocytes (Abdalla *et al.*, 1993). The only clear link observed between maternal age and embryo competence is chromosome abnormality (Navot *et al.*, 1991; Munné *et al.*, 1995a; Dailey *et al.*, 1996; Nicolaidis and Petersen, 1998; Márquez *et al.*, 2000; Sandalinas *et al.*, 2001; Pellestor *et al.*, 2003). The increase in aneuploidy with maternal age leads to an increased risk of producing aneuploid offspring (involving mainly chromosomes 13, 18, 21, X and Y), an increased risk of spontaneous abortion (frequently involving chromosomes 15, 16, 22 and X) and a decrease in implantation rates. Some evidence suggests that there is a negative selection against chromosomal abnormalities during the first stages of

embryonic development (Boué *et al.*, 1985). This early embryonic wastage is thought to be one of the main factors which contribute to the low fertility rate in humans (Bahçe *et al.*, 1999; Sandalinas *et al.*, 2001).

Several strategies have been used to discard chromosomally abnormal embryos, such as selection of embryos based on their ability to grow to the blastocyst stage (Menezo *et al.*, 1992), as well as morphological criteria (Plachot *et al.*, 1990). However, about 37% of trisomic embryos reach the blastocyst stage and 70% of morphologically normal embryos are, in fact, aneuploid (Iwarsson *et al.*, 1999; Sandalinas *et al.*, 2001).

Currently, a reliable identification of chromosomally abnormal embryos can only be achieved by preimplantation genetic diagnosis (PGD) using either polar body or blastomere analysis, in biopsies performed on day 0 or day + 3 after fertilization, respectively (Verlinsky *et al.*, 1990; Munné *et al.*, 1993; Munné *et al.*, 1995b; Durban *et al.*, 2001).

The technique most widely used for this purpose has been fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Using FISH to allow identification and preferential transfer of embryos with normal numbers of the chromosomes assessed, has led to a reduction in spontaneous abortions and an increase in implantation and pregnancy rates for several groups of IVF patients: advanced maternal age and women with a history of recurrent miscarriages. (Gianaroli *et al.*, 1999; Munné *et al.*, 1999, 2003). However, PGD using FISH has several limitations; the most important of which is the number of chromosomes that can be analyzed simultaneously. Although the current panel of nine probes used in our laboratories covers the most frequent abnormalities detected in cleavage-stage embryos and oocytes (Pujol *et al.*, 2003; Munné *et al.*, 2004), some studies indicated that 25–30% of chromosomal abnormalities would remain undetected using FISH with nine chromosome-specific probes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y), leading to the transfer of aneuploid embryos incorrectly diagnosed as normal (Boué *et al.*, 1985; Voullaire *et al.*, 2002). Current FISH protocols have used probes for up to 13 chromosomes (Abdelhadi *et al.*, 2003) but this represents only half of the whole karyotype and accuracy per probe is reduced when large numbers of probes are combined.

Comparative genomic hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic technique that allows the analysis of the full set of chromosomes (Kallioniemi *et al.*, 1992) and it has been applied to detect aneuploidy in single cells (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999). The more extensive analysis of the karyotype provided by CGH allows replacement of only chromosomally normal embryos, which are those most likely to establish a successful pregnancy. This also could lead to the transfer of fewer embryos and consequently reduce multiple pregnancies, which is one concern derived from assisted reproductive technology. As CGH is a labour intensive technique that requires as many as 4 days to obtain results, two different strategies have been proposed to apply CGH to PGD. The first one was the use of CGH in PGD by blastomere analysis (Voullaire *et al.*, 2002). In this case, embryo freezing was required to provide time enough to perform the CGH analysis. Although this approach has recently shown higher implantation and pregnancy rates than FISH, it produced considerable controversy, because 46% of the embryos did not survive the freezing–thawing process (Hill, 2003; Munné and Wells, 2003; Verlinsky and Kuliev, 2003; Wilton *et al.*, 2003a,b). The second strategy was to perform CGH for PGD by first polar body analysis (Wells *et al.*, 2002). Since polar body biopsy is performed on the same day as fertilization by intracytoplasmic sperm injection, CGH analysis was compatible with embryo replacement on day + 4, without embryo freezing.

In female meiosis I, a set of chromosomes, with two chromatids each, segregate to the first polar body (1PB) while the oocyte in metaphase II (MII) retains the reciprocal chromosome complement. Since the 1PB is thought to have no biological role once it has been extruded, the analysis of 1PBs allows the indirect characterization of the chromosome constitution of the MII oocyte (Gitlin, 2003). This means that if a segregation error occurs during this first meiotic division,

and for instance, an extra chromosome is present in the MII oocyte, then the 1PB will show the complementary loss. Most embryo aneuploidies as well as most first trimester aneuploidies were classified as originating in female meiosis I (Nicolaidis and Petersen, 1998; Hassold and Hunt, 2001). However, FISH analysis results of first and second PBs has indicated that a sizable part of aneuploidy occurs in meiosis II, or at least, at the chromosome level, is expressed in meiosis II (Kuliev *et al.*, 2003). Therefore, the detection of abnormal oocytes through PGD using CGH should be performed in both, first and second PBs, but even biopsing on day 1, there is still enough time for CGH results prior to transfer, and no cryopreservation is needed (Wells *et al.*, 2002).

The aim of this study is to evaluate the limitations, error rate and reliability of CGH prior to its clinical application. To achieve this, a series of 1PB and MII oocyte doublets have been analyzed separately in a blind study and the results have been compared.

Materials and methods

Oocyte and polar body recovery

Immature oocytes discarded from IVF cycles were matured *in vitro* (aged 12–24 h) before being processed. Only those that were considered to be at the metaphase II stage (having extruded the 1PB) were included in this study. The oocytes used were donated by 21 women with normal karyotype aged from 21 to 41 years (mean 33.2) and three translocation carriers (two Robertsonian translocation carriers aged 29 and 35 years and one balanced reciprocal translocation carrier aged 35 years). The material was obtained from the IVF programme of the Institut Universitari Dexeus (Barcelona, Spain) and the Institute for Reproductive Medicine and Science at Saint Barnabas Medical Center (West Orange, New Jersey, NJ) in accordance with guidelines set by the internal review board of these centres. Written informed consent was obtained from all patients.

1PB and MII oocyte isolation and lysis

The zona pellucida was removed using acid Tyrode's. After that, MII-oocytes and their 1PBs were isolated and washed in three PBS/0.1% polyvinyl alcohol (PVA) droplets. The single cells were transferred to individual PCR tubes and the presence of the single cell inside the tube was ascertained, although this was not always possible with polar bodies. The tubes were coded and randomized so that the CGH analysis was conducted blindly. Finally, 1 µl of sodium dodecyl sulphate (SDS, 17 µM) and 2 µl of proteinase K (125 µg/ml) were added and the sample was overlaid with light mineral oil. The lysis was performed by incubating at 37°C for 1 h followed by 10 min at 95°C to inactivate proteinase K.

Whole genome amplification

Single cell DNA was amplified using degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) as previously described (Wells *et al.*, 2002) with some modifications. In brief, each PCR tube contained 1 × buffer, 2 µM DOP primer (CCGACTCGAGNNNNNNAT-GTGG), 0.2 mM dNTPs and 2.5 U of SuperTaq Plus polymerase (Ambion, Austin, TX) in a final volume of 50 µl. The sample was spun and heated to 94°C for 4.5 min; 8 cycles of 95°C for 30 s, 30°C for 1.5 min and 72°C for 3 min; 40 cycles of 95°C for 30 sec, 56°C for 1 min and 72°C for 3 min with a final extension step of 72°C for 8 min. The PCR program was carried out in a Tgradient thermocycler

(Biometra, Goettingen, Germany) or alternatively in a 9700 PE thermocycler (Applied Biosystems, Norwalk, USA).

Stringent precautions against contamination were taken. Negative controls were included in each experiment to test the reaction solutions and the phosphate-buffered saline used for washing the single cells in the isolation step. The negative controls were subjected to the entire procedure. No DNA and no hybridization signal should be present after the DOP-PCR and the CGH experiment, respectively.

Genomic DNA extracted from peripheral blood diluted to 100 pg/ μ l or isolated and lysed single buccal cells, both from a normal female were also amplified and used as a reference sample in the CGH experiment.

Nick translation and probe preparation

Whole-genome amplification products were fluorescently labelled by Nick Translation (Vysis, Downers-Grove, USA) according to the manufacturer's instructions. 1PB and MII oocyte DNAs (test) were labelled with Spectrum Red-dUTP (Vysis), whereas reference DNA was labelled with Spectrum Green-dUTP (Vysis). The reaction time was adjusted to obtain a probe of a suitable size, and assessed by electrophoresis of 9 μ l of product in a 2% agarose gel. Labelled reference and test DNA were mixed and ethanol precipitated with 10 μ g of Cot-1-DNA. The pellet was dried and redissolved in 10 μ l of hybridization mixture (50% formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulphate, pH 7).

Comparative genomic hybridization

Normal male (46, XY) metaphase spreads (Vysis) were dehydrated through an alcohol series (70%, 85%, and 100% for 2 min each) and air dried. The slides were then denatured in 70% formamide, 2 \times SSC at 73°C for 5 min and taken through a cold alcohol series and air dried. The probes were denatured at 73°C for 10 min and were applied to the slide; a coverslip was placed on top and sealed

with rubber cement. Hybridization was performed in a moist chamber at 37°C for 36–72 h to evaluate the minimal hybridization time to ensure reliable results. After hybridization, the slides were washed at high stringency in 0.4 \times SSC/0.3% NP-40 at 73°C for 2 min, 2 \times SSC/0.1% NP-40 for 2 min and dipped in distilled water before being dehydrated through an alcohol series and air dried. Finally, the slides were mounted in Vectashield (Vector Labs, Peterborough, UK) containing DAPI to counterstain the chromosomes and nuclei.

Microscopy and image analysis

Metaphase preparations were examined using an Olympus BX 60 epifluorescence microscope equipped with a high-sensitivity camera and filters for the fluorochromes used. An average of 10 metaphases per hybridization were captured and analyzed using SmartCapture software and Vysis Quips CGH software, both supplied by Vysis. The average red/green fluorescent ratio for each chromosome was determined by the CGH software. In regions where the DNA sequence copy number of the test is identical to the reference DNA, the CGH profile shows no fluctuation and the ratio is expected to be close to 1.0. Deviations of the ratio below 0.8 (the test DNA is under-represented) or above 1.2 (the test DNA is over-represented) were scored as loss or gain of material in the test sample, respectively. Deviations of the ratio but within the threshold cut-off of 0.8 or 1.2 were also annotated to evaluate the sensitivity of the technique.

Results

In this work a total of 86 single cells, corresponding to 43 1PB-MII oocyte doublets were isolated. A total of 80 out of 86 single cells were successfully amplified by DOP-PCR (93%) showing a smear between 200 and 4000 bp. Only six

Table I. Summary of CGH data from 25 doubles 1PB-MII oocyte from 46. XX women

Doublet 1PB-MII	Age	CGH interpretation 1PB	Artifacts**	CGH interpretation MII	Artifacts**	Reciprocity
1	38	24, X, +21	22	22, X, -21	19	Yes
2	38	23, X	19	23, X	19,22	Yes
3	24	24, XX*	-	22, -X	-	No
4	39	24, X, +3*, -6, +8*	-	21, X, -3*, +6, -8*, -15*	-	No
5	32	23, X	-	23, X	19	Yes
6	25	23, X	-	23, X	-	Yes
7	41	22, X, -7	17, 22	24, X, +7*	19	No
8	41	21, X, -13, -21*	19	25, X, +13*, +21*	-	No
9	37	23, X, +2, -15	19	23, X, -2, +15	-	Yes
10	39	22, X, -2	19	24, X, +2	-	Yes
11	21	23, X	-	23, X	-	Yes
12	21	25, XX, +1	-	21, -X, -1	-	Yes
13	31	23, X	-	23, X	17, 19, 22	Yes
14	30	23, X	19	23, X	-	Yes
15	31	23, X	-	23, X	-	Yes
16	22	23, X	-	23, -X, -20*	-	No
17	34	23, X	17, 22	23, X	17	Yes
18	34	23, X	22	23, X	19, 22	Yes
19	37	24, X, +19*	-	22, X, -19	-	No
20	33	23, X	22	23, X	17, 19, 22	Yes
21	23	23, X	17	23, X	19, 22	Yes
22	39	24, X, +15	-	22, X, -15	22	Yes
23	41	23, X	-	23, X	-	Yes
24	40	23, X	22	23, X	17, 19	Yes
25	40	22, X, -9	-	24, X, +9	-	Yes

The 1PBs and MII karyotypes were based on the interpretation of the CGH profile determined by the CGH software (see materials and methods). 1PB = first polar body; MII = metaphase II oocyte

*Chromosomes showing deviation but within the threshold cut-off of 0.8 or 1.2, such that it would be difficult to conclude loss or gain of these chromosomes, respectively.

**Chromosomes which show enhancement of the test signal, but they are regarded as artifactual and consequently they are excluded from the analysis.

cells failed to give any smear after amplification, suggesting that the cells had been lost during the isolation step or cell lysis had failed. All the MII oocytes amplified gave a smear with a band pattern at 600, 1250 and 1650 bp, whereas these bands were not visible in any 1PB amplification.

CGH results were obtained in 67 single cells (83.8%), 30 1PB-MII oocyte doublets and seven single 1PBs (data not show). Thirteen cells, three 1PB and 10 metaphase II oocytes, failed to give any result because the hybridization intensity of the test DNA was too weak. Out of the 30 matched pairs with adequate hybridization, 25 were donated by 21 normal females (46, XX) while five were donated by two Robertsonian translocation carriers [45, XX, der(13;14)(q10;q10) and 45, XX, der(13;15)(q10;q10)] and one balanced reciprocal translocation carrier [46, XX, t(1;5)(q21.1;p13.1)].

The results of the CGH analysis are given in Table I. Out of 25 1PB-MII oocyte doublets derived from normal females, 12 presented results consistent with aneuploidy in either the MII oocyte, the 1PB, or both (48%). Although most aneuploid doublets had one (seven), or two (four) chromosomes implicated in aneuploidy (Figure 1), we also found one doublet with extensive aneuploidy involving four different chromosomes.

Heterochromatic, telomeric and centromeric regions were not informative and therefore were excluded from the analysis because they usually show a deviation in the CGH pattern. In this study we have also observed artifactual gains of chromosomes 17 (12%), 19 (28%) and 22 (24% of the analyzed cells). Some studies have already reported the difficulty of interpreting the CGH profile of these chromosomes and commonly, when the test signal is enhanced, they are also excluded from the analysis (Moore *et al.*, 1997; Voullaire *et al.*, 2002).

Age-related aneuploidy has also been analyzed. Thirteen 1PB-MII oocyte pairs from women <37 years old (mean 27.8, range 21–34) were examined, three (23%) giving results consistent with aneuploidy. Additionally, 12 1PB-MII oocyte pairs from women \geq 37 years old (mean 39.2, range 37–41) were investigated, with nine (75%) found to be aneuploid. The difference between the aneuploidy rate in these two age-related groups was statistically significant ($P < 0.02$, Fisher's Exact Test).

The highest rate of aneuploidy was found for chromosome 15, followed by chromosome 21, chromosome X and, interestingly, chromosome 2. It has been previously suggested that chromosome 2 may play a more significant role in human reproductive failure than is typical for such a large chromosome (Wells *et al.*, 2002).

The CGH analysis of the doublet 1PB-MII oocyte from the balanced reciprocal translocation carrier 46, XX, t(1;5)(q21.1;p13.1), revealed an adjacent two segregation and consequently, both cells, 1PB and MII oocyte were unbalanced (Figure 2). The four 1PB-MII oocyte doublets from the two Robertsonian translocation carriers [Rob(13;14) and Rob(13;15)] were found to be normal or balanced. No aneuploidy affecting chromosomes not involved in these rearrangements (interchromosome effect, ICE) was found (Table II).

In this study 24/30 (80%) of the CGH results of the 1PBs were confirmed by MII oocyte results. Six 1PB-MII oocyte

doublets analyzed by CGH were found to give results that were not perfectly complementary between the CGH interpretations of the 1PB and the MII oocyte. Although in some cases results were in partial agreement (e.g. doublet four reveals imbalance affecting several chromosomes, but not all of them are detected in both 1PB and MII oocyte). In all six doublets where data was not entirely complementary, a loss was seen in one cell while the other did not display the reciprocal gain, but showed a normal or doubtful CGH profile for the chromosome in question (labeled by an asterisk in Table I).

Discussion

In this work we have studied chromosome abnormalities in 1PB and MII oocytes; a 48% aneuploidy rate was found. The incidence of chromosomal abnormalities varies from 9.4% to 47.5% (average 27.7%) across the studies which have used various approaches such as R-banding techniques (Pellestor, 1991, 2003), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for up to nine chromosomes (Dailey *et al.*, 1996; Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003), spectral karyotyping (SKY; Márquez *et al.*, 1998; Sandalinas *et al.*, 2002) or Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (m-FISH; Clyde *et al.*, 2003). Our high rate of aneuploidy could be attributed to the fact that all the material used was retrieved at MI stage and matured *in vitro*, and this long *in vitro* maturation could produce morphological alterations of the oocyte spindle, increasing the aneuploidy rate of these oocytes (Pickering *et al.*, 1988). In addition, the reported incidence of abnormalities in embryos resulting from fertilization of *in vitro* matured oocytes was significantly higher than that found for *in vitro* matured oocytes (DeScisciolo *et al.*, 2000). However, it has also been described that unbalanced predivision and non-disjunction did not increase significantly with time in culture (Munné *et al.*, 1995b; Boiso *et al.*, 1997). Therefore, the rate of abnormalities presently found could be overestimated but the higher number of chromosomes being analyzed could also explain this high rate of aneuploidy. It is worth emphasizing that if these cells had been analyzed by FISH for nine chromosomes this rate would decrease to 32% because only eight out of 12 aneuploid doublets would have been detected.

The chromosome most involved in aneuploidy was chromosome 15, as suggested by other researchers (Clyde *et al.*, 2003). We also found aneuploidy for chromosomes 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 13, 19, 20 and 21, in contrast with other studies where aneuploidy for chromosomes 1, 2 and 9 were not found (Mahmood *et al.*, 2000; Sandalinas *et al.*, 2002; Cupisti *et al.*, 2003). Unlike the only previous report of CGH conducted on 1PBs (Wells *et al.*, 2002), no relation was found between chromosome size and aneuploidy frequency in this cohort.

Current strategies for the detection of chromosomal abnormalities in oocytes by 1PB analysis are mostly performed using FISH for five (13, 16, 18, 21 and 22) to nine chromosomes (1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 and X), which are the most commonly involved in aneuploidy in spontaneous abortions and live births (Munné *et al.*, 2000; Kuliev

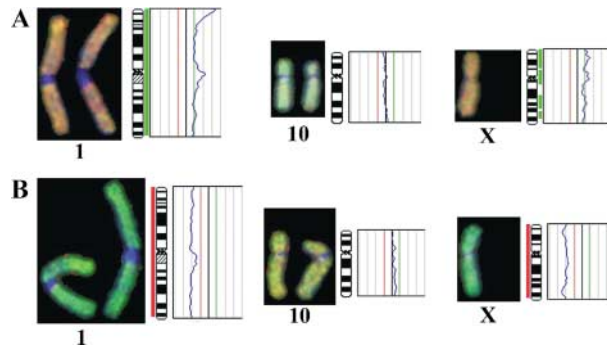


Figure 1. CGH results from doublet 12 (Table I) indicating a double aneuploidy for chromosomes 1 and X. Interestingly, this doublet came from a 21 year old donor. (A) CGH results from the 1PB showing chromosomes 1 and X more red than other chromosomes (e.g. chromosome 10) and deviation of the CGH ratio >1.2 indicating gain. (B) CGH results from the MII oocyte showing the same chromosomes more green and deviation of the CGH ratio to the left (<0.8) indicating the reciprocal loss.

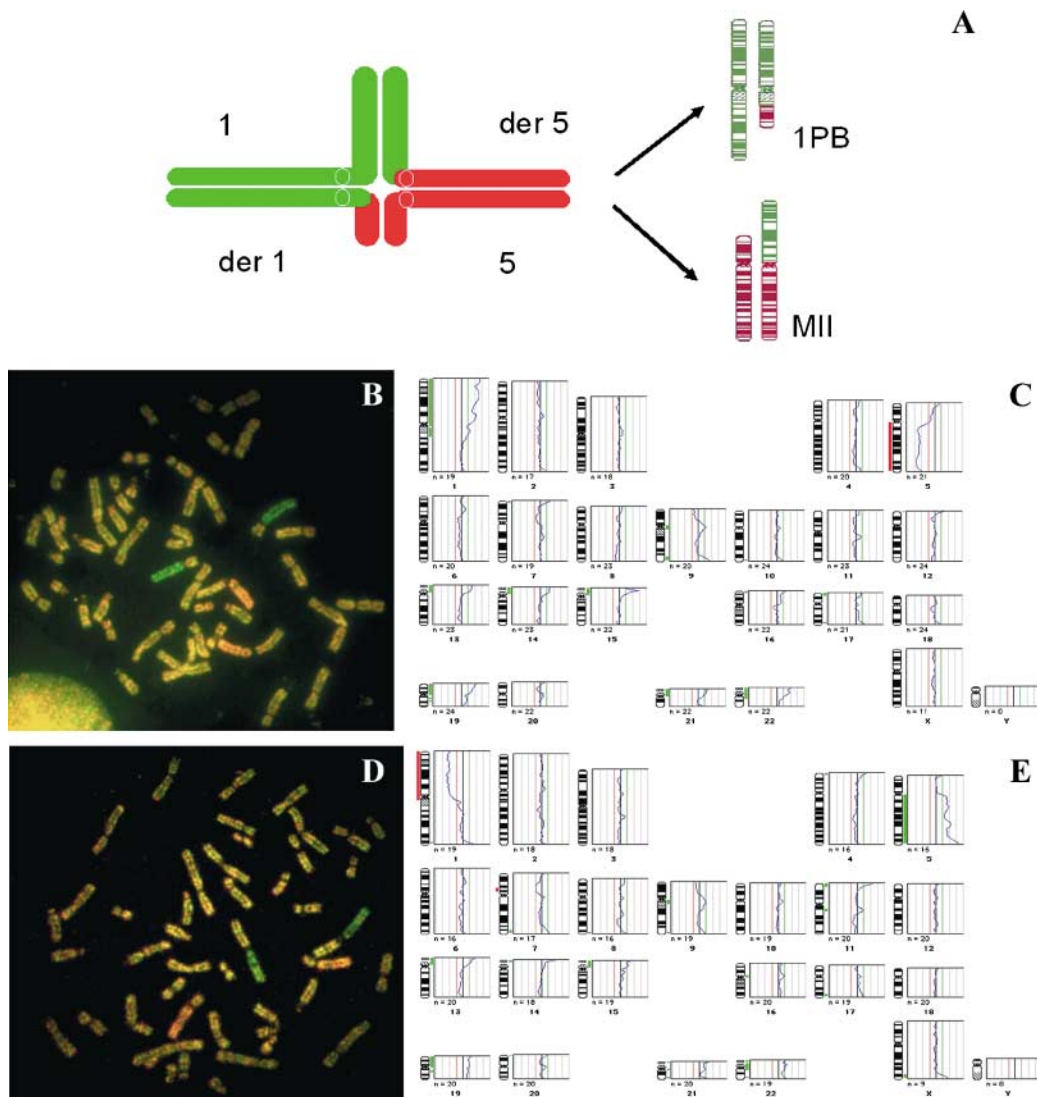


Figure 2. Results of CGH on a doublet 1PB-MII oocyte from a reciprocal translocation carrier 46, XX, t(1;5)(q21.1;p13.1). (A) Quadrivalent formed during prophase I. An adjacent two segregation occurred so that chromosome 1 and the derivative 1 (der 1) segregated to the 1PB while chromosome 5 and the derivative 5 segregated to the MII oocyte. (B) Results from a normal metaphase spread hybridized with amplified normal DNA labelled with Spectrum Green and amplified DNA from the 1PB labelled with Spectrum Red. The short arm of chromosome 1 (1pter-1q21.1) appears relatively more red, while the long arm of chromosome 5 (5p13.1-5qter) appears relatively more green. (C) CGH profile showing the deviation of the region 1pter-1q21.1 to the right (gain) and the region 5p13.1-5qter to the left (loss). (D) Normal metaphase template hybridized with normal female DNA (green) and MII oocyte DNA (red). The region 1pter-1q21.1 appears more green and the region 5p13.1-5qter appears more red. (E) CGH pattern showing an extra region of chromosome 5, reciprocal to that missing in the 1PB, and the short arm of chromosome 1 deviated to the left indicating loss.

Table II. CGH analysis of doublets 1PB-MII oocyte from Robertsonian or reciprocal translocation carriers

Translocation	Doublet 1PB-MII	Age	CGH interpretation 1PB	CGH interpretation MII	Segregation	Reciprocity
t(13;14)(q10;q10)	1	29	23, X or 22, X, +der13;14	22, X, +der13;14 or 23, X	Normal or balanced	Yes
	2	29	23, X or 22, X, +der13;14	22, X, +der13;14 or 23, X	Normal or balanced	Yes
t(13;15)(q10;q10)	3	35	23, X or 22, X, +der13;15	22, X, +der13;15 or 23, X	Normal or balanced	Yes
	4	35	23, X or 22, X, +der13;15	22, X, +der13;15 or 23, X	Normal or balanced	Yes
t(1;5)(q21.1;p13.1)	5	35	23, X, +der1, -5	23, X, -1, +der 5	Adjacent two	Yes

et al., 2003; Pujol *et al.*, 2003). Consequently, only about one third of the chromosomes in each cell are analyzed.

PGD using CGH to detect aneuploidy for almost all the chromosomes might increase IVF pregnancy rates by detecting abnormalities not currently detected by the nine FISH probe set, thus assisting IVF laboratories in selecting viable embryos for transfer and avoiding transfer of aneuploid embryos with low implantation potential.

If we had used FISH for nine chromosomes instead of CGH, 57.1% (4/7) of the 1PB-MII oocyte doublets showing single aneuploidy and 47.3% (9/19) of individual chromosome errors (involving chromosomes 2, 3, 6, 7, 8, 9, 19 and 20) would have been missed. As it has been suggested (Abdelhadi *et al.*, 2003), some pairs (i.e. doublets 4, 9 and 16) showed double or extensive aneuploidy involving not only chromosomes that are routinely analyzed with the nine chromosome panel but also other chromosomes not included in the panel. Consequently the doublet would have been scored as abnormal even if FISH screening only had detected one chromosome error. Despite this fact, it is important to note that about 83% (10/12) or 33% (4/12) of the doublets classified with CGH as aneuploid would have been misdiagnosed as normal using FISH with probes for five or nine chromosomes, respectively. Our results are consistent with a recent study where 25% of the blastomeres diagnosed as aneuploid with CGH, would have been incorrectly diagnosed as normal using FISH for nine chromosomes (Wilton *et al.*, 2003a). However, the higher rate of no reciprocity (20%) with CGH compared to FISH's misdiagnosis (12%) (Abdelhadi *et al.*, 2003) would result also in either normal embryos not being replaced or replacement of some abnormal embryos.

Although the 25 1PB-MII oocyte doublets studied here represented a small sample, it was still possible to recognize a relation between maternal age and chromosomal abnormalities. Consideration of two maternal age groups (21–36 and ≥ 37 years old) revealed a significantly higher aneuploidy rate in the older group (75% versus 23%, $P < 0.02$). Since a recent study has found a 52.1% aneuploidy rate in women of advanced maternal age (average 38.5 years old) using FISH for the analysis of only five chromosomes (Kuliev *et al.*, 2003), our aneuploidy rate in older women is not unexpected. These results support previous reports where age-related aneuploidy is demonstrated analysing a more sizeable dataset (Dailey *et al.*, 1996; Pellestor *et al.*, 2003).

A total of 30 1PB-MII oocyte doublets have been successfully analyzed using CGH. The presence of bands after amplification by DOP-PCR, has been reported previously and they have been identified as mitochondrial DNA, which is selectively amplified by DOP-PCR (Voullaire *et al.*, 2000).

Despite these high levels of mitochondrial DNA in MII oocytes, there is no interference with CGH profiles, as mitochondrial DNA does not hybridize to the template chromosomes (Voullaire *et al.*, 2000). However, mitochondrial DNA may compete with genomic DNA in the amplification and nick translation procedure. This could explain why MIIs, which contain many mitochondria, usually give a weaker hybridization than the 1PBs.

A 20% of non-reciprocity between 1PB and MII oocyte results was found, as six out of 30 1PB-MII oocyte pairs presented one or two missing chromosomes, while the sibling cell (1PB or MII oocyte) did not display a clear gain of material. There are two possible reasons that may explain these results.

First, in standard CGH, hypohaploidy affecting whole chromosome or single chromatid (DNA test: DNA reference ratio 0:2 or 1:2, respectively) is easier to detect than hyperhaploidy (ratio 4:2 or 3:2, respectively), as in the hypohaploidy there is a loss of 50–100% of the chromosomal material, while in the hyperhaploidy there is only a gain of 33–50%. Four out of six doublets which show no reciprocal results between the 1PB and MII oocyte (doublets 3, 7, 8 and 19; Table I) showed a missing chromosome in one of the cells, while the other cell displayed a deviation of red:green ratio that was suggestive of a gain of chromosomal material, but fell within the threshold cut-off of 1.2. Our data combined with other observations suggest that some hyperhaploidies, mainly the ones which could involve single extra chromatids could show a doubtful profile in the CGH analysis (Voullaire *et al.*, 2002).

Second, recent 1PB-MII oocyte FISH studies found evidence of oocytes from karyotypically normal women that appeared to have originated from trisomic germ cell lines (e.g. gonadal mosaicism). Some doublets had an extra chromatid in both the 1PB and the MII oocyte, while others had an extra chromosome with no reciprocal loss of material in the complementary cell (Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003). Considering that artifactual loss of chromosomes is not expected with CGH, our data indicate the possible existence of a gonadal mosaicism with a monosomic germ line in some of these patients, as one of the cells (MII oocyte or 1PB) has a missing chromosome while the other cell shows a normal karyotype.

One of the main limitations of CGH is that it is unable to detect alterations such as balanced predivision of chromatids, which predisposes to aneuploidy, but does not result in an immediate gain or loss of chromosomal material. Additionally, CGH is incapable of detecting changes in ploidy (e.g. diploid oocytes). Heterochromatic, telomeric and centromeric regions have to be excluded from the analysis because

they usually show a deviation in the CGH pattern. Some studies have already reported the difficulty of interpreting the CGH profile of chromosomes 17, 19 and 22 (CG-rich areas) in either classical CGH or CGH applied to the analysis of single cells. Therefore, when the test signal is enhanced, these chromosomes are also excluded from the analysis (Moore *et al.*, 1997; Voullaire *et al.*, 2002). It has been reported that CG-rich areas of the genome yield CGH artefacts but the specific mechanisms that create this artifact are still unknown. We have found artifactual gains of these chromosomes, despite the use of "reverse labelling" method, that may reduce hybridization artefacts in some of these problematic regions (Larramendy *et al.*, 1998). In addition, the use of 1PBs has inherent limitations in itself, since second meiotic, paternally derived and post-zygotic chromosome errors (i.e. embryonic mosaicism, which has been detected in 30% of cleavage-stage embryos; Munné *et al.*, 1995a) cannot be detected.

On the other hand, 90% of embryo aneuploidy is the result of errors in maternal meiosis I (Nicolaidis and Petersen, 1998), consequently, in non male-factor IVF patients, CGH analysis of 1PBs may allow the identification of most chromosomal abnormalities. In a clinical case, the biopsy would be carried out on day 0, after ICSI procedure (Durban *et al.*, 2001). Considering that hybridization times of 36 and 72 h gave comparable results, the total time required to perform the CGH would be about 60 h (counting as: 13 h for the DOP-PCR-CGH experiment, plus 45–48 h of hybridization). This timetable is compatible with regular *in vitro* fertilization and it would allow embryo replacement on day + 3 or + 4 (depending on the number of 1PBs being analysed). Clinical cases have been undertaken via this approach (Wells *et al.*, 2002).

In addition, other studies have shown the ability of CGH to detect chromosome breakage in human embryos (Voullaire *et al.*, 2000; Wells and Delhanty, 2000). FISH probes only reveal information about the small area of each chromosome to which they hybridize and consequently most rearrangements that affect chromosomal regions, rather than the whole chromosomes, are not detected. CGH will be a more appropriate tool for the detection of *de novo* structural abnormalities that results in loss/gain of chromosomal material.

Further investigation involving other techniques such as FISH, SKY or m-FISH is needed to test the reliability of CGH to detect not only extra or missing full chromosomes, but also single chromatid abnormalities (precocious sister chromatid segregation; predivision), which is one of the most common mechanisms of aneuploidy in human oocytes (Angell, 1997).

A recent study showed the ability of CGH to detect unbalanced segregations of translocations, as long as the unbalanced region is larger than 10–20 Mb, which is the resolution of CGH applied to single cells (Malmgren *et al.*, 2002). On the other hand, interchromosomal effects (ICE) in spermatozoa, embryos or oocytes from translocation carriers have been found by some authors (Blanco *et al.*, 2000; Pellestor *et al.*, 2001; Gianaroli *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2003). These studies have been performed using FISH for the analysis of up to 10 selected chromosomes; consequently, some ICE involving other chromosomes could remain undetected. In this study the complementary products of adjacent two segregation were

detected in a 1PB-MII oocyte pair donated from a t(1;5) carrier. This indicates that CGH could be used for PGD of maternal translocations, revealing whether specific rearrangements do indeed induce an ICE during female gametogenesis.

In conclusion, in the present study we have demonstrated the reliability of CGH not only to detect single copy number changes involving whole chromosomes in 1PB and MII oocytes, but also to detect unbalanced segregations of a maternal translocation. Our results indicate that CGH analysis of the 1PB may be used for the indirect characterization of the chromosome constitution of the oocyte. Due to the limited number of oocytes being analysed, further investigation would be necessary to give a better estimation of the error rate of this methodology prior to its standard clinical application. The clinical application of this method for the purposes of PGD could increase success rates for couples undergoing IVF treatment, not only advanced maternal age patients but also female carriers of chromosome rearrangements and women with repeated implantation failure.

Acknowledgements

The authors wish to thank the collaboration in this study of Dr Irene Boiso, Esther Prat and Cristina Hernando. The authors also wish to thank Dr Brynn Levy for providing laboratory facilities. This work was supported by Ministerio de Sanidad (FIS P1020168) and CIRIT (2001 SGR-00201). It has also been supported by Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (Cristina Gutiérrez-Mateo has a Beca para la formación de Personal Universitario; FPU).

