

Doctorat en Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia



Desenvolupament de noves estratègies de diagnòstic molecular aplicades a la prevenció de la trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune

Memòria de la Tesi presentada per obtenir el grau de Doctor en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 2013.

Autor: Laia Freixa Puig
Director: Dra. Núria Nogués Gálvez
Tutor: Dr. Ricardo Pujol Borrell

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.

Marie Curie

ÍNDEX

I. ABREVIATURES.....	6
II. RESUM.....	10
III. INTRODUCCIÓ.....	12
III.1. Antigenes plaquetars.....	12
III.1.1. Sistemes HPA (Human Platelet Antigens).....	12
III.1.1.1. Classificació i nomenclatura	13
III.1.1.2. Base molecular i localització glicoproteica	13
III.1.1.3. Sistema HPA-1	15
III.1.1.4. Freqüències dels antigenes plaquetars específics entre els diferents grups ètnics	16
III.1.1.5. Importància clínica	17
III.1.2. Tipificació HPA.....	18
III.1.2.1. PCR-SSP.....	19
III.1.2.2. Assaig (TaqMan [®]) 5'-nucleasa.....	20
III.1.2.3. Plataforma de genotipatge extensiu a gran escala.....	21
III.1.3. Isoantigenes plaquetars	21
III.1.3.1. Alteracions en l'expressió de les glicoproteïnes de la membrana plaquetar	22
III.2. Trombocitopènia fetal i neonatal al·loimmune (TFNA)	22
III.2.1. Característiques del quadre clínic.....	22
III.2.2. Fisiopatologia.....	23
III.2.3. Immunitat cel·lular associada a la TFNA	24
III.2.4. Associació de la TFNA i l'al·lel HLA-DRB3*0101 de classe II.....	25
III.2.5. Diagnòstic de la TFNA	26
III.2.5.1. Diagnòstic Immunohematològic.....	28
III.2.6. Tractament i profilaxis.....	29
III.2.7. Diferències entre la trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune i la malaltia hemolítica del fetus/nouat.....	30
III.3. Diagnòstic genètic prenatal	32
III.3.1. Tècniques invasives	32
III.3.1.1. Amniocentesi	33
III.3.1.2. Biòpsia de vellositats coriòniques.....	33
III.3.1.3. Cordocentesi o funiculocentesi	34
III.3.2. Tècniques no invasives	35
III.3.2.1. Cèl·lules fetals circulant en sang materna.....	36

III.3.2.1.1.	Descobriment.....	36
III.3.2.1.2.	Tipus de cèl·lules fetals en la circulació materna.....	37
III.3.2.1.2.1.	Leucòcits.....	37
III.3.2.1.2.2.	Trofoblasts	38
III.3.2.1.2.3.	Eritroblasts	39
III.3.2.1.2.4.	Cèl·lules mare i progenitors hematopoètics (HMCs)	39
III.3.2.2.	Àcids nucleics d'origen fetal en circulació materna	40
III.3.2.2.1.	ADN fetal lliure circulant en plasma matern	40
III.3.2.2.1.1.	Antecedents	40
III.3.2.2.1.2.	Fisiologia de l'ADN fetal circulant en plasma matern	42
III.3.2.2.1.2.1.	Origen.....	42
III.3.2.2.1.2.2.	Cinètica de la concentració de l'ADN fetal lliure en plasma matern.....	43
III.3.2.2.1.3.	Característiques dels àcids nucleics en plasma matern	44
III.3.2.2.1.4.	Aplicacions clíniques de l'ADN lliure circulant en plasma matern	45
III.3.2.2.1.4.1.	Determinació del sexe fetal	46
III.3.2.2.1.4.2.	Determinació del genotip fetal Rh(D)	47
III.3.2.2.1.4.3.	Determinació d'altres polimorfismes de grup sanguini	48
III.3.2.2.1.4.4.	Perspectives de futur	49
III.3.2.2.1.4.5.	Anàlisi quantitatiu	50
III.3.2.2.2.	ARNm circulant en plasma matern	50
III.4.	Diagnòstic genètic preimplantacional	51
III.4.1.	Procediment del DGP	51
III.4.1.1.1.	Biòpsia dels corpuscles polars.....	52
III.4.1.1.2.	Biòpsia de blastòmers	53
III.4.1.1.3.	Biòpsia del blastocist.....	54
III.4.1.2.	Diagnòstic genètic.....	55
III.4.1.2.1.	Mètodes citogenètics.....	55
III.4.1.2.2.	Mètodes de diagnòstic molecular.....	56
III.4.1.2.3.	Preamplificació total del genoma	58
III.4.1.2.4.	Inclusió de marcadors microsatèl·lits	60
III.4.1.2.5.	Consideracions importants pel DGP.....	61
III.4.2.	Consideracions legals sobre les indicacions del DGP.....	64
IV.	HIPÒTESI.....	66
V.	OBJECTIUS.....	67
VI.	MATERIAL I MÈTODES	68
VI.1.	Tipificació del sistema HPA-1	68

VI.1.1.	Extracció d'ADN genòmic	68
VI.1.1.1.	Extracció d'ADN utilitzant el sistema de columnes QIAamp DNA Blood Mini Kit.....	68
VI.1.1.2.	Extracció d'ADN automatitzada.....	69
VI.1.1.3.	Amplificació dels al·lels HPA-1 mitjançant PCR amb <i>primers</i> específics de seqüència (PCR-SSP)	70
VI.1.1.4.	Separació electroforètica dels productes de PCR.....	72
VI.2.	Mesures necessàries per evitar contaminacions per al diagnòstic genètic prenatal i preimplantacional.....	72
VI.3.	Diagnòstic prenatal no invasiu	73
VI.3.1.	Obtenció de les mostres	73
VI.3.1.1.	Mostres de gestants HPA-1a negatiu	73
VI.3.1.2.	Mostres control	76
VI.3.2.	Processament de les mostres	76
VI.3.2.1.	Separació del plasma	76
VI.3.2.2.	Extracció d'ADN a partir de plasma	77
VI.3.2.3.	Genotipatge HPA-1a fetal a partir d'ADN de plasma matern.....	78
VI.3.2.3.1.	PCR a temps real al·lel específica mitjançant l'assaig TaqMan	78
VI.3.3.	Anàlisi de marcadors d'ADN fetal.....	79
VI.3.3.1.	Anàlisi del marcador epigenètic RASSF1A	79
VI.3.3.1.1.	Mostres de gestants utilitzades en l'avaluació	80
VI.3.3.1.2.	Digestió enzimàtica de l'ADN de plasma amb l'endonucleasa <i>Bst</i> UI.....	81
VI.3.3.1.3.	Amplificació per PCR a temps real dels gens RASSF1A i β -Actina	82
VI.3.3.2.	Anàlisi del gen SRY com a marcador del cromosoma Y	84
VI.3.3.2.1.	Amplificació del gen SRY per PCR a temps real.....	84
VI.3.3.2.2.	Amplificació Multiplex del gen SRY i l'al·lel HPA-1b per PCR a temps real.....	85
VI.3.4.	Quantificació de l'ADN total lliure en plasma matern.....	86
VI.3.4.1.	Preparació de la dilució seriada de l'estàndard.....	86
VI.3.4.2.	Amplificació del gen CCR5 per PCR a temps real.....	88
VI.3.4.3.	Construcció d'una corba patró	89
VI.4.	Diagnòstic genètic preimplantacional	90
VI.4.1.	Mostres biològiques	90
VI.4.2.	Anàlisi dels blastòmers	90
VI.4.2.1.	Obtenció i aïllament de cèl·lules	90
VI.4.2.2.	Tècnica del Multiple Displacement Amplification (MDA).....	91
VI.4.2.3.	Gel d'electroforesi	93
VI.4.2.4.	Detecció del polimorfisme HPA-1a/1b per PCR a temps real mitjançant sondes TaqMan MGB al·lel específiques	93

VI.4.2.5.	Anàlisi dels STRs.....	94
VI.4.2.5.1.	Amplificació dels marcadors microsatèl·lits	94
VI.4.2.5.2.	Electroforesi capil·lar dels productes de PCR	96
VII.	RESULTATS.....	98
VII.1.	Desenvolupament d'una estratègia per a la determinació del genotip HPA-1a fetal a partir del plasma matern	98
VII.1.1.1.	Consideracions tècniques importants per al disseny de l'estratègia	98
VII.1.1.2.	Abordatge de diferents estratègies per a la determinació del genotip fetal mitjançant PCR a temps real.....	98
VII.1.1.2.1.	Estratègia de tipatge amb sonda TaqMan MGB al·lel específica.....	99
VII.1.1.2.1.1.	Disseny	99
VII.1.1.2.1.2.	Resultats	99
VII.1.1.2.2.	Estratègia d'inclusió de LNAs en la sonda.....	99
VII.1.1.2.2.1.	Disseny	99
VII.1.1.2.2.2.	Resultats	100
VII.1.1.2.3.	Estratègia bloqueig de l'amplificació amb PNAs.....	101
VII.1.1.2.3.1.	Disseny	101
VII.1.1.2.3.2.	Resultats	102
VII.1.1.2.4.	Estratègia de digestió amb <i>HpaII</i>	103
VII.1.1.2.5.	Estratègia <i>primers</i> específics i sonda genèrica	104
VII.1.1.3.	Validació tècnica de l'estratègia de tipatge fetal.....	105
VII.1.1.4.	Validació clínica amb mostres de gestants HPA-1b1b a diferents setmanes de gestació	106
VII.1.1.4.1.	Mostres recollides.....	106
VII.1.1.4.2.	Resultats obtinguts	106
VII.1.1.4.3.	Anàlisi de la concordança amb el genotip del nadó	108
VII.1.1.5.	Quantificació de l'ADN de plasma	108
VII.1.1.5.1.	Resultats de la quantificació d'ADN total en plasma de gestants HPA-1b1b	108
VII.1.1.5.2.	Resultats de la quantificació d'ADN total present en els controls negatius	111
VII.1.1.6.	Incorporació d'uns marcadors d'ADN fetal	113
VII.1.1.6.1.	Multiplexació amb gen SRY.....	113
VII.1.1.6.2.	Detecció del marcador epigenètic RASSF1A	114
VII.1.1.6.2.1.	Posta a punt de l'assaig RASSF1A	114
VII.1.1.6.2.2.	Inclusió dels controls β -actina.....	115
VII.1.1.6.2.3.	Avaluació amb mostres de gestants	115
VII.2.	Diagnòstic genètic preimplantacional	117
VII.2.1.	Selecció i avaluació dels marcadors STRs	117

VII.2.1.1.	Localització i informació disponible.....	117
VII.2.1.2.	Amplificació i anàlisi del perfil al·lèlic d'aquests marcadors	118
VII.2.1.3.	Estudi d'informativitat amb 10 parelles	119
VII.2.2.	Disseny i posta a punt d'una estratègia de tipificació HPA mitjançant PCR a temps real a partir d'una sola cèl·lula	121
VII.2.3.	Avaluació d'un protocol de preamplificació total del genoma mitjançant MDA	122
VII.2.4.	Estudi de validació	123
VII.2.4.1.	Criteris de selecció.....	123
VII.2.4.1.1.	Determinacions en els progenitors.....	123
VII.2.4.1.1.1.	Tipatge HPA-1	124
VII.2.4.1.1.2.	STRs.....	124
VII.2.4.1.2.	Determinacions en blastòmers	125
VII.2.4.1.2.1.	Tipatge HPA-1	126
VII.2.4.1.2.2.	STRs.....	127
VII.2.4.1.3.	Estimació de l'incidència d'ADO	130
VII.2.5.	Optimització d'un protocol de DGP	130
VII.2.5.1.	Modificació del protocol MDA amb inclusió de <i>primers</i> específics	130
VIII.	DISCUSSIÓ.....	132
VIII.1.	Diagnòstic genètic prenatal	132
VIII.2.	Diagnòstic genètic preimplantacional	137
IX.	CONCLUSIONS.....	144
X.	ANNEXOS.....	146
XI.	BIBLIOGRAFIA	166

I. ABREVIATURES

1CP	primer corpuscle polar
2CP	segon corpuscle polar
Ac	anticòs
AcMo	anticòs monoclonal
AcPo	anticòs policlonal
ADN	àcid desoxiribonucleic
ADNg	àcid desoxiribonucleic genòmic
ADO	<i>allele drop-out</i>
Ag	antigen
AP	amplificació preferencial
ARN	àcid ribonucleic
ARNm	àcid ribonucleic missatger
°C	graus centígrads
C ₀	concentració estàndard inicial
CCR5	gen <i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
DGP	diagnòstic genètic preimplantacional
DGPC	diagnòstic genètic preconcepcional
DOP-PCR	<i>degenerate oligonucleotide primed PCR</i>
dNTPs	deoxinucleòsid trifosfat
DGPNI	diagnòstic genètic prenatal no invasiu
DTT	dithiotreitol
DYS14	marcador de seqüència multicopia localitzat en el gen TSPY1
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EDTA	àcid etildiaminatetraacètic
FAM	6-carboxifluoresceïna

Fc	fracció constant de la Ig
FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FIV	fecundació <i>in vitro</i>
g	força centrífuga relativa
GP	glicoproteïna
H ₀	heterozigositat
hCG	gonadotropina coriònica humana
HGH	hormona del creixement
HIC	hemorràgia intracranial
HLA	antigen d'histocompatibilitat leucocitari
HMCs	progenitors hematopoètics
HPA	antígens plaquetars humans
hPL	lactògen placentari humà
ICSI	<i>Intracytoplasmatic Sperm Injection</i>
Ig	immunoglobulina
ITGB3	gen que codifica la integrina $\beta 3$
IVIG	immunoglobulina intravenosa
kDa	kilodalton
KV	kilovolts
L	litre
LES	lupus eritematós sistèmic
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
M	molar
Mb	megabase
MII	segona divisió meiòtica
MAIPA	<i>monoclonal antibody immobilization of platelet antigens</i>
MDA	<i>multiple displacement amplification</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MHFN	malaltia hemolítica del fetus i del nounat

Min	minuts
ml	mililitre
mM	milimolar
MPS	<i>massively parallel sequencing</i>
ng	nanograms
nM	nanomolar
NRBCs	<i>nucleated red blood cells</i>
pb	parell de bases
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PCR-SSP	PCR amb <i>primers</i> específics de seqüència
PEP-PCR	<i>primer extension preamplification PCR</i>
pg	picograms
PGS	<i>preimplantation genetic screening</i>
PNAs	<i>peptide nucleic acid</i>
PTP	púrpura trombocitopènica postransfusional
PVA	polivinil alcohol
RASSF1A	gen <i>Ras Association Domain Family1, isoform A</i>
ROX	6-carboxirodamina
rpm	revolucions per minut
RT-PCR	PCR a temps real
Seg	segons
SEGO	sociedad española de ginecología i obstetrícia
SETS	sociedad española de transfusión sanguínia i terapia celular
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SRY	<i>sex determining region Y</i>
STR	<i>short tandem repeats</i>
TAE	tris-acètic EDTA
TFNA	trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune

T _m	temperatura de <i>melting</i>
U	unitats
V _f	volum final
VNTR	<i>variable number tandem repeat</i>
vWf	factor Von Willebrand
WGA	<i>whole genome amplification</i>
μg	micrograms
μL	microlitre
μM	micromolar

II. RESUM

La trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune (TFNA) és la causa més comú de trombocitopènia greu en el nou-nat. Aquest quadre clínic es produeix per l'acció d'un al·loanticòs matern de tipus IgG que reacciona contra un antigen plaquetar específic (HPA), heretat del pare, que està present en les plaquetes fetals provocant la destrucció d'aquestes. En la població caucàsica, l'al·loimmunització enfront l'antigen HPA-1a és la causa del 85% dels casos de TFNA diagnosticats. Tot i que es tracta d'un quadre relativament poc freqüent (1 afecte de cada 1000-2000 naixements), la TFNA presenta complicacions greus en un percentatge significatiu de casos, sent la complicació més greu l'hemorràgia intracranial. Les gestants de risc s'identifiquen majoritàriament quan ja han tingut complicacions en l'embaràs i/o un fill afecte anterior, ja que de rutina no es realitza un control prenatal per detectar anticossos antiplaquetars ni per tipificar els sistemes antigènics de plaquetes en les gestants.