References

- Abdalla H, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks A and Studd J (1993) Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod* 8,1512–1517.
- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T and Munné S (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 6,226–231.
- Angell R (1997) First-Meiotic-Division Nondisjunction in Human Oocytes. *Am J Hum Genet* 61,23–32.
- Bahçe M, Cohen J and Munné S (1999) Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes? *J Assist Reprod Genet* 16,176–181.
- Blanco J, Egozcue J and Vidal F (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm and nuclei. *Hum Genet* 106,500–505.
- Boiso I, Márquez C, Veiga A and Munné S (1997) Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Assist Reprod Rev* 7,160–164.
- Boué A, Boué J and Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Advan Hum Genet* 14,1–57.
- Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ and Pinckton HM (2003) Karyotyping of human metaphase II oocytes by Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 80,1003–1011.
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJW and Delhanty JDA (2003) Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 23, 663–668.
- Dailey T, Dale B, Cohen J and Munné S (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes detected by FISH analysis. *Am J Hum Genet* 59,176–184.
- DeScisciolo C, Wright DL, Mayer JF, Gibbons W, Muasher SJ and Lanzendorf SE (2000) Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology. *J Assist Reprod Genet* 17,284–292.
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Laila JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J and Navarro J (2001) PGD in

- female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update* 7,591–602.
- Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T and Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 17, 3201–3207.
- Gianaroli L, Magli M, Ferraretti AP and Munné S (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis: identification of the categories to which it should be proposed. *Fertil Steril* 72,837–844.
- Gitlin S (2003) Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online* 6,47–53.
- Hassold T and Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2,280–291.
- Hill DL (2003) Aneuploidy screening of preimplantation embryos using comparative genomic hybridization versus fluorescence in situ hybridization techniques. *Fertil Steril* 80,873–874.
- Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J, Ahrlund-Richter L, Sjoblom P, Lundkvist O, Simberg N, Nordenskjöld M and Blennow E (1999) A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum Genet* 104,376–382.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258,818–821.
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y and Verlinsky Y (2003) Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 6,54–59.
- Larramendy ML, El-Rifai W and Knuutila S (1998) Comparison of fluorescein isothiocyanate- and texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 31,174–179.
- Mahmood R, Brierley CH, Faed MJW, Mills JA and Delhanty JDA (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet* 106, 620–626.
- Malmgren H, Sahlén S, Inzunza J, Aho M, Rosenlund B, Fridström M, Hovatta O, Ahrlund-Richter L, Nordenskjöld M and Blennow E (2002) Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Mol Hum Reprod* 8,502–510.
- Márquez C, Cohen J and Munné S (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 81,254–258.
- Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M and Munné S (2000) Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 1,17–27.
- Meldrum D (1993) Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 59,1–5.
- Menezio Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N and Nicollet B (1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 7,101–106.
- Moore D, Pallavicini M, Cher M and Gray J (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 and Cohen J (1995a) Embryo morphology, development rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64,382–391.
- Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M and Cohen J (2004) Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 8,81–90.
- Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J and Cohen J (1995b) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10,1014–1020.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J and Cohen J (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 8,2185–2191.
- Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Márquez C, Sable D, Ferraretti AP et al. (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 14,2191–2199.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J and Sable D (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 7,91–97.
- Munné S, Sepulveda S, Balmaceda J, Fernández ECF, Mackenna A, López T, Crosby J and Zegers-Hochschild F (2000) Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenat Diagn* 20,582–586.
- Munné S and Wells D (2003) Questions concerning the suitability of comparative genomic hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 80,871–872.
- Navot D, Bergh P, Williams M, Garrisa G, Guzman I and Sandler B (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female infertility. *Lancet* 337,1375–1377.
- Nicolaidis P and Petersen M (1998) Origin and mechanisms of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13,313–319.
- Pellestor F (1991) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 86,283–288.
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C and Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* 112,195–203.
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B and Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 16,1155–1164.
- Pickering S, Johnson M, Braude PR and Houlston E (1988) Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 3,978–989.
- Plachot M, Mandelbaum J and Junca A (1990) Qualité de l' oocyte et de l' embryon et resultat de la FIV. *Contraception Fert Sex* 18,636–638.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J and Navarro J (2003) Analysis of nine chromosome probes in 1st polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 11,325–336.
- Sandalinas M, Márquez C and Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8,580–585.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J and Munné S (2001) Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 19,1954–1958.
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise JM and Strom C (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 5,826–829.
- Verlinsky Y and Kuliev A (2003) Preimplantation diagnosis for aneuploidies using fluorescence in situ hybridization or comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 80,869–870.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R and Wilton L (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 106,210–217.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T and Williamson R (2002) Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 8,1035–1041.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H and Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 19,846–851.
- Wells D and Delhanty JDA (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 6, 1055–1062.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA and 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 JK, Handyside AH and Delhanty JDA (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nuc Acids Res* 27,1214–1218.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R and McBain J (2003a) 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.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R and McBain J (2003b) Preimplantation embryo screening using comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 80,875–876.

Submitted on April 5, 2004; accepted on May 20, 2004

4.2. Aneuploidy study of human oocytes by 1PB-CGH and MII-FISH analysis

C. Gutiérrez-Mateo, J. Benet, D. Wells, P. Colls, MG. Bermúdez, JF. Sánchez-García, J. Egozcue, J. Navarro, S. Munné

Human Reproduction 2004;19:2859-2868

Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence *in situ* hybridization analysis

C.Gutiérrez-Mateo^{1,4}, J.Benet¹, D.Wells², P.Colls³, M.G.Bermúdez², J.F.Sánchez-García¹, J.Egozcue¹, J.Navarro¹ and S.Munné^{2,3}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain, ²The Institute for Reproductive Medicine and Science, St Barnabas Medical Center, 94 Old Short Hills Road, Livingston, NJ 07039 and ³Reprogenetics, 101 Old Short Hills Road, Suite 501, West Orange, NJ 07052, USA

⁴To whom correspondence should be addressed at: Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. E-mail: cristina.gutierrez@uab.es; joaquinia.navarro@uab.es

BACKGROUND: The object of this study was to determine the mechanisms that produce aneuploidy in oocytes and establish which chromosomes are more prone to aneuploidy. **METHODS:** A total of 54 oocytes from 36 women were analysed. The whole chromosome complement of the first polar body (1PB) was analysed by comparative genomic hybridization (CGH), while the corresponding metaphase II (MII) oocyte was analysed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to confirm the results. **RESULTS:** Matched CGH–FISH results were obtained in 42 1PB–MII doublets, of which 37 (88.1%) showed reciprocal results. The aneuploidy rate was 57.1%. Two-thirds of the aneuploidy events were chromatid abnormalities. Interestingly, the chromosomes more frequently involved in aneuploidy were chromosomes 1, 4 and 22 followed by chromosome 16. In general, small chromosomes (those equal to or smaller in size than chromosome 13) were more prone to aneuploidy (χ^2 -test, $P = 0.07$); 25% of the aneuploid doublets would have been misdiagnosed as normal using FISH with probes for nine-chromosomes. **CONCLUSIONS:** The combination of two different techniques, CGH and FISH, for the study of 1PB and MII allowed the identification and confirmation of any numerical chromosome abnormality, as well as helping to determine the mechanisms involved in the genesis of maternal aneuploidy.

Key words: aneuploidy/CGH/first polar body/FISH/oocyte

Introduction

Early embryonic wastage caused by chromosome abnormalities is thought to be one of the main factors which contribute to the low fertility rate in humans (Bahçe *et al.*, 1999). Some evidence suggests that there is a negative selection against some chromosome abnormalities during the first stages of embryonic development (Boué *et al.*, 1985). This may explain the fact that the rate of aneuploidies in cleavage-stage embryos (Munné *et al.*, 1995a; Márquez *et al.*, 2000) is much higher than that found in spontaneous abortions and liveborns (Hassold and Hunt, 2001).

The study of oocytes may produce meaningful data, as most embryo aneuploidies as well as most first trimester aneuploidies were classified as originating in female meiosis I (Nicolaidis and Petersen, 1998; Hassold and Hunt, 2001). In female meiosis, the metaphase I–anaphase I checkpoint, which regulates the proper alignment of the chromosomes in the meiotic spindle, is not as strict as in spermatogenesis (Hunt *et al.*, 1995; LeMarie-Adkins *et al.*, 1997). Thus, when

an error occurs in this alignment, male meiosis is arrested, while female meiosis continues and produces aneuploid oocytes. Moreover, a similar distribution of aneuploidy for all chromosomes was found in human sperm, whereas in oocytes and cleavage stage embryos, some chromosome groups are more prone to be involved in aneuploidy (Pellestor, 1991a; Munné *et al.*, 2004).

Two mechanisms leading to aneuploidy in human oocytes have been commonly reported: non-disjunction of bivalents (Zenzes *et al.*, 1992; Dailey *et al.*, 1996) and premature separation of sister chromatids (pre-division, PSSC) (Angell *et al.*, 1993; Angell 1997). Whereas some authors indicated the co-existence of both mechanisms (Dailey *et al.*, 1996; Verlinsky *et al.*, 1999; Sandalinas *et al.*, 2002; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003), others have found only non-disjunction (Zenzes *et al.*, 1992; Benkhalifa *et al.*, 1996) or PCSS events (Angell, 1997).

The reported incidence of chromosomal abnormalities in human oocytes and polar bodies varies widely between

published studies (from 4.7 to 47.5%, average 27.7%). To date, all of the techniques used for studying aneuploidy in oocytes have been based on the spreading of the chromosome material on to slides, followed by methods such as: banding techniques (Pellestor, 1991b; Pellestor *et al.*, 2003), fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for up to nine chromosomes (Dailey *et al.*, 1996; Verlinsky *et al.*, 1999; Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003), spectral karyotyping (SKY) (Márquez *et al.*, 1998; Sandalinas *et al.*, 2002) or multicolour fluorescence *in situ* hybridization (m-FISH) (Clyde *et al.*, 2003). The dependence on spreading of chromosomes has led to problems not only with overlapping chromosomes, chromosome morphology and artefactual loss of chromosomes during spreading, but also because of the difficulty of obtaining chromosome banding in metaphase II (MII) chromosomes to allow identification of specific chromosome aneuploidies. FISH studies have an extra limitation, as less than a half of the whole karyotype can be analysed because accuracy per probe is reduced when large numbers of probes are combined.

Comparative genomic hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic technique that allows the analysis of the full set of chromosomes in single cells (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999). CGH, as a DNA-based method which does not involve cell fixation, may overcome these limitations by analysing the whole set of chromosomes and giving a more accurate and reliable evaluation of the aneuploidy rate (both hyperhaploidy and hypohaploidy).

In female meiosis I, a set of chromosomes, with two chromatids each, segregate to the first polar body (1PB) while the oocyte in MII retains the reciprocal chromosome complement. The object of this study was to examine chromosome abnormalities in 1PB and MII oocytes to determine which chromosomes are more frequently implicated in aneuploidy events, and to determine the main mechanisms producing aneuploidy in female meiosis I. For this purpose, the whole chromosome complement of the 1PB was analysed by CGH and the corresponding MII was analysed by FISH in order to identify the aneuploidy mechanisms and confirm the results.

Materials and methods

Oocyte and polar body recovery

A total of 66 oocytes was donated by 46 patients aged 23–42 years (mean 34.9) who, due to different aetiologies, were included in the IVF programme of the Institute for Reproductive Medicine and Science of Saint Barnabas Medical Center (West Orange, NJ, USA). These oocytes were obtained in accordance with guidelines set by the internal review board of that Center. Written informed consent was obtained from all patients and the project was approved by our institutional ethics committee. Two kinds of oocytes were used in this study: oocytes retrieved at metaphase I (MI) stage and matured *in vitro* and MII oocytes that failed to fertilize after IVF or ICSI. Only those immature eggs that have reached MII stage (displaying a 1PB) 12–24 h after retrieval and only those which showed no pronuclei and presented a 1PB 24 h after fertilization were used in this study. The oocytes were coded with a number (indicating the patient) plus one letter that indicates the oocyte number for each patient.

1PB isolation and oocyte spreading

The zona pellucida was removed using acid Tyrode's solution. Usually the 1PB disassociates after zona pellucida removal, unless there is a cytoplasm bridge between the 1PB and the oocyte. In that case, vigorous pipetting may help to release the 1PB. After that, the 1PBs were isolated and washed in three phosphate-buffered saline (PBS)/0.1% polyvinyl alcohol droplets. The 1PBs were transferred to individual PCR tubes and 1 μ l of sodium dodecyl sulphate (17 μ mol/l) and 2 μ l of proteinase K (125 μ g/ml) were added. The sample was overlaid with light mineral oil and the lysis was performed incubating at 37°C for 1 h followed by 10 min at 95°C to inactivate proteinase K. Oocytes were spread after zona pellucida removal using the technique of Tarkowski (1966), with some modifications. Briefly, the oocytes were placed individually in hypotonic solution (0.075 mol/l KCl) for 5–7 min. The oocytes were transferred to a grease-free slide in a minimal volume of hypotonic and five drops of freshly prepared Carnoy fixative (3 methanol:1 acetic acid) were dropped onto the oocyte. The position of the oocyte was circled on the slide with a diamond pencil. Every slide was then examined under a phase-contrast microscope and the presence of metaphase spread was ascertained. Finally, the slides were dehydrated through an alcohol series (70, 85 and 100%, 2 min each) and were frozen at –20°C until they were hybridized.

CGH analysis of 1PBs

DNA from the isolated 1PBs was amplified using degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) as previously described (Wells *et al.*, 2002), with some modifications. In brief, each PCR tube contained 1 \times Buffer, 2 μ mol/l DOP primer (CCGACTCGAGNNN-NNNATGTGG), 0.2 mmol/l dNTP and 2.5 U of SuperTaq Plus polymerase (Ambion, USA) in a final volume of 50 μ l. The sample was spun and heated to 94°C for 4.5 min; eight cycles of 95°C for 30 s, 30°C for 1.5 min and 72°C for 3 min; 40 cycles of 95°C for 30 s, 56°C for 1 min and 72°C for 3 min with a final extension step of 72°C for 8 min. The PCR program was carried out in a 9700 PE thermocycler (Applied Biosystems, USA). Isolated and lysed single buccal cells from a normal female were also amplified and used as reference sample in the CGH experiment. Whole genome amplification products were fluorescently labelled by Nick Translation (Vysis, USA) according to the manufacturer's instructions. 1PB DNA (test) was labelled with Spectrum Red-dUTP (Vysis), whereas reference DNA was labelled with Spectrum Green-dUTP (Vysis). Labelled reference and test DNA were mixed and ethanol-precipitated with 10 μ g of Cot-1-DNA. The pellet was dried and redissolved in 10 μ l of hybridization mixture [50% formamide, 2 \times standard saline citrate (SSC), 10% dextran sulphate, pH 7]. Normal male (46,XY) metaphase spreads (Vysis) were dehydrated through an alcohol series (70, 85 and 100% for 2 min each) and air-dried. The slides were then denatured in 70% formamide, 2 \times SSC at 73°C for 5 min and taken through a cold alcohol series and air-dried. The probes were denatured at 73°C for 10 min and were applied to the slide; a coverslip was placed on top and sealed with rubber cement. Hybridization was performed in a moist chamber at 37°C for 40–72 h. After hybridization, the slides were washed at high stringency in 0.4 \times SSC/0.3% NP-40 at 73°C for 2 min, 2 \times SSC/0.1% NP-40 for 2 min and dehydrated through an alcohol series and air-dried. Finally, the slides were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, UK) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Metaphase preparations were examined using an Olympus BX 60 epifluorescence microscope. An average of 10 metaphases per hybridization was captured and analysed using SmartCapture software (Digital Scientific Cambridge, UK) and Vysis Quips CGH

software, both supplied by Vysis. The average red:green fluorescent ratio for each chromosome was determined by the CGH software. Deviations of the ratio <0.8 (the test DNA is under-represented) or >1.2 (the test DNA is over-represented) were scored as loss or gain of material in the test sample respectively. Telomeric, centromeric and heterochromatic regions were excluded from the analysis for being non-informative.

FISH analysis of MII oocytes

The probes used in this study were centromeric, locus-specific or telomeric probes (all provided by Vysis; detailed in Table I) and were used in sequential panels: panels A, B and C. Panel A contained probes for chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22 (MultiVysionPB, Vysis). Panel B contained a mixture of 1, 15, 17 and X probes. Panel C included two chromosome probes, one chromosome which worked as an internal control (usually for the X chromosome), plus a second probe that varies depending on the aneuploidy found by CGH in the sibling 1PB (see Table II). At least two rounds of FISH (panels A and B, testing nine chromosomes) were applied to each oocyte, while in some oocytes (those whose corresponding 1PB showed one or more aneuploidies involving chromosomes not included in panel A or B) a third panel was also applied. In general, telomeric and locus-specific probes were applied in the first round of hybridization, so the order of application of the probe sets was variable. Before the FISH procedure, the slides were postfixed at room temperature in 50 mmol/l $MgCl_2$ /PBS for 5 min, 3% formaldehyde/50 mmol/l $MgCl_2$ /PBS for 9 min and PBS for 5 min. The preparations were then dehydrated, air-dried, stained with DAPI and captured using a fluorescence microscope. DAPI was removed and the slides were dehydrated and air-dried. The first probe set was applied to each slide and covered with a 5×5 mm coverslip. The slides were then sealed with rubber cement and placed for 5 min on a hot-plate at $75^\circ C$. The probes were allowed to hybridize overnight at $37^\circ C$ in a dark moist chamber. Post-hybridization washes were performed according to the manufacturer's instructions. Slides were mounted with DAPI or, in the case of the MultiVysionPB probe, in Vectashield antifade. The slides were examined using a fluorescence microscope with filters for the fluorochromes used. Capture and analysis was performed using SmartCapture software and IPLab

(Scanalytics, Inc., Vysis, USA). After visualization of the first round, the slides were rinsed in distilled water before being dehydrated in an alcohol series. The second and the third rounds of FISH were performed as described above.

Scoring criteria

Sperm chromosomes that had prematurely condensed were easily distinguished from the oocyte complement as they appear much more extended. Sperm chromosomes were excluded from the analysis

The probe sets used in this study were tested on spreads of normal male leukocytes (metaphase and interphase nuclei) using the conditions previously described. Only the probe for chromosome 4 showed cross-hybridization to non-target chromosomes. However, these signals had much lower fluorescence intensity and they were easily distinguished from the specific, more intense signals targeting chromosome 4.

Probes complementary to centromeric regions usually gave one large signal, or alternatively, two smaller paired signals corresponding to the two sister chromatids. For the subtelomeric or locus-specific (LSI) probes (for chromosome 13, 14, 19 and 21), which target telomeric regions or regions of the long arms of these chromosomes, two paired signals were expected.

The presence of additional signals was always considered as confirmed aneuploidies, while missing signals were only considered when the result was confirmed by CGH in the complementary 1PB.

Results

A total of 66 oocytes was obtained. Fifty-four 1PBs obtained from 36 patients were successfully analysed by CGH (81.8%) as 10 1PBs failed to amplify and two 1PBs gave no CGH result because the hybridization intensity of the test DNA was too weak. In order to confirm the CGH results in 1PBs, their complementary MIIs were fixed. Forty-five out of 54 MII showed an adequate metaphase spreading after fixation (83.3%), and FISH results for at least four chromosomes were obtained in 42 oocytes (77.7%) (Table II). Both

Table I. Probes used in this study

Chromosomes	Probes			Labelled	Panel
	Centromeric	Locus-specific	Telomeric		
1	Alpha satellite, DXZ1			SO	B
3	Alpha satellite, D3Z1			SO	C
4	Alpha satellite, D4Z1			SG	C
6	Alpha satellite, D6Z1			SA	C
7	Alpha satellite, D7Z1			SG	C
8	Alpha satellite, D8Z2			SO	C
9	Alpha satellite			SO	C
10	Alpha satellite			SO	C
13		RB1 locus, 13q14		SR	A
14			TelVysion 14q	SO	C
15	Satellite III			SG	B
16	Satellite II, D16Z3			SA	A
17	Alpha satellite, D17Z1			SA	B
18	Alpha satellite, D18Z1			SB	A
19			Telvysion 19q	SO	C
21		Region 21q22.13 – q22.2		SG	A
22		BCR locus, region 22q11.2		Sg	A
X	Alpha satellite, DXZ1			SA and/or SO	B and C

SO = Spectrum Orange; SG = Spectrum Green; SA = Spectrum Aqua; SR = Spectrum Red; SB = Spectrum Blue; Sg = Spectrum Gold.

Table II. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis of oocytes

Oocyte no.	Analysed chromosomes																	Total chromosomes	
	Panel A					Panel B				Panel C									
	13	16	18	21	22	X	1	15	17	3	4	6	7	8	9	10	14		19
1a	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	X										6
1b	X	X	✓	X	✓	✓	✓	X	✓										5
2a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								11
3a	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								5
4a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓								10
5a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓				✓		11
6a	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓										7
8a	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										8
9a	X	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓										7
10a	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓										8
10b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
11a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
12a	✓	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓										7
13a	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓										8
13c	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓										7
14a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	X									7
15a	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										8
16a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓			✓					11
17a	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓										8
18a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
19a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓								10
20a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
21a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
22b	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	X										4
23a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓						10
23b	✓	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓										6
24a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
24b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓								10
24c	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
25a	✓	X	✓	X	✓	X	X	✓	X										4
26a	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓										8
27a	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓						✓			✓	9
28a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									✓	10
29a	✓	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓										7
30a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										9
31a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									✓	9
32a	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										8
34b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓										8
34c	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓										8
34d	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓							✓			9
34e	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓										8
35a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X				✓						9

✓ = FISH results for that chromosome; X = FISH failed to give any result for that chromosome.

CGH and FISH results were obtained in these 42 1PB–MII pairs donated by 33 patients (mean 35.8 years old, range 26–42), while 12 1PB–MII doublets had only the 1PB analysed by CGH (data not shown). In most of the cases, one (81.8%) or two (12.1%) oocytes were analysed by patient, but we also analysed three oocytes in one patient and a maximum of four oocytes from one other patient. Sixteen out of 42 oocytes were matured *in vitro* and 26 failed to fertilize (13 after IVF and 13 after ICSI).

Only six out of 42 MII had FISH results for fewer than seven chromosomes, whereas 36 MII had FISH results for seven to 11 chromosomes. A third round of FISH was necessary in 12 MII. The successive denaturation and washing steps deteriorate the chromosomes, which appeared hairy. However, FISH results were obtained in all 12 MII.

Out of 42 1PBs analysed by CGH, 23 presented results consistent with aneuploidy (Table III). In addition, one extra

chromatid for chromosome 18 was found by FISH in MII 8a while CGH analysis of its 1PB indicated a normal profile for all the chromosomes. According to this, we counted 24 aneuploid doublets, instead of 23. Therefore, the aneuploidy rate was 57.1%. Most aneuploid 1PBs had one (14/24), or two (6/24) chromosomes implicated in aneuploidy, but we also found four 1PBs with extensive aneuploidy involving three or more different chromosomes (Figure 1). Twelve out of 14 single aneuploidies, five out of six double aneuploidies and three out of four extensive aneuploidies were confirmed by FISH analysing the MII complement.

A total of 42 aneuploidy events involving 18 different chromosomes was found by either CGH, FISH or both CGH and FISH (Table IV). Out of 39 aneuploidies found by CGH in 1PBs, 36 were confirmed by FISH (92.3%). In addition, three hyperhaploidies (for chromosomes 15, 18 and X) were found by FISH while the 1PBs showed a normal CGH profile

Table III. Summary of CGH and FISH data from aneuploid pairs 1PB–MII

Oocyte no.	Protocol	Age (years)	CGH interpretation of the 1PB	FISH analysis of the MII	Reciprocity
1b	ICSI	39	23, X, -17, +22	+cht 17, -cht 22	yes
2a	ICSI	40	22, X, +3, -4, -21	-cht 3, +cht 4, +cht 21	yes
4a	ICSI	35	23, X, +4, -16	-chr 4, +cht 16	yes
5a	IVM	42	23, X, +7, -14	-cht 7, +cht 14	yes
8a	IVM	36	23, X	+cht 18	no
9a	IVF	37	24, X, +1	-cht 1	yes
10b	IVF	37	24, X, +16	No aneuploidy detected for chr 16	no
11a	IVM	38	22, X, -1	+cht 1	yes
12a	IVF	41	24, X, +1	-chr 1	yes
16a	IVM	42	23, X, +4, -8	+chr 8. No aneuploidy detected for chr 4	inconclusive
19a	ICSI	40	21, X, -4, -13, +16, -18	+cht 4, +cht 15, -cht 16 +cht 18, +chr X. No aneuploidy detected for chr 13	inconclusive
20a	IVM	32	22, X, -16	+cht 16	yes
23a	IVF	38	23, X, -6, +15, +17, -22	+cht 6, -cht 15, -cht 17, +cht 22	yes
24b	IVF	36	21, X, -4, -17	+cht 4, +cht 17	yes
24c	ICSI	36	22, X, -22	+chr 22	yes
26a	ICSI	33	22, X, -1	+chr 1	yes
27a	IVM	41	25, X, +9, +19	-chr 9, -chr 19	yes
28a	IVM	38	24, X, +19	-cht 19	yes
29a	IVM	26	24, X, +1	-chr 1	yes
31a	IVF	41	24, X, +19	-cht 19	yes
34b	ICSI	27	24, X, +22	-chr 22	yes
34d	ICSI	27	24, X, +10	-cht 10	yes
34e	ICSI	27	24, X, +22	-chr 22	yes
35a	IVF	29	20, X, -6, -13, -18	+cht 6, +cht 13, +cht 18	yes

The 1PBs karyotypes were based on the interpretation of the CGH profile determined by the CGH software. 1PB = first polar body; MII = metaphase II oocyte; cht = chromatid; chr = chromosome; ICSI = Unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection; IVF = Unfertilized oocytes after *in vitro* fertilization; IVM = *In vitro* matured oocytes.

for these chromosomes. FISH analysis revealed that less than one-third of these aneuploidies (11 + 1 = 12 out of 39, 30.8%) were whole chromosome alterations (non-disjunction of bivalent chromosomes), whereas 27 (25 + 2) out of 39

(69.2%) were chromatid abnormalities (pre-division of sister chromatids prior to anaphase I) (Figure 2).

The chromosomes most frequently involved in aneuploidy were chromosomes 1, 4 and 22 (five aneuploid events each,

Table IV. Aneuploidy events found in first polar bodies and oocytes by CGH and/or FISH

Chromosome number	Detected by CGH	Confirmed by FISH		Not confirmed by FISH	Total per chromosome (%)
		Non-disjunction	Unbalanced pre-division		
1	5	3	2	0	5 (11.9)
2	0	0	0	0	0 (0)
3	1	0	1	0	1 (2.4)
4	5	1	3	1	5 (11.9)
5	0	0	0	0	0 (0)
6	2	0	2	0	2 (4.8)
7	1	0	1	0	1 (2.4)
8	1	1	0	0	1 (2.4)
9	1	1	0	0	1 (2.4)
10	1	0	1	0	1 (2.4)
11	0	0	0	0	0 (0)
12	0	0	0	0	0 (0)
13	2	0	1	1	2 (4.8)
14	1	0	1	0	1 (2.4)
15	1	0	1 + 1*	0	2 (4.8)
16	4	0	3	1	4 (9.5)
17	3	0	3	0	3 (7.1)
18	2	0	2 + 1*	0	3 (7.1)
19	3	2	1	0	3 (7.1)
20	0	0	0	0	0 (0)
21	1	0	1	0	1 (2.4)
22	5	3	2	0	5 (11.9)
X	0	1*	0	0	1 (2.4)
Total	39	11 + 1*	25 + 2*	3	42 (100)

*FISH in MII indicated hyperhaploidy for these chromosomes, while their 1PBs showed a normal CGH pattern for the chromosomes in question.

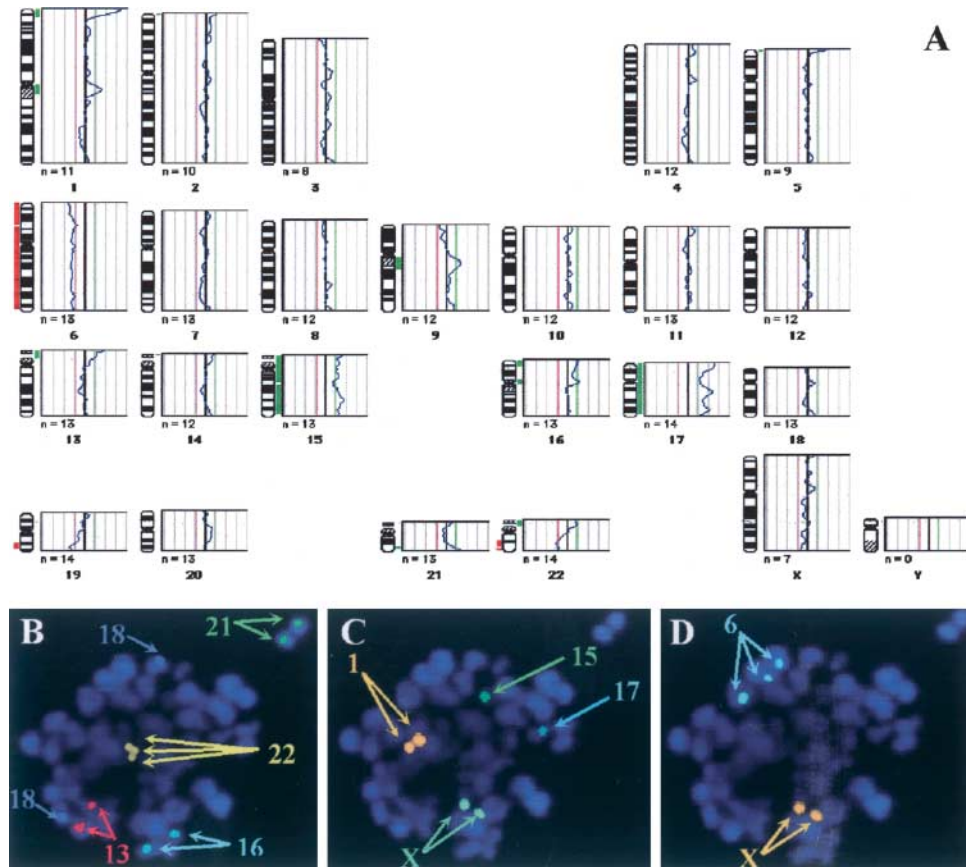


Figure 1. Comparative genomic hybridization (CGH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis from doublet 23a (Table IV) showing reciprocal results between the two sibling cells, first polar body (1PB) and metaphase II (MII). Arrows indicate signals for each chromatid. (A) CGH results from the 1PB showing extensive aneuploidy involving chromosomes 6, 15, 17 and 22. (B) FISH results from the MII testing chromosomes included in panel A. An extra chromatid for chromosome 22 was found. (C) FISH results from panel B showing a missing chromatid for chromosomes 15 and 17. (D) FISH results from panel C testing chromosomes 6 and X. X chromosome worked as an internal control for non-hybridization.

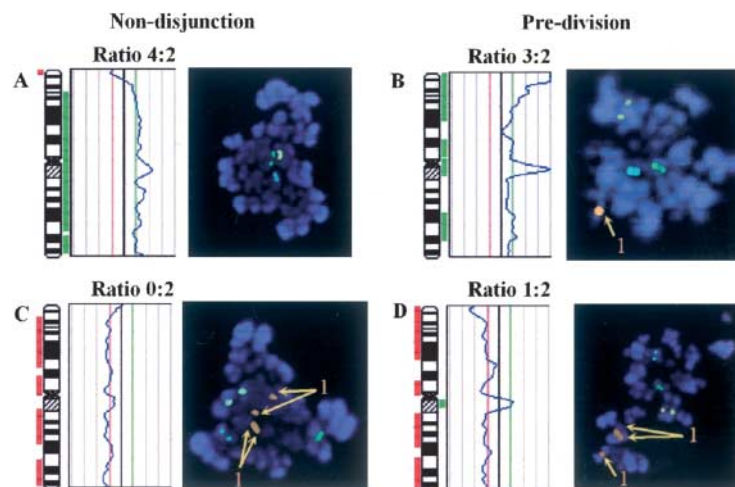


Figure 2. Comparative genomic hybridization (CGH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) results from four doublets 1PB–MII (first polar body and metaphase II) with aneuploidy for chromosome 1. Arrows indicate orange signals for each chromatid 1. Additionally, green signals correspond to chromosome 15, aqua signals to chromosome 17 and yellow signals to X chromosome. CGH analysis allows the detection of full chromosome (non-disjunction) or chromatid abnormalities (pre-division) but our data also indicate that it is difficult to differentiate between 0:2/1:2 or 4:2/3:2 CGH ratios. (A) CGH pattern for chromosome 1 and FISH analysis on doublet 12a. CGH profile deviated to the right, indicating gain. Absence of FISH signals for chromosome 1 in the corresponding MII. (B) Results from doublet 9a. CGH analysis indicates gain of chromosome 1. Only one single chromatid was found in the MII. (C) CGH and FISH results on doublet 26a. CGH profile deviated to the left, indicating loss. FISH analysis revealed non-disjunction of bivalents during meiosis I. (D) Results from doublet 11a indicating loss of chromosome 1 in the 1PB. FISH results of the corresponding MII showed an extra chromatid for that chromosome.

11.9%) followed by chromosome 16 (four events, 9.5%). No aneuploidy affecting chromosomes 2, 5, 11, 12 and 20 were found. Data were analysed using the χ^2 -test. Small chromosomes (chromosomes 13–22) were more prone to aneuploidy (χ^2 test, $P = 0.07$), mostly those chromosomes included in group E.

Age-related aneuploidy has also been analysed. Seven out of 13 analysed 1PBs from five women <35 years old (mean 30.6, range 26–34) gave results consistent with aneuploidy, all of them confirmed by FISH. Additionally, 17 out of 29 oocytes from women aged ≥ 35 years (mean 38.1, range 35–42) were aneuploid. The difference between the aneuploidy rates in these two age-related groups was not statistically significant.

When comparing the aneuploidy rates and the mechanisms involved in aneuploidy (non-disjunction and pre-division) of the different types of oocytes analysed in this study, no significant difference was found between *in vitro* matured oocytes and unfertilized oocytes. In addition, there was no significant difference either when comparing failed fertilized ICSI oocytes with failed fertilized IVF oocytes (data analysed using Fisher's exact and χ^2 -test).

Out of the 42 matched 1PB–MII pairs where both CGH and FISH results were obtained, 37 showed complementary results (88.1%). Five 1PBs were found to give results that were not entirely complementary between the CGH interpretations of the 1PBs and the FISH results of the MIIs (Table III). Some doublets were in partial agreement as CGH of 1PBs 16a and 19a indicated imbalance affecting several chromosomes, but not all of them were confirmed by FISH results in MIIs. Other doublets were not in agreement at all. An extra chromatid for chromosome 18 was found by FISH in MII 8a but the 1PB analysis by CGH revealed a normal karyotype. On the other hand, CGH analysis of 1PB 10b revealed a gain affecting chromosome 16 which was not confirmed by FISH. Finally, doublet 32a was classified as normal despite a missing chromosome 1 detected by FISH in the MII. Its 1PB not only did not display the reciprocal gain, but showed a normal CGH profile for all the chromosomes, indicating artefactual loss of chromosome 1 during spreading of the MII.

Discussion

The aim of this study was to determine the mechanisms that produce aneuploidy in oocytes as well as establishing which chromosomes are more frequently involved in aneuploidy. To achieve this, unfertilized and *in vitro* matured oocytes and their complementary 1PB were analysed. The main cause of failed fertilization after ICSI is a defective oocyte activation (Schmiady *et al.*, 1996). Because $\sim 70\%$ of unfertilized ICSI oocytes have, in fact, a swollen sperm head within them (Flaherty *et al.*, 1995), if we had analysed the oocyte by CGH, a sperm nuclei might have been amplified and given us false results. Therefore, the whole chromosome complement of the 1PB was analysed by CGH, whereas the oocytes were analysed by FISH in order to confirm the aneuploidies found in 1PBs.

The incidence of chromosomal abnormalities in human oocytes and polar bodies varies widely between studies. Karyotyping data indicate that $\sim 16\%$ of oocytes are aneuploid (Zenzes *et al.*, 1992; Nakaoka *et al.*, 1998; Pellestor *et al.*, 2003); the aneuploidy rate found using SKY or m-FISH varies from 16.7 to 39% (mean 31.3%) (Márquez *et al.*, 1998; Sandalinas *et al.*, 2002; Clyde *et al.*, 2003). Data derived from FISH studies displayed even more variation, depending mainly on the number of chromosomes and the chromosomes that were analysed. While some researchers have found relatively low rates of aneuploidy (up to 9.6%) analysing two (chromosomes 18 and X), six (chromosomes 9, 13, 16, 18, 21 and X) or eight (1, 9, 12, 13, 16, 18, 21 and X) chromosomes (Dyban *et al.*, 1996; Anahory *et al.*, 2003; Cupisti *et al.*, 2003), others have found a higher rate of chromosome abnormalities. In recent studies, the aneuploidy rate of MII oocytes analysing chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22 (Kuliev *et al.*, 2003) was 41.7%, analysing chromosomes 1, 7, 13, 18, 21 and X was 44% (Martini *et al.*, 2000) and testing chromosomes 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 and X (the same chromosomes tested in panels A and B) was 47.5% (Pujol *et al.*, 2003). In the present study, a 57.1% aneuploidy rate was found (mean age 35.8 years). This high rate could be attributed to the higher number of chromosomes being analysed compared to other studies. Moreover, it is important to emphasize that all the techniques mentioned above (SKY, m-FISH, banding techniques and FISH) are based on the spreading of the chromosome material on slides, and some problems related to overlapping chromosomes, chromosome morphology, as well as artefactual loss of chromosomes during fixation have been found. To date, only 35% of the oocytes fixed gave a SKY result because of the overlapping chromosomes (Sandalinas *et al.*, 2002) and 25.8% of the missing chromosomes or chromatids found in 1PB were considered artefactual using FISH (Pujol *et al.*, 2003). The difficulty of distinguishing between real hypohaploidies or artefactual losses explains why some publications have considered only hyperhaploidies to evaluate the aneuploidy rate (Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003). In this study, a small excess of hyperhaploidies was found in the MII (22 hyperhaploidies versus 17 hypohaploidies), whereas the 1PB analysis showed more hypohaploidies. These findings are in agreement with other reports where more hypohaploidies were detected in 1PB (Kuliev *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003). However, when studying large series of cleavage stage embryos, more monosomies have been found (Munné *et al.*, 2004). Therefore, this excess of monosomic embryos may not be produced in the oocyte but during the first mitotic divisions, and some mechanisms such as anaphase lag may be involved (Munné *et al.*, 2004). In our hands, the combination of two techniques, CGH as a DNA-based method that allows the identification of any chromosome abnormality (both, hyperhaploidy and hypohaploidy) and FISH to confirm the aneuploidy events found in 1PB, provides a reliable and accurate estimation of the aneuploidy rate in oocytes.

Most preimplantation genetic diagnosis (PGD) centres that perform aneuploidy screening (PGD-AS) in either cleavage stage embryos or polar bodies use probes for chromosomes

most commonly involved in aneuploidy in live births (X, Y, 13, 18 and 21) (Munné and Weier, 1996; Verlinsky and Kuliev, 1997) but also for chromosomes involved in spontaneous abortions (14, 15, 16 and 22) (Munné *et al.*, 1998a,b, 2003). In this study, panels A and B included probes for nine different chromosomes to cover the most frequent abnormalities detected in cleavage stage embryos and oocytes (chromosomes 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 and X). However, these two panels revealed only 26 out of 42 aneuploidy events (61.9%). Thus, if we had not used CGH, 16 aneuploidies (38.1%) involving chromosomes 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14 and 19 would have been missed. It is important to note that oocytes or 1PB with extensive aneuploidy would be scored as abnormal even if FISH screening only detected one chromosome error (i.e. doublet 1PB–MII 2a, Table III). Despite this fact, 25% (6/24) of the 1PB classified as aneuploid would have been misdiagnosed as normal using FISH with probes for the nine chromosomes mentioned above. These results are consistent with a recent study in which 25% of the blastomeres diagnosed as aneuploid with CGH would have been incorrectly diagnosed as normal using FISH for nine chromosomes (Wilton *et al.*, 2003). On the other hand, an 11.9% aneuploidy rate was found for chromosome 1 (Table IV). If we have chosen the current panel of nine chromosomes used by most PGD centres and therefore chromosome 1 had not been included in panel B, 10 out of 24 1PB (41.7%) classified as aneuploid by CGH would have been incorrectly diagnosed as euploid with FISH.

When comparing aneuploidy rates for different chromosomes in cleavage stage embryos with the incidence of these aneuploidies in spontaneous abortions (Simpson, 1990), some aneuploidies were found to survive less often than others (Munné *et al.*, 2004). Bahçe *et al.* (1999) found trisomy 1 at a frequency of 16% in cleavage stage embryos, while to our knowledge there is only one reported case of trisomy 1 in first trimester conceptions (Hanna *et al.*, 1997). Taken together, all these data suggest that aneuploidies of chromosomes not involved in trisomic offspring or spontaneous abortions, such as chromosomes 1, 4 and 17, may be common at conception but fail to implant or shortly die after implantation. Therefore, an ideal PGD-AS should analyse also these chromosomes as their involvement in aneuploidy may have an effect, not causing spontaneous abortions, but a decrease in implantation rates (Bahçe *et al.*, 1999).

When studying age-related aneuploidy, no significant differences were found considering two maternal age groups (<35 and ≥35 years old), suggesting that the sample size was probably too small. In addition, it is worth noting that in a 27 year old woman (patient 34), we found three aneuploid 1PB from a total of four analysed 1PB. The inclusion of four oocytes from this patient, who may have a tendency to produce aneuploid oocytes despite her age, may bias our results, as previously suggested (Zenzes *et al.*, 1992).

Previous reports have suggested that unbalanced pre-division and non-disjunction did not increase significantly with time in culture (Munné *et al.*, 1995b; Boiso *et al.*, 1997), whereas other authors suggest the contrary (Pickering *et al.*, 1988; Dailey *et al.*, 1996). In this study, no

significant difference was found between *in vitro* matured oocytes and unfertilized oocytes concerning aneuploidy rates and aneuploidy mechanisms. On the other hand, no differences were found either when comparing unfertilized oocytes after ICSI or IVF, as previously reported (Edirisinghe *et al.*, 1997).

The highest rates of abnormalities were found for chromosomes 1, 4 and 22, followed by chromosome 16. Chromosomes 16 and 22 have also been frequently involved in aneuploidy in other studies of polar bodies, oocytes and embryos (Sandalinas *et al.*, 2002; Kuliev *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003; Munné *et al.*, 2004). Classifying the chromosomes as large (chromosomes 1–12 and X chromosome) or small (chromosomes 13–22), small chromosomes were more prone to aneuploidy (χ^2 -test, $P = 0.07$). These findings are in agreement with other studies, where small chromosomes are involved more frequently in aneuploidy (Pellestor *et al.*, 2002; Sandalinas *et al.*, 2002; Cupisti *et al.*, 2003). One possible explanation is that small chromosomes tend to form fewer chiasmata during meiosis I, and reduced levels of recombination could predispose to non-disjunction (Koehler *et al.*, 1996; Hassold *et al.*, 2000; Hassold and Hunt, 2001; Sun *et al.*, 2004).

FISH analysis of MII oocytes allowed the confirmation of 92.3% of the aneuploidy events found in 1PBs by CGH. Moreover, FISH analysis detected unequivocally two mechanisms of aneuploidy, revealing that up to two-thirds of the aneuploidy events (69.2%) were due to a PSSC, while only one-third was due to chromosome non-disjunction. Previous reports have also indicated the co-existence of these two mechanisms of maternal aneuploidy, with chromatid anomalies being the most common (Verlinsky *et al.*, 1999; Pellestor *et al.*, 2002; Sandalinas *et al.*, 2002). On the other hand, older women seem also to accumulate more mitochondrial DNA mutations, either in oocytes or in the surrounding follicular cells (Bartmann *et al.*, 2004). These mutations result in a reduced mitochondrial function (Schon *et al.*, 2000). Cohesin is the protein complex that holds replicated sister chromatids together until anaphase II. Considering that meiosis is an energy-dependent process and that ATP is also required for DNA binding by Cohesin (Uhlmann, 2004), a deficiency in oxidative energy metabolism could result in a higher incidence of PSSC in older women, as previously reported (Sandalinas *et al.*, 2002).

In CGH, hypohaploidy affecting single chromatids (DNA test: DNA reference ratio 1:2) is easier to detect than hyperhaploidy (ratio 3:2) as in hypohaploidy there is a loss of 50% of the chromosomal material, while in hyperhaploidy there is only a gain of 33% (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004). In the present study we demonstrate the ability of CGH to detect not only extra or missing full chromosomes, but also single chromatid abnormalities. However, our data also show similar deviations of the CGH profiles in either chromosome (ratios 4:2 or 0:2) or chromatid (ratios 3:2 or 1:2) abnormalities. Therefore, we can conclude that CGH is useful to determine the implication of any chromosome in aneuploidy but is not the most suitable technique to test whether the chromosome abnormality is derived from a non-disjunction of bivalents or

alternatively from a premature separation of sister chromatids at meiosis I.

In this work, five out of the 42 (11.9%) matched 1PB–MII pairs where both CGH and FISH results were obtained showed no reciprocal results. Two kinds of non-reciprocity have been scored: (i) doublets 1PB–MII which presented one or two hyperhaploidies with no reciprocal loss of material in the sibling cell (1PB or MII); (ii) a doublet which presented absence of FISH signals for chromosome 1 in the MII, while its 1PB displayed a normal karyotype, suggesting artefactual loss of chromosome 1 during fixation of the MII. Some authors have also found extra chromosomes or chromatids with no reciprocal loss of material in the complementary cell, suggesting a third mechanism of maternal aneuploidy: the possible existence of a gonadal mosaicism with a trisomic germ line in some of these patients (Mahmood *et al.*, 2000; Cupisti *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2003).

In conclusion, the combination of two different techniques, CGH and FISH, for the study of 1PB and MII allows the identification and confirmation of any chromosome imbalance, as well as determining the mechanisms involved in the genesis of maternal aneuploidy. Our data also have implications for PGD of aneuploidy, as some chromosomes that were involved frequently in aneuploidy are not included in current panels for aneuploidy screening.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ana Castellano for her collaboration on this work. This study was supported by Ministerio de Sanidad (FIS PI020168) and CIRIT (2001 SGR-00201). It has also been supported by Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (Cristina Gutiérrez Mateo has a Beca para la formación de Personal Universitario; FPU).

References

- Anahory T, Andréo B, Régnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M, Demaille J and Pellestor F (2003) Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Mol Hum Reprod* 9,577–585.
- Angell R (1997) First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet* 61,23–32.
- Angell RR, Xian J and Keith J (1993) Chromosome abnormalities in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod* 8,1047–1054.
- Bahçe M, Cohen J and Munné S (1999) Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes? *J Assist Reprod Genet* 16,176–181.
- Bartmann A, Romao G, Ramos E and Ferriani R (2004) Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *J Assist Reprod Genet* 21,79–83.
- Benkhalifa M, Menezo Y, Yanny L, Pouly J and Qumsiyeh M (1996) Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 13,140–148.
- Boiso I, Márquez C, Veiga A and Munné S (1997) Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Assist Reprod Rev* 7,160–164.
- Boué A, Boué J and Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet* 14,1–57.
- Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ and Pincon HM (2003) Karyotyping of human metaphase II oocytes by Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 80,1003–1011.
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJW and Delhanty JDA (2003) Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 23,663–668.

- Dailey T, Dale B, Cohen J and Munné S (1996) Association between non-disjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes detected by FISH analysis. *Am J Hum Genet* 59,176–184.
- Dyban A, Freidine M, Severova E, Cieslak J, Ivakhnenko V and 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, Murch A, Junk S and Yovich J (1997) Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double blind study. *Hum Reprod* 12,2784–2791.
- Flaherty S, Payne D, Swann N and Matthews C (1995) Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 7,197–210.
- Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, Egozcue J, Munné S and Navarro J (2004) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 19,2118–2125.
- Hanna J, Shires P and Matile G (1997) Trisomy 1 in a clinically recognized pregnancy. *Am J Med Genet* 68,98.
- Hassold T and Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Rev Genet* 2,280–291.
- Hassold T, Sherman S and Hunt P (2000) Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum Mol Genet* 9,2409–2419.
- Hunt P, LeMaire R, Embury P, Sheehan L and 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.
- Koehler K, Hawley R, Shreman S and Hassold T (1996) Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet*,5.
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y and Verlinsky Y (2003) Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 6,54–59.
- LeMarie-Adkins R, Radke K and Hunt PA (1997) Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 139,1611–1619.
- Mahmood R, Brierley CH, Faed MJW, Mills JA and Delhanty JDA (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum Genet* 106, 620–626.
- Márquez C, Cohen J and Munné S (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 81,254–258.
- Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M and Munné S (2000) Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 1,17–27.
- Martini E, Flaherty S, Swann N, Matthews C, Ramaekers F and Geraedts J (2000) FISH analysis of six chromosomes in unfertilized human oocytes after polar body removal. *J Assist Reprod Genet* 17,276–283.
- Munné S and Weier U (1996) Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 75,263–270.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J and Cohen J (1995a) Embryo morphology, development rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64,382–391.
- Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J and Cohen J (1995b) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 10,1014–1020.
- Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert J and 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 and 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, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J and Sable D (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 7,91–97.
- Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M *et al.* (2004) Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 8,81–90.

- Nakaoka Y, Okamoto E, Miharu N and 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.
- Nicolaïdis P and Petersen M (1998) Origin and mechanisms of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 13,313–319.
- Pellestor F (1991a) Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Hum Reprod* 6,1252–1258.
- Pellestor F (1991b) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 86,283–288.
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C and 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.
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C and Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Human Genetics* 112,195–203.
- Pickering S, Johnson M, Braude PR and Houlston E (1988) Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 3,978–989.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J and Navarro J (2003) Analysis of nine chromosome probes in 1st polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 11,325–336.
- Sandalinas M, Márquez C and Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8,580–585.
- Schmiady H, Tandler-Schneider A and Kntenich H (1996) Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 11,2239–2245.
- Schon E, Kim S, Ferreira J, Magalhaes P, Grace M, Wardburton D and Gross S (2000) Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection? *Hum Reprod* 15,160–172.
- Simpson J (1990) Incidence and timing of pregnancy losses: relevance to evaluating safety of prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 35,165–173.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J and Martin RH (2004) Human male recombinations maps for individual chromosomes. *Am J Hum Genet* 74,521–531.
- Tarkowski A (1966) An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5,394–400.
- Uhlmann F (2004) The mechanism of sister chromatid cohesion. *Exp Cell Res* 296,80–85.
- Verlinsky Y and Kuliev A (1996) Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in fertile couples of advanced maternal age. *Hum Reprod* 11,2076–2077.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J *et al.* (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 and Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 19,846–851.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH and Delhanty JDA (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification, comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27,1214–1218.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA and 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.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R and McBain J (2003) Pre-implantation 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, Wang P and Casper R (1992) Evidence for maternal predisposition to chromosome aneuploidy in multiple oocytes of some in vitro fertilization patients. *Fertil Steril* 57,143–149.

Submitted on May 24, 2004; accepted on August 18, 2004

4.3. Aneuploidy 12 in a Rob(13;14) carrier: Case report

C. Gutiérrez-Mateo, L. Gadea, J. Benet, D. Wells, S. Munné, J. Navarro

Human Reproduction 2005; 20:1256-1260

Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report

C.Gutiérrez-Mateo^{1,4}, L.Gadea², J.Benet¹, D.Wells³, S.Munné^{2,3} and J.Navarro¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia i Genètica Mèdica, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain, ²Reprogenetics, 101 Old Short Hills Road, Suite 501, West Orange, NJ 07052, ³Institute for Reproductive Medicine and Science, St Barnabas Medical Center, 94 Old Short Hills Road, Livingston, NJ 07039, USA

⁴To whom correspondence should be addressed. E-mail: cristina.gutierrez@uab.es; joaquima.navarro@uab.es

In translocation carriers, the presence of aneuploidy for the chromosomes unrelated to the rearrangement may lead to an additional risk of abnormal pregnancy or implantation failure. Consequently, it may be important to analyse not only the chromosomes involved in the rearrangement but also the rest of chromosomes. We combined spectral karyotyping (SKY) and comparative genomic hybridization (CGH) to karyotype one unfertilized oocyte and its first polar body (1PB) from a Robertsonian translocation carrier t(13;14) aged 29 years who was undergoing IVF and preimplantation genetic diagnosis (PGD) for translocations and aneuploidy screening. Two out of four embryos were aneuploid, as a result of an adjacent segregation. The unfertilized oocyte had a normal/balanced constitution of the chromosomes involved in the reorganization. However, this 1PB–metaphase II doublet was aneuploid for chromosome 12, the oocyte being hyperhaploid (24, X, +12) and its 1PB hypohaploid (22, X, –12). The application of CGH for the study of Robertsonian translocations of maternal origin will be useful to study imbalances of the chromosomes involved in the rearrangement, as well as alterations in the copy number of any other chromosome. The combination of PGD for translocations with aneuploidy screening could help to reduce the replacement of chromosomally abnormal embryos.

Key words: CGH/first polar body/oocyte/SKY/translocation

Introduction

Robertsonian translocations are the most common structural chromosome abnormality found in humans and consist of a fusion of the short arms of two acrocentric chromosomes. The trivalent formed during meiosis I can produce either normal/balanced gametes (alternate segregation) or unbalanced gametes (adjacent segregation). Although most female translocation carriers are fertile, they have a high risk of recurrent spontaneous abortions and produce chromosomally abnormal offspring.

Several fluorescent *in situ* hybridization (FISH) approaches have been used for the preimplantation genetic diagnosis (PGD) of Robertsonian translocations in order to select gametes or embryos resulting from an alternate segregation. PGD based on blastomere analysis has involved the use of enumerator probes (locus-specific, α -satellite or subtelomeric) (Escudero *et al.*, 2000), while first polar body (1PB) analysis has focused on enumerator probes or chromosome painting probes (Durban *et al.*, 2001). PGD of translocations using FISH has achieved a significant reduction of spontaneous abortions (Munné *et al.*, 1998a) and helps to reduce the risk of delivering trisomic offspring (Munné *et al.*, 1998b). However, it is important to emphasize that some Robertsonian translocation carriers fail to achieve a pregnancy

after the replacement of embryos diagnosed as normal or balanced by PGD, and may even suffer from first trimester miscarriages (Escudero *et al.*, 2000; Durban *et al.*, 2001; Munné, 2002; Pujol *et al.*, 2003b). This could be explained by the presence of chromosome abnormalities involving other chromosomes different from those implicated in the rearrangement, which are generally the only ones analysed by FISH.

Interchromosomal effect (ICE) is defined as a structural chromosome abnormality that affects the meiotic segregation of other chromosomes unrelated to the rearrangement. Recently, some authors have combined PGD for translocations with PGD for aneuploidy screening (PGD-AS) for the analysis of up to 10 selected chromosomes (Gianaroli *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2003a). These authors suggest that an ICE may be important in the case of Robertsonian translocations, as a higher rate of aneuploidy was found for the chromosomes not involved in the reorganization compared with controls or with reciprocal translocation carriers.

Comparative genomic hybridization (CGH) and spectral karyotyping (SKY) are two techniques, which, unlike FISH, allow the analysis of the whole chromosome complement in a single cell (Márquez *et al.*, 1998; Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999).

We report on the use of CGH and SKY to detect imbalances not only of the chromosomes involved in a translocation, but also abnormalities of any other chromosomes in one MII oocyte and its 1PB. The use of CGH is desirable for the 1PB because karyotyping them by regular techniques or SKY is very inefficient.

Case report

The patient was a woman aged 29 years with primary infertility due to a Robertsonian translocation [45, XX, der(13;14)(q10;q10)]. She had five previous first trimester miscarriages; four were spontaneous and one was therapeutic. The patient underwent IVF treatment at the Institute for Reproductive Medicine and Science of Saint Barnabas Medical Center (West Orange, New Jersey, USA). Oocyte retrieval was performed by transvaginal follicular puncture. Eight out of 15 oocytes were at metaphase II (MII) stage and five were fertilized after IVF. Four out of five resulting embryos were biopsied on day 3 for PGD of the translocation. Additionally, one unfertilized oocyte was donated for research. The oocyte and embryos were analysed in accordance with guidelines set by the internal review board of that centre. Written informed consent was obtained and the project was approved by the institutional ethics committee.

Materials and methods

Single polar body isolation and oocyte spreading

The oocyte presented a single polar body (1PB) and no pronuclei 24 h after IVF. The zona pellucida was removed using acid Tyrode's. Isolation and lysis of the 1PB was performed as previously described (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004). The oocyte was spread after zona pellucida removal using the technique of Tarkowski (1966). The position of the oocyte was circled using a diamond pencil and the slide was frozen at -20°C until it was hybridized.

CGH analysis of the 1PB

The whole procedure was performed as previously described (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004) without modifications. Briefly, DNA from the isolated 1PB and a single buccal cell from a normal female (used as a reference sample in the CGH experiment) were amplified by DOP-PCR, labelled by nick translation and co-hybridized to normal male (46,XY) metaphase spreads (Vysis, USA) in a moist chamber at 37°C for 48 h. Metaphase preparations were examined using an Olympus AX 70 epifluorescence microscope. Metaphases were captured and analysed using a Cytovision Ultra Workstation (Applied Imaging, UK). The average red:green fluorescent ratio for each chromosome was determined by the CGH software supplied by Applied Imaging. Deviations of the ratio <0.8 (the test DNA is under-represented) or >1.2 (the test DNA is over-represented) were scored as loss or gain respectively of material in the test sample. Telomeric, centromeric and heterochromatic regions were excluded from the analysis for being non-informative.

Spectral karyotyping analysis of the MII oocyte

SKY was performed using the SKY kit (Applied Spectral Imaging, Inc., USA) as previously described (Márquez *et al.*, 1998) with some modifications. In brief, slides were denatured in 70% formamide/2 × standard saline citrate at 70°C for 1 min and taken through a cold alcohol series and air-dried. Denatured SKYPaint

probe was applied ($1\ \mu\text{l}$), covered with a $6\times 6\ \text{mm}$ coverslip and sealed with rubber cement. Hybridization took place at 37°C in a dark, moist chamber for 48 h. Post-hybridization washes and indirect labelling detection was done as previously described without modifications (Márquez *et al.*, 1998). The fixed oocyte was examined using an Olympus BX 60 epifluorescence microscope equipped with a triple bandpass fluorescence filter set (SKY-1; Chroma Technology). SKYVision spectral karyotyping software (Applied Spectral Imaging) was used to analyse both the inverted DAPI image and the RGB image obtained from the excitation of the five fluorochromes present in the SKY probe mixture.

FISH of the biopsied blastomeres

On day 3 of development, the embryos were biopsied and analysed, as previously described (Munné *et al.*, 1996). Two probes were used for test the chromosomes involved in the translocation, centromeric probe for chromosome 13 and subtelomeric probe for chromosome 14. Additionally, aneuploidy screening was performed using four more probes (chromosomes 16, 18, 21 and 22) hybridized during a second round of FISH.

Results

The results of the analysis are given in Table I. Four embryos were biopsied and analysed by FISH. Two out of four cleavage stage embryos were aneuploid for one of the chromosomes implicated in the rearrangement, indicating an adjacent segregation of the trivalent. No aneuploidy involving chromosomes 16, 18, 21 and 22 was found. Two embryos were normal or balanced for the chromosomes analysed and therefore they were transferred to the mother. Unfortunately, no pregnancy was obtained.

CGH analysis of the first polar body (1PB) and SKY results of the MII oocyte are shown in Figure 1. The interpretation of the CGH profile from the 1PB revealed an abnormal karyotype 22, X, -12 , as the CGH ratio for chromosome 12 showed a deviation below the threshold of 0.8, indicating loss. The reciprocal gain was found by SKY in the corresponding MII oocyte, confirming the CGH results and revealing that the oocyte had an extra chromosome 12 (24, X, $+12$). In this case, no aneuploidy affecting the chromosomes involved in the rearrangement (chromosomes 13 and 14) was found, indicating an alternate segregation. Moreover, the SKY analysis of the MII oocyte showed isolated chromosomes 13 and 14, with two chromatids each. Therefore, the translocated chromosome der(13;14) would have been segregated to the 1PB.

Table I.

Oocyte	CGH 1PB results	SKY MII results	FISH blastomeres results
6	22, X, -12	24, X, $+12$	–
1	–	–	Normal/balanced
3	–	–	Monosomy 14
4	–	–	Normal/balanced
5	–	–	Trisomy 13

CGH = comparative genomic hybridization; 1PB = first polar body; SKY = spectral karyotyping; MII = metaphase II oocyte; FISH = fluorescent *in situ* hybridization. FISH analysis was performed for chromosomes 13, 14, 16, 18, 21 and 22.

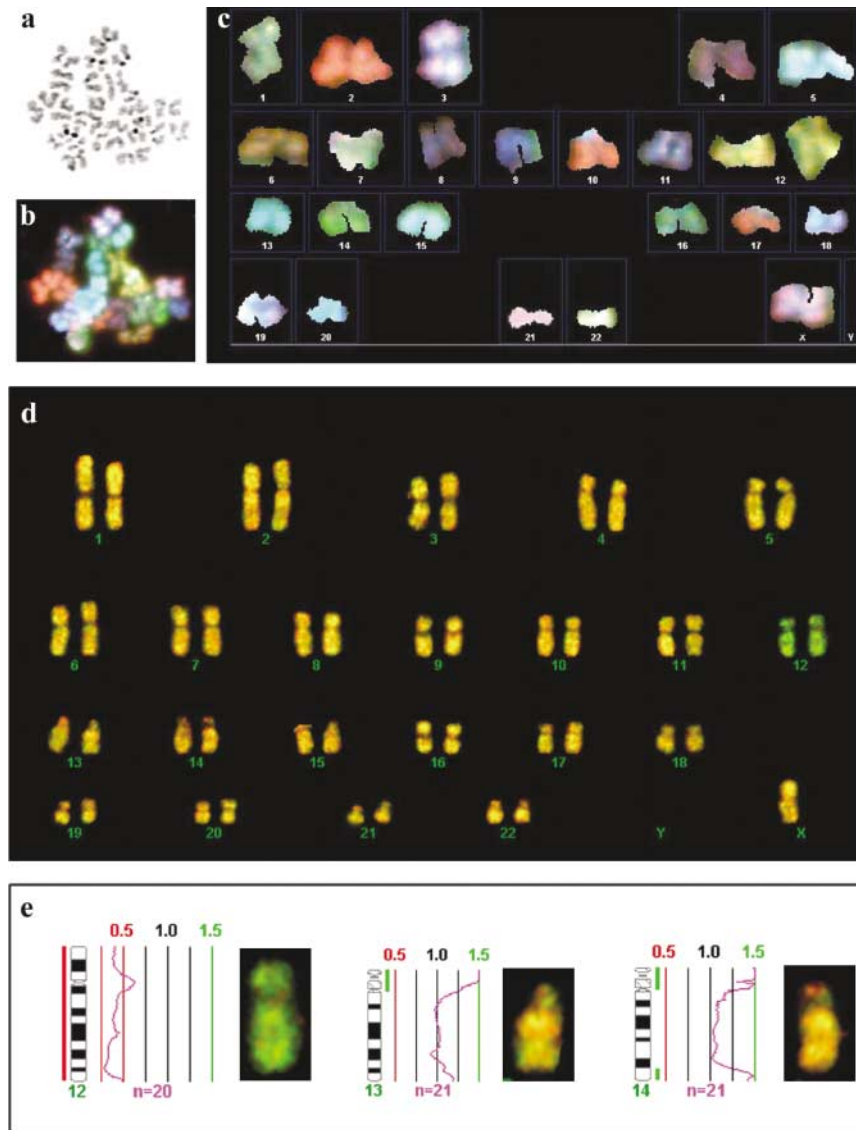


Figure 1. Spectral karyotyping (SKY) and comparative genomic hybridization (CGH) analysis of a metaphase II (MII) oocyte and its first polar body (1PB). (a) Inverted diamidino-2-phenylindole image to show the MII oocyte chromosomes spreading. (b) Composite spectra image after SKY. (c) 24-colour karyotype. An extra bivalent 12 is present within the MII oocyte. (d) CGH image of the 1PB. Chromosome 12 appears more green. (e) CGH profiles of chromosomes 12, 13 and 14. The CGH ratio of chromosome 12 is deviated to the left (<0.8) indicating loss. The CGH ratio of chromosomes 13 and 14 is close to 1.0 indicating a normal copy number of these chromosomes in the 1PB.

Discussion

In this case report, of the four blastomeres and one unfertilized oocyte analysed, two of the blastomeres and the oocyte were aneuploid. Two aneuploidies were related to the chromosomes involved in the translocations and one was unrelated. It is important to note that there is only one previously published FISH study in which chromosome 12 has been assessed in oocytes (Cupisti *et al.*, 2003). Consequently, aneuploidy of chromosome 12, such as detected in this case, is rarely observed in oocytes or cleavage-stage embryos, even in series which have used techniques such as CGH to analyse the copy number changes of every chromosome (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2004).

The fertilization of this oocyte, as long as the abnormality was not rescued in the second meiotic division, would have originated a trisomic embryo that may have failed to implant

or died after implantation, causing a spontaneous abortion. The current PGD approaches use probes only for the chromosomes involved in the translocation. Even in the case of combining PGD of translocations and PGD-AS for the detection of common aneuploidies (chromosomes 1, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22 and X) (Gianaroli *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2003b), chromosome 12 would not have been analysed and the oocyte would have been misdiagnosed as normal. It is worth emphasizing that the presence of embryo mosaicism may also increase the risk of misdiagnosis in PGD-AS, when only one cell is biopsied and analysed (Baart *et al.*, 2004; Los *et al.*, 2004).

Controversial data have been reported when studying inter-chromosomal effects (ICE) in sperm, embryos or oocytes from translocation carriers, with some reports finding evidence of this phenomenon (Pellestor *et al.*, 2001; Gianaroli

et al., 2002; Pujol *et al.*, 2003b) and others finding no evidence (Blanco *et al.*, 1998; Oliver-Bonet *et al.*, 2002). As suggested, the occurrence of ICE could be case specific and it may depend on the type of chromosomes involved in the reorganization and the fragments concerned (Estop *et al.*, 2000; Oliver-Bonet *et al.*, 2002; Pujol *et al.*, 2003b). All these studies have been performed using FISH for the analysis of up to 10 selected chromosomes; thus some imbalances involving other chromosomes would have gone unnoticed (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004). Considering that the frequency of aneuploidy in unfertilised oocytes can rise up to 47.5% (Pujol *et al.*, 2003a), the aneuploidy identified may not be representative of real ICE. Nevertheless, the transfer of abnormal embryos misdiagnosed as normal using FISH could lead to an additional risk of abnormal pregnancy or implantation failure in these patients. Therefore, it may be important to analyse not only the chromosomes involved in the rearrangement or the chromosomes most commonly involved in aneuploidy, but also any other chromosome.

In this case report, we have combined two techniques that provide data on the whole chromosome complement: SKY and CGH. SKY uses 24 chromosome-specific painting probes labelled with a combination of one to five different fluorochromes, so every chromosome can be differentiated from the others by their spectral colour. Considering that 1PB chromosomes are in metaphase up to 6h after oocyte retrieval, PGD of translocations can be performed using SKY to karyotype the 1PB chromosomes. This approach would allow the segregation of the translocation to be determined as well as permitting simultaneous analysis of the whole set of chromosomes. Moreover, SKY permits normal gametes to be distinguished from balanced gametes and therefore, when enough normal embryos were available, those would be preferentially transferred to avoid the perpetuation of the translocation in the family (Munné *et al.*, 1998a). However, SKY is a technique highly dependent on the fixation and spreading of the sample and the 1PB is a very small cell whose fixation requires a high level of skill. Consequently, if the spreading were insufficient, the chromosomes would be too close to be analysed. Conversely, if the 1PB was excessively scattered the risk of artifactual loss of chromosomes during fixation would increase (Munné *et al.*, 1998a). The difficulty in obtaining good 1PB spreads explains why <25% of polar bodies can be karyotyped by SKY (Márquez *et al.*, 1998; Munné, 2002; Sandalinas *et al.*, 2002).

On the other hand, CGH cannot detect alterations that do not involve gain or loss of DNA and therefore is unable to differentiate between balanced and normal gametes. However, the advantage of CGH compared with SKY is that being a DNA-based method, cell fixation is not required and as much as 83% of the 1PBs can be analysed, as recently reported (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004). Consequently, CGH would be a useful tool not only to detect unbalanced segregation of translocations, but also to make a reliable detection of aneuploidy (both hyperhaploidy and hypohaploidy) of any other chromosome. CGH has been applied clinically for the PGD-AS through 1PB analysis (Wells *et al.*, 2002), and recently the present authors have demonstrate their reliability

to detect unbalanced segregations of a maternal translocation (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004).

In conclusion, we have demonstrated that SKY and CGH can be combined for the study of any chromosome abnormality present in oocytes and polar bodies. More data using these methods may contribute to reveal which specific rearrangements induce an ICE during female gametogenesis. The clinical application of CGH for PGD of maternal translocations by 1PB analysis could help to reduce the replacement of aneuploid embryos and reduce the incidence of spontaneous abortions in these patients.

Acknowledgements

We thank Jorge Sánchez and Pere Colls for their collaboration in this work. This work was supported by Ministerio de Sanidad (FIS PI020168) and CIRIT (2001 SGR-00201). It has also been supported by Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (Cristina Gutiérrez-Mateo has a Beca para la formación de Personal Universitario; FPU).

References

- Baart EB, Van Opstal D, Los FJ, Fauser BCJM and Martini E (2004) Fluorescence in situ hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Hum Reprod* 19,685–693.
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N and Vidal F (1998) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83,275–280.
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJW and Delhanty JDA (2003) Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn* 23,663–668.
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Lailla JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J *et al.* (2001) PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update* 7,591–602.
- Escudero T, Michael L, Carrel D, Blanco J and Munné S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45, XY, t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 20,599–602.
- Estop AM, Cieply K, Munné S, Surti U, Wakim A and Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 106,517–524.
- Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T and Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 17,3201–3207.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, Egozcue J, Munné S and Navarro J (2004) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 19,2118–2125.
- Los FJ, Van Opstal D and Van den Berg C (2004) The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Hum Reprod Update* 10,79–94.
- Márquez C, Cohen J and Munné S (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 81,254–258.
- Munné S (2002) Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online* 4,183–196.
- Munné S, Dailey T, Finkelstein M and Weier H (1996) Reduction in signal overlap results in increased FISH efficiency: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 13,149–156.
- Munné S, Morrison L, Fung J, Márquez C, Weier H and Bahçe M (1998a) Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *J Assist Reprod Genet* 15,290–296.
- Munné S, Scott R, Sable D and Cohen J (1998b) First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil Steril* 69,675–681.

- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J and Benet J (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 8,958–963.
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B and Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Hum Reprod* 16,1155–1164.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J and Navarro J (2003a) Analysis of nine chromosome probes in 1st polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 11,325–336.
- Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J and 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 and Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 8,580–585.
- Tarkowski A (1966) An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5,394–400.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H and Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 19,846–851.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH and Delhanty JDA (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27,1214–1218.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA and 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.