En el cas de dones HPA-1a negatiu sensibilitzades per aquest antigen, el coneixement del genotip HPA-1 fetal en gestacions subsegüents és molt important per determinar si el fetus es troba en risc de TFNA i per fer un bon maneig adequat d'aquestes gestacions.

En aquest treball s'ha posat a punt una estratègia per la determinació del genotip HPA-1 fetal en gestants HPA-1a negatiu mitjançant una aproximació no invasiva, que permetria evitar l'ús de les actuals tècniques invasives disponibles pel genotipatge HPA-1a fetal i els riscos associats que comporten, tant pel fetus com pel possible increment de la sensibilització materna. Aquesta estratègia consisteix en la detecció d'un únic SNP responsable del polimorfisme HPA-1a/1b a partir de l'ADN fetal circulant en plasma matern, tenint en compte les dificultats tècniques que això suposa per la baixa proporció d'ADN fetal present en plasma matern. Per complementar aquesta estratègia i evidenciar la presència d'ADN fetal s'ha utilitzat l'amplificació d'una seqüència corresponent al promotor d'un gen supressor de tumors (RASSF1A) que conté diferències epigenètiques entre l'ADN matern i l'ADN fetal proporcionant així un possible marcador d'ADN fetal universal.

Atesos als avenços tecnològics dels darrers anys que permeten detectar mutacions, fins i tot puntuals, a partir d'una sola cèl·lula i la consegüent aplicació d'aquestes tècniques en el context del diagnòstic preimplantacional de malalties monogèniques s'ha abordat també en aquest treball el disseny d'un protocol de DGP aplicat a la prevenció de la TFNA. El desenvolupament d'aquest protocol i la seva validació

permet oferir una alternativa més a les parelles amb antecedents de TFNA greu i un alt risc de recurrència d'aquest quadre clínic, tot i que només en els casos en que el pare sigui heterozigot HPA-1a1b. En aquest context, s'ha posat a punt un protocol pel genotipatge HPA-1 a partir d'un únic blastòmer biopsiat d'embrions obtinguts per fecundació *in vitro* amb la finalitat de detectar i transferir només aquells que siguin HPA-1a negatiu, evitant així la incompatibilitat fetomaterna per l'antigen HPA-1a.

III. INTRODUCCIÓ

III.1. ANTIGENS PLAQUETARS

Les plaquetes són petits fragments citoplasmàtics, irregulars i sense nucli que deriven de la fragmentació de les seves cèl·lules precursoras, els megacariòcits. El recompte normal en sang és de $150-350 \times 10^9$ plaquetes/L i juguen un paper molt important en l'hemostàsia.

En la membrana plaquetar es localitzen diferents tipus d'alloantigens: "els antígens específics" (HPA, *Human Platelet Antigens*) i els denominats "antígens comuns". La diferència recau en que els "antígens específics" o HPA van ser identificats per primera vegada a la membrana plaquetar mitjançant al·loanticossos presents en el sèrum d'individus sensibilitzats i, pel contrari, els anomenats "antígens comuns" es van detectar en plaquetes després d'identificar-se primer en altres cèl·lules i teixits de l'organisme (sistemes AB0, H, Le, I, P i molècules HLA de classe I).

III.1.1. Sistemes HPA (*Human Platelet Antigens*)

Els al·loantigens plaquetars específics estan agrupats en diferents sistemes HPA, acrònim de l'anglès *Human Platelet Antigens* (antígens plaquetars humans), que es localitzen en les glicoproteïnes dels complexos GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V i GPIa/IIa de la membrana plaquetar.

A dia d'avui, s'han descrit un total de 33 al·loantigens plaquetars, que inclouen 6 sistemes HPA bial·lèlics (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 y HPA-15) i una llarga relació de fins a 21 antígens més, de baixa incidència (Taula 1). Els antígens de baixa freqüència s'han definit per la detecció de l'anticòs del corresponent antigen tòxic però no per l'antitòxic. La raó per la qual no s'ha descrit la presència d'alloanticossos per aquests antígens antitòxics és que es presenten amb tal baixa freqüència que els individus homozigots i, per tant, susceptibles a sensibilitzar-se, són molt rars o inexistents.

La taula actualitzada dels sistemes HPA es pot consultar en la pàgina web del *European Bioinformatics Institute (EBI)*: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/index.html>.

Antigen	Glyco-protein	HGNC	Chromosome	Entrez Gene	Ref_Seq	Swiss-Prot	dbSNP	Nucleotide Change	Precursor	Mature Protein	Reference
HPA-1	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs5918	176T>C	L59P	L33P	Newman et al, J Clin Invest 83:1778-81 (1989)
HPA-2	GP1Ib	GP1BA	17	2811	NM_000173	GPBA_Human	rs6065	482C>T	T161M	T145M	Kuijpers et al, J Clin Invest 89:381-4 (1992)
HPA-3	GP1Ib	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	rs5911	2621T>G	I874S	I843S	Lyman et al, Blood 1990, 75:2343-8 (1990)
HPA-4	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs5917	506G>A	R169Q	R143Q	Wang et al, Proceedings of the Japan Academy 67:102-6 (1991)
HPA-5	GP1a	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human	rs10471371	1600G>A	E534K	E505K	Wang et al, J Clin Invest 90:2038-43 (1992)
HPA-6w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs13306487	1544G>A	R515Q	R489Q	Santoso et al, J Clin Invest 92:2427-32 (1993)
HPA-7w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1297C>G	P433A	P407A	Wang et al, Blood 82:3386-91 (1993)
HPA-8w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1984C>T	R662C	R636C	Kuijpers et al, Blood 81:70-6 (1993)
HPA-9w	GP1Ib	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human		2602G>A	V868M	V837M	Santoso et al, J Biol Chem 269:8439-44 (1994)
HPA-10w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		263G>A	R88Q	R62Q	Noris et al, Blood 86:1019-26 (1995)
HPA-11w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1976G>A	R659H	R633H	Peyruchaud et al, Blood 89:2422-28 (1997)
HPA-12w	GP1Ib	GP1BB	22	2812	NM_000407	GPBB_Human		119G>A	G40E	G15E	Simsek et al, Br J Haematol 97:330-335 (1997)
HPA-13w	GP1a	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human		2483C>T	T828M	T799M	Sachs et al, Blood 95:1849-55 (2000)
HPA-14w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1909_1911delAAG	K637del	K611del	Santoso et al, Blood 94:4103-11 (1999)
HPA-15	CD109	CD109	6	135228	NM_133493	Q8TDJ3	rs10455097	2108C>A	S703Y	S682Y	Santoso et al, Blood 99:1205-14 (2002)
HPA-16w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		497C>T	T166I	T140I	Schuh et al, Blood 99:1692-98 (2002)
HPA-17w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		662C>T	T21M	T195M	Jallu et al, Blood 99:4449-56 (2002)
HPA-18w	GP1a	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human		2235G>T	Q745H	Q716H	Stafford et al, Transfusion 48:1432-38 (2008)
HPA-19w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	ss120032848	487A>C	K163Q	K137Q	Bertrand et al, Transfusion 49:2076-83 (2009)
HPA-20w	GP1Ib	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	ss120032852	1949C>T	T650M	T619M	Peterson et al, Transfusion (2009)
HPA-21w	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	ss120032849	1960G>A	E654K	E628K	Peterson et al, Transfusion (2009)
HPA-22bw	GP1Ib	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	rs142811900	584A>C	K195T	K164T	Peterson et al, Transfusion (2012)
HPA-23bw	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human	rs139166528	1942C>T	R648W	R622W	Peterson et al, Transfusion (2012)
HPA-24bw	GP1Ib	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human		1508G>A	S503N	S472N	Jallu et al, Transfusion (2011)
HPA-25bw	GP1a	ITGA2	5	3673	NM_002203	ITGA2_Human		3347C>T	T1116M	T1087M	Kroll et al, Transfusion (2011)
HPA-26bw	GP1IIa	ITGB3	17	3690	NM_000212	ITB3_Human		1818G>T	K606N	K580N	Sachs et al, Thromb Haemost (2012)
HPA-27bw	GP1Ib	ITGA2B	17	3674	NM_000419	ITAB_Human	rs149468422	2614C>A	L872M	L841M	Jallu et al, published online (2012)

Taula 1. Informació genètica de tots els antígens HPA descrits. HGNC. Nom del gen assignat per l'Organització del Genoma Humà (HUGO). Comitè de la nomenclatura genètica.

III.1.1.1. Classificació i nomenclatura

Històricament, els antígens plaquetars es van designar amb el nom dels pacients dels quals es va obtenir l'antisèrum que els definien. Això va resultar posteriorment problemàtic perquè diferents autors van definir un mateix antigen amb l'obtenció d'antisèrums de diferents pacients, de manera que la literatura va esdevenir cada vegada més confusa per a la comunitat científica inexperta en el camp de la immunohematologia.

Amb la finalitat de resoldre aquest problema, Von dem Borne i Dècary van proposar una manera més simple per nombrar aquests antígens plaquetars que consistia en classificar-los numèricament i d'acord amb la data del seu descobriment [Von dem Borne and Dècary, 1990]. La majoria dels sistemes HPA són bial·lèlics, en què les dues variants al·lèliques definides estan determinades per polimorfismes. La anotació "a" designa els al·lels d'alta freqüència, mentre la lletra "b" designa al·lels de baixa freqüència.

Per altra banda, quan s'assigna una "w" (workshop) a un antigen significa que es desconeix l'al·loanticòs reactiu contra l'antigen antitètic [Metcalf, et al., 2003].

III.1.1.2. Base molecular i localització glicoproteica

Els antígens específics de plaquetes estan presents en els 3 complexos glicoproteics principals: IIB/IIIa, Ib/IX/V i Ia/IIa. La majoria d'aquests antígens es localitzen en les glicoproteïnes de membrana que formen el **complex glicoproteic GPIIb/IIIa** (Figura 1Figura 3). Les glicoproteïnes que integren aquest complex són molècules

d'adhesió cel·lular pertanyents a la superfamília de les integrines, que són receptors de membrana que es presenten com a heterodimers de subunitats alfa i beta. La integrina β_3 (GPIIIa, CD61) juntament amb la integrina α_{IIb} (GPIIb, CD41) constitueix el complex heterodimèric glucoproteic GPIIb/IIIa, del qual existeixen de 50000 a 80000 còpies per plaqueta i, el qual, requereix Ca^{2+} per a la seva funció. Els dos gens que codifiquen les dues cadenes glucoproteiques es localitzen en el cromosoma 17.

Principalment la integrina plaquetària $\alpha_{IIb}\beta_3$ actua com a receptor del fibrinogen, una molècula dimèrica capaç d'unir-se a dos d'aquests receptors situats en la mateixa plaqueta o en plaquetes diferents per fer de pont i mediar l'agregació plaquetar. Té d'altres lligands corresponents a proteïnes adhesives com la fibronectina, vitronectina i factor von Willebrand, però la unió del fibrinògen al complex inicia el tràfic de senyals per a l'activació i agregació plaquetar.

Els sistemes HPA-1, -4, -6, -7, -8, -10, -11, -14, -16, -17, -19 i -21 estan localitzats en la glucoproteïna GPIIIa, mentre que els sistemes HPA-3, -9 i -20 se situen en la GPIIb. Existeixen altres antígens HPA de baixa freqüència localitzats en aquest complex, com el HPA-22bw, HPA-23bw, HPA-24bw, HPA-26bw i HPA-27bw.

La majoria dels al·loantígens estan determinats per polimorfismes, a excepció de l'antigen Oe^a que és el resultat d'una deleció de tres nucleòtids en la regió codificant de l'al·lel HPA-1b.