Submitted on September 23, 2004; accepted on December 21, 2004

4.4. Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH

C. Gutiérrez-Mateo, J. Benet, H. Starke, M. Oliver-Bonet, S. Munné, T. Liehr, J. Navarro

Enviat a publicar

Title: Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH

Running title: CenM-FISH and CGH analysis of oocytes

Authors: C. Gutiérrez-Mateo^{1,5}, J. Benet¹, H. Starke², M. Oliver-Bonet¹, S. Munne^{3,4}, T. Liehr², J. Navarro^{1,5}

Addresses: ¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. ²Institute of Human Genetics and Anthropology, 07740 Jena, Germany. ³The Institute for Reproductive Medicine and Science, St. Barnabas Medical Center, 94 Old Short Hills Road, Livingston, NJ 07039, USA ⁴Reprogenetics, 101 Old Short Hills Road, Suite 501, West Orange, NJ 07052, USA. ⁵To whom correspondence should be addressed at: Cristina Gutiérrez, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Tel:+34 935811175; Fax:+34 935811025. E-mail:cristina.gutierrez@uab.es; joaquima.navarro@uab.es

Abstract

BACKGROUND: Metaphase II chromosome complements are difficult to karyotype. The objective of this study was to investigate the efficiency and limitations of cenM-FISH to analyse the whole chromosome complement within human oocytes. **METHODS:** Oocytes were donated by 34 patients undergoing ovarian stimulation and IVF. The metaphase II oocytes were analysed by means of cenM-FISH, while the confirmation of results was performed by FISH and/or by analysing the corresponding first polar bodies using CGH. **RESULTS:** A total of 30 cells, corresponding to 16 oocytes and 14 first polar bodies were successfully karyotyped by either cenM-FISH or CGH. The incidence of aneuploidy was 25% and eight out of nine aneuploidy events were confirmed by CGH and FISH. **CONCLUSIONS:** We demonstrate for the first time that the identification of any numerical abnormality in oocytes is feasible using cenM-FISH. Despite the fact that the fixation efficiency remains low, the present results confirm the advantage of analyzing the whole set of chromosomes to make an accurate estimation of the aneuploidy rate in human oocytes.

Key Words: aneuploidy/cenM-FISH/CGH/first polar body/oocyte

Introduction

Chromosome abnormalities are one of the major causes of embryo wastage during the first stages of development. As previously reported (Nicolaidis i Petersen 1998; Hassold i Hunt 2001), most aneuploidies in embryos have its origin in female meiosi. Consequently, the study of chromosome abnormalities of human oocytes and polar bodies (PBs) may reveal both the aneuploidy mechanisms and the preferential involvement of certain chromosomes.

Various approaches have been used for the analysis of available human oocytes, basically those excluded from IVF cycles for being immature or failed to fertilize after insemination (Pellestor *et al.* 2005). In the recent years, several reports have used various fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) strategies for the analysis of up to nine selected chromosomes (Anahory *et al.* 2003; Cupisti *et al.* 2003; Eckel *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a). In these studies one or two rounds of FISH are performed, but only about one third of the chromosomes per cell can be analysed due to technical problems (Liu *et al.* 1998).

A full chromosome count may provide meaningful data, since the analysis of only the chromosomes most frequently involved in aneuploidy is likely to underestimate the real incidence of aneuploidy in oocytes. Recent studies have reported that any chromosome can be involved in aneuploidy (Wilton 2005) and that about 30% of the chromosome abnormalities in oocytes and blastomeres would gone unnoticed if FISH for nine chromosome-specific probes had been used (Wilton *et al.* 2003a; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004b).

Up to date, the analysis of the full set of chromosomes of the oocyte has been performed using four different techniques, conventional karyotyping (Wall *et al.* 1996; Angell 1997; Pellestor *et al.* 2002), Spectral Karyotyping (SKY) (Márquez *et al.* 1998; Sandalinas *et al.* 2002), Multicolor fluorescence *in situ* hybridisation (M-FISH) (Clyde *et al.* 2001; Clyde *et al.* 2003) and Comparative Genomic Hybridisation (CGH) (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004b). Whereas conventional karyotyping, SKY and M-FISH are techniques that strongly depend on the spreading on metaphase chromosomes on slides, CGH is a DNA-based method which does not require cell fixation.

CenM-FISH is a 24-color FISH technique that uses centromere-specific probes labelled with different combinations of five fluorochromes. This technique allows the simultaneous identification of all chromosomes, excluding chromosomes 13 and 21, which are not differentiated (Nietzel *et al.* 2001). It has been applied in constitutional and cancer cytogenetics for the identification of small supernumerary marker chromosomes (sSMC) with nearly no euchromatin, which are difficult to classify using other techniques such as M-FISH, SKY or

CGH (Henegariu *et al.* 2001; Nietzel *et al.* 2001). It also has been applied for karyotyping synaptonemal complexes in spermatocytes from controls and infertile males (Oliver-Bonet *et al.* 2003; Sun *et al.* 2004; Oliver-Bonet *et al.* *In press.*).

In this work, we evaluated the reciprocity between the cenM-FISH results of the oocytes and the CGH results of their corresponding first polar bodies (1PBs) in order to investigate the efficiency, advantages and limitations of cenM-FISH, as a new technique for basic studies on human oocytes. The frequency of aneuploidy, the implication of two mechanisms of maternal aneuploidy and the benefits of the analysis of the whole set of chromosomes are also discussed.

Materials and methods

Oocyte and polar body recovery

A total of 54 oocytes were donated by 34 patients who due to different aetiologies were included in the IVF program of the Institute for Reproductive Medicine and Science of Saint Barnabas Medical Center (West Orange, New Jersey, USA). These oocytes were obtained in accordance with guidelines set by the internal review board of that center. Written informed consent was obtained from all patients and the project was approved by our institutional ethics committee. The oocytes used were oocytes retrieved at MI stage and matured in vitro and MII oocytes that failed to fertilize after in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Only those immature eggs that have reached MII stage (displaying a first polar body) 12-24 hours after retrieval and only those which showed no pronuclei and presented a first polar body (1PB) 24 after insemination were used in this study.

1PBs isolation and oocyte spreading

The zona pellucida was removed using acid Tyrode's. Isolation and lysis of the 1PBs were performed as previously described (Wells *et al.* 2002). Oocytes were spread after zona pellucida removal using a modification of a previously described method (Tarkowski 1966). The slides were frozen at -20°C until they were hybridised.

CGH analysis of 1PBs

All the procedure was performed as previously described (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004b). Briefly, DNA from the isolated 1PBs and single buccal cells from a normal female (reference sample in the CGH experiment) were amplified using degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR). Whole genome amplification products were fluorescently labelled by Nick Translation (Vysis, Downers-Grove, USA). 1PBs DNA (test) were labelled with Spectrum Red-dUTP (Vysis), whereas reference DNA was labelled with Spectrum Green-dUTP (Vysis). Labelled reference and test DNA were co-hybridised to normal male (46, XY) metaphase spreads (Vysis) in a moist chamber at 37°C for 40-72 hours. Metaphase preparations were examined using an Olympus BX 60 epifluorescence microscope. An average of 10 metaphases per hybridisation was captured and analysed using SmartCapture programa and Vysis Quips CGH programa, both supplied by Vysis. The average red/green fluorescent ratio for each chromosome was determined by the CGH programa. Deviations of the ratio below 0.8 (the test DNA is under-represented) or above 1.2 (the test DNA is over-represented) were scored as loss or gain of

material in the test sample, respectively. Telomeric, centromeric and heterochromatic regions were excluded from the analysis for being non informative.

CenM-FISH of the oocytes

CenM-FISH probes are non commercial centromere or subcentromere-specific probes which were prepared as previously described (Nietzel *et al.* 2001). Briefly, each probe was labelled separately by DOP-PCR with Spectrum Green-dUTP, Spectrum Red-dUTP, Spectrum Orange-dUTP, diethylaminocourmarine-dUTP and/or biotin-dUTP according to the labelling scheme showed in Table I. Labelled probes were mixed and ethanol precipitated with 2 µg of Cot-1-DNA to avoid cross-hybridisation of the different centromere-specific probes. The pellet was dried and stored at -20°C until it was used. Then, the pellet was resuspended in 10 µl of hybridisation mixture (50% formamide, 2 X SSC, 10% dextran sulphate, pH 7), denatured for 5 minutes at 75°C and prehybridised for 10 minutes at 37°C.

The cytoplasm was removed using pepsin (50 µg/ml) in HCl 10 mM at 37°C. Prior to FISH, the slides were postfixed at room temperature in 50mM MgCl₂/PBS for 5 minutes, 1% formaldehyde/50mM MgCl₂/PBS for 2 minutes and PBS for 5 minutes. The preparations were dehydrated, air dried, stained with DAPI and captured. DAPI was removed using 2 x SSC/0.05% Tween 20 solution for 5 minutes and then the slides were dehydrated and air dried. The slides were denatured in 70% formamide, 2 X SSC at 70°C for 1 minute and taken through a cold alcohol series and air dried. The cenM-FISH probe was applied to each slide and covered with a 5 x 5 mm coverslip. The slides were sealed with rubber cement and were allowed to hybridise overnight at 37°C in a dark moist chamber.

After hybridisation, the slides were washed three times in 50% formamide, 2 X SSC at 45°C for 10 minutes, followed by 10 minutes in 2 X SSC at 45°C and finally 5 minutes in 4 X SSC/0.05% Tween 20 at 45°C. Biotin labelling detection was done using a Cy5-avidin system. Finally, the slides were mounted in Vectashield (Vector Labs, Peterborough, UK) containing DAPI. Metaphase preparations were examined using an Olympus BX 60 epifluorescence microscope equipped with a CCD camera. Capture and analysis was performed using the SpectraVysion Sotware (Vysis). After capture the slides were rinsed in distilled water before being dehydrated in an alcohol series.

FISH analysis of MII oocytes

Centromeric, locus-specific and/or telomeric probes (Vysis) were used in order to confirm the aneuploidy detected by cenM-FISH in the oocyte. The probes were hybridised in one or two rounds of FISH, as previously described (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a). The slides were examined using a fluorescence microscope with filters for the fluorochromes used. Capture and analysis was performed using Smartcapture programa (Digital Scientific Cambridge, UK) and IPLab (Scanalytics, Inc, Vysis, USA). After visualization of the first round the slides were rinsed in distilled water before being dehydrated in an alcohol series.

Scoring criteria

The cenM-FISH probe was tested on spreads of normal male leukocytes. These centromeric probes usually gave one large signal or alternatively, two smaller paired signals corresponding to the two sister chromatids. The presences of additional signals were always considered as confirmed aneuploidies, while missing signals were only considered when the result was confirmed by CGH in the corresponding 1PB in order to avoid artefact.

Results

A total of 48 oocytes were obtained. Eight out of these 48 oocytes were either lost during fixation or showed no metaphase. Forty oocytes showed a metaphase after fixation, but six of them (15%) were incomplete or had excessively scattered chromosomes. Additionally, 14 oocytes (35%) had either premature chromosome condensation of sperm and or overlapping chromosomes that unable a proper cenM-FISH analysis, so they were also excluded from this study. The remaining 20 oocytes (41.6%) were hybridised with the cenM-FISH probe. Sixteen oocytes obtained from 15 patients (mean 32.9 years old, range 26-42) were successfully karyotyped by cenM-FISH (80%). Four out of these 16 oocytes were non-inseminated, matured in vitro oocytes; four failed to fertilize after IVF and eight failed to fertilize after ICSI. Fourteen out of their correspondent 1PBs were analysed by CGH (87.5%), as one 1PB was lost during isolation and the other one gave no CGH result because the hybridisation intensity was too weak.

The reciprocity rate between 1PB-CGH and oocyte-cenM-FISH was 93% (13/14), since one missing chromosome 4 was found by cenM-FISH in oocyte K whereas CGH analysis of its 1PB indicated a normal profile for all the chromosomes. According to this, doublet K was classified as normal, as an artifactual loss of chromosome 4 during spreading of the oocyte may has happened.

Four out of 16 oocytes were aneuploid (25%)(Table II). Except for the loss of chromosome 4 in doublet K, all the aneuploid events found by cenM-FISH were confirmed in a second or third round of FISH and by the CGH analysis of the corresponding 1PBs. The four abnormal oocytes were donated by four patients. A 32 years old patient donated the 1PB-oocyte doublet D, which presented a pre-division of chromatids of chromosome 13. Doublet E (Figure 1) was donated by a 36 years-old patient, and had a double aneuploidy for chromosomes 1 and 8 due to a non-disjunction and a pre-division of chromatids, respectively. 1PB-oocyte pair L had several aneuploidies involving chromosomes 10, 18 and 19 and it was obtained from another patient, aged 38 years old, who suffered from ovarian dysfunction. Finally, a 42 years-old patient donated doublet M, which had two pre-division of chromatids, one affecting chromosome 10 and the other affecting chromosome 21.

A total of eight aneuploid events involving chromosomes 1, 8, 10, 13, 18, 19 and 21 were found, five of them were chromatid abnormalities and three were due to non-disjunction. Age related aneuploidy was not analysed because the sample size was too small.

Discussion

The most important limitation of karyotyping oocytes by either conventional or by any 24-colour FISH techniques is the spreading of the chromosome material on slides because these techniques work only with very well spread metaphase chromosomes. (Weier *et al.* 2004). In this study, despite the cenM-FISH efficiency was as high as 80%, we only successfully karyotyped 16 oocytes from a total of 48 donated oocytes, so the overall efficiency was 33.3%. These results are consistent with other publications which reported similar overall efficiency rates in karyotyping human oocytes (from 31.6 to 35.8%) (Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003). Several problems such as overlapping of chromosomes, excessive spreading or artifactual loss of chromosomes have been described (Gutierrez-Mateo *et al.* 2005). It is important to note that even using a more gradual fixation technique (Kamiguchi *et al.* 1993), the efficiency rate remained low (45.9%) and 0.05% of oocytes displayed extreme aneuploidy (with fewer than 18 chromosomes in the metaphase plate), which suggest artifactual loss of chromosomes during fixation (Pellestor *et al.* 2002). CGH as a DNA-base method which does not involve cell fixation may help to overcome these limitations, providing a reliable complete karyotype in 87% of the analysed cells.

The aneuploidy rate was 25%, as four out of 16 doublets had errors. The incidence of chromosomal abnormalities in human oocytes varies extensively across the published data, even if we take into consideration only those studies which have evaluated the whole set of chromosomes to estimate the aneuploidy rate. Karyotyping data indicates that about 21% of the oocytes are aneuploid (Pellestor *et al.* 2005), while the aneuploidy rate found using Spectral Karyotyping (SKY) or Multicolor fluorescence *in situ* hybridisation (M-FISH) varies from 16.7% to 39% (mean 31.3%) (Márquez *et al.* 1998; Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003). The aneuploidy rate recently found using CGH is even higher, since about 52% of the 1PB-oocytes pairs were aneuploid (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004b). These variations could be attributed to differences in maternal age, source of oocytes, cohort size and study design (Clyde *et al.* 2003). Some aspects such as the fixation technique (if used), the incidence of artifactual loss of chromosomes, the presence of overlapping chromosomes as well as the criteria to select the analysed oocytes should also be taken into account to explain these discrepancies. In our hands, the analysis of both 1PB and metaphase II oocytes, provides the best internal control to make a reliable and accurate estimation of the aneuploidy rate in oocytes.

In this work, eight aneuploidy events were found. Apart from an artifactual loss of chromosome 4 in doublet K, all the chromosome abnormalities detected by cenM-FISH could be confirmed by FISH and CGH in the complementary 1PB. Five aneuploidies were due to premature separation of sister chromatids (predivision) whereas three were due to non-disjunction of bivalent chromosomes. It is important to note that both mechanisms can operate in the same cell leading to aneuploid doublets with both, missing or extra chromosomes and chromatids (Table II, doublets E and L). This finding is consistent with recent studies which have also indicated the co-existence of two mechanisms of maternal aneuploidy, with chromatid anomalies being the most common (Verlinsky *et al.* 1999; Sandalinas *et al.* 2002; Pellestor *et al.* 2003; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a). Interestingly, in the case of doublet E (Figure 1), CGH analysis of the 1PB was sensible enough to determine the mechanism leading aneuploidy. In this 1PB, deviation to the left of the CGH ratio of chromosome 8 was close to the threshold cut-off of 0.8, which corresponded to a single chromatid loss, as indicated by the cenM-FISH analysis of the correspondent oocyte. On the other hand, the more dramatic deviation of the CGH ratio of chromosome 1 (<0.5) corresponded to the lack of chromosome 1 in the 1PB, as showed the cenM-FISH results of the complementary oocyte. Nevertheless, it is important to emphasize that as long as the deviation of the CGH profile was close to the threshold cut-off of 0.8, non-disjunction of bivalents or premature separation of sister chromatids cannot easily be distinguished using CGH, as recently reported by our group (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a). Other techniques such as, SKY, M-FISH or cenM-FISH usually enables to determine whether a chromosome abnormality is due to predivision or to non-disjunction. However, it is important to emphasize that SKY and M-FISH, unlike cenM-FISH, use whole chromosome painting probes which commonly inflate the chromosomes and make harder the distinction of the mechanism of aneuploidy (Márquez *et al.* 1998; Sandalinas *et al.* 2002). Consequently, in some cases it was necessary an additional conventional FISH analysis after SKY to investigate predivision (Márquez *et al.* 1998).

Even though age-related aneuploidy was not analysed because the sample size was too small, it is important to note that three out of the four aneuploid doublets came from women aged >35 years old.

CGH analysis of blastomeres have detected aneuploidies of all chromosomes (Wilton 2005). In this work, aneuploidies for chromosomes 1, 8, 10, 13, 18, 19 and 21 were found. As previously reported (Wilton *et al.* 2003a; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutiérrez-Mateo

et al. 2004b), if we had used FISH to analyse only the chromosomes included in current PGD panels for aneuploidy screening (commonly chromosomes 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X and Y), some of these aneuploidies would not have been detected. Despite that, some of these aneuploid doublets would have correctly identified as abnormal because they had multiple aneuploidies, some of them affecting chromosomes included in the 9-chromosome-FISH panel (i.e. doublet L and M) (Abdelhadi *et al.* 2003). However, it is important to emphasize that 25-30% of the aneuploid doublets (i.e. doublet E in the present study) would have been incorrectly diagnosed as normal using FISH for nine chromosomes (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004a; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2004b). Therefore, the analysis of only some selected chromosomes may underestimate the real aneuploidy rate of human oocytes (Anahory *et al.* 2003; Cupisti *et al.* 2003).

One disadvantage of cenM-FISH compared to SKY or M-FISH is that chromosomes 13 and 21 cannot be differentiated by their color code because both chromosomes had almost identical α -satellite sequences (Nietzel *et al.* 2001). However, in oocytes, the distinction between these two chromosomes can usually be made on the basis of their size. Additionally, cenM-FISH provides information only about the centromeric regions of the chromosomes but not about the remainder chromosome. Consequently, it cannot detect specific structural rearrangements, which can be identified with CGH, SKY or M-FISH, which give information about the full length of the chromosomes.

On the other hand, the particular morphology of the oocyte chromosomes and the difficulty to obtain good chromosome banding have limited the data obtained from the conventional karyotyping reports, since specific chromosome aneuploidy is rarely identified and some of the chromosome counts that have been published might be biased by the erroneous classification of single chromatids as additional chromosomes (Pellestor *et al.* 2005). Considering that unlike SKY and M-FISH, cenM-FISH can be performed on a previously G-banded slide (Nietzel *et al.* 2001), this technique would be appropriate to re-analyse the whole chromosome complement of previously karyotyped R-banded oocyte chromosomes (Wall *et al.* 1996; Pellestor *et al.* 2002).

Additionally, some sSMC had been found in infertile couples referred for assisted reproduction techniques (Clementini *et al.* 2005). Some of these markers have barely any euchromatin and thus they cannot be clearly identified by either M-FISH or SKY, which use expensive commercial whole chromosome painting probes that do not cover the centromeric regions of human chromosomes (Liehr *et al.* 2004). Otherwise, cenM-FISH

would enable the study and characterization of such markers as well as the identification of any other numerical chromosome abnormality in human oocytes, as previously reported in prenatal and postnatal samples (Nietzel *et al.* 2001).

In conclusion, we have reported the first application of cenM-FISH in human oocytes and our preliminary results prove that cenM-FISH is a reliable method to detect any numerical chromosome abnormality at meiosis I either due to non-disjunction of chromosomes or premature separation of sister chromatids. Its combination with 1PB-CGH analysis enables an accurate estimation of the aneuploidy rate and provides a useful new technique for basic studies on human oocytes. The use of seven fluorochromes instead of five, will allow a maximum of two-fluorochrome combination for each chromosome, which may achieve a reduction of the number of signals per channel thus facilitating the identification of signals in certain overlapping situations and improving the karyotyping efficiency of this technique (Azofeifa *et al.* 2000). Our results also confirm the advantage of a full chromosome analysis over the FISH analysis of only some selected chromosomes.

Acknowledgemens

This work was supported in part by Ministerio de Sanidad (FIS PI020168) and CIRIT (2001 SGR-00201). It has also been supported by Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (C. Gutiérrez-Mateo has a Beca para la formación de Personal Universitario; FPU) and by Dr. Robert Pflieger-Stiftung, the “Förderverein des Klinikums der FSU Jena e.V.”

References

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munné S (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 6:226-231
- Anahory T, Andréo B, Régnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M, Demaille J, Pellestor F (2003) Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Molecular Human Reproduction* 9:577-585
- Angell R (1997) First-Meiotic-Division Nondisjunction in Human Oocytes. *American Journal of Human Genetics* 61:23-32
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR (2000) An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *American Journal of Human Genetics* 66:1684-1688
- Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM (2005) Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Human Reproduction* 20:437-442
- Clyde JM, Gosden RG, Rutherford AJ, Picton HM (2001) Demonstration of a mechanism of aneuploidy in human oocytes using Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 76:837-840
- Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ, Picton HM (2003) Karyotyping of human metaphase II oocytes by Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 80:1003-1011
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJW, Delhanty JDA (2003) Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenatal Diagnosis* 23:663-668
- Eckel H, Kleinstein J, Wieacker P, Stumm M (2003) Multi-locus (ML)-FISH is a reliable tool for nondisjunction studies in human oocytes. *Cytogenet Cell Genet* 103:47-53
- Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez M, Sánchez-García J, Egozcue J, Navarro J, Munné S (2004a) Aneuploidy study of human oocytes by 1PB-CGH and MII-FISH analysis. *Human Reproduction* 19:2859-2868
- Gutiérrez-Mateo C, Gadea L, Benet J, Wells D, Munné S, Navarro J (*In press*) Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report. *Human Reproduction* 20:1256-1260

- Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil 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. *Human Reproduction* 19:2118-2125
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Review Genetics* 2:280-291
- Henegariu O, Bray-Ward P, Artan S, Vance G, Qumsyieh M, Ward D (2001) Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (CM-FISH). *Laboratory investigation* 81:475-481
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K (1993) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Human Genetics* 90:533-541
- Liehr T, Claussen U, Starke H (2004) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenetic and Genome Research* 107:55-67
- Liu J, Tsai Y, Zheng X, Yazigi R, Baramki T, Compton G, Katz E (1998) Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 4:972-977
- Márquez C, Cohen J, Munné S (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenetics and Cell Genetics* 81:254-258
- Nicolaidis P, Petersen M (1998) Origin and mechanisms of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Human Reproduction* 13:313-319
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, *et al.* (2001) A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108:199-204
- Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, *et al.* (*In press.*) Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Human Reproduction*
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, *et al.* (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *European journal of human genetics* 11:879-883
- Pellestor F, Anahory T, Hamamah S (2005) The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Human Reproduction Update* 11:15-32

- Pellestor F, Andréo 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. *Human Reproduction* 17:2134-2145
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Human Genetics* 112:195-203
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J, Navarro J (2003) Analysis of nine chromosome probes in 1st polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *European Journal of Human Genetics* 11:325-336
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Molecular Human Reproduction* 8:580-585
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH (2004) Human male recombinations maps for individual chromosomes. *The American Journal of Human Genetics* 74:521-531
- Tarkowski A (1966) An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, *et al.* (1999) Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16:165-169
- Wall M, Marks K, Smith T, Gearon C, Muggleton-Harris A (1996) Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected "failed-fertilized" human oocytes. *Human Reproduction* 11:2230-2238
- Weier H-U, Weier J, Oter-Renom M, Zheng A, Colls P, Nureddin A, Pham C, Chu L, Racowsky C, *et al.* (2004) Fluorescence in situ hybridization and spectral imaging analysis of human oocytes and first polar bodies. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 52:1-4
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA, Munné S (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility* 78:543-549

Wilton L (2005) Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Human Reproduction Update* 11:33-41

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. *Fertility and Sterility* 80:860-868

Tables

Table I. Labelling scheme of the centromere-specific probes of all chromosomes used in cenM-FISH.

	Spectrum Red	Spectrum Orange	Spectrum Green	Diethyl-amino coumarin	Byotin-Cyanine 5
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13/21					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
22					
X					
Y					

Table II. Summary of the chromosome abnormalities presently found

1PB-oocyte	Age	Procedure	Infertility cause	CGH results of the 1PB	CenM-FISH results of the oocyte	Confirmed by FISH
D	32	IVF	endometriosis	22, X, -13	23, X, +cht 13	yes
E	36	MIV	tubal origin	21, X, -1, -8	24, X, + 1, +cht 8	yes
L	38	ICSI	ovary disfunction	24, X, +10, -18, +19	21, X, +18, -19, -cht 10	yes
M	42	ICSI	unspecified	23, X, +10, -21	23, X, -cht 10,+cht 21	yes

cht= chromatid

Figure

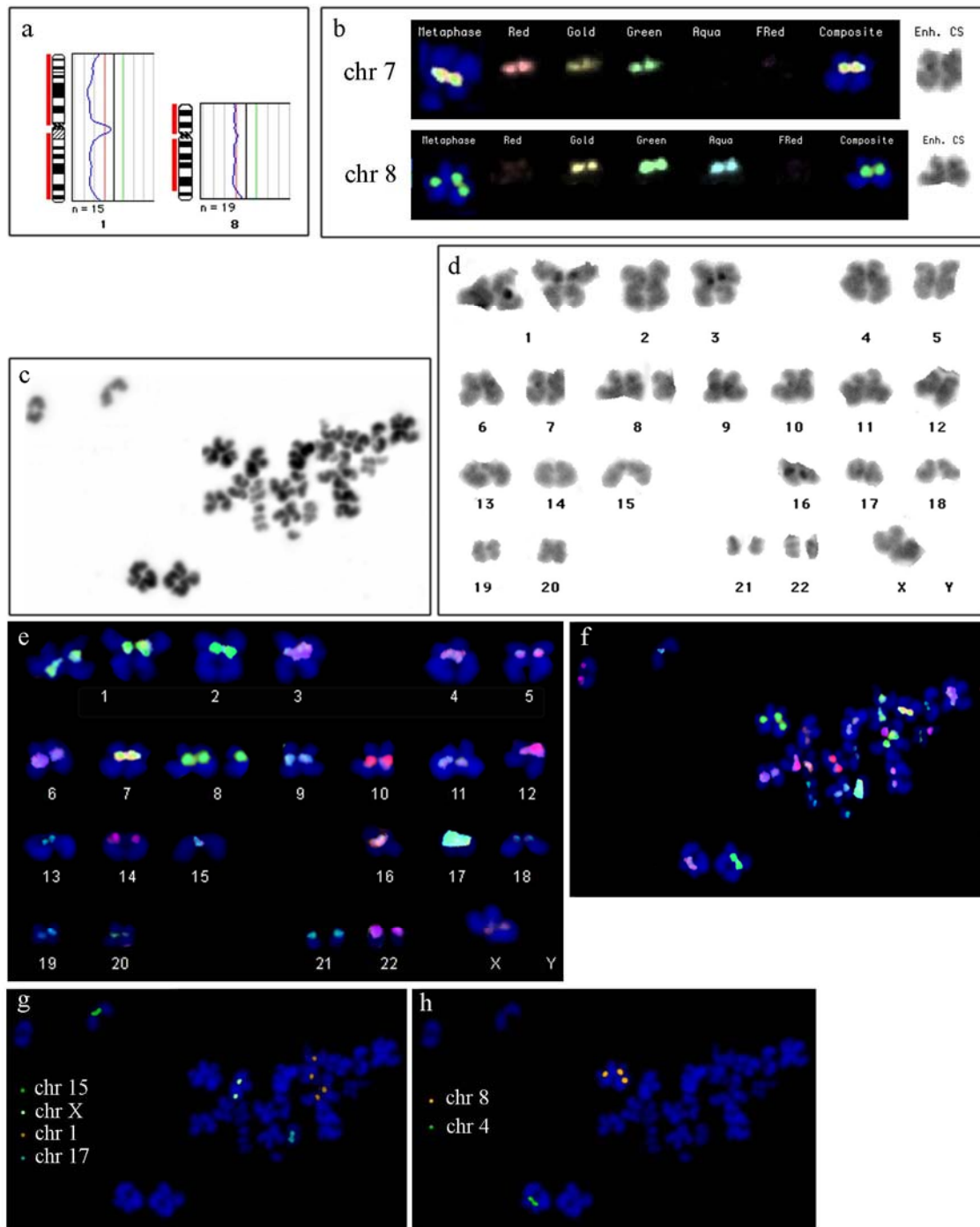


Figure legend**Figure**

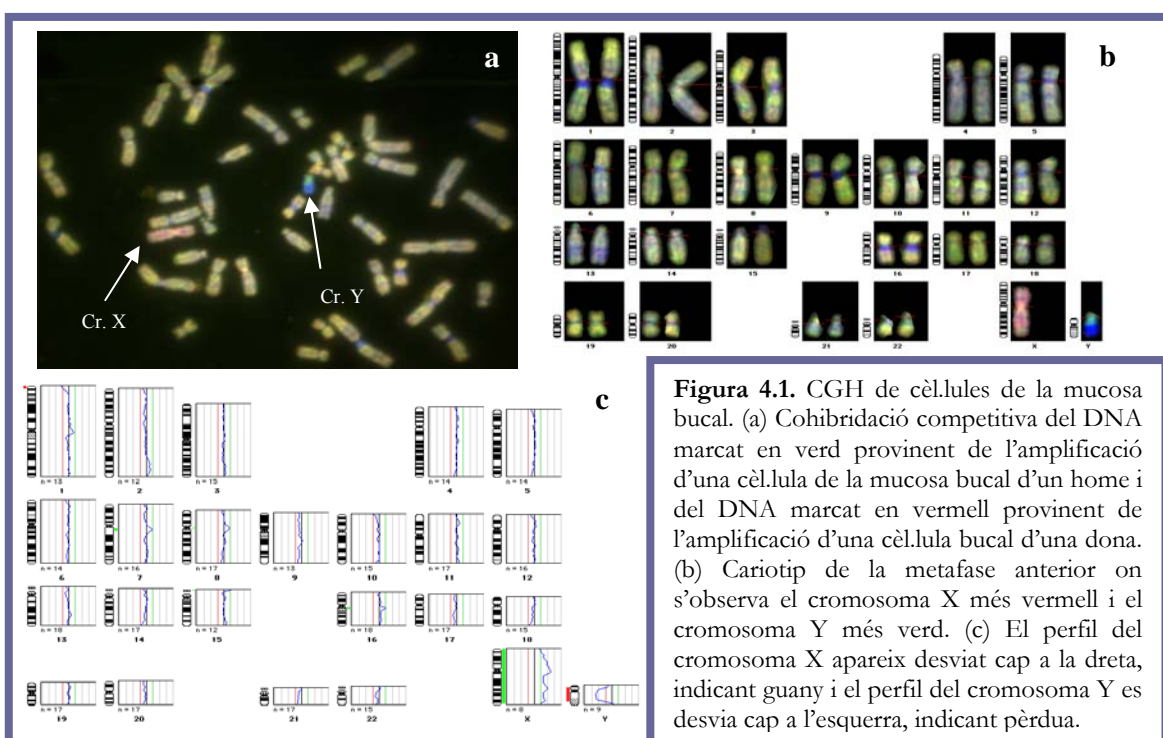
CGH, cenM-FISH and FISH results from the doublet E (Table II). (a) CGH results from the 1PB showing a deviation to the left of the CGH ratio indicating loss of chromosomes 1 and 8. (b) CenM-FISH signals which enable the identification of two different chromosomes. (c) Inverted diamidino-2-phenylindole image showing the MII oocyte chromosomes spreading. (d) Inverted diamidino-2-phenylindole image of the karyotype. (e) CenM-FISH analysis of the oocyte indicating an extra chromosome 1 and an extra chromatid 8. (f) CenM-FISH of the oocyte. (g) and (h) FISH analysis of the oocyte.

4.5. RESULTATS GLOBALS

A continuació es resumeixen els resultats obtinguts.

4.5.1. Posada a punt de la CGH en cèl.lules aïllades

L'anàlisi de cèl.lules aïllades mitjançant CGH s'ha posat a punt inicialment en cèl.lules de la mucosa bucal i en DNA extret de sang perifèrica diluït aproximadament fins a 100 pg/ μ l. En aquesta posada a punt es van utilitzar els protocol descrits per Wells *et al.* (1999) i Voullaire *et al.* (1999), sense modificacions. El DNA amplificat d'una cèl.lula de la mucosa bucal d'una dona, constituïa el DNA problema (marcat en vermell) i el DNA obtingut de l'amplificació d'una cèl.lula bucal d'un home, constituïa el DNA control (marcat en verd). Els cromosomes que presenten igual nombre de còpies en ambdós DNAs, DNA problema i DNA control, apareixen en la hibridació grocs, i la relació entre fluorescència vermella i verda calculada pel programa és pròxima a 1,0, excepte en les regions heterocromàtiques, centròmriques i telòmeriques. En el cas dels cromosomes sexuals, el cromosoma X apareix més vermell respecte de la resta de cromosomes, i el cromosoma Y apareix més verd (Figura 4.1). Això es visualitza en uns perfils de CGH desviats per aquests cromosomes, sent la relació fluorescència vermella/verda per al cromosoma X $>1,2$ (perfil desviat a la dreta, que indica guany del cromosoma en el DNA problema) i per al cromosoma Y $<0,8$ (desviat a l'esquerra i, per tant, que indica pèrdua del cromosoma en el DNA problema).



4.5.2. Optimització, validació i eficiència dels protocols desenvolupats

4.5.2.1. Optimització de la lisi cel.lular i la DOP-PCR

La lisi cel.lular i l'amplificació total del genoma de la cèl.lula s'han optimitzats introduint algunes modificacions al protocol prèviament esmentat (Wells *et al.* 1999):

- El temps d'inactivació de la proteïnasa K es va reduir de 15 a 10 minuts.
- Es va reduir el temps de desnaturalització inicial de la PCR de 9 a 4,5 minuts.
- Es va disminuir el nombre de cicles de 50 a 40.
- Es va augmentar el temps d'extensió d'1,5 a 3 minuts.
- I, finalment, es va substituir la SuperTaq polymerase (HT Biotechnology, UK) per la SuperTaq Plus (Ambion) i la temperatura d'extensió de 72°C per la de 68°C.

En general, aquestes modificacions s'han dirigit a obtenir productes d'amplificació molt més llargs. Si els productes d'amplificació són petits, quan aquests es marquen amb *Nick Translation* el DNA es talla i, per tant, la mida d'aquests fragments disminueix per sota del rang òptim per fer una CGH (de 300 a 3000 pb), i s'obtenen hibridacions granuloses i amb molt soroll de fons.