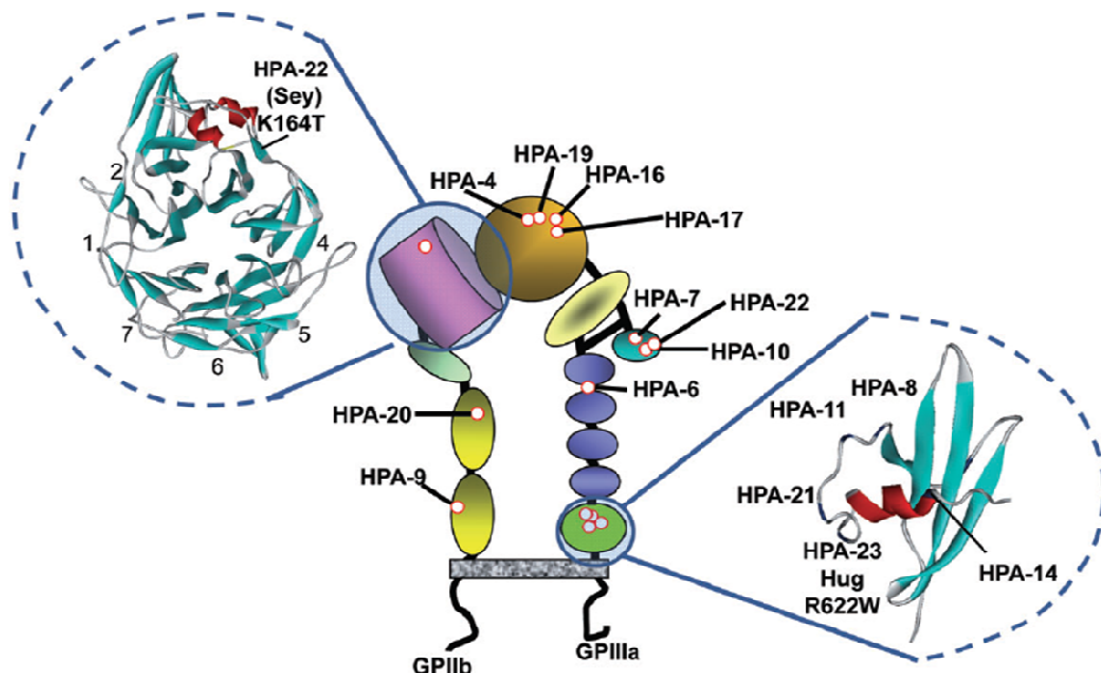


Figura 1. Estructura del complex GPIIb/IIIa on s'indiquen els antígens de baixa freqüència. [Peterson, et al., 2011].

Les glicoproteïnes que constitueixen el **complex GPIb/IX/V** no són integrines, sinó que formen part de la família de proteïnes riques en leucina i actuen com a principal receptor pel factor von Willebrand (vWf) (Figura 2). En cada plaqueta existeixen 25000 còpies d'aquest complex i 12000 de la GPV. En el cromosoma 17 es localitza el gen corresponent a la GPIba. En el cromosoma 22 es localitza el gen que codifica per la GPIb β i en el cromosoma 3 els corresponents a la GPIX i V. Els sistemes HPA-2 i HPA-12 es localitzen en la GPIba i GPIb β respectivament.

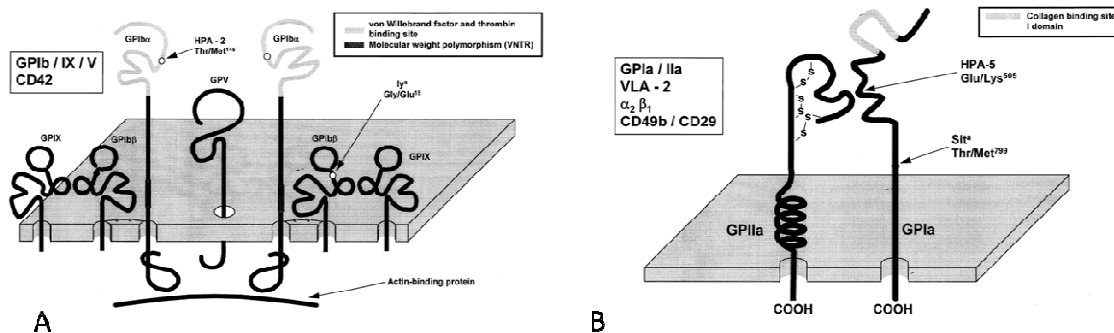


Figura 2. Representació esquemàtica del complex GPIb/IX/V. (A) i del complex GPIa/IIa (B). Els antígens plaquetars específics (HPA) estan senyalats amb una fletxa.

Les glicoproteïnes que formen part del **complex GPIa/IIa** pertanyen, al igual que les del complex GPIIb/IIIa, a la superfamília de les integrines i actuen com a receptor del col·lagen (Figura 2). Existeixen de 800 a 2800 còpies d'aquest complex a la membrana plaquetar. S'han descrit dues substitucions nucleotídiques en el gen que codifica la GPIa que s'associen a una variabilitat en l'expressió d'aquest complex en la membrana plaquetar. Els sistemes que es localitzen en la proteïna GPIa són l'HPA-5, -13, -18 i -25.

Un altre glicoproteïna que actua com a receptor del col·lagen és la **CD109**, en la qual es localitza el sistema HPA-15. D'aquesta proteïna s'expressen entre 1000-2000 còpies per plaqueta.

III.1.1.3. Sistema HPA-1

L'antigen HPA-1a, implicat en la majoria dels casos de TFNA, s'expressa en la glicoproteïna GPIIIa (110 kDa). La diferència genètica entre l'al·lel HPA-1a y HPA-1b és un únic canvi nucleotídic T>C en la posició 196 del gen *ITGB3* que codifica la glicoproteïna i que comporta un canvi aminoacídic en la seva seqüència proteica d'una leucina per una prolina (Leu33Pro) (Figura 3) [Van den Veyver, et al., 1994; Bennett, et al., 1994].

El gen que codifica la GPIIIa o CD61, anomenat *ITGB3*, es localitza en el braç llarg del cromosoma 17, concretament en la regió 17q21.32. Aquest gen s'estén al llarg

de 46 kilobases i comprèn 15 exons, dels quals el dimorfisme HPA-1a/1b es localitza en l'exó 3 [Rosa, et al., 1988; Newman, et al., 1989]

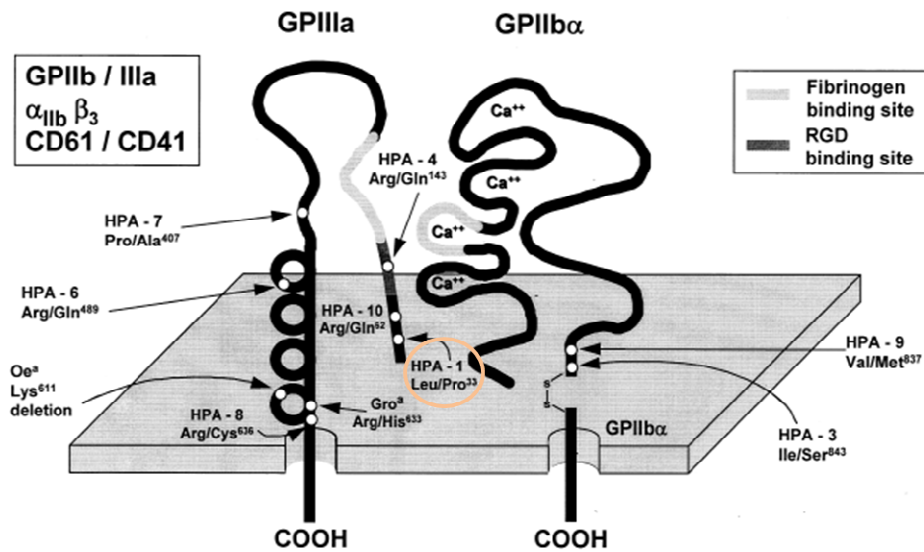


Figura 3. Complex glicoproteic plaquetar GPIIb/IIIa. Els sistemes plaquetars específics estan senyalats amb una fletxa indicant les substitucions aminoacídiques que determinen els diferents antígens. El sistema HPA-1 està senyalat amb un cercle taronja. (Lucas G.F., Metcalfe P., 2000).

III.1.1.4. Freqüències dels antígens plaquetars específics entre els diferents grups ètnics

La freqüència dels antígens plaquetars varia en les diferents poblacions i races. En la població afroamericana i en els orientals, el fenotip HPA-1b1b no és gens comú i, per tant, s'observen rarament TFNAs causades per la incompatibilitat fetomaterna per l'antigen HPA-1a. En la població caucàsica ocorre el contrari, de manera que la causa principal de TFNA és justament la incompatibilitat entre la mare i el fetus de l'al·loantigen HPA-1a (aproximadament el 2% de la població és HPA-1a negatiu; dada referenciada a la Taula 2).

Per altra banda, en la població asiàtica, la majoria dels casos de TFNA estan originats per l'acció dels anticossos d'especificitat anti-HPA-4b, anti-HPA-6b i, recentment s'ha afegit com a possible causa la identificació d'anticossos anti- HPA-21bw [Koh, et al., 2012; Peterson, et al., 2013]. Per tant, és important tenir en compte que la distribució dels sistemes HPA varia segons la població a la que ens referim i que existeix una correlació evident en la prevalença de la TFNA i en les especificitats antigèniques involucrades, de manera que en els asiàtics el sistema HPA-4 té més importància clínica que el sistema HPA-1 [Nomura, et al., 2010]. No és d'estranyar, així doncs, la activa cerca i la identificació constant de nous al·loantígens plaquetars, com per exemple l'HPA-22bw, -23bw, -24bw, -26bw i -27bw localitzats en el complex glicoproteic GPIIb/IIIa.

El fet de conèixer les freqüències al·lèliques dels sistemes HPA d'una població donada és molt important per:

- ❖ El diagnòstic de les TFNAs.
- ❖ Dissenyar programes de cribatge per identificar les gestants potencialment de risc.
- ❖ Dissenyar protocols per al maneig i monitorització de les gestacions de risc.
- ❖ Oferir consell genètic.
- ❖ Cercar hemocomponents compatibles per individus amb anticossos anti-HPA.

Les freqüències fenotípiques dels diferents grups ètnics es poden consultar en el següent link: http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html.

Antigens	Other names	Phenotypic frequency*	Glycoprotein location/amino acid change	Nucleotide substitution
HPA-1a (P ^{A1}) HPA-1b (P ^{A2})	P ^A , Zw	72% a/a 26% a/b 2% b/b	GPIIIa/Leu ↔ Pro ₃₃	T → C ₁₉₆
HPA-2a (K ^o ^b) HPA-2b (K ^o ^a)	Ko, Sib	85% a/a 14% a/b 1% b/b	GPIIb/Thr ↔ Met ₁₄₅	C → T ₅₂₄
HPA-3a (Bak ^a) HPA-3b (Bak ^b)	Bak, Lek	37% a/a 48% a/b 15% b/b	GPIIb/Ile:Ser ₆₄₃	T → G ₆₂₂
HPA-4a (P ^{en} ^a) HPA-4b (P ^{en} ^b)	Pen, Yuk	>99.9% a/a <0.1% a/b <0.1% b/b	GPIIIa/Arg:Gln ₁₄₃	G → A ₅₂₆
HPA-5a (B ^r ^b) HPA-5b (B ^r ^a)	Br, Hc, Zav	80% a/a 19% a/b 1%b/b	GP1a/Glu:Lys ₅₀₅	G → A ₆₄₈
HPA-6bw	Ca ^a , Tu	<1% b/b	GPIIIa/Arg ↔ Gln ₄₈₉	A → G ₁₉₆₄
HPA-7bw	Mo ^b	<1% b/b	GPIIIa/Pro ↔ Ala ₄₀₇	C → G ₁₃₁₇
HPA-8bw	Sr ^a	<0.1% b/b	GPIIIa/Arg:Cys ₆₃₆	T → C ₂₀₀₄
HPA-9bw	Max ^a	<1% b/b	GPIIb/Val:Met ₆₃₇	A → G ₂₆₀₃
HPA-10bw	La ^a	1% b/b	GPIIIa/Arg:Gln ₄₂₂	A → G ₂₃₃
HPA-11bw	Gro ^a	<0.5% b/b	GPIIIa/Arg:His ₆₃₃	A → G ₁₉₆₆
HPA-12bw	ly ^a	1% b/b	GPIIb/Gly:Glu ₁₅	A → G ₁₄₁
HPA-13bw	Sit ^a	<1% b/b	GP1a/Met:Thr ₇₉₉	T → C ₂₅₃₁
HPA-14bw	Oe ^a	1% b/b	GPIIIa/Del:Lys ₆₅₁	A → G ₁₉₂₉₋₃₁
HPA-15a (Gov ^b) HPA-15b (Gov ^a)	Gov	35% a/a 42% a/b 23% b/b	CD109/Tyr:Ser ₃₀₃	A → C ₂₁₀₈
HPA-16bw	Duv ^a	<1%	GPIIIa/Thr:Ile ₁₄₀	C → T ₅₁₇
HPA-?	Va ^a	<1%	GPIIIa/ND	ND
NA	Nak ^a	99.8% (White) 97% (Black) 96% (Asian)	CD36 (GP1V)	T → G ₁₂₆₄ C → T ₄₇₈

Taula 2. Antígens plaquetars humans indicant la seva localització glicoproteica i el polimorfisme que els caracteritza . *Freqüències fenotípiques dels antígens plaquetars referides únicament a la població de raça blanca [Mcquiltan, et al., 2011].

III.1.1.5. Importància clínica

Els anticossos específics de plaquetes són els responsables de la trombocitopènia fetal i neonatal al·loimmune (TFNA), la púrpura trombocitopènica postransfusional (PTP), les reaccions febrils no hemolítiques postransfusional, la trombocitopènia al·loimmune passiva i la trombocitopènia associada als transplants, que poden contribuir a la refractarietat a les plaquetes, conjuntament amb els

anticossos anti-HLA. Les principals vies d'immunització són la transfusió de sang o derivats, l'embaràs i el transplantament al·logènic de medul·la òssia.

Tot i que els 33 antígens plaquetars són potencialment capaços d'induir una trombocitopènia fetal al·loimmune, els anticossos d'especificitat anti-HPA-1a són en la població caucàsica els responsables d'un 85% dels casos de TFNA greu seguit dels anti-HPA-5b (9% dels casos) amb una freqüència menor o anti-HPA-15b [van den Akker and Oepkes, 2008; Kaplan, 2006; Peterson, et al., 2013]. Altres anticossos menys freqüents associats a la TFNA són els d'especificitat anti-HPA-3a (poc freqüent però d'alt risc) i anti-HPA-1b. En la taula Taula 3 es mostren els antígens HPA que poden causar potencialment TFNA.

Sistema	Antigens	Glicoproteïna	Freqüència dels antigens
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa	97.9
	HPA-1b		28.8
HPA-2	HPA-2a	GPIIb	>99.9
	HPA-2b		13.2
HPA-3	HPA-3a	GPIIb	80.95
	HPA-3b		69.8
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa	>99.9
	HPA-4b		<0.1
HPA-5	HPA-5a	GPIa	99.0
	HPA-5b		19.7
HPA-15	HPA-15a	CD109	74
	HPA-15b		81

Taula 3. Sistemes HPA més rellevants que causen la TFNA i les freqüències antigèniques corresponents. [Protocol d'actuació en gestants amb antecedents de trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune (TFNA), 2011 (Annex)].