La SuperTaq Plus és una Taq que polimeritza a 68°C i que té activitat correctora (*proof reading*). Aquesta Taq permet obtenir productes de PCR de fins a 20 kb i en el cas d'amplificacions de cèl.lules aïllades els fragments superaven fàcilment les 5 kb. En canvi, en el cas de la SuperTaq polymerase els fragments rarament superaven les 2 kb (Figura 4.2).

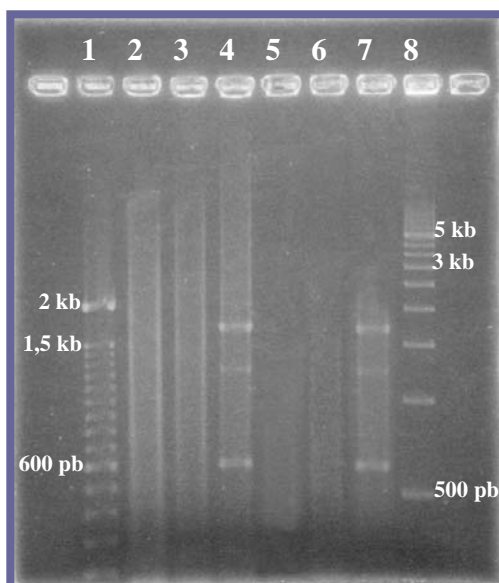


Figura 4.2. Productes de DOP-PCR de cèl.lules aïllades utilitzant dues Taq Polimerases diferents. (1) Patró de bandes de 100 parells de bases (2) 3 cèl.lules de la mucosa bucal amplificades amb Super Taq Plus (Ambion). (3) Producte de DOP-PCR d'un 1CP amplificat amb la mateixa Taq. (4) Amplificació de l'oòcit complementari. Les bandes situades a 600, 1250 i 1700 pb corresponen a l'amplificació del DNA mitocondrial. (5) Negatiu de la PCR que mostra una pinzellada de menor pes molecular. (6) Producte d'amplificació d'un 1CP amb SuperTaq polymerase (HT). (7) DOP-PCR de l'oòcit complementari amplificat amb la mateixa Taq. (8) Patró de bandes de 500 parells de bases.

El protocol desenvolupat amb aquestes mateixes modificacions s'ha aplicat a l'amplificació del genoma de primers corpuscles polars i de MIIs d'òcits.

4.5.2.2. Optimització de la CGH aplicada a cèl.lules aïllades

En l'optimització del protocol de CGH descrit per Voullaire *et al.* (1999) s'han introduït els canvis següents:

- Prèviament al marcatge amb *Nick Translation* no es precipiten els productes d'amplificació.
- El temps de marcatge amb *Nick Translation* s'ha d'ajustar a 2 hores.
- La sonda de CGH un cop desnaturalitzada no es deixa prehibridant a 37°C.
- Es pot reduir el temps d'hibridació de 72 a 40 hores fant prèviament una hibridació d'una hora en el microones a 70 W.
- Els rentats posthibridació s'han fet a més temperatura (73°C) però durant menys temps.

Aquestes modificacions han permès disminuir la durada del protocol sense disminuir-ne la fiabilitat i l'eficiència. Això és de gran importància a l'hora de fer casos clínics de PGD.

4.5.2.3. Eficiència dels protocols utilitzats

L'eficiència de la DOP-PCR en cèl.lules aïllades ha estat del 90,1% (155 cèl.lules amplificades d'un total de 172), mentre que l'eficiència de la CGH ha estat del 89,7% (139 cèl.lules amb resultat de CGH d'un total de 155 cèl.lules amplificades). Per tant, l'eficiència global de la CGH en cèl.lules aïllades ha estat del 80,1% (139/172).

Pel que fa a l'eficiència de fixació de les MIIs, en un 83,3% (45 de 54) de les MII fixades s'ha obtingut una extensió adequada per a la posterior anàlisi amb FISH, mentre que només un 41,6% (20 de 48) de les MIIs fixades donaven una extensió cromosòmica adient per a l'anàlisi amb cenM-FISH.

L'eficiència de la FISH per analitzar un mínim de 4 cromosomes ha estat del 93,3% (42 de 45) i, per tant, l'eficiència global per analitzar amb FISH les MIIs ha estat del 77,8% (42 de 54). Pel que fa al cenM-FISH s'ha aconseguit una eficiència del 80% (16 de 20) però

l'eficiència global baixa al 33,3% (16 d'un total de 48) per raó de l'etapa crítica de fixació del material.

4.5.2.4. Determinació de falsos positius

S'han detectat desviacions artefactuals dels perfils de les regions centromèriques, telomèriques, heterocromàtiques i dels braços 1p i 16p així com dels cromosomes 17, 19 i 22. Normalment aquestes regions són excloses de l'anàlisi.

Els artefactes de la regió 1p33-pter, del braç 16p i dels cromosomes 17, 19 i 22 s'han trobat aproximadament en un 20% de les cèl.lules analitzades. Aquests artefactes poden aparèixer tots junts en una mateixa cèl.lula o bé de manera aïllada (per exemple, una cèl.lula amb només un artefacte per al cromosoma 19). Sovint les desviacions dels perfils van cap a la dreta, la qual cosa indica guany, però de vegades també s'han observat desviacions cap a l'esquerra que s'interpretarien com a pèrdues de material. S'ha observat, però, que quan dos o més artefactes apareixen en una mateixa cèl.lula tots ells apareixen bé com a guanyats o com a perduts. Per tant, en vista dels nostres resultats, si una cèl.lula presenta un guany de 1p i del cromosoma 19 (possiblement falsos positius) però una pèrdua del cromosoma 22, la pèrdua del cromosoma 22 hauria de ser considerada com a real (Figura 4.3).

4.5.2.5. Detecció d'errors de cromosoma i de cromàtida

L'anàlisi de parelles 1CP-MII combinant la CGH amb tècniques que permeten la discriminació entre anomalies de cromosoma i de cromàtida (FISH, SKY, cenM-FISH) ha mostrat que la CGH aplicada a cèl.lules aïllades és capaç de detectar tant guanys o pèrdues de cromosoma com de cromàtida. A més a més, les dades mostren que utilitzant la CGH els guanys són més difícils de detectar. Això es deu a que en les hipohaploïdies es perd d'un 50% (si es perd una cromàtida) a un 100% del material (si es perd un cromosoma), mentre que en les hiperhaploïdies es guanya només d'un 33% (guany de cromàtida) a un 50% del material (si es guanya un cromosoma) (Figura 4.4).

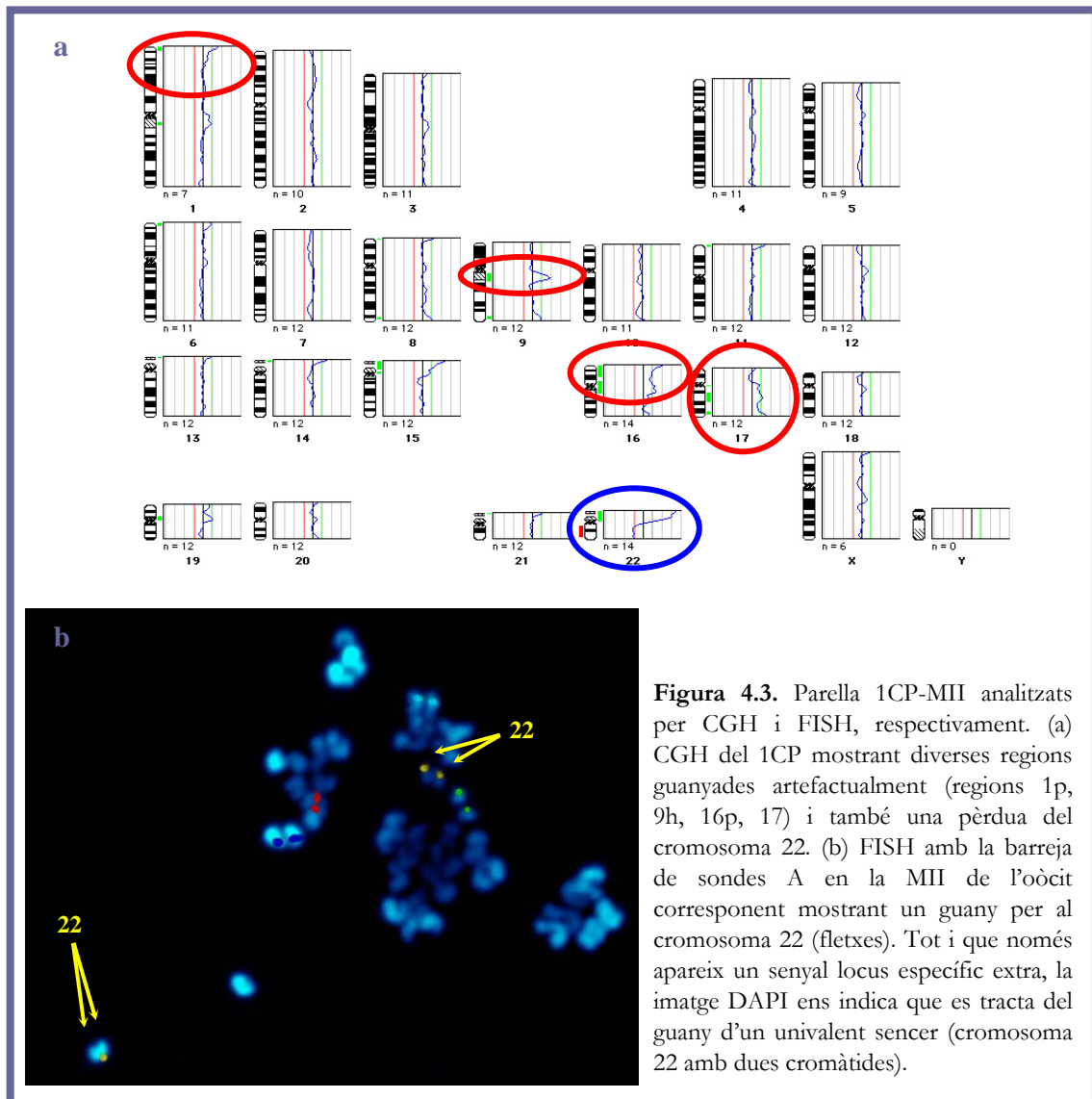


Figura 4.3. Parella 1CP-MII analitzats per CGH i FISH, respectivament. (a) CGH del 1CP mostrant diverses regions guanyades artefactualment (regions 1p, 9h, 16p, 17) i també una pèrdua del cromosoma 22. (b) FISH amb la barreja de sondes A en la MII de l'oòcit corresponent mostrant un guany per al cromosoma 22 (fletxes). Tot i que només apareix un senyal locus específic extra, la imatge DAPI ens indica que es tracta del guany d'un univalent sencer (cromosoma 22 amb dues cromàtides).

Els perfils de CGH mostren desviacions similars en casos d'errors de cromàtida o de cromosoma, sobretot en casos de guany de material. A causa d'això, la diferenciació entre errors de cromàtida o de cromosoma mitjançant la CGH només ha estat possible en alguns casos de pèrdues de cromosoma, on s'observa una desviació molt marcada del perfil de CGH $< 0,5$ (Figura 4.4.a.; cromosomes 1 i X).

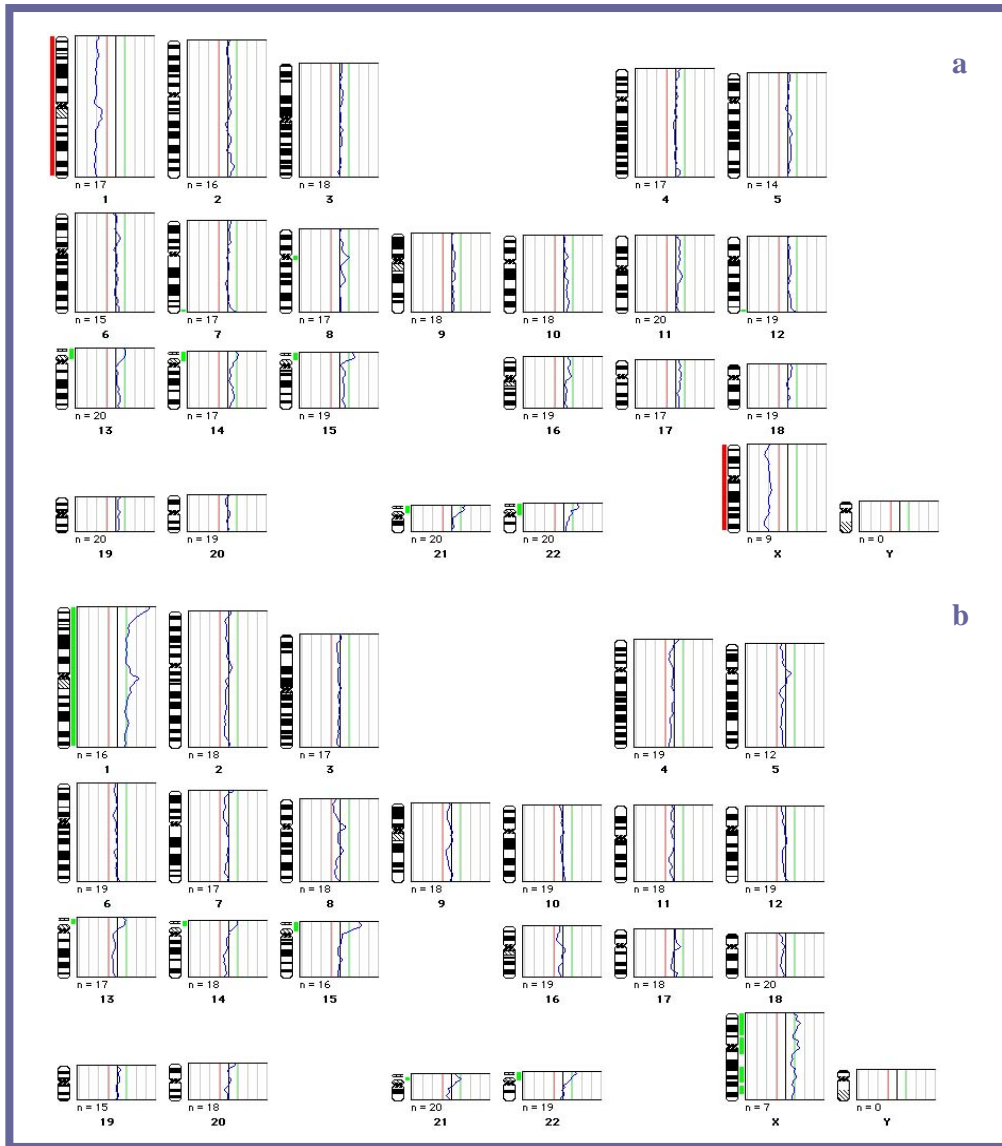


Figura 4.4. Resultat de CGH d'una parella 1CP-MII amb dues aneuploïdies. (a) CGH de la MII mostrant dues pèrdues del 100% del material dels cromosomes 1 i X (nullisomia o pèrdua de cromosoma). (b) CGH de l'1CP que mostra dos guanys dels cromosomes 1 i X, que representen un guany del 50% del material total.

4.5.3. Anàlisi d'anomalies cromosòmiques

S'han analitzat un total de 199 cèl.lules que es divideixen en dos grups. El primer grup inclou oòcits de dones amb cariotip normal, de les quals s'han analitzat 81 parelles 1CP-MII i 25 cèl.lules sense parella (23 1CPs i 2 MII). El segon grup inclou 6 parelles 1CP-MII provinents de dones portadores d'una translocació equilibrada.

4.5.3.1. Oòcits provinents de dones amb cariotip normal

S'han analitzat un total de 106 oòcits, corresponents a 81 parelles 1CP-MII i 25 complements sols (23 1CPs i 2 MII). Els 104 1CPs d'aquesta sèrie s'han analitzat amb CGH, mentre que les 83 MIIs s'han analitzat amb CGH, FISH o cenM-FISH.

Els 106 oòcits van ser donats per 71 dones (mitjana d'1,49 oòcits per dona), sotmeses a estimulació ovàrica i punció fol·licular en un dels centres de fecundació assistida col·laboradors. Tot i que alguns oòcits provenien de donants (13 oòcits), la majoria d'oòcits provenien de pacients sotmeses a un tractament d'infertilitat en aquests centres. La majoria de dones van donar un (45 dones) o dos oòcits (21 dones) però quatre dones van donar tres oòcits i una dona en va donar set. Les dones tenien edats compreses entre 21 i 42 anys, amb una mitjana de 33,9 anys.

La taxa d'oòcits aneuploides ha estat del 45,3%, ja que 48 de les 106 mostres analitzades tenien anomalies cromosòmiques (Taula 4.1). S'ha trobat un total de 80 aneuploidies, repartides de la manera següent: 28 oòcits (58,3%) presentaven una sola aneuploidia, 12 oòcits en presentaven dues (25%) i, finalment, 8 oòcits tenien 3 o més errors cromosòmics (16,6%). Un 66,3% (53/80) d'aquestes aneuploidies s'han confirmat amb el resultat de l'altre membre de la parella 1CP-MII. Tanmateix, si només considerem les aneuploidies presents en les parelles 1CP-MII, el nombre d'aneuploidies confirmades puja al 82,8% (53/64) ja que algunes aneuploidies no tenen confirmació per no tenir la parella analitzada. D'aquestes 53 aneuploidies complementàries entre 1CP i MII, s'ha trobat un petit excés de pèrdues cromosòmiques en els 1CPs (28 pèrdues i 25 guanys) i, per tant, també un petit excés de guanys en les MIIs (28 guanys respecte a 25 pèrdues).

Un total de 47 aneuploidies s'han detectat amb FISH o cenM-FISH (Taula 4.1). D'aquestes, 15 aneuploidies són degudes a una no-disjunció de cromosomes (31,9%) mentre que 32 es deuen a una separació precoç de cromàtides germanes (68,1%).

Taula 4.1. Anomalies cromosòmiques en primers corpuscles polars (1CP) i en MIIs d'oòcits (MII)

Oòcit	Edat pacient	Protocol	Resultat 1CP (CGH)	Resultat MII (CGH/FISH/cenM-FISH)
1	38	MIV	24, X, +21	22, X, -21
3	24	MIV	23, X	22, -X
4	39	MIV	22, X, -6	24, X, +6
7	41	MIV	22, X, -7	23, X
8	41	MIV	22, X, -13	23, X
9	37	MIV	23, X, +2, -15	23, X, -2, +15
10	39	MIV	22, X, -2	24, X, +2
12	21	MIV	25, XX, +1	21, -X, -1
16	22	MIV	23, X	22, -X
19	37	MIV	23, X	22, X, -19
22	40	MIV	24, X, +15	22, X, -15
25	40	MIV	22, X, -9	24, X, +9
3t	30	MIV	22, X, -7	SR
1b	39	ICSI	23, X, -17, +22	+cht 17, -cht 22
2a	40	ICSI	22, X, +3, -4, -21	-cht 3, +cht 4, +cht 21
4a	35	ICSI	23, X, +4, -16	-chr 4, +cht 16
5a	42	MIV	23, X, +7, -14	-cht 7, +cht 14
8a	36	MIV	23, X	+cht 18
9a	37	IVF	24, X, +1	-cht 1
10b	37	IVF	24, X, +16	Normal pels cromosomes analitzats
11a	38	MIV	22, X, -1	+cht 1
12a	41	IVF	24, X, +1	-chr 1
16a	42	MIV	23, X, +4, -8	+chr 8
19a	40	ICSI	23, X, -4, -13, +16, -18	+cht 4, +cht 15, -cht 16 +cht 18, +chr X
20a	32	MIV	22, X, -16	+cht 16
23a	38	IVF	23, X, -6, +15, +17, -22	+cht 6, -cht 15, -cht 17, +cht 22
24b	36	IVF	21, X, -4, -17	+cht 4, +cht 17
24c	36	ICSI	22, X, -22	+chr 22
26a	33	ICSI	22, X, -1	+chr 1
27a	41	MIV	25, X, +9, +19	-chr 9, -chr 19
28a	38	MIV	24, X, +19	-cht 19
29a	26	MIV	24, X, +1	-chr 1
31a	41	MIV	24, X, +19	-cht 19
34b	27	ICSI	24, X, +22	-chr 22
34d	27	ICSI	24, X, +10	-cht 10
34e	27	ICSI	24, X, +22	-chr 22
35a	29	IVF	20, X, -6, -13, -18	+cht 6, +cht 13, +cht 18
9t	40	ICSI	23, X, +1, -15	SR
10t	37	MIV	22, X, +14, -15, -17	SR
11t	38	IVF	22, X, +1, -16, -19	SR
15t	27	ICSI	24, X, +22	SR
17t	29	IVF	23, X, -16, +21	SR
D	32	IVF	22, X, -13	24, X, +cht 13
E	36	MIV	21, X, -1, -8	25, X, +1, +cht 8
L	38	ICSI	24, X, +10, -18, +19	22, X, -cht 10, +18, -19
M	42	ICSI	23, X, +10, -21	23, X, -cht 10, +cht 21
22t	37	MIV	24, X, -1, +3, +12	SR
24t	38	ICSI	24, XX	SR

En la interpretació dels perfils de CGH els guanys i pèrdues només s'han considerat com a tals quan superaven el límit d'1,2 o de 0,8, respectivament. SR = sense resultat; Xt= oòcits no inclosos a cap article.

S'ha observat complementarietat dels resultats en el 86,4% de les 81 parelles 1CP-MII analitzades. En 11 parelles els resultats entre l'1CP i la MII no eren recíprocs (Taula 4.2). En cinc parelles 1CP-MII analitzades per CGH (parelles 3, 7, 8, 16 i 19) un dels complements mostrava una pèrdua cromosòmica mentre que l'altre no mostrava el guany complementari. En les sis parelles restants, els 1CPs s'ha analitzat també amb CGH però les MIIs s'han fixat i s'han analitzat amb FISH o cenM-FISH. Dues d'aquestes parelles presenten una pèrdua cromosòmica en la MII mentre que no s'observa el corresponent guany en el perfil de CGH del corresponent 1CP (parelles 32a i K). A més a més, tres parelles amb un guany cromosòmic en l'1CP o en la MII no presenten la pèrdua corresponent en l'altre complement (parelles 8a, 10b i 16a). I finalment, la parella 19a presenta diverses aneuploidies en l'1CP i en la MII, algunes d'elles confirmades en ambdós complements però en d'altres no.

Taula 4.2. Parelles 1CP-MII amb resultats no complementaris.

Oòcit	Edat pacient	Protocol	Resultat 1CP (CGH)	Resultat MII (CGH/FISH/cenM-FISH)
3	24	MIV	23, X	22, -X
7	41	MIV	22, X, -7	23, X
8	41	MIV	22, X, -13	23, X
16	22	MIV	23, X	22, -X
19	37	MIV	23, X	22, X, -19
8a	36	MIV	23, X	+cht 18
10b	37	IVF	24, X, +16	Normal pels cromosomes analitzats
16a	42	MIV	23, X, +4, -8	+chr 8
19a	40	ICSI	23, X, -4, -13, +16, -18	+cht 4, +cht 15, -cht 16 +cht 18, +chr X
32a	35	MIV	23, X	-chr 1
K	33	MIV	23, X	22, X, - 4

S'han dividit les mostres en dos grups d'edats, un format per 50 oòcits provinents de dones menors de 35 anys (29,2 anys de mitjana), i l'altre format per 56 oòcits de dones entre 35 i 42 anys (38,1 anys de mitjana). En el grup de dones <35 anys s'han trobat 14 oòcits aneuploides i, per tant, la incidència d'aneuploidies en aquest grup d'edat és d'un 28%. En canvi, la taxa d'aneuploidies en el grup de dones de ≥ 35 anys és del 60,7%, ja que 34 dels 56 oòcits presenten anomalies cromosòmiques. Les diferències entre la incidència d'aneuploidia d'aquests dos grups d'edat és estadísticament molt significativa ($P = 0,0015$).

Les mostres també s'han dividit en funció de l'origen dels oòcits analitzats. Del total de 106 oòcits analitzats, 58 oòcits van ser descartats dels cicles de FIV per estar en estadi de MI en el moment de la punció fol·licular. Els 48 oòcits restants, en canvi, no es van classificar com a fecundats, 24 hores després d'una fecundació in vitro convencional (19 oòcits) o després d'una ICSI (29 oòcits). Les taxes d'aneuploidia trobades en aquests dos grups són molt similars (43,1% i 47,9% respectivament; $P = 0,7645$), i les diferències entre la incidència d'aneuploidia de tots tres grups, madurats in vitro (43,1%), fallada de fecundació in vitro (47,4%) i fallada d'ICSI (48,3%) tampoc no mostren diferències significatives.

S'han trobat aneuploidies per a gairebé qualsevol cromosoma, amb l'excepció dels cromosomes 5, 11 i 20 (Taula 4.3). Els cromosomes que més freqüentment han estat implicats en aneuploidia han estat, per ordre: el cromosoma 1 (10 vegades), els cromosomes 15, 16, 19 i 22 (6 vegades cadascun), els cromosomes 4 i X (5 vegades), els cromosomes 13, 17, 18 i 21 (4 vegades), els cromosomes 6, 7 i 10 (3 vegades), els cromosomes 2, 3, 8, 9 i 14 (2 vegades) i finalment el cromosoma 12 que va estar involucrat en una aneuploidia. Considerant dos grups de cromosomes segons la seva mida: cromosomes grans (grups A-C + cromosoma X) i cromosomes petits (grups D-G), en general, s'han detectat més aneuploidies de les esperades (42 respecte de 35 d'esperades) per als cromosomes petits, i menys aneuploidies de les esperades per al grup dels grans (38 respecte de 45 d'esperades). Tanmateix, les diferències entre aquests dos grups no són estadísticament significatives ($P = 0,103$). Els grups A, E i G són els que en general presenten més aneuploidies. És important destacar, però, que la distribució d'aneuploidies dins d'aquests grups és molt diferent. Mentre que en els grups E i G la incidència d'aneuploidies és força uniforme pels diferents cromosomes; en el grup A, la majoria d'aneuploidies corresponen a aneuploidies del cromosoma 1.

Taula 4.3. Aneuploidies trobades en 1CPs i MIIs

Cromosoma	Aneuploidies detectades amb CGH en 1CP o MII	Aneuploidies confirmades amb CGH en 1CP o MII	Aneuploidies confirmades en MII amb FISH		Aneuploidies confirmades en MII amb cenM-FISH		Total d'aneuploidies confirmades	Aneuploidies no confirmades amb CGH/ FISH	Aneuploidies no confirmades (sense parella)	Aneuploidies totals (%)
			No-disjunció	Previsió	No-disjunció	Previsió				
1	10	1	3	2	1		7	0	3	10 (12,5)
2	2	2	0	0			2	0	0	2 (2,5)
3	2	0	0	1			1	0	1	2 (2,5)
4	5	0	1	3			4	1	0	5 (6,25)
5	0	0	0	0			0	0	0	0 (0)
6	3	1	0	2			3	0	0	3 (3,75)
7	3	0	0	1			1	1	1	3 (3,75)
8	2	0	1	0		1	2	0	0	2 (2,5)
9	2	1	1	0			2	0	0	2 (2,5)
10	3	0	0	1		2	3	0	0	3 (3,75)
11	0	0	0	0			0	0	0	0 (0)
12	1	0	0	0			0	0	1	1 (1,25)
13	4	0	0	1		1	2	2	0	4 (5)
14	2	0	0	1			1	0	1	2 (2,5)
15	5	2	0	1+1*			3	0	2	6 (7,5)
16	6	0	0	3			3	1	2	6 (7,5)
17	4	0	0	3			3	0	1	4 (5)
18	3	0	0	2+1*		1	3	0	0	4 (5)
19	6	0	2	1		1	4	1	1	6 (7,5)
20	0	0	0	0			0	0	0	0 (0)
21	4	1	0	1			3	0	1	4 (5)
22	6	0	3	2			5	0	1	6 (7,5)
X	4	1	1*	0			1	2	1	5 (6,25)
Total	77	9	11+1*	25+2*	3	5	53	8	16	80 (100)

* L'anàlisi amb FISH de la MII indica una hiperhaploïdia però l'1CP corresponent mostra un perfil de CGH normal per aquests cromosomes

4.5.3.2. Oòcits provinents de dones portadores de translocacions equilibrades

S'han analitzat sis parelles 1CP-MII provinents de tres dones portadores d'una translocació equilibrada (Taula 4.4). Concretament, s'han analitzat dues parelles 1CP-MII d'una dona portadora d'una translocació robertsoniana 45, XX, der(13;15)(q10;q10), tres parelles provinents d'una dona portadora d'una translocació robertsoniana 45, XX, der(13;14)(q10;q10) i, finalment, una parella d'una dona portadora d'una translocació recíproca 46, XX, t(1;5)(q21.1;p13.1). En aquest grup, els 1CPs han estat analitzats mitjançant CGH mentre que les MII s'han analitzat bé amb CGH o amb SKY.

Les cinc parelles 1CP-MII de les dones portadores d'una translocació robertsoniana són el resultat d'una segregació alternant en meiosi I de manera que tant els 1CPs com les MII tenen una dotació equilibrada dels cromosomes implicats en la translocació. Tanmateix, una de les cinc parelles té una aneuploïdia del cromosoma 12 detectada tant per CGH com per SKY. En el cas de la dona amb la translocació recíproca t(1;5), la parella 1CP-MII és el resultat d'una segregació adjacent 2 i, per tant, ambdós complements són desequilibrats. El cromosoma 1 i el seu derivatiu han segregat al 1CP i, per consegüent, la cèl.lula té un guany de 1pter-1q21.1 i una pèrdua de 5p13.1-5qter. De forma complementària, el cromosoma 5 i el seu derivatiu han segregat a la MII de manera que aquesta presenta un guany de 5p13.1-5qter i una pèrdua de 1pter-1q21.

Taula 4.4. Anàlisi de parelles 1CP-MII de dones portadores de translocacions equilibrades.

Oòcit	Edat pacient	Translocació	Protocol	Resultat 1CP (CGH)	Resultat MII (CGH/SKY)
1	29	t(13;14)	IVF	Normal o equilibrat	Normal o equilibrat
2	29	t(13;14)	IVF	Normal o equilibrat	Normal o equilibrat
3	35	t(13;15)	MIV	Normal o equilibrat	Normal o equilibrat
4	35	t(13;15)	MIV	Normal o equilibrat	Normal o equilibrat
5	35	t(1;5)	MIV	23, X, +der 1, -5	23, X, -1, +der 5
6	29	t(13;14)	IVF	22, X, -12	24, X, +12

4.6. PGD en primer corpuscle polar mitjançant CGH

S'ha fet un PGD-AS en una dona d'edat materna avançada (42 anys). Es van obtenir set oòcits madurs per punció fol·licular. La biòpsia de l'1CP es va fer mitjançant làser. Es va obtenir resultat de CGH en cinc dels set 1CPs (71,4%) ja que un 1CP es va perdre després de la biòpsia i un altre no va donar producte d'amplificació després de la DOP-PCR. Els resultats d'aquests cinc 1CPs es van obtenir el dia +4 (comptant com a dia 0 el dia de la punció fol·licular)(Taula 4.5).

Taula 4.5. Resultats del DGP en 1CP mitjançant CGH

1CP	Interpretació de la CGH	Resultat en l'embrió
2	23, X, -21, +22	Potencialment inviable a causa de la monosomia 22 o de la trisomia 21
3	23, X	Cromosòmicament normal
5	24, XX	Potencialment inviable a causa de la monosomia X
6	23, X	Cromosòmicament normal
7	21, X, -19, -22	Potencialment inviable a causa de la trisomia 19 i 22

Tres dels cinc 1CPs analitzats eren aneuploides (60%). Les aneuploidies afectaven els cromosomes 19, 21, 22 i X. Dos oòcits van ser cromosòmicament normals i es va recomanar la transferència dels embrions resultants. Tanmateix, l'oòcit 6 no es va fecundar correctament i l'oòcit 3, tot i ser fecundat correctament va donar lloc a un embrió amb 8 blastòmers a dia +4 però amb més d'un 50% de fragmentació. L'embrió resultant de la fecundació de l'oòcit 3 es va transferir a l'úter matern. Malauradament no es va aconseguir l'embaràs.

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

5.1. POSADA A PUNT I OPTIMITZACIÓ DE LA CGH PER A L'ANÀLISI DE CÈL.LULES AÏLLADES

5.1.1. Amplificació total del genoma de la cèl.lula

El protocol de la hibridació genòmica comparada (CGH) requereix un mínim de 200 ng de DNA (Kallionemi *et al.* 1992). Això correspon al DNA que contenen unes 25.000-50.000 cèl.lules diploides (Kuukasjärvi *et al.* 1997) ja que una sola cèl.lula conté només de 5 a 10 picograms de DNA (Vendrely 1955). Per tant, per realitzar una CGH a partir del contingut de DNA d'una sola cèl.lula, és imprescindible l'amplificació total del genoma de la cèl.lula (Whole Genome Amplification, WGA).

El primer que cal fer per amplificar el DNA d'una cèl.lula és trencar la membrana plasmàtica i l'embolcall nuclear per alliberar el DNA al medi. Tot i que hi ha diverses estratègies per a lisar una cèl.lula (introduir les cèl.lules en una solució hipotònica com per exemple l'aigua, en nitrogen líquid...), els dos sistemes de lisi més utilitzats són la lisi alcalina (KOH/DTT) i la lisi mitjançant proteïnasa K/SDS. La lisi alcalina resulta força efectiva però no s'ha utilitzat perquè el KOH (base forta) desnatura el DNA de la cèl.lula. A més, el DTT, a diferència de la proteïnasa K, trenca els ponts disulfur però no degrada les proteïnes.

La proteïnasa K, en canvi, és una endopeptidasa que digereix les proteïnes de membrana però no interfereix amb el DNA de la cèl.lula (El-Hashemite i Delhanty 1997). S'adquireix lliure de DNA, de DNases i de RNases, fet molt important a l'hora de treballar amb cèl.lules aïllades. A més, té l'avantatge que també degrada possibles DNases que puguin ser-hi presents i que introduirien talls en el DNA de la cèl.lula. A més a més, el detergent SDS desestructura els lípids de membrana i incrementa fins a set vegades l'activitat de la proteïnasa K.

S'han avaluat diferents mètodes de WGA que permeten la posterior realització d'una CGH (Wells *et al.* 1999): la *degenerate oligonucleotide primed* PCR o DOP-PCR (Telenius *et al.* 1992), la *primer extension preamplification* o PEP-PCR (Zhang *et al.* 1992), la *tagged*-PCR o T-PCR (Grothues *et al.* 1993) i, finalment, la alu-PCR (Lengauer *et al.* 1992). La PEP-PCR i la DOP-PCR aconseguen l'amplificació del 91% o del 89% del genoma, respectivament, mentre que la T-PCR i la alu-PCR aconseguen un percentatge d'amplificació força

menor. Així com la PEP-PCR no mostra evidències d'amplificacions preferencials de certes regions del genoma, la DOP-PCR, la T-PCR i la alu-PCR sí que amplifiquen certes seqüències més eficientment que altres. Tanmateix, amb la PEP-PCR s'obté molta menys quantitat de DNA que amb els altres mètodes i això dificulta el posterior anàlisi amb CGH. El mètode de WGA que ha donat millor resultats per poder fer després la CGH ha estat la DOP-PCR, que, a partir d'una única cèl.lula i utilitzant *primers* parcialment degenerats, ha permès obtenir diversos micrograms de DNA i hibridacions intenses i homogènies. Utilitzant aquest mètode es poden arribar a obtenir 20 µg de DNA a partir de l'amplificació d'una sola cèl.lula (Wells i Delhanty 2000).