Aproximadament un 2% de la nostra població és HPA-1a negatiu, és a dir, homozigota per l'al·lel HPA-1b i, per tant, pot potencialment sensibilitzar-se enfront a plaquetes HPA-1a positiu desencadenant una resposta immune humoral; mentre que el 98% de la població és HPA-1a positiu (HPA-1a1a o HPA-1ab).

III.1.2. Tipificació HPA

La tipificació serològica dels antígens plaquetars específics, a diferència d'altres sistemes de grup sanguini com els eritrocitaris, presenta encara certes limitacions. Actualment encara no s'han desenvolupat reactius comercials fiables i/o disponibles per a la fenotipificació serològica d'aquests antígens, sinó que existeixen únicament alguns anticossos monoclonals (AcMo) com l'anti-HPA-1a, -3a i -5b i alguns d'altres policlonals (AcPo), tot i que aquests últims presenten freqüentment anticossos anti-

HLA de classe I que els fan contraindicats en el seu ús perquè afecten a l'especificitat de la reacció i dificulten la interpretació dels resultats.

Fins al 1990, la tipificació dels antígens plaquetars s'havia realitzat sempre amb tècniques serològiques però el coneixement de les bases moleculars d'aquests antígens (veure apartat III.1.1.2), la majoria caracteritzats per SNPs, van permetre la introducció de mètodes de tipificació molecular ràpids i fiables que han esdevingut el *gold standard* en la tipificació HPA.

S'han descrit diverses tècniques pel genotipatge HPA d'un individu, totes elles basades en les diferents variants de la PCR, entre les quals destaca la PCR-SSP (*PCR-sequence specific primers*) que és sens dubte la tècnica que s'ha implementat preferentment en la majoria dels laboratoris per la seva simplicitat.

III.1.2.1. PCR-SSP

La PCR amb *primers* específics de seqüència (PCR-SSP) permet distingir directament diferents variants al·lèliques d'un mateix sistema HPA mitjançant l'ús d'una bateria de *primers* que contenen l'especificitat en l'extrem 3'. D'aquesta manera, es determina el genotip HPA d'un individu per l'obtenció o no del producte amplificat amb la combinació d'uns determinats *primers* i sota condicions astringents de PCR. En totes les reaccions s'ha de coamplificar una banda control per assegurar que les condicions de reacció s'han donat correctament (veure apartat VI.1.1.3)(Figura 4).

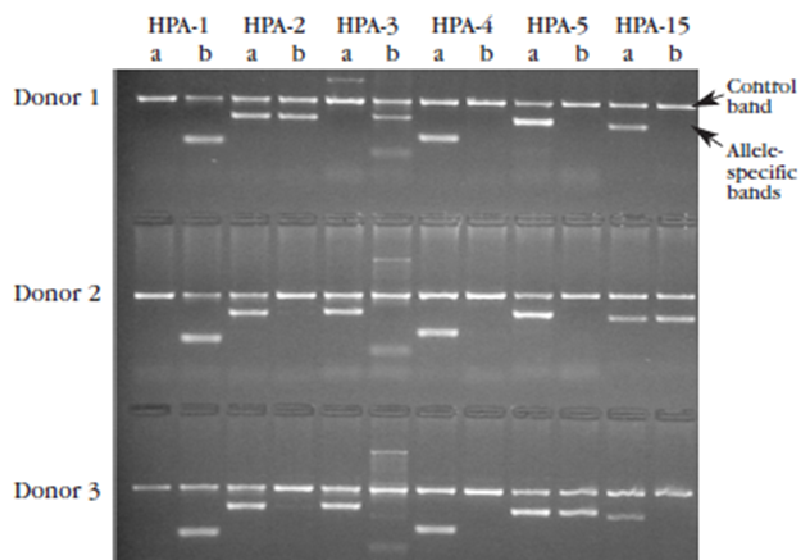


Figura 4. Genotipatge simultani dels sistemes HPA-1, -2, -3, -4, -5 i -15 per PCR-SSP. La banda superior present en tots els carrils correspon a la banda control del producte amplificat de la hormona del creixement humana (429 pb). Les bandes inferiors corresponen als productes específics de PCR. El genotipatge dels 3 individus son: HPA-1b1b; 2a2b; 3b3b, 4a4a; 5a5a; 15a15a (Donor 1); HPA-1b1b; 2a2a; 3a3a, 4a4a; 5a5a; 15a15b (Donor 2); HPA-1b1b; 2a2a; 3a3a, 4a4a; 5a5b; 15a15a (Donor 3). [Norton, et al., 2004].

III.1.2.2. Assaig (TaqMan[®]) 5'-nucleasa

La genotipificació a nivell d'SNPs també es pot realitzar utilitzant una altra de les variants de la tècnica de PCR com és la PCR a temps real [Wilhelm and Pingoud, 2003]. Aquesta tècnica ha suposat un gran avanç especialment en el camp del diagnòstic genètic prenatal i preimplantacional [Traeger-Synodinos, 2006], àmbits en què s'ha desenvolupat aquesta tesi i els quals es desenvolupen amb més detall en el següents capítols.

En la tipificació molecular HPA utilitzant la tecnologia TaqMan s'amplifica un fragment d'ADN que inclou el polimorfisme HPA que es vol analitzar. A la mescla de reacció s'afegeixen dues sondes al·lel específiques marcades amb dos fluorocroms distints, sent cadascuna d'elles complementaria a la seqüència de l'al·lel corresponent. Les sondes TaqMan[®] [Livak, 1999] són oligonucleòtids de 18-22 pb complementaris a una de les dues cadenes d'ADN que estan marcats amb un fluorocrom tant en l'extrem 5' (*reporter*) com en l'extrem 3' (*quencher*), tot i que existeixen *quenchers* no fluorescents com el grup MGB (*Minor groove binder*) [Kutyavin, et al., 2000]. Les sondes intactes no alliberen fluorescència perquè el fluorocrom del *reporter* de la sonda està emmascarat per la proximitat del *quencher*, el qual absorbeix la longitud d'ona que emet el *reporter*. En la fase d'elongació de la PCR, la sonda que hibrida amb la seva seqüència nucleotídica complementària a l'ADN motlle s'hidrolitza mitjançant l'activitat 5'→3' exonucleasa de l'enzim ADN polimerasa. L'emissió de fluorescència és proporcional a la degradació de la sonda. Si el "*match*" no és completament homòleg, la sonda no hibridarà i no s'observarà fluorescència (Figura 5). Durant la reacció, l'amplificació de la seqüència d'interès i la seva detecció es produeixen simultàniament en el mateix microtub de PCR sense necessitat de fer un pas addicional post-PCR per visualitzar el producte amplificat. A més a més, l'amplificació es pot monitoritzar en cada cicle per mitjà de la fluorescència emesa i que es registra a mesura que l'amplicó es va generant. Els nivells de fluorescència detectats puntualment en cada cicle són proporcionals a la quantitat d'ADN amplificat.

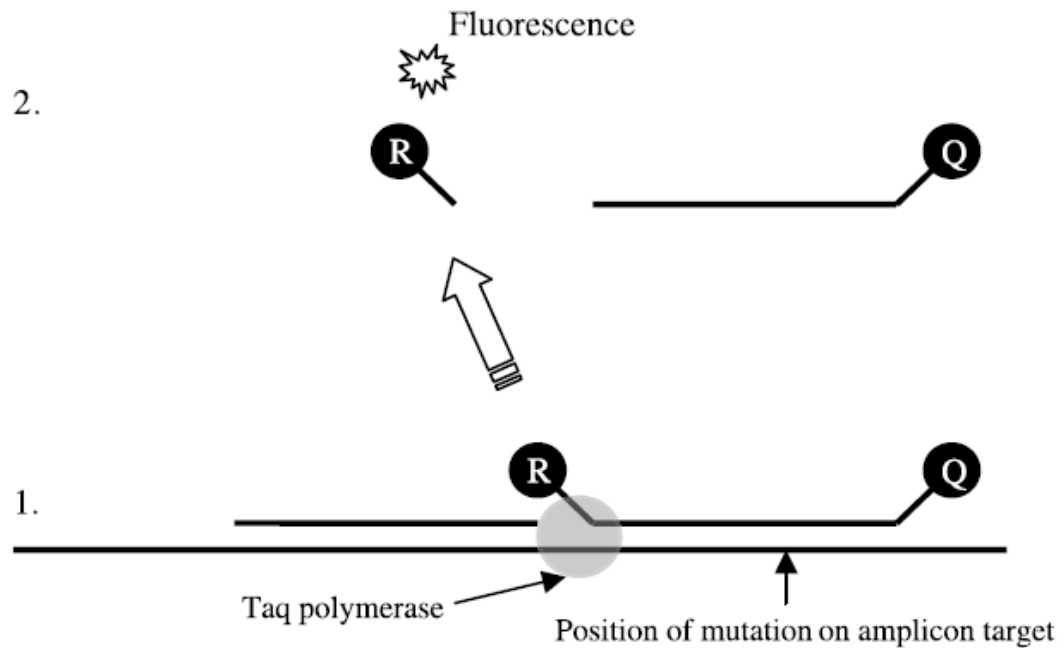


Figura 5. Esquema de la detecció de SNPs amb sondes TaqMan® (hidròlisi). (1) La sonda híbrida amb la seva seqüència complementària i durant la fase d'extensió l'ADN polimerasa la degrada. (2) L'emissió de fluorescència és deguda a que es trenca la proximitat entre el *reporter* i el *quencher*. [Traeger-Synodinos, 2006].

III.1.2.3. Plataforma de genotipatge extensiu a gran escala

El desenvolupament de noves tècniques d'anàlisi evolucionen cap a la reducció de la quantitat de mostra necessària i la major rapidesa i automatització de l'assaig. Per altra banda, cada vegada és més freqüent la necessitat d'analitzar simultàniament moltes mostres, així com també analitzar un número major de seqüències al mateix temps utilitzant les tècniques de multiplex. La última generació pel genotipatge de grups sanguinis es basa en l'amplificació en multiplex dels diferents loci d'interès i la subsegüent hibridació amb sondes específiques immobilitzades sobre un suport sòlid. S'han descrit diferents plataformes de detecció com els portaobjectes, microplaques *arrays*, *beads arrays* i espectrometria de masses. Tots aquests sistemes permeten la detecció simulània de molts polimorfismes però el seu cost encara segueix sent molt elevat. Una de les plataformes més noves pel genotipatge HPA està basada en la tecnologia xMAP® i l'anàlisi dels *beads* es dona en el sistema Luminex®100/200™.

III.1.3. Isoantígens plaquetars

Els isoantígens plaquetars són determinants antigènics expressats en les plaquetes d'aquells individus que no presenten cap anomalia en l'expressió de les glicoproteïnes de la membrana plaquetar. Entre els diferents tipus d'isoantígens es troben els que simulen al·loantígens, que són epítops reconeguts pels anticossos

que generen els individus que tenen un dèficit d'alguna de les glicoproteïnes plaquetars i són sensibilitzats per transfusió i/o embaràs.

III.1.3.1. Alteracions en l'expressió de les glicoproteïnes de la membrana plaquetar

La deficiència congènita quantitativa (defectes en la funció) o qualitativa (defectes en l'expressió) de les glicoproteïnes de la membrana plaquetar poden afectar a la funció de les plaquetes facilitant quadres hemorràgics o trombòtics. Les patologies clínicament més rellevants són la trombastènia de Glanzmann i el síndrome de Bernard-Soulier. La deficiència en l'expressió del complex GPIIb/IIIa s'associa a la trombastènia de Glanzmann i l'absència o disfunció del complex GPIb/IX/V s'associa al síndrome de Bernard-Soulier. En aquests quadres clínics, l'expressió dels al·loantigens plaquetars que es localitzen en aquestes GP resulta alterada i, per tant, la tipificació serològica HPA (fenotip) pot resultar discrepant amb la tipificació molecular (genotip). La transmissió genètica de les dues patologies és autosòmica recessiva i freqüentment es troba consanguinitat en els individus afectats.

En aquests pacients, les situacions de sagnat per traumes, cirurgia, o bé, en el moment del part es consideren d'alt risc hemorràgic i tenen més possibilitats de requerir transfusions de plaquetes. Cal tenir en compte, però, que és convenient de fer transfusions de sang autòloga prèviament congelada, ja que si no és així corren el risc d'isoimmunització HLA i del complex glicoproteic que manquen.

III.2. TROMBOCITOPÈNIA FETAL I NEONATAL AL·LOIMMUNE (TFNA)

III.2.1. Característiques del quadre clínic

La trombocitopènia o plaquetopènia es defineix com a la disminució de la xifra de plaquetes sanguínies per sota del seu límit inferior normal (150×10^9 plaquetes/L).

La trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune és la causa més comú de trombopènia en el nouat i té una incidència¹ d'un afecte de cada 1.000-2000 naixements [Peterson, et al., 2013]. El 1-4% de tots els nouats presenten una

¹ La incidència d'una malaltia es refereix al nombre de nous casos que sorgeixen en una població determinada i en un període de temps determinat. La prevalença d'una malaltia, en canvi, es refereix al número total d'individus que pateixen una malaltia durant un període de temps dividit per la població que pot arribar a patir la malaltia (proporciona una estimació del risc de que un individu d'aquesta població pateixi la malaltia).

xifra inferior a 150×10^9 plaquetes/L, però normalment es clínicament simptomàtica quan el nivell de plaquetes decau en valors inferiors a 50×10^9 plaquetes/L [van den Akker and Oepkes, 2008].

Tot i que el grau de trombopènia és variable es considera potencialment molt greu quan la xifra de plaquetes és inferior a 20×10^9 plaquetes/L. La complicació més greu és la hemorràgia intracranial (HIC) que es manifesta en un 20-30% dels casos [Kaplan, 2008] conduint a la mort del fetus en el 10% dels casos o provocant seqüeles neurològiques irreversibles en els nounats que sobrevisquin. Del 50-80% de les hemorràgies intracranials (HIC) es produeixen en la vida intrauterina entre les setmanes 30-35 habitualment, però de vegades pot ser que apareguin ja en la setmana 16 de la gestació [Bussel, et al., 2008; Kaplan, 2008; Peterson, et al., 2013]. Els resultats ecogràfics associats a la hemorràgia intracranial (HIC) són ventriculomegalia cerebral, lesions destructives i quists intracranials o hidrocefalia. La trombocitopènia fetal i neonatal al·loimmune és considera el procés equivalent de plaquetes a la malaltia hemolítica del fetus i del nounat. La incompatibilitat fetomaterna de l'antigen HPA-1a del sistema antigènic plaquetar HPA-1 és la causa més comú de trombopènia fetal al·loimmune en la població caucàsica.

Diversos treballs han evidenciat que els valors de plaquetes durant la gestació (en gestants sanes) són inferiors als nivells normals d'un individu adult [Matthews, et al., 1990; Ahmed, et al. 1993]. Per aquest motiu alguns autors han establert com a límit inferior de la normalitat durant una gestació uns nivells de 120×10^9 plaquetes/L després d'observar que les xifres de plaquetes no varien en aquesta situació fisiològica. El fetus, no obstant, adquireix una xifra de plaquetes similar a la dels adults cap a la setmana 18-20 de la gestació.

III.2.2. Fisiopatologia

Tot i que en la membrana plaquetar s'expressen molècules HLA de classe I i el grup sanguini ABO, l'al·loimmunització materna enfront antígens específics plaquetars (HPA, *Human Platelet Antigens*) presents en la membrana de les plaquetes del fetus és la causa principal de la trombopènia fetal i neonatal al·loimmune. Els anticossos materns generats, de classe IgG, són capaços de travessar la placenta i reconèixer aquests antígens al·logènics per la mare i heretats del pare induint la destrucció de les plaquetes fetals. Com ja s'ha esmentat anteriorment l'al·loimmunització enfront l'antigen HPA-1a és responsable de la majoria dels casos clínicament diagnosticats com a TFNA.

Tot i que els anticossos anti-HLA és presenten en més d'un terç de les gestacions, els fetus queden protegits i rarament els anticossos d'aquesta especificitat són els

responsables d'una TFNA. Seguint aquesta línia, estudis prospectius han demostrat que els anticossos anti-HLA no causen trombocitopènia [Kaplan, 2006] però avui en dia és encara objecte de controvèrsia [Peterson, et al., 2013]. Tot i així, s'han reportat pocs casos de TFNA en gestants múltiples enfront l'antigen HLA-A2 i HLA-B27 [Chow, et al., 1992; Thude, et al., 2006]. Per altra banda, estudis prospectius han demostrat una correlació entre el genotip del grup sanguini ABO de la mare i la freqüència de nounats amb trombocitopènia greu. El risc d'un nounat de patir TNA és menor si la mare HPA-1a al·loimmunitzada presenta un fenotip de grup sanguini O. El 20% de les gestacions de les dones HPA-1a al·loimmunitzades amb fenotip O van resultar en una trombocitopènia greu en el nounat, comparat amb el 47% de les dones amb grup sanguini tipus A [Ahlen, et al., 2011].

Els al·loanticossos materns, de naturalesa IgG, poden travessar la placenta a partir de la catorzena setmana de gestació, tot i que els antígens fetals estan totalment expressats en la membrana plaquetar a partir de la divuitena setmana de gestació [Kaplan C., 2006].

El grau de severitat de la trombopènia fetal pot està relacionat amb diferents factors:

- ❖ Densitat de l'antigen(s) diana en les plaquetes fetals/neonatal.
- ❖ L'habilitat de fixar el complement.
- ❖ L'activitat dels fagòcits en el sistema reticuloendotelial fetal/neonatal.
- ❖ La concentració i subclasse dels al·loanticossos IgG materns.
- ❖ L'habilitat de la medul·la òssia fetal/neonatal per compensar la destrucció accelerada de les plaquetes sensibilitzades pels anticossos materns.

Els al·loanticossos IgG travessen la barrera placentària pel mecanisme de pinocitosis de les cèl·lules del sincitiotrofoblast i opsonitzen les plaquetes del fetus portadores de l'al·loantigen, facilitant així la seva destrucció per fagocitosi o lisi per citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos pels macròfags esplènics del fetus.

Val a dir que únicament el 10% de les gestants produeixen anticossos anti-HPA tot i ser portadores d'un fetus HPA-1a positiu [Kamphuis, et al., 2010]. L'al·loimmunització enfront l'antigen HPA-1a està estretament associada amb la presència de l'al·lel HLA-*DRB3*0101* (veure l'apartat III.2.4).

III.2.3. Immunitat cel·lular associada a la TFNA

Tot i que la transferència transplacentària d'anticossos IgG que reaccionen contra antígens plaquetars es coneix com a la principal causa etiològica de la TFNA, encara falta molta informació relacionada amb l'activació i les interaccions de les cèl·lules

immunes implicades que produeixen aquests anticossos. El coneixement d'aquest procés portaria al desenvolupament d'estratègies que potencialment podrien prevenir la producció d'anticossos reactius enfront al·loantigens plaquetars inhibint o modificant les cèl·lules immunes que participen en la resposta immunològica. Generalment els limfòcits B verges madurs reconeixen específicament antígens nadius proteics a través dels seus receptors de membrana (Ig). La unió de l'antigen amb el receptor indueix la transmissió d'una sèrie de senyals bioquímiques que activen el limfòcit B. Gràcies a aquesta unió, el receptor és capaç d'interioritzar l'antigen per endocitosis i transportar l'antigen al compartiment endosòmic, de manera que la proteïna es processa en diferents fragments peptídics que s'uneixen a les molècules HLA de classe II i es presenten en la superfície del limfòcit B perquè siguin reconeguts específicament pels limfòcits T cooperadors o *helper* CD4⁺. Així, els propis limfòcits B actuen com a cèl·lules presentadores d'antígens als limfòcits T cooperadors en la resposta immunitària humoral als antígens proteics. Tenint això en compte, la interacció directa entre cèl·lules T i B és necessària per a la selecció i diferenciació d'un limfòcit B en una cèl·lula plasmàtica secretora d'anticossos.

Per tant, per a una resposta humoral eficaç es requereix l'activació de limfòcits T i B, de manera que probablement les interaccions cel·lulars que precedeixen a la producció d'anticossos en la TFNA són similars a les descrites. En aquests casos, les dones homozigotes HPA-1b1b poden generar una resposta immune humoral enfront l'epítot que conté la leucina en el residu 33 (HPA-1a) i que el fetus ha heretat del pare.

III.2.4. Associació de la TFNA i l'al·lel HLA-DRB3*0101 de classe II

És ben sabut que les molècules HLA de classe II tenen un paper molt important en la presentació d'antígens i en el reconeixement antigènic específic per part dels limfòcits T. L'expressió de determinats al·lells de l'HLA de classe II en un individu determina la seva capacitat per a respondre a antígens concrets. Els gens de l'HLA s'expressen de manera codominant en tots els individus, és a dir, cada individu expressa els al·lells de l'HLA heretats d'ambdós progenitors. El conjunt d'aquests al·lells present en els dos cromosomes es denomina haplotip de l'HLA. D'aquesta manera s'augmenta al màxim el número de mol·lècules HLA disponibles per unir-se a pèptids i presentar-los als limfòcits T. Els gens estructurals de l'HLA de classe II influeixen en la reactivitat immunitària, ja que els diversos al·lells difereixen en la capacitat d'unió amb els diferents determinants antigènics i, per tant, afecta directament a l'estimulació dels limfòcits T cooperadors específics. La majoria de dones HPA-1b1b al·loimmunitzades són portadores de l'al·lel HLA-DRB3*0101, que juntament amb l'al·lel HLA-DRA codifiquen la mol·lècula heterodimèrica HLA de

classe II anomenada HLA-DR52a. Existeix una clara associació entre la presència de l'al·lel HLA-DRB3*0101 i la producció d'anticossos d'especificitat anti-HPA-1a, la qual cosa implica que la mol·lècula heterodimèrica HLA-DR52a està restringida a la resposta de cèl·lules T CD4 maternes per al desenvolupament de TFNA. S'ha demostrat que l'afinitat de les mol·lècules HLA-DR52a pels antígens HPA-1 és alta si contenen una leucina en la posició 33 (pèptid HPA-1a), mentre que quan en aquesta mateixa posició es presenta una prolina (pèptid HPA-1b) la facilitat per presentar aquest epítop a les cèl·lules T-helper disminueix considerablement. En aquest sentit, s'ha evidenciat que la unió del complex HLA-pèptid és més estable amb el residu Leu33. No obstant, no totes les dones HPA-1b1b que generen anticossos d'especificitat anti-HPA-1a són portadores de l'al·lel HLA-DRB3*0101. En aquests casos, la resposta immunitària adaptativa està conduïda per altres mol·lècules HLA i, possiblement, els epítops reconeguts pels limfòcits T deriven d'alloantigens diferents però lligats al pèptid HPA-1a. Per tant, no s'exclouen altres possibilitats d'altres mol·lècules HLA i d'altres epítops associats a la TFNA. De fet, s'ha trobat que l'al·lel HLA-DQB1*0201 també té una forta associació amb la TFNA.

En resum, la presència de l'al·lel HLA-DRB3*0101 en dones HPA-1a negatiu es considera un factor de risc per a la seva sensibilització. De fet, el 80% de les gestants que presenten anticossos anti-HPA-1a són HLA-DRB3*0101 positiu [Skogen, et al., 2010; Peterson, et al., 2013], mentre que el risc de les dones que no tenen aquest al·lel és inferior al 2%. No obstant això, només entre el 30-35% de les dones HPA-1a negatiu que són HLA-DRB3*0101 positiu es sensibilitzen.

Tot i que el valor predictiu negatiu en l'absència de l'al·lel HLA-DRB3*0101 per l'alloimmunització HPA-1a en dones HPA-1a negatiu es major de 99%, el valor predictiu positiu en la seva presència per a l'alloimmunització s'ha estimat en un 30%-35%, i no totes les dones alloimmunitzades donen a llum a nens amb trombocitopènia [Bussel and Primiani, 2008].

III.2.5. Diagnòstic de la TFNA

En l'absència d'un programa d'*screening* per identificar les gestants potencialment en risc de desenvolupar una TFNA, la incompatibilitat HPA materno-fetal es detecta generalment després del naixement d'un nen afecte. Les mesures preventives es poden prendre en les subsegüents gestacions. A diferència de la malaltia hemolítica del fetus/nounat, en els casos de TFNA no hi ha de rutina un control antenatal per a detectar anticossos antiplaquetars maternes ni per tipificar els sistemes antigènics de plaquetes, de manera que sovint es diagnostiquen a les gestants de risc quan ja han tingut complicacions en embarassos previs i/o un fill afecte anterior. Per al

diagnòstic d'una TFNA cal excloure prèviament altres causes etiològiques com són les infeccions virals o bacterianes, coagulopaties de consum, trastorns de la megacariocitopoesis, hemangioma i, particularment, l'autoimmunitat materna (púrpura trombocitopènia autoimmune o lupus).

Durant el període de gestació, el diagnòstic de la TFNA té lloc normalment quan apareix una hemorràgia intracranial com a conseqüència d'una trombocitopènia fetal greu, o bé durant els primers dies postpart quan s'observen símptomes evidents d'hemorràgies en el nounat. Els casos més característics tracten d'una gestació sense complicacions en una mare sana no trombocitopènica en que, poques hores després del part, s'observa en el nounat símptomes de petèquies i/o equimosis que pot anar acompanyada de hematúria, hemorràgia digestiva i, inclús, d'hemorràgia intracranial en els casos més greus.

La incompatibilitat maternofetal s'ha de confirmar mitjançant un estudi serològic per detectar i identificar la presència d'un al·loanticòs plaquetar específic en el sèrum matern. L'estudi també ha d'incloure el genotipatge plaquetar dels pares i del fetus quan sigui possible [Arnold, et al., 2008].

És important identificar les gestants en risc principalment per les gestacions subsegüents. El *cut-off* de consens per sota del qual es considera un fetus trombopènic és de 50×10^9 plaquetes/L, tot i que les formes més greus es consideren a partir d'una xifra de plaquetes inferior a les 20×10^9 plaquetes/L i amb tendència a disminuir en les primeres 24-72 hores de vida.

Els casos clínicament diagnosticats es deuen generalment a les TFNAs causades per anticossos d'especificitat anti-HPA-1a (85% dels casos) seguit dels d'especificitat anti-HPA-5b (9% dels casos) i, més rarament, per anticossos anti-HPA-3a (<1% dels casos). El risc d'hemorràgia intracranial i altres complicacions característiques d'una TFNA greu són comuns en la incompatibilitat per l'antigen HPA-1a i, en canvi, els casos produïts per anticossos anti-HPA-5b acostumen a associar-se amb trombopènies moderades i solen ser anticossos clínicament poc significatius. Els casos de trombopènia causats per anticossos d'especificitat anti-HPA-3a són molt infreqüents però quan es presenten solen manifestar-se de forma greu i amb característiques clíniques similars als casos produïts per anticossos anti-HPA-1a.

Com s'ha especificat anteriorment, les freqüències al·lèliques tenen una distribució diferent segons la situació geogràfica o la població en la que ens trobem. Així, la població japonesa és un clar exemple en que els anticossos comunament implicats en les TFNAs són d'especificitat anti-HPA-4b.

Tot i la investigació continua de noves especificitats d'al·loanticossos plaquetars, el diagnòstic de la TFNA continua sent un repte. Avui en dia encara hi ha molts casos de TFNA en què no es detecten els al·loanticossos responsables, fins i tot en aquells casos en que la incompatibilitat materno fetal per l'antigen HPA-1a és evident.

III.2.5.1. Diagnòstic Immunohematològic

Les proves per a la identificació de TFNA es realitzen en els següents casos:

- ❖ Per confirmar una TFNA en cas de sospita, com per exemple gràcies a algun signe ecogràfic que ho indiqui.
- ❖ Per a qualsevol fetus o nounat que manifesti una hemorràgia intracranial d'origen desconegut.
- ❖ Per a qualsevol nounat amb una trombocitopènia de causa no explicada, amb o sense símptomes hemorràgics evidents.