En la posada a punt de la tècnica d'amplificació total del genoma en cèl.lules aïllades (DOP-PCR) s'han introduït diferents modificacions al mètode descrit per Wells i col (1999) que anaven dirigides a disminuir la durada del protocol per poder aplicar-lo al PGD, així com a l'obtenció de productes d'amplificació més llargs:

- El temps d'inactivació de la proteïnasa K s'ha reduït de 15 a 10 minuts.
- El temps de desnaturalització inicial s'ha reduït de 9 a 4,5 minuts.
- S'ha disminuït el nombre de cicles de 50 a 40.
- S'ha augmentat el temps d'extensió d'1,5 a 3 minuts.

- I, finalment, s'ha substituït la SuperTaq polimerasa (HT Biotechnology, UK) per la SuperTaq Plus (Ambion) i la temperatura d'extensió de 72°C per la de 68°C.

Les nostres mostres test o problema (MII, 1CPs, cèl.lules bucals) contenen únicament dues còpies de DNA i, per tant, és molt important preservar la seva integritat. En l'optimització del protocol s'han escurçat les etapes d'inactivació de la proteïnasa K i les de desnaturalització ja que en la DOP-PCR es fan a més de 90°C. Les temperatures elevades o els canvis bruscos de temperatura poden fer malbé el genoma de la cèl.lula ja que es poden produir talls en el DNA que farien que els productes de l'amplificació fossin més curts. A més, els temps de desnaturalització massa llargs, també fan que la Taq Polimerasa perdi activitat.

L'augment del temps d'extensió i sobretot la utilització de la SuperTaq Plus han afavorit l'obtenció de productes d'amplificació més llargs. Això fa que el temps de marcatge del DNA amb *Nick Translation* pugui ser de dues hores sense causar un escurçament excessiu de les sondes de CGH i obtenir fragments de longituds òptimes per la CGH (de 300-3000 pb). La SuperTaq Plus, és una barreja de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* i d'una DNA polimerasa termostable que té activitat correctora (*proof reading*). La fidelitat de síntesi

de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* és aproximadament de 10^{-4} (Tindall i Kunkel 1988), és a dir, per cada 9.000 nucleòtids s'incorpora erròniament un nucleòtid. En el cas de la Super Taq Plus, en lloc d'aturar-se la síntesi de DNA, la DNA polimerasa amb activitat correctora repara l'error i la síntesi continua. D'aquesta manera s'obtenen productes de PCR de més de 5 Kb a partir de cèl.lules úniques. Pel contrari, amb la SuperTaq polymerase (composta només de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*) els fragments rarament superen les 2 Kb. La elecció de la Taq polimerasa s'ha considerat com un factor clau en l'amplificació del genoma total de cèl.lules úniques (Piyamongkol *et al.* 2003).

El nombre de cicles s'ha disminuït ja que la intensitat i eficiència de la CGH no millora en realitzar 50 cicles en lloc de 40 en l'etapa d'amplificació. Això ha permès escurçar en una hora el protocol d'amplificació.

El fet que els controls de contaminació (controls negatius) s'observin en un gel d'agarosa amb una pinzellada de DNA de menor pes molecular que la resta d'amplificacions de cèl.lules aïllades també ha estat descrits prèviament per altres autors (Telenius *et al.* 1992; Larsen *et al.* 2001). Com que els primers de DOP tenen una seqüència parcialment degenerada, aquesta pinzellada de DNA seria més aviat atribuïble a la formació de dímers de primers o bé de a l'amplificació de bacteris i/o d'altres cèl.lules no humanes. Els nostres resultats avalen aquesta explicació ja que quan s'han utilitzat els productes de l'amplificació d'aquests controls negatius com a sonda de CGH, no s'ha observat senyal d'hibridació.

Quan s'ha utilitzat oli mineral exposat a la llum ultraviolada per cobrir les mostres s'ha produït la inhibició de la DOP-PCR. Aquest fet ja ha estat descrit anteriorment per altres autors (Dohner *et al.* 1995).

Com ja s'ha mencionat, la DOP-PCR té aproximadament una eficiència del 89% per cobrir i amplificar la totalitat del genoma d'una cèl.lula (Wells i col, 1999) però també existeixen llocs d'*annealing* preferencial pels primers de DOP (Telenius *et al.* 1992). Els productes d'amplificació de les MIIs i dels blastòmers, a diferència dels de 1CPs, mostren en un gel d'agarosa la pinzellada de DNA típica, més unes bandes intenses, de aproximadament 600 i 1200 i 1600 pb. Això indica que certes seqüències, que són abundants en MIIs (i blastòmers) però no tant en 1CPs, són amplificades preferencialment durant la DOP-PCR. S'ha suggerit que aquestes seqüències podrien ser de DNA mitocondrial (Voullaire *et al.* 2000) i els nostres resultats podrien ser una altra evidència indirecta que corroboren aquesta proposta ja que els 1CPs, a diferència de les MIIs i dels blastòmers són cèl.lules petites, amb molt poc citoplasma, i amb un contingut mitocondrial molt menor (Gitlin 2003).

L'existència de llocs d'amplificació preferencial durant la DOP-PCR fa que l'amplificació de totes dues mostres, DNA test i també DNA control, sigui la millor estratègia ja que les dues sondes amb les quals es fa la cohibridació han de ser equivalents per obtenir resultats de CGH fiables. Hi ha diversos estudis que, utilitzant la tècnica de DOP-PCR-CGH mostren que, efectivament, els perfils de CGH fluctuen menys si el DNA utilitzat com a control també és amplificat amb DOP-PCR (Klein *et al.* 1999; Voullaire *et al.* 1999; Huang *et al.* 2000; Larsen *et al.* 2001).

5.1.2. Hibridació genòmica comparada en material amplificat

Alguns estudis demostren que la DOP-PCR-CGH proporciona una informació citogenètica equivalent a l'obtinguda mitjançant la CGH estàndard (Harada *et al.* 2000; Larsen *et al.* 2001).

Inicialment, en la posada a punt de la tècnica de CGH en cèl.lules aïllades es va utilitzar el protocol descrit per Voullaire *et al.* (1999) que va permetre obtenir bones hibridacions partint de cèl.lules de la mucosa bucal i de DNA amplificat. Tot i així, l'esmentat protocol s'ha millorat sobretot quant a la durada del procés. D'aquesta manera, certes etapes s'han escurçat i altres s'han eliminat.

El pas de precipitació dels productes d'amplificació no es du a terme. Aquesta etapa permet eliminar dNTPs i *primers* sobrants del procés d'amplificació (entre altres) així com concentrar tot el producte d'amplificació resultant d'una sola cèl.lula (els 45 μ l) en un volum menor per marcar-lo. Es va veure, però, que aquests components no interferien en el procés de marcatge posterior i que el marcatge de només la meitat del producte d'amplificació (22,5 μ l) era suficient per obtenir bones hibridacions. A més a més, el fet que el producte d'amplificació d'una sola cèl.lula (45 μ l) fos suficient per a fer dues CGHs, va permetre fer canvis en el protocol (per exemple, escurçar el temps de hibridació) i comparar ambdós resultats obtinguts a partir del material amplificat de la mateixa cèl.lula. L'eliminació de l'etapa de precipitació ha permès, a més, escurçar el protocol unes dues hores.

El marcatge es fa mitjançant *Nick Translation* durant 2 hores en lloc de 8, i s'incrementa la concentració de l'enzim responsable del marcatge. S'han descrit diverses estratègies per al marcatge de productes d'amplificació de cèl.lules aïllades: el marcatge amb PCR i el marcatge amb *Nick Translation*. Tot i que el marcatge mitjançant una segona ronda de DOP-PCR permetia estalviar temps i simplificar el protocol (Wells *et al.* 1999), aquesta

opció no ha donat bons resultats en el nostre laboratori, ni sembla que actualment doni bons resultats (Dagan Wells, comunicació personal), segurament pel fet que els fragments marcats tenen mides massa grans. S'ha optat doncs, pel marcatge amb *Nick Translation*. Aquest mètode permet tallar la sonda i reduir la mida dels fragments a 300-3000 pb, que és la longitud òptima per a la realització de la CGH. Segons la literatura, el marcatge amb *Nick Translation* produeix hibridacions més homogènies i amb menys soroll de fons que les hibridacions de sondes marcades amb DOP-PCR (Larsen *et al.* 2001). Actualment, tots els grups que fan CGH en cèl.lules úniques marquen la sonda de CGH amb *Nick Translation* (Malmgren *et al.* 2002; Wells *et al.* 2002; Wilton *et al.* 2003a; Trussler *et al.* 2004).

En el protocol inicial de Voullaire *et al.* (1999), la sonda de CGH un cop desnaturalitzada es deixa prehibridant a 37°C durant 1 h. Aquesta etapa permet que les seqüències repetitives de Cot-1-DNA trobin altres seqüències repetitives i bloquegin millor les zones de DNA repetitiu, com per exemple els centròmers i els telòmers. S'ha vist, però, que els perfils de CGH en aquestes regions conflictives segueixen sense ser informatius tot i fer aquesta etapa de prehibridació, per tant, aquesta va ser eliminada del protocol per estalviar temps.

El temps d'hibridació s'ha reduït de 72 a 40 hores fent una hibridació prèvia d'una hora en el microones a 70 W. El tractament amb microones accelera la hibridació i aconsegueix hibridacions amb senyals intensos però en menys temps (Bahçe *et al.* 2000; Gosálvez *et al.* 2002). A partir del DNA amplificat de diferents cèl.lules aïllades s'han fet hibridacions de diferents durades (72 hores i 40 hores més 1 hora de microones). La intensitat dels senyals així com els resultats obtinguts van ser equivalents.

Finalment, els rentats posthibridació es van fer a més temperatura (73°C) però durant menys temps. Aquest canvi també ha permès estalviar temps sense que augmenti el soroll de fons de la hibridació.

5.2. VALIDACIÓ DE LA CGH APLICADA A CÈL.LULES AÏLLADES

La precisió i la utilitat de la CGH ha estat demostrada extensivament en la citogenètica del càncer (Kallionemi *et al.* 1992; Kallionemi *et al.* 1994; Speicher *et al.* 1994). Tanmateix, la fiabilitat i la precisió de la tècnica no han estat descrites en el cas de la seva aplicació per a l'anàlisi de cèl.lules aïllades. És per aquest motiu que s'ha fet una validació de la CGH a partir de l'anàlisi de complementarietat de parelles 1CP-MII. Aquest disseny experimental

ens permet disposar sempre d'un control intern que ens proporciona informació sobre la fiabilitat dels resultats (Pellestor *et al.* 2005). S'han analitzat un total de 87 parelles 1CP-MII, 81 provinents de dones amb cariotip normal i 6 de dones portadores de translocacions. En aquestes parelles s'ha combinat sempre l'anàlisi de l'1CP mitjançant CGH amb l'anàlisi de la MII amb un altre mètode (CGH, FISH, SKY o cenM-FISH) amb l'objectiu de confirmar qualsevol aneuploidia.

Les MIIs es van analitzar amb CGH únicament quan provenien d'oòcits madurats *in vitro* i no havien estat inseminats. La causa més important de fallada de fecundació després de l'ICSI no és l'absència de l'espermatozoide en la MII de l'oòcit, sinó una activació defectuosa d'aquest (Schimiady *et al.* 1996) i, de fet, el 70% dels oòcits no fecundats després d'un ICSI presenten un cap inflat d'espermatozoide a l'interior de la MII de l'oòcit (Flaherty *et al.* 1995). Així, l'anàlisi de MIIs d'oòcits inseminats amb CGH no és aconsellable ja que es podria amplificar també el genoma de l'espermatozoide i obtenir resultats erronis. Per tant, les MIIs d'oòcits inseminats no s'han amplificat, sinó que s'han fixat i s'han analitzat amb tècniques que permeten l'anàlisi de tots els cromosomes (mitjançant SKY o cenM-FISH) o l'anàlisi d'alguns cromosomes (mitjançant FISH), d'aquesta manera se n'exclou el material provinent dels espermatozoides. Una segona raó per fixar les MIIs en lloc dels 1CPs és que en ser una cèl.lula més gran la seva fixació és molt més fàcil (Durban *et al.* 1998). A més a més, cariotipar el complement cromosòmic dels 1CPs ja sigui emprant tècniques convencionals o tècniques de citogenètica molecular (SKY o cenM-FISH) té un rendiment molt baix ja que només es cariotipen menys del 25% dels 1CPs fixats (Márquez *et al.* 1998; Munné 2002; Sandalinas *et al.* 2002).

L'anàlisi de complementaritat entre parelles 1CP-MII ha permès valorar la sensibilitat de la CGH a l'hora de detectar guanys o pèrdues i de detectar alteracions de cromosomes o de cromàtides, determinar l'existència d'artefactes o falsos positius en l'anàlisi amb CGH i avaluar la taxa d'error i la eficiència de la CGH aplicada a l'anàlisi de cèl.lules aïllades.

5.2.1. Sensibilitat de la CGH per detectar guanys i pèrdues i alteracions de cromosomes i cromàtides

L'anàlisi de parelles 1CP-MII combinant la CGH amb tècniques com la FISH, el cenM-FISH i de vegades el SKY (Márquez *et al.* 1998) ha permès distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtida i determinar la capacitat de la CGH de discriminar entre aquests

dos tipus d'anomalies. Els nostres resultats demostren que la CGH aplicada a cèl·lules aïllades és capaç de detectar tant guanys o pèrdues de cromosoma com de cromàtida.

Segons Kallionemi *et al.* (1992), la CGH permet la quantificació dels cromosomes sencers i, per tant, en el cas d'una trisomia (o d'un guany d'una cromàtida) la desviació teòrica esperada del perfil de CGH estaria a prop del punt de tall d'1,5 mentre que en el cas d'una tetrasomia (equivalent al guany de cromosoma) la desviació teòrica dels perfils de CGH hauria d'estar a prop del punt de tall de 2,0. Tanmateix, en aquest treball, els perfils de CGH mostren sovint desviacions similars tant en anomalies de cromàtida com de cromosoma i, per tant, és difícil determinar el tipus d'error, sobretot en casos de guany de material. Aquests resultats estan recolzats per estudis d'altres autors, que descriuen que la CGH no sempre permet la quantificació dels guanys i les pèrdues i que aquests perfils teòrics poques vegades s'observen a la pràctica (Lestou *et al.* 1999; Voullaire *et al.* 2002).

Les dades també mostren que en l'anàlisi de cèl·lules aïllades mitjançant CGH és més difícil detectar guanys que pèrdues, especialment en el cas d'anomalies de cromàtides. Això es deu al fet que en la pèrdua de cromàtida es perd un 50% del material i, per tant, queda la meitat de material (respecte el control d'hibridació) mentre que en el guany de cromàtida no hi ha el doble de material sinó que hi ha únicament un guany del 33% de més respecte del control. Els perfils de CGH en el cas d'una pèrdua, doncs, són més clars (Voullaire *et al.* 2002).

A causa de tot això, la diferenciació entre errors de cromàtida o de cromosoma mitjançant la CGH només ha estat possible en alguns casos de nul·lisomia (pèrdues de cromosoma), on s'observava una desviació molt pronunciada del perfil de CGH cap a l'esquerra, sobrepassant en alguns casos el punt de tall del 0,5.

Les nostres observacions semblen contrastar amb els resultats de CGH de mostres tumorals, on les amplificacions són més fàcils de detectar que, per exemple, les delecions o pèrdues de material. L'explicació és que en els tumors les seqüències amplificades es troben presents en un ordre de magnitud molt superior al que comporta un guany d'una cromàtida o d'un cromosoma (per exemple, en una amplificació es poden trobar 10 còpies de la seqüència original). Aquesta dada també explica per què la resolució de la CGH convencional per a detectar guanys o pèrdues de material és de 10 a 20 Mb (Kallionemi *et al.* 1994; Bentz *et al.* 1998; Griffin *et al.* 1998) mentre que la resolució per detectar còpies

amplificades és molt més alta ja que permet detectar amplificacions de només unes 2-4 Mb (Piper *et al.* 1995).

5.2.2. Falsos positius

Certes regions del genoma han estat descrites com a regions conflictives per a una anàlisi acurada utilitzant CGH. Kallionemi *et al.* (1994) va recomanar excloure de l'anàlisi variacions d'aquestes regions i la majoria de grups que treballen amb CGH i cèl·lules aïllades segueixen aquestes recomanacions (Voullaire *et al.* 2000; Wells i Delhanty 2000; Trussler *et al.* 2004). Les regions centromèriques, les regions d'heterocromatina (1qh, 9qh i 16qh), els braços curts dels cromosomes acrocèntrics i, finalment, les regions telomèriques són regions del genoma difícils d'interpretar que acostumen a mostrar desviacions artefactuals dels perfils de CGH (Kallionemi *et al.* 1994). Aquestes regions són riques en seqüències repetitives i com que aquestes seqüències són bloquejades en la CGH per Cot-1-DNA, la intensitat de fluorescència en aquestes regions és molt baixa. És possible, doncs, que les desviacions dels perfils de CGH en aquestes regions siguin degudes al fet que el programa, en restar automàticament el soroll de fons a la hibridació (ho fa abans de la determinació de les ràtios), resti també el senyal d'hibridació d'aquestes regions, que ja és, de per si, molt baix. Això pot donar lloc a desequilibris entre fluorescències vermelles i verdes i, per tant, que les ràtios obtingudes en aquestes regions no siguin fiables (Moore *et al.* 1997). A més a més, en el cas dels telòmers s'afegeix la dificultat de localitzar amb precisió els finals dels cromosomes en el procés de segmentació que fa el programa (Moore *et al.* 1997). Altres regions conflictives del genoma són la regió 1p33-pter, el braç 16p, i els cromosomes 17, 19 i 22.

Un dels mecanismes responsables de les variacions en aquestes regions és que les molècules dels fluorocroms (Spectrum Green i Spectrum Red) poden tenir diferent afinitat per certes seqüències del DNA (com per exemple les regions riques en GC) que no es distribueixen homogèniament pel genoma (Larramendy *et al.* 1998). El fet que totes aquestes regions conflictives corresponguin a àrees del genoma riques en GC (Saccone *et al.* 1992) dóna suport a aquesta hipòtesi. Ha estat publicat que el marcatge directe amb fluorocroms ajuda a minimitzar els artefactes (Isola *et al.* 1994) i que el "marcatge revers" (és a dir, marcar el DNA test en vermell i el DNA reference en verd en lloc del marcatge descrit inicialment per Kallionemi: DNA test en verd i DNA referència en vermell) també permet eliminar els

artefactes d'aquestes regions (Larramendy *et al.* 1998). Tanmateix, aquest “marcatge revers” (utilitzant fluorocroms marcats directament) ha estat utilitzat en el nostre estudi però els artefactes de 1p33-pter, 16p i dels cromosomes 17, 19 i 22 s'han trobat igualment aproximadament en un 20% de les cèl·lules analitzades.

Recentment s'ha descrit que utilitzant la *Linker Adapter*-PCR-CGH per a l'anàlisi de cèl·lules aïllades, molts dels artefactes observats en experiments de DOP-PCR-CGH desapareixen (per exemple, falsos positius dels cromosomes 19 i 22) (Pirker *et al.* 2004). En canvi, altres autors que utilitzen la LA-PCR per analitzar amb CGH blastòmers aïllats també troben artefactes en aquestes regions conflictives i les exclouen de l'anàlisi (Malmgren *et al.* 2002).

Un altre factor que en el nostre cas pot afectar la presència d'aquests artefactes és que la DOP-PCR teòricament tendeix a amplificar més les seqüències repetitives (Larsen *et al.* 2001). Aquesta possibilitat queda minimitzada en amplificar amb DOP-PCR no solament el DNA test sinó també el DNA control ja que així qualsevol regió sobre amplificada en el DNA test també ho estarà el DNA control i, per tant, en la hibridació competitiva la relació seguirà sent 1:1.

Tot i que tots aquests artefactes poden aparèixer simultàniament o bé de manera aïllada en una cèl·lula és esperable que siguin quins siguin els mecanismes implicats en aquestes desviacions artefactuals, afectin de la mateixa manera totes les regions conflictives. Per tant, si en una cèl·lula trobem desviacions artefactuals del cromosoma 19 i del 22, tots dos apareixeran o bé guanyats o bé perduts, però no un de perdut i l'altre de guanyat llevat que una d'aquestes desviacions no sigui deguda a un artefacte sinó a una alteració cromosòmica real. A la vista dels nostres resultats i com que s'han descrit casos en què la CGH ha estat capaç de detectar guanys i pèrdues de material en aquestes regions conflictives (Ghaffari *et al.* 1998; Hernando *et al.* 2002), no podem descartar el fet que alguna de les variacions que observem en aquestes regions sigui real i, per tant, aquestes regions han estat avaluades amb molta precaució en cada experiment de CGH (Lestou *et al.* 1999). Tot i que en la majoria de casos s'han exclòs de l'anàlisi variacions en aquestes regions, de vegades aquestes variacions han estat considerades i posteriorment confirmades com a anomalies cromosòmiques reals (vegeu la Figura 4.3 a la secció de Resultats).

5.2.3. Absència de complementarietat entre parelles 1CP-MII

La complementarietat trobada entre els resultats dels 1CPs i de les corresponents MIIs ha estat del 87,4% ja que només 11 de les 87 parelles mostren resultats no recíprocs (Vegeu la Taula 4.2, secció de Resultats). Això dona una taxa d'error aproximadament d'un 12,6%, molt similar a la taxa d'error del 12% publicada per la FISH aplicada al diagnòstic genètic preimplantacional (Abdelhadi *et al.* 2003).

És important destacar, però, que no totes aquestes manques de complementarietat poden ser atribuïbles a errors en la interpretació dels perfils de CGH, sinó que cal tenir en compte altres factors que estarien relacionats amb la sensibilitat de la CGH i amb els mecanismes implicats en l'origen de les aneuploidies.

Cinc parelles 1CP-MII que tenien ambdós complements analitzats amb CGH (parelles 3, 7, 8, 16 i 19) (Taula 4.2 de Resultats), presentaven una pèrdua cromosòmica en un dels complements, mentre que en la parella no es detectava el guany corresponent, encara que en alguns d'aquests casos s'observaven desviacions dels perfils cap a la dreta però que no sobrepassaven el punt de tall d'1,2. Aquesta falta de complementarietat, doncs, podria explicar-se pel fet que alguns guanys (sobretot els que afecten cromàtides) poden ser difícils de detectar amb CGH o donar lloc a perfils difícils d'interpretar, tal com s'ha esmentat prèviament.

En les sis parelles restants, els 1CPs es van analitzar també amb CGH però les MIIs es van fixar i analitzar amb FISH o cenM-FISH. Dues d'aquestes parelles presentaven una pèrdua cromosòmica en la MII mentre que el guany no es detectava amb CGH en l'1CP (parelles 32a i K). La falta de complementarietat d'aquestes parelles podria ser explicada per l'existència d'una pèrdua artefactual d'un cromosoma durant la fixació de la MII. Tres parelles tenien un guany en l'1CP o en la MII, que no anava acompanyat per la pèrdua corresponent en l'altre complement (parelles 8a, 10b i 16a). Aquesta falta de complementarietat es podria explicar per l'existència de mosaïcisme gonadal amb una línia germinal trisòmica en alguna de les pacients que va donar aquests oòcits (Mahmood *et al.* 2000; Cupisti *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a). Finalment, la parella 19a presentava diverses aneuploidies en l'1CP i en la MII, algunes d'elles confirmades en ambdós complements però d'altres no. Altres autors també han publicat resultats de CGH en els que les anomalies eren tan generalitzades que era difícil caracteritzar-les a partir dels perfils de

CGH (Voullaire *et al.* 2000; Voullaire *et al.* 2002). Aquest sembla que és el cas d'aquesta última parella 1CP-MII.

5.2.4. Eficiència de les tècniques utilitzades

Els avantatges i inconvenients de les diferents tècniques emprades en l'estudi d'oòcits humans es detallen en la Taula de l'annex.

5.2.4.1. CGH en 1CPs i MIIs d'oòcits

L'eficiència global de la CGH aplicada a cèl·lules aïllades per a l'estudi de tots els cromosomes ha estat del 80,1% ja que aproximadament 9 de cada 10 cèl·lules han estat correctament amplificades per DOP-PCR i en 9 de cada 10 cèl·lules correctament amplificades s'han obtingut resultats de CGH. Les eficiències descrites per altres autors varien entre el 70 i el 89% (Wells i Delhanty 2000; Malmgren *et al.* 2002; Voullaire *et al.* 2002; Wells *et al.* 2002; Wilton *et al.* 2003a). S'han descrit diverses causes de fallada de la DOP-PCR, entre les quals les més importants són la pèrdua de la cèl·lula en l'última etapa de l'aïllament i la inhibició de la PCR (Wells i Delhanty 2000; Malmgren *et al.* 2002; Voullaire *et al.* 2002). En el nostre cas, la inhibició de la PCR s'ha donat només quan es va treballar amb oli mineral exposat a la llum ultraviolada (Dohner *et al.* 1995). Les raons de fallada de la CGH, en canvi, solen ser la hibridació massa feble del DNA test (Wells i Delhanty 2000; Voullaire *et al.* 2002; Wells *et al.* 2002; Trussler *et al.* 2004).

Cal destacar que l'eficiència de la CGH a l'hora d'analitzar 1CPs és més alta que quan s'analitzen les MIIs. És possible que això sigui degut a l'amplificació preferencial en la DOP-PCR del DNA mitocondrial, molt abundant en les MIIs. Els productes d'amplificació amb DOP-PCR de les MIIs apareixen en un gel d'agarosa com una pinzellada de DNA amb unes bandes de 600, 1250 i 1700 pb que no apareixien en el cas dels productes d'amplificació dels 1CPs. Aquestes bandes s'han identificat com a DNA mitocondrial (Voullaire *et al.* 2000). Aquests nivells tan elevats de DNA mitocondrial en els productes d'amplificació de les MIIs no afecten els perfils de la CGH ja que el DNA mitocondrial no hibrida amb els cromosomes. Tanmateix, aquest excés de DNA mitocondrial pot competir amb el DNA genòmic de la cèl·lula en el procés d'amplificació i

de marcatge, i per tant es disminueix la intensitat de la hibridació i l'eficiència del procediment en les MIIs.

5.2.4.2. FISH en MIIs d'oòcits

L'eficiència global aconseguida per analitzar de 4 a 11 cromosomes amb la tècnica de FISH va ser del 77,8% ja que un 83,3% de les MII fixades van donar una extensió adequada per a la posterior anàlisi amb FISH, mentre que l'eficiència de la FISH va ser del 93,3%. L'eficiència obtinguda en la fixació del material cromosòmic de les MIIs és superior a la descrita per altres autors, del 57% i del 60,8%, respectivament (Martini *et al.* 2000; Anahory *et al.* 2003) i molt similar a l'eficiència descrita per Martini *et al.* (1997). Les causes principals de fallades en la fixació han estat la pèrdua total del material cromosòmic, la presència d'extensions amb massa pocs cromosomes (que indica pèrdues artefactuals) o d'extensions cromosòmiques massa esteses, i també el fet de trobar extensions amb cromosomes d'espermatozoide al voltant o al mig del complement cromosòmic de la MII. En aquest últim cas, la presència de cromosomes d'espermatozoide es deu a una condensació prematura dels seus cromosomes (PCC), prèviament descrita en oòcits inseminats (Márquez *et al.* 1998; Cupisti *et al.* 2003) i associada amb una immaduresa del citoplasma de l'oòcit, que causa una prolongació de l'activitat del factor promotor de la mitosi (MPF) (Schimiady *et al.* 1996).

En la literatura, les eficiències globals per l'anàlisi amb FISH de 2 a 7 cromosomes varien des del 46,2% fins al 82,3% (Martini *et al.* 1997; Mahmood *et al.* 2000; Martini *et al.* 2000; Anahory *et al.* 2003).

5.2.4.3. CenM-FISH en MIIs d'oòcits

En aquest treball s'ha aconseguit aplicar la tècnica del cenM-FISH i obtenir resultats en el 80% de les MIIs fixades correctament. Tot i així, només un 41,6% de les MIIs mostraven una extensió cromosòmica adient per a l'anàlisi amb cenM-FISH. Per tant, a causa de l'etapa crítica de fixació del material l'eficiència global d'aquesta tècnica per a l'estudi de tots els cromosomes ha estat molt baixa, del 33,3%. Les causes limitants de la fixació del material, han estat les mateixes que s'han descrit en el cas de FISH i, a més a més, la dificultat d'obtenir extensions apropiades per a la identificació de tots els cromosomes. Si

L'extensió és insuficient, els cromosomes no estan prou separats i se solapen entre ells, dificultant l'anàlisi (Márquez *et al.* 1998; Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003). Si pel contrari els cromosomes estan massa estesos, s'incrementa el risc de pèrdues cromosòmiques artefactuals (Munné *et al.* 1998b). A més a més, en aquest últim cas, cal agafar més de dos camps de captura i això fa que el programa tingui problemes per mesurar correctament la fluorescència dels cromosomes aïllats en relació amb el soroll de fons, i així se'n dificulta l'anàlisi (Clyde *et al.* 2003).

Els nostres resultats amb cenM-FISH concorden amb les eficiències descrites per altres autors per a l'anàlisi de tots els cromosomes amb tècniques similars en MIIs fixades (M-FISH o SKY), eficiències que van des del 31,6 fins al 35,8% (Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003). És important destacar, que fins i tot en estudis que utilitzaven una tècnica de fixació més gradual i teòricament més vàlida per evitar les pèrdues artefactuals de cromosomes (Kamiguchi *et al.* 1993), l'eficiència descrita per a l'obtenció d'extensions cromosòmiques adequades per aplicar aquests tipus de tècniques seguia sent baixa (45,9%) i el 0,05% de les MIIs presentaven extensions amb menys de 18 cromosomes, fet que indicava l'existència de pèrdues cromosòmiques artefactuals (Pellestor *et al.* 2002).

5.3. ANÀLISI D'ANOMALIES CROMOSÒMIQUES

5.3.1. Oòcits de dones amb cariotip normal

S'han analitzat 106 oòcits donats per 71 dones. La majoria de dones van donar un o dos oòcits per evitar esbiaixar els resultats (Zenzes *et al.* 1992).

5.3.1.1. Incidència d'aneuploïdia

La incidència d'anomalies cromosòmiques varia molt en funció de l'estudi. Els resultats originats d'estudis amb FISH varien depenent bàsicament del nombre de cromosomes i dels cromosomes que s'han analitzat. Mentre que alguns autors han trobat incidències d'errors relativament baixes (fins al 9,6%) analitzant dos cromosomes (18 i X), sis cromosomes (9, 13, 16, 18, 21 i X) o set (1, 9, 13, 16, 18, 21 i X) (Dyban *et al.* 1996; Anahory *et al.* 2003; Cupisti *et al.* 2003), d'altres han trobat incidències molt més elevades. Per exemple, analitzant els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22, la taxa d'aneuploïdia va ser del

41,7% en dones d'edat materna >35 anys (Kuliev *et al.* 2003), analitzant els cromosomes 1, 7, 13, 18, 21 i X, la incidència d'aneuploidies va ser del 44% (Martini *et al.* 2000) i, finalment, analitzant els cromosomes 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X es va obtenir una taxa d'aneuploidia del 47,5%. Si considerem només aquells estudis que avaluaven tot el complement cromosòmic també observem certa variabilitat ja que, per exemple, els estudis de cariotipatge indiquen que, com a mitjana, un 21% dels oòcits són aneuploides (Zenzes *et al.* 1992; Nakaoka *et al.* 1998; Pellestor *et al.* 2003; Pellestor *et al.* 2005) i, en canvi, la taxa d'aneuploidia trobada en estudis de M-FISH o de SKY varia del 16,7 al 39% (Márquez *et al.* 1998; Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003). Aquestes variacions podrien ser explicades per diferències en l'edat materna, l'origen dels oòcits, la mida mostral o el disseny experimental de l'estudi (Clyde *et al.* 2003; Pellestor *et al.* 2005).

En el present estudi s'ha trobat una taxa d'aneuploidia del 45,3%. Aquesta elevada taxa d'aneuploidia pot ser deguda a l'elevat nombre de cromosomes que són analitzats en comparació amb altres estudis que no arriben a analitzar ni una tercera part dels cromosomes presents a la cèl.lula (Martini *et al.* 1997; Mahmood *et al.* 2000; Martini *et al.* 2000; Petit *et al.* 2000; Anahory *et al.* 2003; Kuliev *et al.* 2003). Alguns estudis han intentat extrapolar la incidència d'anomalies trobada analitzant només alguns cromosomes a la incidència d'anomalies que haurien trobat analitzant la totalitat de cromosomes (Dyban *et al.* 1996; Anahory *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a). Tanmateix, si considerem que en oòcits, la distribució d'aneuploidies no és homogènia per a tots els cromosomes, aquestes estimacions de la taxa d'aneuploidia global podrien no ajustar-se a la realitat (Cupisti *et al.* 2003). Altres autors, analitzant també la totalitat de cromosomes amb M-FISH han trobat incidències d'aneuploidia similars a la trobada en aquest estudi (Clyde *et al.* 2003).

També és important destacar que tots els estudis citogenètics fets fins a l'actualitat s'han basat en la fixació del material cromosòmic de l'oòcit i alguns aspectes com ara el mètode de fixació, la incidència de pèrdues artefactuals de cromosomes, la presència de cromosomes solapats i els criteris per seleccionar els oòcits analitzats, també s'haurien de tenir en compte per explicar les discrepàncies observades amb el nostre estudi. Per exemple, menys d'un 50% dels oòcits fixats són finalment cariotipats (per tècniques convencionals, M-FISH o SKY) per raó de problemes tècnics de la fixació com ara cromosomes solapats, pèrdua de cromosomes o material massa dispers (Pellestor *et al.* 2002; Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003). Aquest fet podria esbiaixar els resultats obtinguts fent que les taxes d'aneuploidia trobades no fossin del tot fiables. Un altre

exemple és que el 28,5% de les hipohaploïdies trobades en 1CPs amb FISH, són en realitat, pèrdues artefactuals de cromosomes (Pujol *et al.* 2003a).

En aquest estudi els 1CPs han estat analitzats sempre amb CGH, una tècnica no basada en la fixació del material cromosòmic i que, per tant, permet superar totes aquestes limitacions tècniques. La CGH permet analitzar la totalitat dels cromosomes de la cèl.lula sense la necessitat de fer estimacions basades només en alguns cromosomes. A més a més, l'anàlisi d'ambdues cèl.lules, 1CP i MII, ens permet tenir un control intern del nostre experiment per obtenir una taxa d'aneuploïdia fiable i precisa.

Tanmateix, és important tenir en compte que aquest i altres estudis s'han fet sobre una proporció seleccionada de gàmetes, és a dir, tots els oòcits analitzats han estat prèviament descartats de cicles de fecundació in vitro i, a més a més, la majoria provenen de dones amb problemes de fertilitat. Això fa que la incidència d'aneuploïdia trobada no pugui ser extrapolada en molts casos a la població general. Tot i així, en la gametogènesi femenina, el punt de control entre metafase I i anafase I, que regula el posicionament correcte dels cromosomes en el fus mitòtic no és tan estricte com en la gametogènesi masculina (LeMarie-Adkins *et al.* 1997). Per tant, quan es dona un error en aquest posicionament, la gametogènesi masculina es bloqueja, mentre que la gametogènesi femenina continua produint errors. Aquest fet podria explicar l'elevada incidència d'aneuploïdia trobada en aquest i altres estudis.

5.3.1.2. Hipohaploïdies i hiperhaploïdies

Totes les tècniques basades en la fixació del material cromosòmic de MIIs i 1CPs han tingut una limitació important, que ha estat la dificultat de determinar si una pèrdua cromosòmica correspon realment a una hipohaploïdia o bé ha de ser considerada com una pèrdua artefactual. De fet, analitzant el complement de l'1CP junt amb la MII s'ha pogut determinar que més d'un 25% de les hipohaploïdies detectades són en realitat pèrdues artefactuals (Zenzes i Casper 1992; Pujol *et al.* 2003a). La resta d'hipohaploïdies poden ser degudes al retard anafàsic o *anafase lag* (Martin 1984; Coonen *et al.* 2004), a alteracions en el citoesquelet (Eichenlaub-Ritter *et al.* 1986) o al desplaçament de cromosomes (Ford i Lester 1982) en la meiosi femenina.

La dificultat per distingir entre pèrdues reals i artefactuals explica per què molts estudis han optat per estimar una taxa d'aneuploïdia conservadora, és a dir, es multiplica per dos la taxa

d'hiperhaploïdies perquè es considera que les hipohaploïdies i les hiperhaploïdies es produeixen per igual com a resultat d'una segregació independent dels cromosomes entre la MII i el primer corpuscle polar (Mahmood *et al.* 2000; Plachot 2001; Cupisti *et al.* 2003). Aquesta estimació, però, podria no valorar de manera fiable la freqüència d'aneuploïdia real en oòcits (Pellestor *et al.* 2002). Per exemple, la majoria d'estudis mostren un excés d'hipohaploïdies en comparació amb les hiperhaploïdies probablement degut a la incidència de pèrdues artefactuals que se sumen a la incidència de pèrdues reals. Pel contrari, en aquest treball s'ha trobat un petit excés d'hiperhaploïdies en les MIIs (i un excés d'hipohaploïdies en els 1CPs). Aquests resultats coincideixen amb estudis en 1CPs que mostren més hipohaploïdies que hiperhaploïdies (Wells *et al.* 2002; Kuliev *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a).

Aquesta major incidència d'hiperhaploïdies en les MIIs hauria de correspondre's amb una major incidència d'embrions trisòmics que monosòmics. Tanmateix, en sèries de blastòmers analitzats amb FISH s'observa un excés de monosomies (Munné *et al.* 2004). La presència de més monosomies podria ser atribuïda a artefactes tècnics com ara la hibridació deficient de les sondes, el solapament dels senyals de FISH o la pèrdua de micronuclis (Harper *et al.* 1995; Munné *et al.* 1998a). Tampoc no es pot descartar, però, que aquest excés d'embrions monosòmics s'hagi produït per altres mecanismes com per exemple *l'anafase lag* durant la segona divisió meiótica o les divisions postzigòtiques de l'embrió (Zenzes *et al.* 1990; Plachot 2001; Cupisti *et al.* 2003; Coonen *et al.* 2004; Daphnis *et al.* 2004; Munné *et al.* 2004).

La utilització de la CGH com una tècnica que no requereix la fixació del material cromosòmic, i l'anàlisi simultània de l'1CP i de la MII complementària permet detectar i confirmar qualsevol aneuploïdia (hipohaploïdia o hiperhaploïdia) en oòcits.

5.3.1.3. Mecanismes implicats en l'origen de les aneuploïdies

En la literatura s'han descrit bàsicament dos mecanismes implicats en l'origen d'aneuploïdies: la no-disjunció d'homòlegs (Zenzes *et al.* 1992; Dailey *et al.* 1996) i la separació precoç de cromàtides germanes (predivisió o PSSC)(Angell *et al.* 1993; Angell 1997).

Mentre que la majoria d'estudis recents han confirmat la coexistència d'aquests dos mecanismes (Pellestor 1991a; Munné *et al.* 1995b; Dailey *et al.* 1996; Verlinsky *et al.* 1999;

Sandalinas *et al.* 2002; Cupisti *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a), altres autors només han trobat exemples de no-disjunció (Zenzes *et al.* 1992; Benkhalifa *et al.* 1996) o de predivisió de cromàtides (Angell *et al.* 1993; Angell 1997). A més a més, tenint en compte només aquells estudis que mostren l'existència d'ambdós mecanismes, hi ha autors que troben més freqüentment no-disjuncions (Kamiguchi *et al.* 1993; Dailey *et al.* 1996), d'altres que troben un predomini de predivisions (Verlinsky *et al.* 1999; Pellestor *et al.* 2002; Sandalinas *et al.* 2002) i d'altres que troben tots dos mecanismes implicats de manera equivalent (Cupisti *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a).

En aquest treball d'un total de 47 aneuploïdies que van ser detectades amb FISH o cenM-FISH es van identificar inequívocament dos mecanismes d'aneuploïdia: la no-disjunció de cromosomes i la separació precoç de cromàtides germanes, sent aquesta última la més comuna (31,9% i 68,1%, respectivament). A més a més, les nostres dades també suggereixen l'existència d'un tercer mecanisme d'aneuploïdia: el mosaïcisme gonadal amb una línia germinal trisòmica. Aquest mecanisme ja ha estat descrit en altres estudis de FISH on s'avaluava la complementarietat 1CP-MII, i en els que, com en el nostre cas, certes parelles mostraven una falta de complementarietat (Mahmood *et al.* 2000; Cupisti *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a). En alguns casos aquesta falta de complementarietat es veu reflectida en la presència d'una cromàtida extra tant en l'1CP com en la MII (Mahmood *et al.* 2000; Cupisti *et al.* 2003), mentre que en altres casos, incloent-hi els d'aquest estudi, s'observava un cromosoma extra en un dels complements i una dotació normal per a aquell cromosoma en l'altre complement (Pujol *et al.* 2003a).

5.3.1.4. Aneuploïdia relacionada amb l'edat materna, el temps en cultiu i l'origen dels oòcits descartats

5.3.1.4.1. Aneuploïdia i edat materna

En el present treball, la incidència d'aneuploïdies en el grup d'oòcits de dones menors de 35 anys és del 28%, mentre que en el grup de dones de ≥ 35 anys és del 60,7% ($P = 0,0015$). Considerant que un estudi recent on s'analitzen només 5 cromosomes, s'ha trobat una incidència d'aneuploïdies en dones d'edat avançada del 52,1% (mitjana de 38,5 anys), l'incidència d'aneuploïdies en el grup d'edat avançada trobada en aquest estudi no és inesperada. Els nostres resultats coincidesen amb estudis previs que mostren que la incidència d'aneuploïdia, sobretot quant a les anomalies de cromàtida, augmenta amb l'edat

materna (Dailey *et al.* 1996; Plachot 2001; Honda *et al.* 2002; Pellestor *et al.* 2003). Tanmateix, altres autors no han trobat diferències significatives entre aneuploidia i diferents grups d'edat materna (Clyde *et al.* 2003).

S'han descrit diversos mecanismes dependents de l'edat que podrien estar implicats en aquest augment en la incidència d'aneuploidies. En primer lloc, sembla que les dones d'edat avançada acumulen més mutacions en el DNA mitocondrial tant en oòcits com en les cèl·lules fol·liculars que els envolten (Bartmann *et al.* 2004). Aquestes mutacions comportarien una reducció de la funció mitocondrial (Schon *et al.* 2000). Considerant que la meiosi és un procés dependent d'energia i que l'ATP és necessari per a la unió de les cohesines al DNA (Uhlmann 2004), és possible que en dones d'edat avançada es produeixi una deficiència en el procés de fosforilació oxidativa que resultaria en una major incidència de predivisió de cromàtides. En segon lloc, en cicles naturals de dones d'edat avançada (40-45 anys) també s'han observat moltes alteracions del posicionament dels cromosomes així com dels microtúbuls que formen el fus (Battaglia *et al.* 1996). I, finalment, també en oòcits de dones d'edat avançada s'ha descrit una menor concentració dels transcrits de gens responsables del control de la unió del fus amb els cromosomes (gens *MAD2* i *BUB1*) (Steuerwald *et al.* 2001).

5.3.1.4.2. Aneuploidia, inducció hormonal, temps en cultiu i origen dels oòcits

En aquests treball tots els oòcits analitzats van ser obtinguts després d'inducció hormonal. Tanmateix, tots els estudis fets fins a l'actualitat indiquen que la inducció hormonal en comparació amb els cicles naturals no té efecte en la incidència d'aneuploidies (Pellestor 1991a; Edirisinghe *et al.* 1992; Gras *et al.* 1992).

També s'ha proposat la hipòtesi que l'exposició dels oòcits a ambients subòptims durant el cultiu *in vitro* podia induir errors cromosòmics en produir alteracions morfològiques en el fus de l'oòcit (Pickering *et al.* 1988). Malgrat això, s'ha observat que ni la separació precoç de cromàtides desequilibrada ni la no-disjunció augmenten amb el temps en cultiu (Munné *et al.* 1995b; Boiso *et al.* 1997). Les nostres dades recolzen aquesta observació ja que es van trobar taxes d'aneuploidia similars en ambdós grups; els 58 oòcits madurats *in vitro* i els 48 oòcits madurats *in vivo* (fallades de fertilització). La predivisió equilibrada de cromàtides, no considerada com a aneuploidia però sí com un factor que hi predisposa (Angell *et al.* 1994; Munné *et al.* 1995b; Dailey *et al.* 1996; Martini *et al.* 1997; Sandalinas *et al.* 2002), sí que

augmenta amb el temps en cultiu *in vitro*, tal com demostra Sandalinas *et al.* (2002). La predivisió equilibrada de cromàtides també s'ha atribuït a la degeneració dels oòcits o dels 1CPs (Sandalinas *et al.* 2002; Pujol *et al.* 2003a).

D'altra banda, s'ha proposat que les fallades de fertilització després d'ICSI estan associades típicament amb una fallada total en l'activació de l'oòcit (Sousa i Tesarik 1994; Flaherty *et al.* 1995). Per tant, alguns autors suggereixen que una major incidència d'alteracions cromosòmiques en aquests oòcits podria produir aquesta fallada en l'activació (Martini *et al.* 1997). Tanmateix, tampoc no s'han observat diferències significatives en comparar els dos tipus de fallades de fertilització (després d'ICSI o després d'una FIV), tal com s'ha publicat prèviament (Edirisinghe *et al.* 1997).

5.3.1.5. Cromosomes més involucrats en aneuploïdia

Les aneuploïdies trobades en el present treball han afectat tots els grups cromosòmics i gairebé tots els cromosomes, amb l'excepció dels cromosomes 5, 11 i 20 (Taula III). Aquesta dada és recolzada per estudis de CGH en blastòmers, en els quals s'han trobat aneuploïdies per a tots els cromosomes del cariotip (Wilton 2005). Mentre que, en general i amb algunes excepcions, la distribució d'aneuploïdies en espermatozoides és homogènia en els diferents grups cromosòmics (Pellestor 1991b), els errors en la segregació dels cromosomes no sembla que es produeixin a l'atzar en oòcits i embrions (Munné *et al.* 2004). Això pot ser degut a la mateixa asimetria de la gametogènesi femenina, que dona lloc a un únic gàmeta funcional i a dos corpuscles polars (Pardo-Manuel de Villena i Sapienza 2001).

Les freqüències esperades si la distribució d'aneuploïdies fos igual per a tots els cromosomes són diferents a les observades ja que hi ha certs grups cromosòmics que mostren unes freqüències d'aneuploïdia inferiors a les esperades (grup B i grup C); en canvi, altres (grups E i G) presenten una major predisposició als errors que la resta de grups (Taula 5.1), tot i que les diferències no són estadísticament significatives. Aquests resultats concorden amb les dades publicades per altres autors (Kamiguchi *et al.* 1993; Angell 1997; Nakaoka *et al.* 1998; Pellestor *et al.* 2002).

Taula 5.1. Incidència d'aneuploidia esperada i observada pels diferents grups cromosòmics

Grup	Cromosomes	Freqüència observada	Freqüència esperada
A	1, 2, 3	14*	10,4
B	4, 5	5	7
C	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X	19	27,8
D	13, 14, 15	12	10,4
E	16, 17, 18	14	10,4
F	19, 20	6	7
G	21, 22	10	7
Total	23 cromosomes	80	

*10 de les 14 aneuploidies observades corresponen a aneuploidies del cromosoma 1

Si dividim els cromosomes en dos grups en funció de la seva mida, i considerem com a cromosomes grans del cromosoma 1 al 12 més el cromosoma X, i com a cromosomes petits del cromosoma 13 al 22 (Taula 5.2), en general, s'observa que els cromosomes petits estan més freqüentment involucrats en aneuploidies que els grans, tot i que les diferències tampoc no són estadísticament significatives.

Taula 5.2. Incidència d'aneuploidia en funció de la mida dels cromosomes

Mida	Freqüència observada	Freqüència esperada
Gran (1-12+X)	38	45,2
Petit (13-22)	42	34,8
Total	80	

Altres autors també han observat que els cromosomes petits estan més afectats per errors de segregació (Mahmood *et al.* 2000; Sandalinas *et al.* 2002; Wells *et al.* 2002; Cupisti *et al.* 2003) ja que aquests cromosomes tendeixen a presentar menys quiasmes durant la meiosi i s'ha observat que taxes de recombinació reduïdes poden predisposar a la no-disjunció (Sherman *et al.* 1991; Koehler *et al.* 1996; Lamb *et al.* 1997; Thomas *et al.* 2001).

D'altra banda, alguns autors han suggerit l'existència d'una relació entre la no-disjunció i una mida petita del DNA alfa satèl·lit present en els centròmers (Roizés 1992; Lo *et al.*

1999; Maratou *et al.* 2000). La divisió precoç de cromàtides (predivisió) sembla que està molt relacionada amb la degradació prematura (abans d'anafase II) o amb l'absència de cohesines, fet que s'ha evidenciat en llevats mutants per la cohesina rec8 defectuosos en la cohesió de cromàtides germanes (Molnar *et al.* 1995). En mamífers, a més, s'ha suggerit que la variació de la seqüència centromèrica o la quantitat d'heterocromatina centromèrica pot influir en la pèrdua de cohesió entre cromàtides germanes ja que s'ha vist que les cromàtides dels diferents cromosomes es separen de forma asincrònica en funció de la quantitat d'heterocromatina que tinguin (Vig 1987). Es pot proposar la hipòtesi, doncs, que la separació precoç de cromàtides és específica de cromosoma i que es dona preferentment en aquells cromosomes amb seqüències alfa satèlit petites a les quals no s'uneixen suficients proteïnes de cohesió per mantenir unides les dues cromàtides germanes. Aquesta hipòtesi tornaria a indicar una predisposició dels cromosomes petits a ser afectats per la divisió prematura de cromàtides ja que els cromosomes grans, en presentar diversos quiasmes podrien prevenir aquesta separació prematura. Els nostres resultats corroboren aquesta hipòtesi ja que el grup de cromosomes més gran (grup A), junt amb el grup F (que consta del cromosoma 19, amb un bloc heterocromàtic important i del cromosoma 20) són els grups que presenten un predomini de no-disjunció respecte de la predivisió. Altres autors també han trobat un defecte d'anomalies de cromàtida en el grup A i un excés en els grups E i G (Pellestor *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003; Pellestor *et al.* 2005).

Els cromosomes que més freqüentment han estat implicats en aneuploidia en aquest estudi han estat, per ordre: el cromosoma 1, els cromosomes 15, 16, 19 i 22, els cromosomes 4 i X, els cromosomes 13, 17, 18 i 21, els cromosomes 6, 7 i 10, els cromosomes 2, 3, 8, 9 i 14 i, finalment, el cromosoma 12. Diversos estudis han mostrat que el cromosoma 22 és el més freqüentment implicat en aneuploidia en oòcits i embrions (Sandalinas *et al.* 2002; Clyde *et al.* 2003; Munné *et al.* 2004), tot i que per a altres autors és el cromosoma 16 el que presenta més errors (Voullaire *et al.* 2002; Abdelhadi *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a). Altres grups, en canvi, han indicat que el cromosoma 21 és el més propens a patir errors (Mahmood *et al.* 2000; Cupisti *et al.* 2003; Kuliev *et al.* 2003). El cromosoma 1 ha estat poc estudiat si el comparem amb altres cromosomes. A més a més, a l'hora d'intentar establir la incidència d'errors per aquest cromosoma s'han obtingut resultats completament oposats. Mentre que alguns autors han trobat el cromosoma 1 freqüentment implicat en aneuploidia en oòcits i embrions (Martini *et al.* 1997; Bahçe *et al.* 1999), altres l'han trobat, amb una freqüència menor (Watt *et al.* 1987; Wells i Delhanty 2000; Pujol *et al.* 2003a; Munné *et al.*

2004) i, sorprenentment, hi ha treballs on no s'ha detectat ni un sol error que afectés aquest cromosoma (Sandalinas *et al.* 2002; Cupisti *et al.* 2003). En aquest estudi s'ha trobat 10 aneuploidies per a aquest cromosoma, set de les quals han pogut ser confirmades. Una possible explicació per l'elevada incidència d'errors trobada per a aquest cromosoma és que les mostres estudiades no són representatives de la població general i estan esbiaxades per un o més factors (edat materna, causes d'infertilitat, disseny experimental, etc). A la literatura podem trobar altres exemples, com ara, el cas del cromosoma 14, que alguns autors han trobat freqüentment involucrat en aneuploidia en embrions (Voullaire *et al.* 2002), altres, l'han considerada una de les aneuploidies menys comunes (Munné *et al.* 2004). Serien necessaris, doncs, més estudis que analitzin aquest cromosoma per avaluar amb més precisió la seva implicació en esdeveniments d'aneuploidia.

Si comparem la incidència d'aneuploidia per als diferents cromosomes en embrions o en oòcits amb la incidència d'aquestes aneuploidies en avortaments espontanis (Simpson 1990) o en nascuts vius, les dades no acaben de concordar. Això es deu al fet que aneuploidies per a diferents cromosomes presenten diferent viabilitat al llarg del desenvolupament embrionari (Sandalinas *et al.* 2001; Munné *et al.* 2004). Per exemple, l'aneuploidia per al cromosoma 22 es redueix 11 vegades, des d'una incidència del 24,5% en embrions (Bahçe *et al.* 1999) fins a una incidència del 2,26% en avortaments espontanis (Simpson 1990). De la mateixa manera, aneuploidies per al cromosoma 1 han estat trobades amb un incidència del 16% en embrions (Bahçe *et al.* 1999) però només s'ha publicat un cas de trisomia 1 en embarassos de primer trimestre (Hanna *et al.* 1997). Així doncs, les aneuploidies de cromosomes que no es troben sovint en descendència trisòmica o avortaments espontanis (per exemple, cromosomes 1, 4, 17 i 19) poden ser, en realitat, comunes en el moment de la concepció però molt possiblement els embrions tenen problemes per implantar o s'aturen poc després de la implantació.

5.3.1.6. Implicacions dels resultats obtinguts en el PGD utilitzant FISH

Els cromosomes triats per al *screening* d'aneuploidies en el PGD han estat els que presentaven una alta incidència d'aneuploidies en mostres prenatales (cromosomes 13, 18, 21, X i Y) o en avortaments espontanis (cromosomes 15, 16 i 22) (Bahçe *et al.* 1999). Tanmateix, com ja s'ha dit, en oòcits i embrions s'ha trobat un rang molt més ampli d'aneuploidies per a diferents cromosomes. Per tant, s'ha suggerit que el *screening*

preimplantacional per a només aquelles aneuploidies que es troben en unes etapes més tardanes de l'embaràs pot no ser la millor estratègia (Bahçe *et al.* 1999; Wells *et al.* 2002) ja que aneuploidies per a altres cromosomes poden estar produint una pèrdua embrionària més primerenca o una fallada d'implantació.

En aquests treballs s'han trobat aneuploidies per als cromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 17 i 19, cromosomes que no s'analitzen rutinàriament en el diagnòstic genètic preimplantacional utilitzant FISH. En total, s'han trobat 45 aneuploidies que afecten aquests cromosomes, que corresponen al 56,25% (45/80) de les aneuploidies trobades.

És important, però, tenir en compte que 1CPs o embrions amb múltiples aneuploidies ja haurien estat classificats correctament com a anòmals si una d'aquestes aneuploidies afectés un dels cromosomes analitzats rutinàriament amb FISH (Abdelhadi *et al.* 2003). Tot i tenir en compte aquest fet, el 58,3% (28/48) de les cèl·lules aneuploides d'aquest estudi haurien estat erròniament classificades com a normals utilitzant FISH per analitzar 5 cromosomes (cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22) (Kuliev *et al.* 2003; Montag *et al.* 2004), un 31,3% (15/48) si s'hagués utilitzat FISH per a l'anàlisi d'11 cromosomes (cromosomes 8, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) (www.reproductivegenetics.com), i un 25% (12/48) si s'hagués utilitzat la FISH per a l'anàlisi de 9 cromosomes que s'ha posat a punt en el nostre laboratori (cromosomes 1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X) (Pujol *et al.* 2003a). Aquest fet també tindria efecte a l'hora de determinar les taxes d'aneuploidia ja que la taxa del 45,3% trobada en el present estudi s'hagués reduït al 18,9% si s'haguessin analitzat els 5 cromosomes prèviament esmentats, al 31,1% si s'haguessin analitzat els 11 cromosomes i al 34% si s'haguessin analitzat els 9 cromosomes.

Tot això té una gran implicació en el diagnòstic genètic preimplantacional ja que en alguns d'aquests casos es podria aconsellar la transferència i, per tant, s'arribarien a transferir embrions aneuploides classificats erròniament com a normals, que possiblement no s'implantarien o aturarien el seu desenvolupament poc després de la implantació. La CGH, doncs, és una eina molt vàlida per determinar quins cromosomes i en quina mesura estan més implicats en la pèrdua embrionària durant els estadis més primerencs del desenvolupament embrionari.

5.3.2. Oòcits de dones portadores de translocacions equilibrades

5.3.2.1. Detecció de segregacions desequilibrades de translocacions

Tot i que la resolució de la CGH aplicada a cèl·lules aïllades s'ha estimat en unes 40 Mb, un estudi recent ha mostrat que la CGH en cèl·lules aïllades és capaç de detectar segregacions desequilibrades de translocacions sempre que la regió desequilibrada sigui major que 10-20 Mb (Malmgren *et al.* 2002). En el present estudi s'han analitzat sis parelles 1CP-MII provinents de dones portadores de translocacions equilibrades, cinc portadores d'una translocació robertsoniana i una portadora d'una translocació recíproca. Cal destacar que totes aquestes translocacions tenien implicats fragments cromosòmics majors de 10-20 Mb. En el cas de les translocacions robertsonianes, cap de les parelles no va presentar cap desviació dels perfils de CGH dels cromosomes implicats en la translocació, cosa que indicava una segregació alternant. Com que la CGH només pot detectar guanys i pèrdues de material, la diferenciació entre gàmetes normals o equilibrats no es pot dur a terme utilitzant aquesta tècnica. Tanmateix, la CGH sí que ha estat capaç de detectar els productes desequilibrats d'una segregació adjacent 2 en el cas de la translocació recíproca t(1;5). Això indica la validesa de la CGH per a la seva aplicació en el PGD no només per al *screening* d'aneuploidies sinó també per detectar segregacions desequilibrades de translocacions maternes sempre que la regió afectada sigui major que 10-20 Mb.

5.3.2.2. Investigació d'efectes intercromosòmics en la segregació de translocacions

En la literatura podem trobar dades contradictòries quant a l'existència dels efectes intercromosòmics (ICE) en espermatozoides, embrions i oòcits de portadors de translocacions. Mentre que alguns autors han trobat evidències d'aquest fenomen (Blanco *et al.* 1998; Blanco *et al.* 2000; Estop *et al.* 2000; Pellestor *et al.* 2001; Gianaroli *et al.* 2002; Oliver-Bonet *et al.* 2002; Pujol *et al.* 2003b), d'altres no n'han trobat (Blanco *et al.* 1998; Honda *et al.* 1999; Estop *et al.* 2000; Oliver-Bonet *et al.* 2002; Munné *et al.* 2005). Per tant, tal com s'ha indicat, la incidència dels ICE pot variar segons el cas i els cromosomes implicats en la translocació així com dels fragments afectats (Estop *et al.* 2000; Oliver-Bonet *et al.* 2002; Pujol *et al.* 2003b).

És important destacar que tots aquests estudis s'han fet amb FISH per a l'anàlisi de fins a 10 cromosomes (incloent-hi els cromosomes implicats en la translocació) i, per tant, les possibles anomalies que afectessin la resta de cromosomes no s'avaluen.

En el present treball s'han analitzat sis parelles 1CP-MII de tres dones portadores d'una translocació equilibrada. Només en el cas d'una dona de 29 anys amb una translocació robertsoniana (13;14), s'ha trobat una anomalia cromosòmica que afecta algun cromosoma no implicat en la reorganització. A aquesta dona se li van analitzar un total de tres parelles 1CP-MII. En dues d'elles es van analitzar ambdós complements amb CGH i en la tercera es va analitzar l'1CP amb CGH i la MII complementària amb SKY. En les tres parelles la dotació dels cromosomes implicats en la translocació va ser normal o equilibrada, la qual cosa indica una segregació alternant. Tanmateix, en la darrera parella es va trobar una aneuploidia del cromosoma 12, confirmada en ambdós complements. Tenint en compte l'edat de la dona (29 anys) no és esperable que l'aneuploidia trobada estigués relacionada amb l'edat materna. A més a més, en oòcits no s'ha publicat cap altra aneuploidia per al cromosoma 12, probablement perquè fins a l'actualitat només hi ha un estudi de FISH que analitzi aquest cromosoma (Cupisti *et al.* 2003). Tanmateix, considerant l'elevada taxa d'aneuploidia trobada en oòcits per alguns autors (Martini *et al.* 1997; Martini *et al.* 2000; Clyde *et al.* 2003; Pujol *et al.* 2003a), no podem concloure que l'aneuploidia detectada sigui conseqüència d'un ICE degut a la translocació.

Malgrat això, i sigui quin sigui el mecanisme implicat en l'origen d'aquesta aneuploidia, la fecundació d'aquest oòcit, sempre que l'anomalia no fos corregida durant la segona divisió meiótica, hauria originat un embrió trisòmic que no s'hauria implantat o que s'hauria aturat poc després de la implantació causant un avortament espontani (Munné *et al.* 2004). L'estratègia actual en el PGD és analitzar exclusivament els cromosomes involucrats en la translocació (Conn *et al.* 1998; Munné *et al.* 1998c; Durban *et al.* 2001; Munné 2002). Fins i tot combinant el PGD de la translocació amb el PGD per l'*screening* de les aneuploidies més comunes (incloent-hi sondes per als cromosomes 1, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X) (Gianaroli *et al.* 2002; Pujol *et al.* 2003b), el cromosoma 12 no s'hauria analitzat i, per tant, l'oòcit hauria estat diagnosticat com a normal.

Per tant, és important tenir en compte que la transferència d'embrions anòmals, incorrectament classificats com a normals amb FISH, podria comportar un risc addicional d'embarassos desequilibrats o de fallades d'implantació en aquestes pacients. La CGH, en casos de translocacions, seria una eina molt vàlida per analitzar no només els cromosomes

involucrats en la reorganització o els cromosomes més freqüentment afectats per aneuploïdies sinó també la resta de cromosomes.

5.4. PGD MITJANÇANT CGH EN DONES D'EDAT AVANÇADA

5.4.1. Casos de PGD en 1CP mitjançant CGH

La utilització de la CGH per al diagnòstic genètic preimplantacional analitzant l'1CP es va aplicar per primer cop l'any 2002 (Wells *et al.* 2002). Aquest estudi es va fer en una dona de 40 anys i els resultats de CGH van mostrar que nou dels 10 1CPs analitzats eren aneuploides, i que algunes d'aquestes aneuploïdies haurien passat inadvertides utilitzant FISH. En el cas clínic fet en una dona de 42 anys que s'ha inclòs en aquest treball, es van trobar aneuploïdies per als cromosomes 19, 21, 22 i X en tres dels cinc 1CPs analitzats. En aquest cas, però, tots els oòcits classificats com a aneuploides amb CGH haurien estat classificats també com a aneuploides utilitzant FISH per a l'anàlisi de 9 cromosomes perquè aneuploïdies de cromosomes no analitzats (per exemple el cromosoma 19) es combinen en la mateixa cèl.lula amb aneuploïdies de cromosomes que sí que s'haguessin analitzat.

Ambdós casos corroboren l'alta incidència d'aneuploidia en els oòcits de dones d'edat avançada, sense que aquesta pugui ser atribuïble en aquest cas a l'envelliment dels oòcits.

5.4.2. Limitacions del PGD en 1CP amb CGH

La utilització de l'1CP en el PGD té limitacions inherents. En primer lloc, no es podrien detectar errors de la segona divisió meiótica. Recentment, en un estudi en què s'analitza el primer i el segon corpuscle polar, s'ha trobat unes taxes d'errors similars en la primera (41,8%) i en la segona (37,3%) divisió meiótica (Kuliev *et al.* 2003). Malgrat això, la hipòtesi més estesa és que la majoria d'errors s'esdevenen en la primera divisió (Sherman *et al.* 1994; Fisher *et al.* 1995; Hassold *et al.* 1995; Peterson i Mikkelsen 2000). Cal considerar, també, que aproximadament una tercera part dels errors originats en la primera divisió meiótica poden ser corregits en la segona divisió meiótica i, per tant, analitzant tan sols l'1CP s'estaria sobrevalorant la taxa d'aneuploidia d'aquests oòcits (Wells *et al.* 2002; Kuliev i

Verlinsky 2004a). Tanmateix, un 82% d'aquests oòcits que han corregit els seus errors originen embrions cromosòmicament anòmals per als mateixos cromosomes, per altres o amb mosaïcisme, la qual cosa indica que els errors observats en l'oòcit són deguts principalment a anomalies en el procés de la meiosi i de la mitosi (per exemple, anomalies en el fus) més que a errors en la segregació de cromosomes específics (Kuliev i Verlinsky 2004a; Kuliev i Verlinsky 2004b).

Una altra limitació és que els errors d'origen patern no s'analitzen. Tanmateix, la dotació paterna s'ha vist que contribueix relativament poc en el total d'anomalies presents en els embrions i que pràcticament la totalitat dels errors (90%) són el resultat d'errors en la primera divisió meiòtica femenina (Nicolaidis i Petersen 1998).

Els errors postzigòtics, com ara el mosaïcisme embrionari, que s'ha detectat aproximadament en un 30% dels embrions (Munné *et al.* 1995a) tampoc no haurien pogut ser detectats. Tanmateix, la presència d'aquest mosaïcisme embrionari també dificulta el PGD en blastòmers (Munné *et al.* 1994b; Munné *et al.* 2002), sobretot quan només es biopsia i s'analitza un dels blastòmers de l'embrió (Baart *et al.* 2004; Los *et al.* 2004).

Finalment, l'existència d'un mosaïcisme gonadal en pacients de cariotip normal també podria induir a error en el PGD utilitzant l'1CP.

Totes aquestes limitacions podrien ser solucionades si es confirmessin les aneuploidies trobades i estudiant, a part, una cèl.lula de l'embrió a l'estadi de 6-8 cèl.lules, fet que no afectaria la viabilitat del embrió analitzat (Wells *et al.* 2002; Pujol *et al.* 2003b; Magli *et al.* 2004). A més a més, el fet de realitzar un PGD ja sigui en 1CP o en blastòmer, no elimina la conveniència de fer posteriorment un diagnòstic prenatal.

La CGH també presenta diverses limitacions inherents, ja que només pot detectar guanys i pèrdues de material i, per tant, no és capaç de distingir entre gàmetes equilibrats o normals resultants d'una segregació alternant en portadores de translocacions, ni és capaç de detectar alteracions equilibrades com per exemple la predivisió equilibrada de cromàtides, que predisposa a l'aneuploidia (Munné *et al.* 1995b; Dailey *et al.* 1996; Sandalinas *et al.* 2002). La CGH tampoc no permet detectar canvis en la ploïdia i, per tant, els oòcits diploides, que tenen una incidència d'aproximadament un 17,8% en oòcits sense 1CP (Márquez *et al.* 1998), serien considerats com a normals. Malgrat això, aquesta limitació afectaria relativament poc al PGD ja que els oòcits diploides s'originen normalment a partir de la no extrusió del 1CP (Benkhalifa *et al.* 1996), mentre que la freqüència de diploidia en oòcits

que han extrusionat l'1CP (els que analitzaríem en el PGD) es redueix considerablement fins a aproximadament un 1,7% (Márquez *et al.* 1998). Les altres tres causes descrites de diploïdia en oòcits han estat la no-disjunció del complement sencer de l'oòcit durant la citocinesi (donant un oòcit diploide i un 1CP nul·lisòmic que s'interpretaria com una fallada d'amplificació després de la DOP-PCR) (Boiso *et al.* 1997), la divisió meiòtica d'un oòcit primari tetraploide i la fusió de dues oogònies. Tanmateix, la incidència d'aquests dos darrers casos és molt petita i en ambdós casos l'oòcit diploide seria el doble de gran i, per tant, es podria detectar morfològicament (Kamiguchi *et al.* 1993; Munné *et al.* 1994a).

Una limitació considerable són les aneuploïdies per als cromosomes 17, 19 i 22 que, com s'ha dit anteriorment, haurien de ser considerades amb precaució ja que acostumen a ser falsos positius.

5.4.3. Avantatges del PGD en 1CP amb CGH

El major avantatge de la CGH és l'anàlisi fiable de pràcticament la totalitat de cromosomes, i, per tant, la detecció no únicament de les aneuploïdies més freqüents, sinó també de la resta d'aneuploïdies que podrien causar una pèrdua embrionària primerenca o una fallada d'implantació. La CGH, a més, permet una avaluació fiable de les hipohaploïdies ja que en aquest cas, la fixació del material cromosòmic no és necessària i les pèrdues artefactuals dels cromosomes no es poden produir. A més a més, la CGH permet analitzar els cromosomes en tota la seva longitud, a diferència de la FISH, en la que només s'identifiquen certes regions del cromosoma (centròmers, telòmers o determinats gens). Això ha permès detectar trencaments cromosòmics en embrions humans (Voullaire *et al.* 2000; Wells i Delhanty 2000), i indica que la CGH és una tècnica molt útil per detectar alteracions estructurals *de novo* resultants en una pèrdua o un guany de material cromosòmic.

Les optimitzacions fetes en el protocol permeten fer la CGH en unes 60 hores, corresponents aproximadament a 13 hores per al protocol de DOP-PCR-CGH i 45-48 hores d'hibridació. Tot i que a aquest temps se li ha d'afegir les dues hores necessàries per a l'anàlisi de cada corpuscle, aquest protocol permet obtenir de resultats el dia +3 o +4 (considerant com a dia 0 el dia de la punció fol·licular). Així, la transferència embrionària es pot fer el dia +4, dia en què s'aconsella la transferència després de qualsevol PGD (Gianaroli *et al.* 1999b).

Aquesta estratègia permetria analitzar la totalitat de cromosomes en un PGD i evitaria la congelació dels embrions, requisit imprescindible per fer l'anàlisi de CGH en blastòmers biòpsiats a dia +3 (Voullaire *et al.* 2002; Wells *et al.* 2002; Wilton *et al.* 2003a).