Per tal de confirmar la TFNA és necessari demostrar el següent:

- ❖ Evidenciar la incompatibilitat antigènica maternofetal. En tots els casos potencials de TFNA es tipifiquen de forma consensuada en el laboratori els sistemes HPA-1, -2, -3, -4, 5 i -15 d'ambdós progenitors i, sempre que sigui possible, del nounat. Cal tenir en compte que la tipificació del sistema HPA-4 va dirigida especialment als individus asiàtics o originaris de l'Amèrica llatina. El sistema HPA-9, segons l'ordre d'importància clínica, és el següent sistema clínicament significatiu. En cas de que en una gestació la paternitat sigui incerta, cal determinar el genotip HPA del fetus mitjançant tècniques invasives (veure apartat III.3.1)
- ❖ La detecció i identificació d'al·loanticossos materns. Per aquesta prova s'utilitzen tècniques d'immunofluorescència o de captura, com són l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) i la tècnica MAIPA (*monoclonal antibody immobilization of platelet antigens*), que permeten determinar si el sèrum problema conté anticossos anti-HLA o d'altres específics de plaquetes.
- ❖ La realització de la prova creuada entre el sèrum de la mare davant de plaquetes del pare és important per descartar o confirmar una especificitat privada o antígens de baixa freqüència (sobretot quan s'han descartat els al·loanticossos més comuns).
- ❖ Descartar autoanticossos materns mitjançant el test d'immunofluorescència directe utilitzant un anticòs anti-IgG.
- ❖ En els casos en que el diagnòstic clínic és evident però no s'ha pogut identificar l'al·loanticòs plaquetar corresponent, es procedeix a la

investigació d'especificitats de baixa freqüència i a l'ampliació del genotipatge per identificar possibles incompatibilitats rares.

III.2.6. Tractament i profilaxis

Avui en dia no s'ha consensuat encara un protocol pel tractament de la TFNA. No existeix cap tractament segur ni eficaç, així com tampoc una estratègia profilàctica disponible per a la prevenció de la immunització materna. En els casos de TFNA, el tipus de tractament i el moment de la gestació en què s'aplica depèn de les manifestacions hemorràgiques i del grau de severitat de la trombocitopènia.

Existeixen dues aproximacions pel tractament de la TFNA, cadascuna d'elles comporten avantatges i inconvenients:

- ❖ Tractament invasiu: prendre una mostra de sang fetal mitjançant la tècnica de cordocentesi (veure apartat III.3.1.3), per determinar la xifra de plaquetes en el fetus, i la transfusió de plaquetes intraúter. L'ús d'aquestes maniobres poden portar a complicacions com és el risc de dessagnat i de pèrdua fetal. Les plaquetes transfoses tenen pocs dies de vida, així que es requereixen transfusions setmanals de plaquetes [Bussel, et al.,1988].
- ❖ Tractament no invasiu: tractament matern amb IVIG i/o Corticosteroides. No se sap ben bé el mecanisme d'acció de les IVIG però s'ha proposat la combinació de dos factors:
 - Les IVIG tenen la capacitat de bloquejar els receptors de la placenta disminuint la transferència d'anticossos materns anti-HPA.
 - En la circulació fetal, les IVIG poden bloquejar els receptors Fc presents en els macròfags i evitar la destrucció de plaquetes opsonitzades.

L'administració de IVIG intravenoses es considera un tractament car, força segur i ben tolerat. Per a la seva producció a partir de plasma es van necessitar més de mil donants de sang, la qual cosa suposa un risc d'infeccions virals o d'altres tipus i, per tant, no es pot garantir el risc "0" tot i haver seguit uns controls estrictes.

L'administració de IVIG pot produir també efectes secundaris a la pacient com mal de cap, calfreds, nàusees i malestar general. Els efectes secundaris dels Corticosteroides són: augment de la gana, irritabilitat, insomni, molèsties gàstriques, feblesa muscular, diabetes i HTA.

El tractament amb IVIG ha donat molts bons resultats, ja que s'ha disminuït satisfactòriament la presència de HIC (Taula 4). No obstant, aproximadament el 20% dels fetus no responen al tractament i continuen tenint una xifra de plaquetes

inferior a 50×10^9 plaquetes/L. Es desconeix la causa d'aquest fenomen però en aquestes gestacions continua havent-t'hi el risc de HIC.

Per altra banda, el seguiment del títol d'anticossos anti-HPA en una gestació en curs aporta informació en l'evolució dels casos, però no sempre existeix una correlació entre el títol de l'anticòs en el sèrum matern i el grau de severitat de trombopènia fetal. La monitorització del títol de l'anticòs matern per les especificitats anti-HPA-1a i anti-HPA-5b poden ajudar per establir el tractament durant la gestació i a induir el part en el moment oportú. És important també saber l'especificitat implicada en la incompatibilitat materno-fetal antigènica plaquetar, ja que ajuda a avaluar el grau de risc en cada cas.

En els últims anys s'ha avançat molt en el seguiment i maneig de la TFNA. En aquesta línia la tendència ha portat a minimitzar o, inclús a eliminar l'aplicació de tècniques invasives i a implementar cada vegada més aproximacions no invasives. A l'estat espanyol, la societat espanyola de ginecologia i obstetrícia (SEGO) i la societat espanyola de transfusió sanguínia i terapia cel·lular (SETS) van redactar un protocol de consens (Annex).

	Number of fetuses	Dose (g/kg/week)	ICH (n)	Plt count at birth ($\times 10^9/L$)	Neonatal Plt $<50 \times 10^9/L$
Lynch <i>et al.</i> (1992)	4	1.0	0	184 (57–322)	0
Birchall <i>et al.</i> (2003)	12	1.0	0	83	4 (33%)
Berkowitz <i>et al.</i> (2007)	37	2.0	1 ^a	169 (14–312)	5 (14%)
Yinon <i>et al.</i> (2006)	24	1.0	0	118	<30: 2 (8%)
Van den Akker <i>et al.</i> (2007)	45	1.0	0	136	7 (16%)
Giers <i>et al.</i> (2010)	30	1.0	0	31 ^b (6–117)	26 (87%)
Bertrand <i>et al.</i> (2011)	27	1.0	0	89 (95% CI 55–123)	12 (44%)
Knight <i>et al.</i> (2011)	17	n.s.	0	n.s.	n.s.

Taula 4. Resum de la literatura de l'administració de IVIG materna per prevenir HIC en la TFNA. Els estudis inclouen l'administració de IVIG sense Corticosteroides, ni transfusions de plaquetes intrauterines en dones amb un fill afecte anterior sense HIC.

ICH, hemorràgia intracranial; IVIG, immunoglobulina intravenosa; n.s., no s'indica; Plt, plaquetes^b, valor obtingut per una mostra de sang fetal just abans del naixement, seguit d'una sola transfusió de plaquetes. [Kamphuis and Oepkes, 2011].

III.2.7. Diferències entre la trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune i la malaltia hemolítica del fetus/nounat.

En primer lloc i segurament una de les principals diferències és que la TFNA pot manifestar-se com a greu ja en la primera gestació, en més del 50% dels casos [Akker and Oepkes, 2008]. La raó exacta d'aquest fet es desconeix però hi ha dues hipòtesis al respecte: una d'elles es podria relacionar amb una major capacitat d'una dosi lliandar de plaquetes que travessen la placenta i, l'altre, podria referir-se a l'existència d'una altra font d'immunització de plaquetes encara no demostrada. En segon lloc, actualment no hi ha un programa d'*screening* de rutina per a la tipificació de plaquetes de les gestants, al contrari de quan se sospita una

incompatibilitat maternofetal pel factor Rh gràcies a la tipificació antigènica eritrocitària que es realitza des de la primera visita i que permet controlar l'embaràs des del començament, inclús en les dones que mai han estat embarassades anteriorment. L'únic país en que hi ha un programa *d'screening* de la TFNA és a Noruega, fora d'aquest país l'única manera de sospitar una TFNA greu és mitjançant la història familiar amb antecedents de TFNA greu en un fill anterior. Les principals diferències entre la TFNA i la MHFN s'indiquen a la Taula 5.

Per últim, existeixen diferències quant a morbiditat:

- ❖ En la malaltia hemolítica del recent nascut l'anèmia pot ser per si mateixa la causa de molts problemes però el segell distintiu que la caracteritza és kernicterus², mentre que en la TFNA és la hemorràgia intracranial (HIC).
- ❖ En la incompatibilitat Rh, el fetge pot quedar afectat degut a la hematopoesis extramedul·lar, mentre que en la TFNA no.
- ❖ El tractament d'un fetus amb TFNA implica també a la mare, mentre que en la malaltia hemolítica del fetus i del nounat (MHFN), el fetus rep transfusions d'eritrocits cada tres setmanes.
- ❖ El 15% de les dones blanques son Rh negatiu i moltes es sensibilitzen, mentre pel que fa a la TFNA, només 1 de cada 40 dones són HPA-1a negatiu i una tercera part es sensibilitzen.

	Rh	AIT
Incidence	1/100 (25% severe)	1/1000
First child affected	No	Yes
Routine screening in place	Yes	No
Testing readily available	Yes (any blood bank)	No (send out)
Prophylaxis available	Yes (Rhogam)	No
Severe clinical phenotype	Hydrops, kernicterus	ICH
Management of next pregnancy	<i>In utero</i> RBC Tx	Maternal IVIG

Taula 5. Diferències entre la MHFN i la TFNA [Bussel, 2009].

² El kernicterus és una complicació neurològica greu causada per un augment en els nivells de bilirrubina en sang del nounat.

III.3. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PRENATAL

Fins a principis dels anys setanta, la medicina fetal no existia i les parelles amb un alt risc de concebre un fill amb algun desordre hereditari només comptaven amb tres opcions possibles: abstenir-se de tenir fills, acceptar la situació, o bé considerar altres possibilitats com la anticoncepció, la interrupció de l'embaràs o l'adopció.

Durant les últimes dècades s'ha avançat molt tant en el camp de la biologia de la reproducció com també en altres tecnologies que han permès obtenir més informació i un millor coneixement del fetus. Avui en dia el diagnòstic prenatal és una part integral de la pràctica obstètrica moderna i el fetus ha esdevingut un pacient que es pot diagnosticar, seguir i tractar.

Fins el moment, les tècniques obstètriques empleades en el diagnòstic genètic prenatal incloïen la biòpsia de vellositats coriòniques i l'amniocentesi com els procediments més comunament utilitzats per a l'obtenció de teixits o cèl·lules fetals. No obstant, aquests mètodes són cars, requereixen habilitat i experiència, no es poden realitzar abans de la desena setmana de gestació i s'associen a una taxa d'avortament de al voltant de l'1%. A causa d'aquestes limitacions, durant els últims anys s'ha generat un gran interès en cercar altres fonts de material genètic fetal que ofereixin nous mètodes alternatius, no invasius, eficaços, innocus i fiables per a l'estudi genètic del fetus. La primera aproximació que ha ocupat gran part dels últims 30 anys s'ha centrat en la cerca de cèl·lules fetals en la circulació materna. Durant la última dècada, però, s'ha obert un nou front en la investigació relacionada amb la presència d'àcids nucleics lliures d'origen fetal presents en circulació materna. En aquest sentit, el descobriment de la presència d'ADN fetal lliure en la circulació materna ha sigut revolucionari en aquest camp i ha obert una porta al diagnòstic prenatal no invasiu (DPNI) que obviaria no únicament els riscos intrínsecs dels procediments invasius (invasió del medi intrauterí), sinó també l'ansietat que es produeix en les gestants a l'hora de sotmetre's en algun d'aquests procediments.

III.3.1. Tècniques invasives

Les tècniques invasives permeten accedir al fetus *in utero* per obtenir una mostra de material genètic fetal en gestacions d'alt risc per dur a terme un diagnòstic prenatal citogenètic o molecular del fetus. La principal desavantatge d'aquests procediments invasius es relaciona amb el risc de pèrdua fetal que se xifra entre un 0.5-3% al qual se suma la possibilitat d'intensificar el grau d'isoimmunització materna que suposa la maniobra invasiva i que pot ocasionar hemorràgies

transplacentàries. A més a més, des del punt de vista psicològic, aquests procediments generen en les gestants un estat d'ansietat i estrés. Per tant, aquestes probes únicament es reserven per a una petita part de la població i en casos en què el fetus tingui un risc potencial de patir un defecte genètic. L'elecció del tipus de tècnica dependrà del moment de la gestació, les condicions de cada cas, les indicacions i l'experiència de l'operador.

III.3.1.1. Amniocentesi

L'amniocentesi és el primer procediment invasiu que es va introduir en el diagnòstic genètic prenatal. Aquesta tècnica consisteix en l'extracció de 10-20 ml de líquid amniòtic mitjançant una punció transabdominal guiada per ecografia (Figura 6). És una prova que es realitza entre la setmana 15 i 17 de la gestació i no es recomana fer-la abans d'aquest període perquè comprometria el benestar del fetus. En els casos en què és necessària una prova prenatal durant el primer trimestre, l'obtenció d'una mostra de vellositats coriòniques seria l'opció més segura. De totes les tècniques invasives, l'amniocentesi és la tècnica més estesa i la que té el risc menor de pèrdues fetals (menys del 1%) [Tabor, et al., 2009], tot i que pot induir a hemorràgies feto-maternes.

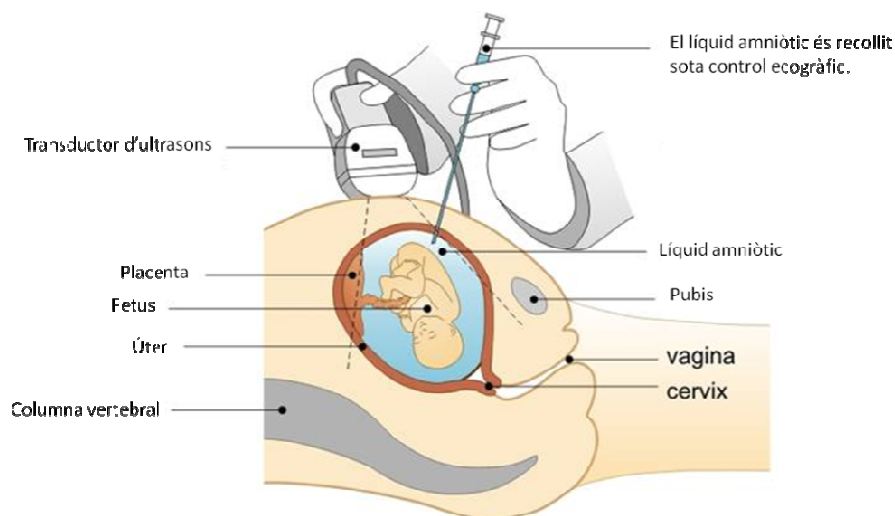


Figura 6. Amniocentesi. Imatge extreta de la web: <http://www.sogi.net.au>.