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. La tècnica de CGH permet analitzar la totalitat dels cromosomes en cèl.lules aïllades. Tanmateix, alteracions en els blocs heterocromàtics, regions centromèriques i telomèriques, així com aneuploïdies dels cromosomes 17, 19 i 22 han de ser considerades amb precacució ja que són regions propenses a donar falsos positius.

2. La CGH és capaç de detectar tant errors de cromosoma com de cromàtida, encara que molt sovint no permet diferenciar entre aquests errors. La desviació dels perfils en la CGH aplicada a cèl.lules aïllades és més pronunciada en els casos de pèrdues que de guanys.

3. L'eficiència i la fiabilitat de la CGH aplicada a l'anàlisi de cèl.lules aïllades és major que la d'altres tècniques de citogenètica molecular basades en la fixació del material cromosòmic en portaobjectes, ja que aquesta tècnica permet avaluar de manera acurada la incidència no tan sols de les hiperhaploïdies sinó també de les hipohaploïdies de pràcticament qualsevol cromosoma.

4. L'anàlisi d'ambdues cèl.lules, 1CP i MII, mitjançant la combinació de la CGH amb la FISH, l'SKY i el cenM-FISH, que ha estat aplicat en oòcits per primer cop en el present treball, és útil per determinar la incidència global d'aneuploïdies en els oòcits estudiats, per confirmar els resultats obtinguts, així com per investigar els mecanismes implicats en l'origen de les aneuploïdies: la no-disjunció, la separació precoç de cromàtides i el mosaïcisme gonadal.

5. La incidència d'aneuploïdia depèn de l'edat materna ja que s'han trobat diferències significatives en els oòcits dels dos grups d'edat analitzats. Tanmateix, la incidència d'aneuploïdia no depèn de l'origen dels oòcits ja que el nombre d'anomalies cromosòmiques no són significativament diferents en analitzar oòcits madurats in vitro o oòcits descartats per causa d'una fallada de fertilització.

6. L'anomalia més freqüent en la primera divisió meiótica no és la no-disjunció de cromosomes sinó la divisió precoç de cromàtides germanes, amb una afectació preferent dels cromosomes més petits.

7. S'ha demostrat la importància de l'anàlisi de la totalitat de cromosomes en el PGD-AS ja que s'han detectat aneuploidies de pràcticament tots els cromosomes estudiats.

8. L'anàlisi amb FISH emprant sondes per als 9 cromosomes analitzats rutinàriament en el PGD-AS hauria diagnosticat incorrectament com a normals d'un 25% a un 30% dels oòcits aneuploides. A més, el PGD-AS utilitzant FISH exclou l'anàlisi de més de la meitat dels cromosomes de la cèl.lula, alguns d'ells (cromosomes 1, 4 i 19), afectats freqüentment per errors i possiblement implicats en les pèrdues embrionàries primerenques i en les fallades d'implantació de la majoria de pacients.

9. La CGH pot ser utilitzada per detectar segregacions desequilibrades de translocacions materns en el PGD de translocacions quan els fragments implicats siguin majors de 10-40 Mb. Aquesta estratègia permet detectar anomalies no tan sols dels cromosomes reorganitzats, sinó també de la resta de cromosomes i minimitzar d'aquesta manera la transferència d'embrions anòmals incorrectament diagnosticats com a normals.

10. El protocol posat a punt i optimitzat en el nostre laboratori ha estat validat i és apte per ser aplicat en el PGD mitjançant l'anàlisi del 1CP. Aquest protocol de PGD és compatible amb la transferència embrionària el dia +4.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

A

- Abdalla H, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks A, Studd J (1993) Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Human Reproduction* 8:1512-1517
- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munné S (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 6:226-231
- Agerholm L, Ziebe S, Williams B, Berg C, Crüger DF, Bruun Petersen G, Kolvraa S (2005) Sequential FISH analysis using competitive displacement of labelled peptide nucleic acid probes for eight chromosomes in human blastomeres. *Hum Reprod* 20:1072-1077
- Anahory T, Andréo B, Régnier-Vigouroux G, Soulie JP, Baudouin M, Demaille J, Pellestor F (2003) Sequential multiple probe fluorescence in-situ hybridization analysis of human oocytes and polar bodies by combining centromeric labelling and whole chromosome painting. *Molecular Human Reproduction* 9:577-585
- Anderson A, Wohfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M (2000) Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320:1708-1712
- Angell R, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird D (1994) First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* 65:194-202
- Angell R (1997) First-Meiotic-Division Nondisjunction in Human Oocytes. *American Journal of Human Genetics* 61:23-32
- Angell RR, Xian J, Keith J (1993) Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Human Reproduction* 8:1047-1054
- Antonarakis SE (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 234:872-876
- Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR (2000) An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *American Journal of Human Genetics* 66:1684-1688

B

- Baart EB, Van Opstal D, Los FJ, Fauser BCJM, Martini E (2004) Fluorescence in situ hybridization analysis of two blastomeres from day 3 frozen-thawed embryos followed by analysis of the remaining embryo on day 5. *Human Reproduction* 19:685-693
- Bahçe M, Cohen J, Munné S (1999) Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: were we looking at the wrong chromosomes? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16:176-181
- Bahçe M, Escudero T, Sandalinas M, Morrison L, Legator M, Munné S (2000) Improvements of preimplantation diagnosis of aneuploidy by using microwave

- hybridization, cell recycling and monocolour labelling of probes. *Molecular Human Reproduction* 6:849-854
- Bartmann A, Romao G, Ramos E, Ferriani R (2004) Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *J Assist Reprod Genet* 21:79-83
- Battaglia D, Goodwin P, Klein N, Soules M (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human Reproduction* 11:2217-2222
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes C, Templado C, Navarro J (in press) Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenetic and Genome Research*
- Benkhalifa M, Menezo Y, Yanny L, Pouly J, Qumsiyeh M (1996) Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J Assist Reprod Genet* 13:140-148
- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P (1998) Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer* 21:172-175
- Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F (1998) FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet Cell Genet* 83:275-280
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F (2000) Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm and nuclei. *Human Genetics* 106:500-505
- Boada M, Carrera M, De la Iglesia C, Sandalinas M, Barri P, Veiga A (1998) Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet* 15:302-307
- Boiso I, Márquez C, Veiga A, Munné S (1997) Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes. *Assist. Reprod. Rev.* 7:160-164
- Bosch M, Osvaldo R, Egozcue J, Templado C (2003) Linear increase of structural and numerical chromosome 9 abnormalities in human sperm regarding age. *European Journal of Human Genetics* 11:754-759
- Boué A, Boué J, Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Advances in Human Genetics* 14:1-57

C

- Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM (2005) Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Human Reproduction* 20:437-442
- Clyde JM, Gosden RG, Rutherford AJ, Picton HM (2001) Demonstration of a mechanism of aneuploidy in human oocytes using Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 76:837-840
- Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ, Picton HM (2003) Karyotyping of human metaphase II oocytes by Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility* 80:1003-1011
- Cohen J (2002) Sorting out chromosome errors. *Science* 296:2164-2166

- Conn C, Harper J, Winston R, Delhanty JDA (1998) Infertility couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet* 102:117-123
- Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JCM, van Wissen LCP, Bras M, Janssen M, Evers JLH, Geraedts JPM (2004) Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 19:316-324
- Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJW, Delhanty JDA (2003) Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenatal Diagnosis* 23:663-668

D

- Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S (1996) Association between non-disjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes detected by FISH analysis. *American Journal of Human Genetics* 59:176-184
- Daphnis DD, Delhanty JDA, Jerkovic S, Geyer J, Craft I, Harper JC (2004) Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy. *Human Reproduction* 20:129-137
- de Boer K, Catt J, Jansen R, Leigh D, McArthur S (2004) Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertility and Sterility* 82:295-298
- Dean F, Husono S, Fang L, Wu X, Faruqi F, Bray-Ward P (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5261-5266
- Delhanty JDA, Harper JC, Handyside AH, Winston RML (1997) Multicolor FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Human Genetics* 99:755-760
- Dohner D, Dehner M, Gelb L (1995) Inhibition of PCR by mineral oil exposed to UV irradiation for prolonged periods. *Biotechniques* 18:964-967
- Durban M, Benet J, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J (1998) Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes. *Human Reproduction* 13:583-587
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Laila JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, *et al.* (2001) PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Human Reproduction Update* 7:591-602
- Dyban A, Freidine M, Severova E, Cieslak J, Ivakhnenko V, Verlinsky Y (1996) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent in situ hybridization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 13:73-78

E

- Eckel H, Kleinstein J, Wieacker P, Stumm M (2003) Multi-locus (ML)-FISH is a reliable tool for nondisjunction studies in human oocytes. *Cytogenet Cell Genet* 103:47-53
- Edgar D, Bourne H, Speirs A, McBain J (2000) A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 15:175-179

- Edirisinghe W, Murch A, Yovich J (1992) Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an in-vitro fertilization programme. *Human Reproduction* 7:230-236
- Edirisinghe W, Murch A, Junk S, Yovich J (1997) Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double blind study. *Human Reproduction* 12:2784-2791
- Eichenlaub-Ritter U, Chandley A, Gosden R (1986) Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study. *Chromosoma* 94:337-345
- El-Hashemite, Delhanty JDA (1997) A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Molecular Human Reproduction* 3:975-978
- Escudero T, Michael L, Carrel D, Blanco J, Munné S (2000) Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45, XY, t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenatal Diagnosis* 20:599-602
- Estop AM, Cieply K, Munné S, Surti U, Wakim A, Feingold E (2000) Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet* 106:517-524
- Evsikov S, Cieslak J, Verlinsky Y (2000) Effect of chromosomal translocations on the development of preimplantation human embryos in vitro. *Fertility and Sterility* 74:672-677

F

- Fisher J, Harvey J, Morton N, Jacobs P (1995) Trisomy 18: studies of the parent and cell division of origin and effect of aberrant recombination on non disjunction. *Am J Hum Genet* 56:669-675
- Flaherty S, Payne D, Swann N, Matthews C (1995) Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.* 7:197-210
- Ford J, Lester P (1982) Factors affecting the displacement of chromosomes from the metaphase plate. *Cytogenet Cell Genet* 33:327-332

G

- Ghaffari S, Boyd E, Connor J, Jones A, Tolmie J (1998) Mosaic supernumerary ring chromosome 19 identified by comparative genomic hybridization. *J Med Genet* 35:836-840
- Gianaroli L, Magli M, Ferraretti AP, Munné S (1999a) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis: identification of the categories to which it should be proposed. *Fertility and Sterility* 72:837-844
- Gianaroli L, Magli M, Munné S, Fortini D, Ferraretti A (1999b) Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* 16:170-175
- Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP (2001) Preimplantation genetic diagnosis. Paper presented at Current practices and controversies in assisted reproduction, report of

- a meeting on medical, ethical and social aspects of assisted reproduction held at WHO headquarters. 17-21 September. Geneva, Switzerland
- Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A (2002) Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Human Reproduction* 17:3201-3207
- Gitlin S (2003) Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online* 6:47-53
- Gosálvez J, De La Torre J, Pita M, Martínez-Ramírez A, López-Fernández C, Goyanes V, Fernández JL (2002) FISHing in the microwave: the easy way to preserve proteins. Colocalization of DNA probes and surface antigens in human leukocytes. *Chromosome Research* 10:137-143
- Gras L, McBain J, Trounson A, Kola I (1992) The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) uniseminated human oocytes. *Human Reproduction* 1992
- Griffin D, Handyside AH, Penketh R, Winston R, Delhanty JDA (1991) Fluorescence in situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Human Reproduction* 6:101-105
- Griffin D, Sanoudou D, Adamski E, McGriffert C, O'Brien P, Wienberg J, Ferguson-Smith M (1998) Chromosome specific comparative genome hybridisation for determining the origin of intrachromosomal duplications. *J Med Genet* 35:37-41
- Grothues D, Cantor C, Smith C (1993) PCR amplification of megabase DNA with tagged random primers (T-PCR). *Nucleic Acids Research* 21:1321-1322
- Gutiérrez-Mateo C, Gadea L, Benet J, Wells D, Munné S, Navarro J (2005) Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13;14) carrier: Case report. *Human Reproduction* 20:1256-1260
- Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez M, Sánchez-García J, Egozcue J, Navarro J, Munné S (2004a) Aneuploidy study of human oocytes by 1PB-CGH and MII-FISH analysis. *Human Reproduction* 19:2859-2868
- Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil 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. *Human Reproduction* 19:2118-2125

H

- Handyside AH, Kontogianni E, Hardy K, Winston R (1990) Pregnancies from biopsy human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344:768-770
- Handyside AH, Robinson M, Simpson J, Omar M, Shaw M, Grudzinskas J, Rutherford A (2004) Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Molecular Human Reproduction* 10:767-772
- Hanna J, Shires P, Matile G (1997) Trisomy 1 in a clinically recognized pregnancy. *American Journal of Medical Genetics* 68:98
- Harada T, Shiraishi K, Kusano N, Umayahara K, Kondoh S, Okita K, Sasaki K (2000) Evaluation of the reliability of chromosomal imbalances detected by combined use of universal DNA Amplification and Comparative Genomic Hybridization. *Jpn. J. Cancer Research* 91:1119-1125

- Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN, Delhanty JDA (1995) Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic pre-implantation human embryos. *Prenatal Diagnosis* 15:41-49
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane J, *et al.* (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Rev Genet* 44:151-176
- Hassold T, Jacobs P (1984) Trisomy in man. *Annu. Rev. Genet.* 18:69-97
- Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S (1995) Recombination and maternal age dependent non-disjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57:867-874
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Review Genetics* 2:280-291
- Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Odaib A, Ozand P (2004) Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Molecular Human Reproduction* 10:847-852
- Henegariu O, Bray-Ward P, Artan S, Vance G, Qumsyieh M, Ward D (2001) Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (CM-FISH). *Laboratory investigation* 81:475-481
- Hernando C, Plaja A, Rigola M, Perez M, Vendrell T, Egozcue J, Fuster C (2002) Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations. *J Med Genet* 39:24-26
- Hill DL (2003) Aneuploidy screening of preimplantation embryos using comparative genomic hybridization versus fluorescence in situ hybridization techniques. *Fertility and Sterility* 80:873-874
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K (1999) Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence. *Hum Genet* 105:428-436
- Honda N, Miharu N, Hara T, Samura O, Honda H, Ohama K (2002) Chromosomal FISH analysis of unfertilized human oocytes and polar bodies. *J Hum Genet* 47:488-491
- Hu D, Webb G, Hussey N (2004) Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridisation. *Mol. Hum. Reprod.* 10:283-289
- Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RSK (2000) Improving Degenerate Oligonucleotide Primed PCR- Comparative Genomic Hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 28:395-403
- 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. *Human Molecular Genetics* 4:2007-2012

I

- Isola J, Devries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F (1994) Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145:1301-1308
- Iwarsson E, Lundqvist M, Inzunza J, Ahrlund-Richter L, Sjoblom P, Lundkvist O, Simberg N, Nordenskjold M, Blennow E (1999) A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Human Genetics* 104:376-382

J

- Jacobs P, Hassold T (1995) The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 33:101-133
- Jeffner L (2004) Advanced maternal age- How old is too old? *N Engl J Med* 4:1927-1929

K

- Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821
- Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman F, Gray JW, Pinkel D (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 10:231-243
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K (1993) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Human Genetics* 90:533-541
- Kearney L (2001) Molecular cytogenetics. Best practice and research clinical haematology 14:645-668
- Klein CA, Schmidt-Kittler O, Schardt JA, Pantel K, Spercher MR, Riethmüller G (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4494-4499
- Koehler K, Hawley R, Shreman S, Hassold T (1996) Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y (2003) Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reproductive Biomedicine Online* 6:54-59
- Kuliev A, Verlinsky Y (2004a) Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update* 10:401-407
- Kuliev A, Verlinsky Y (2004b) Thirteen years' experience of preimplantation diagnosis: report of the 5th International Symposium of preimplantation genetics. *Reprod Biomed Online* 8:229-235
- Kuukasjärvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J (1997) Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes, Chromosomes and Cancer* 18:94-101

L

- Lamb N, Freeman S, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, *et al.* (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to nondisjunction in both maternal meiosis-I and meiosis-II. *Nat Genet* 14:400-405
- Lamb N, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, *et al.* (1997) Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 6:1391-1399

- Lamb N, Hassold T (2004) Nondisjunction - a view from ringside. *N Engl J Med* 351:1931-1934
- Larramendy ML, El-Rifai W, Knuutila S (1998) Comparison of fluorescein Isothiocyanate- and texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 31:174-179
- Larsen J, Ottensen A, Lundsteen C, Leffers H, Larsen J (2001) Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry* 44:317-325
- LeMarie-Adkins R, Radke K, Hunt PA (1997) Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 139:1611-1619
- Lengauer C, Green ED, Cremer T (1992) Fluorescent in situ hybridization of YAC clones after ALU-PCR amplification. *Genomics* 13:826-828
- Lestou V, Lomax B, Barrett I, Kalousek D (1999) Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology* 59:325-330
- Liehr T, Claussen U, Starke H (2004) Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenetic and Genome Research* 107:55-67
- Liu J, Tsai Y, Zheng X, Yazigi R, Baramki T, Compton G, Katz E (1998) Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 4:972-977
- Lo A, Liao G, Rocchi M, Choo K (1999) Extreme reduction of chromosome-specific alpha-satellite array is unusually common in human chromosome 21. *Genome Res* 9:895-908
- Los FJ, Van Opstal D, Van den Berg C (2004) The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. *Human Reproduction Update* 10:79-94

M

- Magli M, Gianaroli L, Ferraretti A, Toschi M, Esposito F, Fasolino M (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Human Reproduction* 19:1163-1169
- Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munné S (1999) Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Human Reproduction* 4:770-773
- Mahmood R, Brierley CH, Faed MJW, Mills JA, Delhanty JDA (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Human Genetics* 106:620-626
- Malmgren H, Sahlén S, Inzunza J, Aho M, Rosenlund B, Fridström M, Hovatta O, Åhrlund-Richter L, Nordenskjöld M, *et al.* (2002) Single cell CGH analysis reveals a high degree of mosaicism in human embryos from patients with balanced structural chromosome aberrations. *Molecular Human Reproduction* 8:502-510
- Maratou K, Siddique Y, Kessling A, Davies G (2000) Variation in alphoid DNA size and trisomy 21: a possible cause of nondisjunction. *Hum Genet* 106:525-530
- Márquez C, Cohen J, Munné S (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenetics and Cell Genetics* 81:254-258

- Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S (2000) Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 1:17-27
- Martin RH (1984) Comparison of chromosomal abnormalities in hamster egg and human sperm pronuclei. *Biol Reprod* 31:819-825
- Martini E, Flaherty SP, Swann NJ, Payne D, Matthews CD (1997) Analysis of unfertilized oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection using two rounds of fluorescence in-situ hybridization and probes to five chromosomes. *Human Reproduction* 12:2011-2018
- Martini E, Flaherty S, Swann N, Matthews C, Ramaekers F, Geraedts J (2000) FISH analysis of six chromosomes in unfertilized human oocytes after polar body removal. *J Assist Reprod Genet* 17:276-283
- Meldrum D (1993) Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertility and Sterility* 59:1-5
- Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B (1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Human Reproduction* 7:101-106
- Menken J, Trussel J, Larsen U (1986) Age and fertility. *Science* 233:1389-1394
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91:35-45
- Mikamo K, Kamiguchi Y (1983) Primary incidences of spontaneous chromosomal anomalies and their origins and causal mechanisms in the Chinese hamster. *Mutat Res* 108:265-278
- Miller OJ, Therman E (2001) *Human chromosomes*. Springer-Verlag, Inc, New York
- Molnar M, Bahler J, Sipiczki M, Kohli J (1995) The *rec8* gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in linear element formation, chromosome pairing and sister-chromatid cohesion during meiosis. *Genetics* 141:61-73
- Montag M, Van der Ven K, Dorn C, Van der Ven H (2004) Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 9:425-429
- Moore D, Pallavicini M, Cher M, Gray J (1997) A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 28:183-190
- Munné S, Alikani M, Cohen J (1994a) Monospermic polyploid and atypical embryo morphology. *Human Reproduction* 9:506-510
- Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier H-U (1994b) Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multi-probe FISH study. *American Journal of Human Genetics* 55:150-159
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995a) Embryo morphology, development rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility* 64:382-391
- Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J (1995b) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Human Reproduction* 10:1014-1020
- Munné S, Magli C, Bahçe 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. *Prenatal Diagnosis* 18:1459-1466
- Munné S, Morrison L, Fung J, Márquez C, Weier H, Bahçe M (1998b) Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15:290-296
- Munné S, Scott R, Sable D, Cohen J (1998c) First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertility and Sterility* 69:675-681

- Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Márquez C, Sable D, *et al.* (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reproduction* 14:2191-2199
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J, Network atSBMCP (2000) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertility and Sterility* 73:1209-1218
- Munné S (2002) Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online* 4:183-196
- Munné S, Cohen J, Sable D (2002) Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertility and Sterility* 78:234-236
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J, Sable D (2003) Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reproductive Biomedicine Online* 7:91-97
- Munné S, Wells D (2003) Questions concerning the suitability of comparative genomic hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and Sterility* 80:871-872
- Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M, *et al.* (2004) Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reproductive Biomedicine Online* 8:81-90
- Munné S, Escudero T, Fisher J, Chen S, Hill J, Stelling J, Estop A (2005) Negligible interchromosomal effect in embryos of robertsonian translocation carriers. *Reprod Biomed Online* 10:363-369

N

- 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. *Human Reproduction* 13:419-424
- Navarro J, Gutierrez-Mateo C, Pujol A, Durban M, Sánchez-García JF, Egozcue J, Benet J (in press) Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD): Screening for aneuploidy in human oocytes and polar bodies. In: Wells, D (ed) *Cytogenetics in Reproductive Medicine*. Landes Bioscience / Eureka.com, Georgetown
- Navot D, Bergh P, Williams M, Garrisa G, Guzman I, Sandler B (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female infertility. *Lancet* 337:1375-1377
- Nicolaidis P, Petersen M (1998) Origin and mechanisms of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Human Reproduction* 13:313-319
- Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substitutes polyamide. *Science* 254:1497-1500
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, *et al.* (2001) A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 108:199-204
- Norwitz E, Schust D, Fisher S (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400-1408

O

- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J (2002) Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Molecular Human Reproduction* 8:958-963
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, *et al.* (2003) Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *European journal of human genetics* 11:879-883
- Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, Starke H, Greene C, Ko E, *et al.* (In press.) Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Human Reproduction*

P

- Pardo-Manuel de Villena F, Sapienza C (2001) Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females. *Mamm Genome* 12:331-339
- Paulasova P, Andréo B, Diblík J, Macek M, Pellestor F (2004) The peptide nucleic acids as probes for chromosomal analysis: application to human oocytes, polar bodies and preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction* 10:467-472
- Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C, Pellicer A (2003) Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online* 6:232-237
- Pellestor F (1991a) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Human Genetics* 86:283-288
- Pellestor F (1991b) Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Human Reproduction* 6:1252-1258
- Pellestor F, Dufour M, Arnal F, Humeau C (1993) A simplified method for R banding of human oocyte chromosomes. *Human Reproduction* 8:604-608
- Pellestor F, Imbert I, Andréo B, Lefort G (2001) Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization and primed in-situ labelling techniques. *Human Reproduction* 16:1155-1164
- Pellestor F, Andréo 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. *Human Reproduction* 17:2134-2145
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Human Genetics* 112:195-203
- Pellestor F, Anahory T, Hamamah S (2005) The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Human Reproduction Update* 11:15-32
- Peterson M, Mikkelsen M (2000) Non disjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenet Cell Genet* 91:199-203
- 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. *Prenatal Diagnosis* 20:1067-1071
- Pickering S, Johnson M, Braude PR, Houliston E (1988) Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Human Reproduction* 3:978-989

- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9138-9142
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kno W, Chen C, *et al.* (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211
- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallionemi A, Kallionemi O, Waldman F, Gray JW, Pinkel D (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:10-26
- Pirker C, Raidl M, Steiner E, Elbling L, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Aubele M, Grasl-Kraupp B, Marosi C, *et al.* (2004) Whole genome amplification for CGH analysis: Linker-Adapter PCR as the method of choice for difficult and limited samples. *Cytometry* 61A:26-34
- Piyamongkol W, Bermúdez M, Harper J, Wells D (2003) Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Molecular Human Reproduction* 9:411-420
- Plachot M, Veiga A, Montagut J, Grouchy Jd, Calderon G, Lepretre S, Junca A, Santalo J, Carles E, *et al.* (1988) Are clinical and biological IVF parameters corelated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Human Reproduction* 3:627-635
- Plachot M, Mandelbaum J, Junca A (1990) Qualite de l'oocyte et de l'embryon et resultat de la FIV. *Contraception Fert Sex* 18:636-638
- Plachot M (2001) Chromosome abnormalities in oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183:S59-S63
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P (2005) Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. *Fertility and Sterility* 83:393-397
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J, Navarro J (2003a) Analysis of nine chromosome probes in 1st polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *European Journal of Human Genetics* 11:325-336
- Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, 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
- Pujol A, Benet J, Campillo M, Codina-Pascual M, Egozcue J, Navarro J (2004) The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD. *Cytogenetic and Genome Research* 105:29-35

R

- Roizés G (1992) The origin of non-disjunction in human chromosomes: an hypothesis. *Genetics* 11:239-240
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 18:182-188

S

- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G (1992) The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4913-4917
- Sánchez-García JF, Benet J, Gutiérrez-Mateo C, Sécúli J, Monrós E, Navarro J (in press) Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol Hum Reprod*
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S (2001) Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Human Reproduction* 19:1954-1958
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Molecular Human Reproduction* 8:580-585
- Savage AR, Petersen M, Pettay D, Taft L, Allran K, Freeman SB, Karadima L, Avramopoulos D, Torfs C, *et al.* (1998) Nondisjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum Mol Genet* 3:1529-1535
- Schimiady H, Tandler-Schneider A, Kentenich H (1996) Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 11:2239-2245
- Schon E, Kim S, Ferreira J, Magalhaes P, Grace M, Wardburton D, Gross S (2000) Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection? *Human Reproduction* 15:160-172
- Schröck E, Manoir Sd, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith M, Nin Y, Ledbetter D, Bar-Am I, *et al.* (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497
- Senger G, Chudoba I, Plesch A (1998) Multicolor-FISH: the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *Bioforum* 9:499-503
- Sermon K (2002) Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Human Reproduction Update* 8:11-20
- Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Preimplantation genetic diagnosis. *The Lancet* 363:1633-1641
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, *et al.* (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Human Reproduction* 20:19-34
- Shahine LK, Caughey AB (2005) Preimplantation genetic diagnosis: the earliest form of prenatal diagnosis. *Gynecol Obstet Invest* 60:39-46
- Sherman S, Takaesu N, Freeman S, Grantham M, Phillips C, Blackston R, Jacobs P, Cockwell A, Freeman V, *et al.* (1991) Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. *American Journal of Human Genetics* 49:608-620
- Sherman S, Peterson M, Freeman S, Hersey J, Pettay D, Taft L, Frantzen M, Mikkelsen M, Hassol T (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 (1990) Incidence and timing of pregnancy losses: Relevance to evaluating safety of prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics* 35:165-173

- Snabes M, Chong S, Subramanian S, Kristjansson K, DiSepio D, Hugues M (1994) Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6181-6185
- Sousa M, Tesarik J (1994) Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 9:2374-2380
- Speicher MR, Schoell B, Du Manoir S, Schröck E, Ried T, Cremer T, Storkel S, Kovacs A, Kovacs G (1994) Specific loss of chromosome 1, 2, 6, 10, 13, 17 and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 145:356-364
- Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12:368-375
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 19:2849-2858
- Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, sandalinas M, Brenner CA (2001) Association between spindle assembly chechpoint expression and maternal age in human oocytes. *Molecular Human Reproduction* 7:49-55
- Stirrat G (1990) Recurrent miscarriage: definition and epidemiology. *Lancet* 336:673-675
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Ko E, Rademaker A, Navarro J, Benet J, Martin RH (2004) Human male recombinations maps for individual chromosomes. *The American Journal of Human Genetics* 74:521-531

T

- Tarkowski A (1966) An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR: General Amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725
- Templado C, Bosch M, Benet J (in press) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenetic and Genome Research*
- Thomas SN, Ennis S, Sharp AJ, Durkie M, Hassold T, Collins AR, Jacobs PA (2001) Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. *Human Molecular Genetics* 10:243-250
- Tindall K, Kunkel T (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27:6008-6013
- Trussler J, Pickering S, Ogilvie CM (2004) Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online* 8:701-711

U

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

V

- Vendrey R (1955) The deoxyribonucleic acid content of the nucleus. Vol II. Academic Press, New York
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, M. Strom C (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human Reproduction* 5:826-829
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, *et al.* (1999) Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16:165-169
- Verlinsky Y, Evsikov S (1999) Karyotyping of human oocytes by chromosomal analysis of the second polar body. *Molecular Human Reproduction* 5:89-95
- Verlinsky Y, Kuliev A (2003) Preimplantation diagnosis for aneuploidies using fluorescence in situ hybridization or comparative genomic hybridization. *Fertility and Sterility* 80:869-870
- Vig B (1987) Sequence of centromere separation: a possible role for repetitive DNA. *Mutagenesis* 2:155-159
- Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenatal Diagnosis* 19:846-851
- Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L (2000) Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Human Genetics* 106:210-217
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R (2002) Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from pwomen with repeated implantation failure. *Molecular Human Reproduction* 8:1035-1041

W

- Wall M, Marks K, Smith T, Gearon C, Muggleton-Harris A (1996) Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected "failed-fertilized" human oocytes. *Human Reproduction* 11:2230-2238
- Wardburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B (1986) Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porter, L, Willey, A (eds) *Perinatal genetics: diagnosis and treatment*. Academic press, New York, pp 133-148
- Watt J, Templeton A, Messinis I, Bell L, Cunningham P, Duncan R (1987) Trisomy 1 in an eight cell human pre-embryo. *Journal of Medical Genetics* 24:60-64
- Weier H-U, Weier J, Oter-Renom M, Zheng A, Colls P, Nureddin A, Pham C, Chu L, Racowsky C, *et al.* (2004) Fluorescence in situ hybridization and spectral imaging analysis of human oocytes and first polar bodies. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 52:1-4
- Wells D, Sherlock J (1998) Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenatal Diagnosis* 18:1389-1401
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Research* 27:1214-1218

- Wells D, Delhanty JDA (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction* 6:1055-1062
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA, Munné S (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility* 78:543-549
- Wells D, Levy B (2003) Cytogenetics in reproductive medicine: the contribution of comparative genomic hybridization (CGH). *Bioessays* 25:289-300
- Wells D, Steuerwald N, Chu L, Weier U, Cohen J, Munné S (2004) Microarrays for analysis and diagnosis of human embryos. In: In Papp, Z, Rodeck, C (eds) *Recent advances in prenatal genetic diagnosis*. Medimond, Bologna, Italy, pp 9-17
- Wilcox A, Weinberg C, O'Connor J, Baird D, Schlatterer J, Canfield R, Armstrong E, Nisula B (1988) Incidence of early loss pregnancy. *N Engl J Med* 319:189-194
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L (2001) Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by compared genomic hybridization. *New England Journal of Medicine* 345:1537-1541
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J (2003a) Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility* 80:860-868
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J (2003b) Preimplantation embryo screening using comparative genomic hybridization. *Fertility and Sterility* 80:875-876
- Wilton L (2005) Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Human Reproduction Update* 11:33-41
- Wolstenholme J, Angell R (2000) Maternal age and trisomy - a unifying mechanism of formation. *Chromosoma*? 109:435-438

Z

- Zenzes M, de Geyter C, Bordt J, Schneider H, Nieschlag E (1990) Abnormalities of sperm chromosome condensation in the cytoplasm of immature human oocytes. *Human Reproduction* 5:842-846
- Zenzes M, Casper R (1992) Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet* 88:367-375
- Zenzes M, Wang P, Casper R (1992) Evidence for maternal predisposition to chromosome aneuploidy in multiple oocytes of some in vitro fertilization patients. *Fertility and Sterility* 57:143-149
- Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5847-5851

ANNEX

TÈCNiques PER A L'ANÀlisi D'OòCITS: AVANTATGES I INCONVENIENTS

	AVANTATGES	INCONVENIENTS
Citogenètica convencional i/o cariotipat	<ul style="list-style-type: none"> - Permet el comptatge del nombre de cromosomes 	<ul style="list-style-type: none"> - Depèn d'una bona extensió cromosòmica - Susceptible a pèrdues cromosòmiques artefactuals - Eficiència global baixa - No s'identifiquen aneuploidies específiques - Molt sovint no permet distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtida
FISH/PRINS	<ul style="list-style-type: none"> - Ràpida. - Identificació d'aneuploidies específiques - Permet estudiar cèl.lules en metafase però també en interfase - Permet distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtida 	<ul style="list-style-type: none"> - Depenen de la fixació del material i per tant són susceptibles a pèrdues cromosòmiques artefactuals. - Limitat nombre de cromosomes que poden analitzar-se. - És necessari predefinir els cromosomes que s'analitzen. - Detecció només de certes regions dels cromosomes (centròmers, telòmers...)
PNAs	<ul style="list-style-type: none"> - És ràpida, permet l'estudi de cèl.lules en metafase i en interfase i la identificació d'aneuploidies específiques - Permet distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtida - Específica i eficient 	
M-FISH/SKY	<ul style="list-style-type: none"> - Permeten analitzar la totalitat de cromosomes sense predefinir els cromosomes que s'analitzen. - Identificació d'aneuploidies específiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Depenen d'una bona extensió cromosòmica - Susceptibles a pèrdues cromosòmiques artefactuals - Eficiència global baixa - De vegades no permeten distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtida - No es pot aplicar a mostres bandejades i no detecten cromosomes marcadors sense eucromatina.
CenM-FISH	<ul style="list-style-type: none"> - Permeten analitzar la totalitat de cromosomes sense predefinir els cromosomes que s'analitzen. - Identificació d'aneuploidies específiques - Ràpida - Eficax en mostres bandejades i en la detecció de cromosomes marcadors sense pràcticament eucromatina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Depèn d'una bona extensió cromosòmica - Susceptible a pèrdues cromosòmiques artefactuals - Eficiència global baixa - Detecció només dels centròmers dels cromosomes
CGH	<ul style="list-style-type: none"> - Permet analitzar la totalitat de cromosomes sense predefinir els cromosomes que s'analitzen - Identificació d'aneuploidies específiques - Permet detectar desequilibris al llarg dels cromosomes - No depèn de la fixació del material - Avaluació fiable de les hipohaploïdies - Eficiència global elevada 	<ul style="list-style-type: none"> - No detecta alteracions citogenètiques equilibrades ni canvis de ploïdia - Resolució en cèl.lules aïllades: 10-40 Mb - Requereix l'amplificació total de la cèl.lula - Tècnica laboriosa que requereix un mínim de quatre dies per donar resultats - Presenta regions conflictives on l'anàlisi no és del tot fiable: centròmers, telòmers, heterocromatina i cromosomes 17, 19 i 22 - Molt sovint no permet distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtida
M-CGH	<ul style="list-style-type: none"> - Permet analitzar la totalitat de cromosomes i identificar aneuploidies específiques - Permet detectar desequilibris al llarg dels cromosomes - No depèn de la fixació del material - Avaluació fiable de les hipohaploïdies - És ràpida i permet l'automatització - Alta resolució: 45 Kb-1 Mb 	<ul style="list-style-type: none"> - No detecta alteracions citogenètiques equilibrades - Requereix l'amplificació total de la cèl.lula - En fase encara molt experimental