III.3.1.2. Biòpsia de vellositats coriòniques

La biòpsia de còrion va aparèixer als anys vuitanta com a una alternativa a l'amniocentesi per a cercar procediments alternatius que poguessin oferir un diagnòstic genètic fetal més ràpid i precoç. Aquest procediment es realitza entre les setmanes 10-14 de la gestació i, tot i que es dur a terme per mans expertes, comporta un risc d'avortament més alt que el de l'amniocentesi, aproximadament d'un 2% [Tabor, et al., 2009]. La prova consisteix en una aspiració transcervical o

transabdominal, segons la posició de la placenta i la preferència de l'operador, de vellositats coriòniques d'origen fetal que deriven del trofoblast guiada per una monotorització ecogràfica. Normalment s'arrossegueuen cèl·lules de la decídua maternal en el moment de recollir la mostra, de manera que han de ser retirades abans de realitzar l'anàlisi (Figura 7).

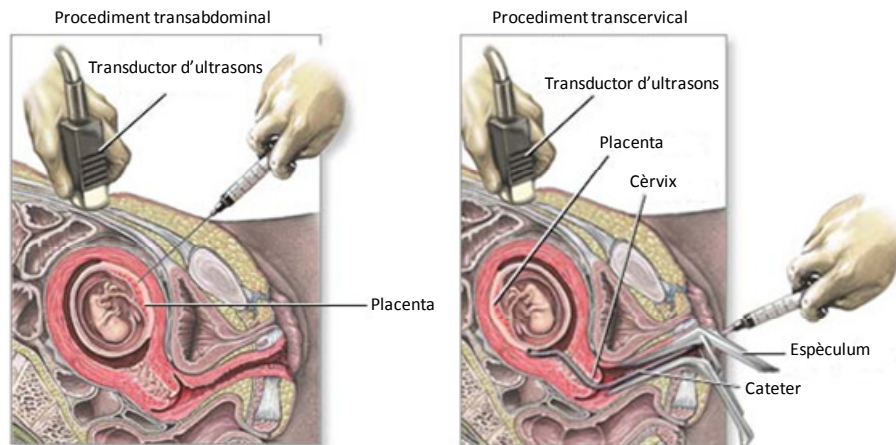


Figura 7. Biòpsia de vellositats coriòniques. Imatge extreta de la web: <http://www.adamimages.com>.

III.3.1.3. Cordocentesi o funiculocentesi

La cordocentesi és una tècnica que permet l'accés directe a la circulació fetal. És un procediment poc freqüent en el seu ús per la seva complexitat, pels riscos que implica per la mare i pel fetus i perquè es requereix de personal altament qualificat. Consisteix en la obtenció directa d'una mostra de sang fetal, entre 1 i 3 ml, mitjançant una punció del cordó umbilical, que sota control ecogràfic travessa la paret abdominal i l'úter fins a arribar a penetrar a la vena umbilical. Aquesta prova es realitza a partir de la setmana 20 de la gestació per assegurar el gruix mínim del cordó umbilical i minimitzar les complicacions que puguin sorgir a l'hora de fer la punció. Dins de les tècniques invasives, la cordocentesi és la que s'associa amb major risc de pèrdua fetal, el qual oscil·la entre el 2-3% [Buscaglia, et al., 1996; Antsaklis, et al., 1998], tot i que les xifres disminueixen al adquirir experiència en la seva realització. Està indicada en els casos de l'anàlisi del cariotip fetal, per detectar la incompatibilitat del factor Rh entre la mare i el fetus, per a diagnosticar malalties de la coagulació i per a descartar infeccions congènites. Per altra banda, la cordocentesi no només té fins diagnòstics, sinó també terapèutics. Serveix com a tractament de l'anèmia i la trombocitopènia fetal mitjançant les transfusions de sang o plaquetes intraúter. La cordocentesi ha tingut un paper molt important en el control i seguiment de la malaltia hemolítica del fetus. Obtenint una mostra de sang s'avalua el grau de gravetat del procés hemolític causat per la incompatibilitat Rh

entre la mare i el fetus i la necessitat de procedir a una transfusió sanguínia mitjançant aquesta tècnica (

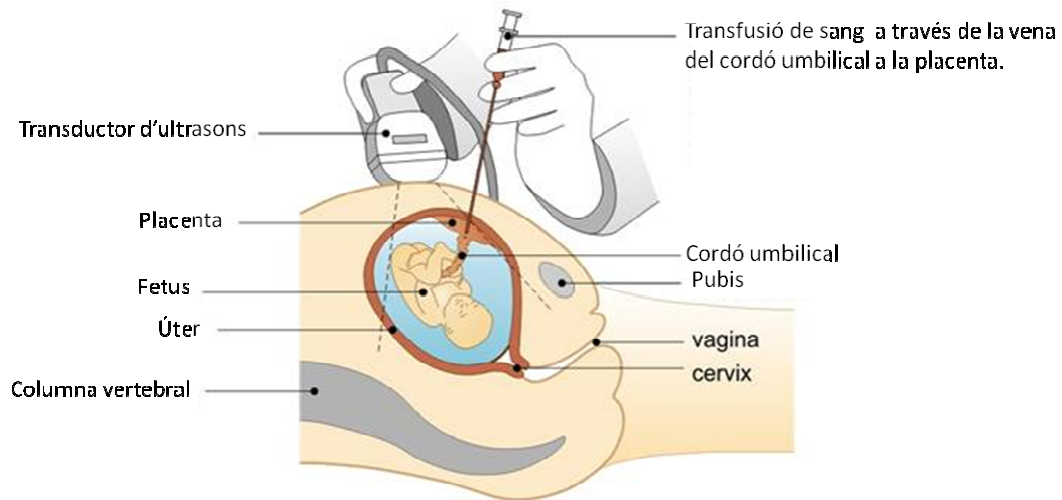


Figura 8).

Per últim, una altra de les aplicacions terapèutiques de la cordocentesi és l'administració de medicaments al fetus.

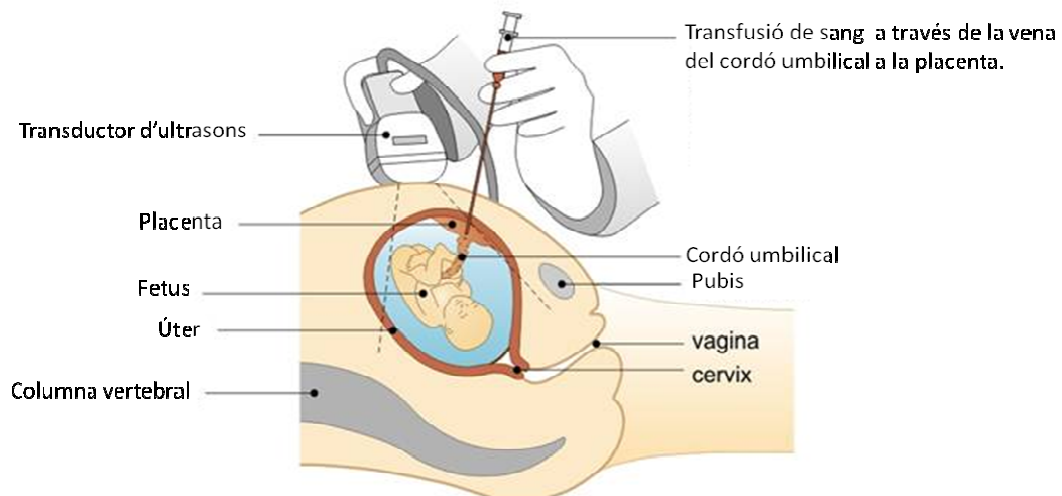


Figura 8. Cordocentesi. Imatge extreta de la web: <http://www.sogi.net.au>.

III.3.2. Tècniques no invasives

Tal i com s'ha descrit anteriorment, l'ús de tècniques invasives per l'estudi genètic del fetus implica grans desavantatges que s'han de tenir en compte, entre les quals es troba no només el petit però significatiu risc de pèrdua fetal sinó també el risc addicional de reimmunització materna enfront a certs antígens que la mare no presenta però que en el fetus sí que s'expressen. Aquests inconvenients són els que condueixen a moltes gestants a refusar aquestes proves en casos en què, tot i això, siguin altament recomanables realitzar-les.

Precisament per aquest motiu, l'objectiu del diagnòstic genètic prenatal no invasiu és resoldre tots aquests problemes mitjançant l'estudi genètic del fetus a partir d'una mostra de sang perifèrica materna, cosa que no comportaria cap risc ni pel fetus ni per la mare. Actualment existeixen dos abordatges per al diagnòstic genètic prenatal no invasiu (DGPNI):

- ❖ L'estudi de cèl·lules fetals circulants en el torrent sanguini matern.
- ❖ L'estudi d'àcids nucleics fetals lliures (ADN i ARN) circulants en el torrent sanguini matern.

III.3.2.1. Cèl·lules fetals circulant en sang materna

III.3.2.1.1. Descobriment

En el 1893, el patòleg alemany Georg Schmörl va descriure per primera vegada l'aparició de cèl·lules fetals (trofoblasts) en circulació materna, concretament en els capil·lars pulmonars d'una gestant que va morir d'eclàmpsia³ [Lapaire, et al., 2007]. Anys més tard, en el 1969, Walknowska va identificar cromosomes Y en limfòcits aïllats de sang de gestants portadores de fetus masculins [Walknowska, et al., 1969;] i, això mateix, va ser repetit per Herzenberg, en el 1979 [Herzenberg, et al., 1979]., que va ser el primer en enriquir cèl·lules fetals mitjançant la citometria de flux reconeixent-ne els leucòcits d'origen fetal per l'expressió de HLA-A2 en la seva superfície.

El desenvolupament de la citometria de flux i de tècniques moleculars sensibles com la PCR o la FISH van provar de manera convincent la transferència cel·lular feto-materna. Amb aquestes tècniques es van poder aïllar i identificar les cèl·lules d'origen fetal en base a les seves característiques pròpies i distintives de cada tipus cel·lular. En el 1990, Bianchi i col·laboradors van ser el primer grup en aïllar específicament eritroblasts fetals de la circulació materna. Aquest grup va identificar una seqüència del cromosoma Y mitjançant la tècnica de PCR, detectant així la presència del cromosoma Y en el 75% de les gestacions corresponents a fetus masculins amb l'objectiu d'aplicar el diagnòstic genètic prenatal [Bianchi, et al., 1990].

Tot i que l'existència de cèl·lules fetals en la circulació materna durant l'embaràs va suposar, en un inici, una font molt prometedora d'ADN fetal per desenvolupar tècniques no invasives de diagnòstic prenatal, hi ha una sèrie d'inconvenients que no van fer possible la seva aplicació:

³L'eclàmpsia es defineix com l'aparició de crisis convulsives o coma durant l'embaràs o puerperi sense tenir cap relació amb una afectació cerebral preexistent.

- ❖ L'existència d'una escassa concentració de cèl·lules fetals en circulació materna, de l'ordre d'una cèl·lula per mil·lilitre de sang materna [Bianchi, et al., 1997; Wright and Burton, et al., 2009].
- ❖ Dificultats metodològiques per aïllar, identificar i analitzar aquestes cèl·lules d'origen fetal.
- ❖ S'han descrit dificultats en l'anàlisi cromosomal del fetus associades amb la compactació de la cromatina dels eritroblasts abans de que s'expulsi el nucli de la cèl·lula interferint en la fiabilitat de la tècnica FISH [Babochkina, et al., 2005].
- ❖ Persistència d'algunes d'aquestes cèl·lules fetals en la circulació sanguínia materna durant dècades que podrien resultar en falsos positius en gestacions subsegüents.

La gran avantatge de l'anàlisi de cèl·lules fetals intactes respecte l'ADN fetal lliure en sang materna és que permeten l'accés al genoma complet del fetus i, per tant, es podrien detectar anomalies cromosòmiques i determinar el sexe fetal simplement amb l'anàlisi del cariotip fetal. Per aquest motiu, els estudis actuals van dirigits en la línia d'optimitzar els mètodes de recuperació i anàlisi dels eritroblasts fetals, per aconseguir de forma efectiva utilitzar aquesta font de material genètic fetal per la pràctica clínica.

Fins al moment, s'ha descrit la presència de diverses poblacions de cèl·lules fetals nucleades en sang perifèrica materna, entre les quals s'inclouen els eritroblasts [Bianchi, et al., 1990], limfòcits [Herzenberg, et al., 1979], els trofoblasts [Beroud, et al., 2003] i els progenitors hematopoètics.

III.3.2.1.2. Tipus de cèl·lules fetals en la circulació materna

Un cop es va arribar al consens generalitzat de la presència en sang materna de diferents tipus cel·lulars d'origen fetal, els investigadors es van centrar en identificar la cèl·lula fetal idònia per a la realització del diagnòstic prenatal no invasiu.

III.3.2.1.2.1. Leucòcits

Els leucòcits fetals van marcar el començament d'una nova era de les cèl·lules fetals en circulació materna en un estudi que demostrava la presència del cromosoma Y en limfòcits en metafase estimulats per mitògens obtinguts de gestants portadores de fetus masculins [Walknowska, et al., 1969]. Encara que un dels primers atractius dels leucòcits fetals consistia en la seva capacitat de proliferar *in vitro*, aquesta mateixa característica constitueix avui en dia una

limitació des de que es va comprovar que aquestes cèl·lules també podien proliferar *in vivo* en òrgans materns. La demostració de que aquests limfòcits podien persistir durant almenys 27 anys després del part i interferir en l'estudi genètic del fetus d'un embaràs posterior va suposar un gran inconvenient per al diagnòstic prenatal no invasiu [Bianchi, 1999]. Una altra de les limitacions que dificulta l'ús dels leucòcits és la manca d'anticossos monoclonals específics per antígens exclusivament de leucòcits d'origen fetal, tot i que hi ha grups que han recuperat leucòcits fetals a partir de sang materna mitjançant la citometria de flux basant-se en les diferències entre l'expressió del HLA fetal i el matern [Herzenberg, et al., 1979] sense assolir el 100% de sensibilitat i especificitat. Malgrat els resultats aparentment bons, l'aplicació clínica d'aquesta estratègia va resultar ser poc pràctica, atesa la necessitat de realitzar la tipificació HLA d'ambdós progenitors i comptant que aquestes parelles fossin polimòrficament informatives.

III.3.2.1.2.2. Trofoblasts

En principi, les cèl·lules del trofoblast serien les cèl·lules idònies per ser aïllades de sang materna gràcies a la seva morfologia multinuclear característica que permet la seva identificació per microscopia i també per la facilitat que tenen per desprendre's de la placenta cap a la circulació materna. Són cèl·lules epitelials que s'alliberen a la circulació materna a partir de la sisena setmana de la gestació [van Wijk, et al., 1996], tot i que normalment s'eliminen entre les setmanes 10-12 de la gestació a través de la circulació pulmonar [Attwood and Park, 1961]. No obstant, existeixen varies raons per descartar aquestes cèl·lules fetals com el tipus cel·lular adient per realitzar el diagnòstic prenatal:

- ❖ El seu origen extraembrionari implica que les cèl·lules trofoblàstiques poden manifestar mosaïcisme confinat⁴ a la placenta en el 1% dels casos [Hahnemann and Vejerslev, 1997], de manera que l'anàlisi d'aquestes cèl·lules probablement no reflecteixen el cariotip fetal real.
- ❖ La naturalesa multinucleada de les cèl·lules del sincitiotrofoblast no ofereixen resultats fiables quan l'anàlisi cromosòmic s'analitza mitjançant la hibridació *in situ* fluorescent (FISH).
- ❖ L'obtenció d'anticossos monoclonals específics contra antígens de la superfície cel·lular dels trofoblasts és difícil. Malgrat les dificultats tècniques, alguns grups han aïllat amb èxit trofoblasts de sang materna utilitzant

⁴ El mosaïcisme confinat a la placenta es deu a mutacions genètiques produïdes després de les primeres divisions postzigòtiques i dins del trofoblast en divisió o les cèl·lules progenitores extraembrionaries de la massa cel·lular interna que causen una anomalia genètica, generalment una trisomia, limitada a la placenta que no afecten a la constitució genètica del fetus. Les conseqüències del mosaïcisme placentari depenen de l'anomalia citogenètica específica i el percentatge de cèl·lules implicades.

anticossos monoclonals per realitzar anàlisis morfològics i genètics [Hawes, et al., 1994].

III.3.2.1.2.3. Eritroblasts

De tots els tipus cel·lulars descrits, els eritroblasts fetals (NRBCs, *Nucleated red blood cells*) són el tipus cel·lular que reuneixen totes les característiques desitjades per al diagnòstic prenatal no invasiu. En primer lloc, els eritroblasts fetals (hematies immadurs) són molt abundants en la circulació fetal durant el primer trimestre de la gestació i principis del segon, amb un valor màxim a les 8 setmanes, cosa que en sang perifèrica d'un individu adult se troben pràcticament absents. A diferència dels leucòcits, tenen una vida mitjana curta en sang materna (25-35 dies) degut a la seva capacitat proliferativa limitada que fa poc probable l'aïllament d'eritroblasts fetals d'embarassos previs. Una altra de les avantatges és que tenen una morfologia característica que permet identificar-los i que estan constantment presents en sang materna durant tota la gestació [Parano, et al., 2001]. Per altra banda, els eritroblasts són cèl·lules mononucleades i com a tals contenen tota la informació genètica del fetus.

Per últim i a diferència dels leucòcits, presenten antígens de superfície com el receptor de la transferrina (CD71), el receptor de la trombospondina (CD36) i la glicoforina A (ACP), així com també marcadors citoplasmàtics com les hemoglobines embrionàries i les fetals que caracteritzen les cèl·lules eritroides immadures i les permet diferenciar dels eritròcits madurs. Els marcadors de superfície faciliten l'enriquiment dels eritroblasts fetals a partir de totes les gestacions i no només de les parelles HLA informatives. Les diferències entre els antígens expressats en la superfície dels eritroblasts fetals i de les cèl·lules maternes es van utilitzar com a base per desenvolupar anticossos monoclonals que permeten aïllar aquestes cèl·lules fetals de sang materna. La principal limitació d'aquesta estratègia implica la reacció creuada dels anticossos monoclonals utilitzats que reconeixen no només els eritroblasts fetals, sinó també una subpoblació d'eritròcits nucleats d'origen matern. Tot i considerant aquests avenços amb l'objectiu d'identificar diferències en l'expressió d'antígens de superfície cel·lular que s'expressen entre les cèl·lules fetals i maternes, la baixa proporció d'eritroblasts fetals en sang materna, estimada a ser per alguns autors de l'ordre d'1 cèl·lula/ml de sang materna [Wright and Burton, et al., 2009], continua suposant un gran obstacle.

III.3.2.1.2.4. Cèl·lules mare i progenitors hematopoètics (HMCs)

L'escassa concentració de cèl·lules fetals en sang materna es podria afrontar si aquestes cèl·lules preparades per enriquir-les poguessin proliferar *in vitro* fàcilment

o poguessin ser induïdes a fer-ho, amb l'esperança d'obtenir un major nombre de cèl·lules disponibles per al diagnòstic prenatal. Les cèl·lules candidates que compleixen amb aquestes característiques són les cèl·lules progenitores hematopoètiques i les cèl·lules mare. Molts grups han intentat desenvolupar aquesta estratègia, sobretot amb cèl·lules progenitores fetals de la línia eritroide. No obstant, a causa de la contaminació de cèl·lules maternes en el cultiu cel·lular, l'amplificació selectiva de les cèl·lules progenitores d'origen fetal respecte les de origen matern no va resultar amb èxit en aquests estudis [Campagnoli, et al.,2002].

A més dels problemes relacionats amb la infreqüència de cèl·lules fetals, del seu enriquiment i expansió *in vitro* a partir de sang materna, els anàlisis d'aquestes cèl·lules realitzats amb la tècnica de PCR estan associats amb un alt grau d'efecte *allele drop-out* i, en conseqüència, es necessitarien com a mínim 5-6 cèl·lules fetals per compensar aquesta taxa d'*allele drop-out*.

En un moment donat, van sorgir les cèl·lules mare mesenquimatoses com a possibles candidates per aplicar el diagnòstic prenatal no invasiu [Campagnoli, et al., 2001]. No obstant, la seva capacitat de renovació i diferenciació, que comparteixen amb totes les cèl·lules mare, poden comportar de la mateixa manera una limitació per a la seva aplicació clínica. Probablement, després del traspàs transplacentari, aquestes cèl·lules poden ser segrestades ràpidament per teixits maternos i/o persistir de gestacions anteriors i continuar circulant en sang materna en la gestació en curs. Aquest tipus cel·lular també s'ha desestimat pel moment.

III.3.2.2. Àcids nucleics d'origen fetal en circulació materna

III.3.2.2.1. ADN fetal lliure circulant en plasma matern

III.3.2.2.1.1. Antecedents

L'existència de petites quantitats d'ADN extracel·lular en circulació sanguínia va ser reportat per primera vegada per Mandel i Metais en el 1948 [Mandel and Metais, 1948; Wright and Burton, 2009], al observar la presència d'àcids nucleics (ADN i ARN) en plasma d'individus sans i malalts. Aquest descobriment va tenir certa importància, ja que pocs anys després es va confirmar gràcies als treballs de Alfred D. Hershey i la seva col·lega Martha Chase que l'ADN conté la informació genètica heretable, al contrari de les proteïnes que es el que es creia fins aquell moment. Aquests articles són inclús anteriors a la famosa publicació de Watson i Crick on es proposa el model de l'estructura tridimensional de doble hèlix de l'ADN [Watson and Crick, 1953]. Desafortunadament, l'estudi de 1948 no va obtenir gran reconeixement ni massa interès durant la dècada següent fins a l'any 1960, en què

es va reprendre la investigació gràcies al descobriment de la presència de nivells alts d'ADN circulant en pacients que patien lupus eritematós sistèmic (LES) [Tan, et al., 1966]. Posteriorment es va detectar en pacients amb càncer altes concentracions d'ADN lliure circulant en sèrum [Leon, et al., 1977], particularment en aquells individus que es trobaven en fase metastàsica amb mal pronòstic.

Més endavant i seguint aquesta línia d'investigació es va descriure la presència de mutacions oncogèniques a partir de plasma de pacients amb síndrome mielodisplàstica, leucèmia aguda mieloide i càncer de pàncrees [Lo, 2001] demostrant que les cèl·lules tumorals són capaces d'alliberar el seu ADN cap al torrent circulatori.

Aquests descobriments van obrir una nova era i la possibilitat de trobar ADN lliure circulant en plasma en altres escenaris clínics.

Seguint aquesta línia i donat les característiques que comparteixen els mecanismes de la invasió trofoblàstica en l'úter i els tumors malignes, va portar a alguns investigadors a denominar la placenta com a un teixit pseudo-maligne [Strickland and Richards, 1992]. Considerant els estudis previs de l'observació d'ADN lliure circulant d'origen tumoral en pacients oncològics, molts grups interessats en altres camps van començar a investigar altres formes d'ADN no hostes en el plasma/sèrum per considerar altres aplicacions com podria ser el diagnòstic prenatal. Un d'aquests grups es va centrar en la recerca de cèl·lules nucleades que entren en la circulació materna durant la gestació [Lo, et al., 1996], però no va ser fins el 1997 quan Lo i col·laboradors van demostrar per primera vegada la presència d'ADN fetal lliure en plasma/sèrum matern mitjançant la detecció per PCR convencional de seqüències específiques d'ADN del cromosoma Y en plasma de dones portadores d'un fetus masculí [Lo, et al., 1997;]. Més endavant i gràcies al desenvolupament de la tècnica de la PCR a temps real va permetre a aquests mateixos autors quantificar la concentració d'ADN fetal en plasma matern [Lo, et al. 1998]. Avui en dia s'han descrit nombroses aplicacions clíniques pel diagnòstic prenatal no invasiu com el genotipatge Rh(D) fetal en incompatibilitat, determinació del sexe fetal per a desordres lligats al cromosoma X, malalties genètiques heretades per via paterna i condicions associades a l'embaràs com pot ser la preeclàmpsia⁵. Moltes altres proves diagnòstiques s'estan desenvolupant actualment utilitzant aquesta tecnologia, com és el cas del genotipatge HPA-1a fetal en el context de la trombocitopènia fetal al·loimmune [Scheffer, et al., 2011; Le Toriellet, et al., 2013].

⁵ La preeclàmpsia és un trastorn multisistèmic de la gestació que s'associa amb una hipertensió arterial i proteinúria.

*III.3.2.2.1.2. Fisiologia de l'ADN fetal circulant en plasma matern**III.3.2.2.1.2.1. Origen*

Després del revolucionari descobriment basat en la identificació d'ADN fetal lliure en plasma matern, el següent aspecte que calia investigar i que va ocasionar un gran debat durant uns quants anys va ser esbrinar quin era l'origen i la naturalesa d'aquest ADN fetal extracel·lular. Inicialment es va plantejar la teoria de que el traspàs transplacentari de cèl·lules hematopoètiques fetals cap a la circulació materna podria ser una possible explicació per aquest fenomen; no obstant, el nombre d'aquestes cèl·lules en el torrent sanguini matern es va considerar molt baix per donar compte de tot l'ADN fetal lliure alliberat en plasma matern [Bianchi, et al., 2004], el qual es troba en una concentració relativament alta. Avui en dia és àmpliament acceptat que la placenta (Figura 9), concretament les cèl·lules trofoblàstiques, són la font predominant de l'ADN fetal lliure en plasma matern. Alberry i col·laboradors van demostrar la detecció persistent d'ADN fetal circulant en plasma matern en gestacions anembrionades⁶ corresponents a fetus masculins detectant el marcador DYS14 del cromosoma Y mitjançant PCR a temps real sense obtenir diferències significatives en el promig del número de còpies d'aquest gen comparat amb el grup control d'embarassos normals (promig 148.3 còpies/ml), suggerint que la placenta és en efecte la principal font d'ADN fetal circulant [Alberry, et al., 2007]. Entre els estudis que recolzen aquesta idea s'inclouen la detecció de molècules d'ARNm específiques en plasma matern d'origen placentari [Ng, et al., 2003], la demostració de marques epigenètiques característiques de la placenta i distintives en l'ADN de plasma matern [Chim, et al., 2005], la presència d'ADN fetal circulant posterior a la formació de la placenta però anterior a l'establiment de la circulació fetoplacentària [Guibert, et al., 2003], la presència d'ADN placentari en plasma matern en casos amb anomalies cromosòmiques confinades a la placenta [Masuzaki, et al., 2004] i la correlació existent entre les concentracions d'ADN fetal i la gonadotropina coriònica (hCG) mesurades en una mateixa mostra de plasma matern [Bianchi, 2004].

Entre les cèl·lules que formen el teixit placentari es troben concretament les cèl·lules del sincitiotrofoblast, que són les responsables de proveir un flux constant d'ADN fetal lliure cap a la circulació materna a través del procés de l'apoptosi⁷ [Bischoff, et al.2004]. La relativa estabilitat de l'ADN extracel·lular en plasma, el

⁶ Les gestacions anembrionades estan caracteritzades pel desenvolupament del sac coriònic i de la placenta amb absència de pol embrionari.

⁷ L'apoptosi, o mort cel·lular programada, es el procés cel·lular genèticament controlat pel qual les cèl·lules indueixen la seva pròpia mort en resposta a determinats estímuls extra o intracel·lulars. El procés apoptòtic es fonamental per al desenvolupament embrionari, el manteniment de l'homeòstasi de les poblacions cel·lulars dels teixits o en les reaccions immunitàries.

qual conté nucleases, i el fet de poder amplificar fàcilment l'ADN d'origen fetal a partir d'una mostra de plasma o sèrum indicava que aquest ADN no es metabolitzava immediatament un cop entrava al torrent circulatori matern postulant-ne la idea de que aquests àcids nucleics circulaven protegits per cossos apoptòtics. Corroborant aquesta teoria, es va demostrar la presència de cossos apoptòtics en plasma matern i l'amplificació de seqüències del cromosoma Y (provinents de fetus masculins) a partir d'aquest material biològic [Orozco, et al., 2006]. D'altra banda s'ha demostrat també que durant el procés apoptòtic existeixen empaquetaments diferents d'ADN i ARN en diferents cossos apoptòtics per a la seva degradació [Bischoff, et al., 2005].

Per tant, i de manera resumida, l'ADN fetal prové dels fragments nucleosomals que formen part dels cossos apoptòtics presents en circulació materna com a conseqüència del procés apoptòtic que pateixen les cèl·lules del trofoblast que formen part de la placenta.

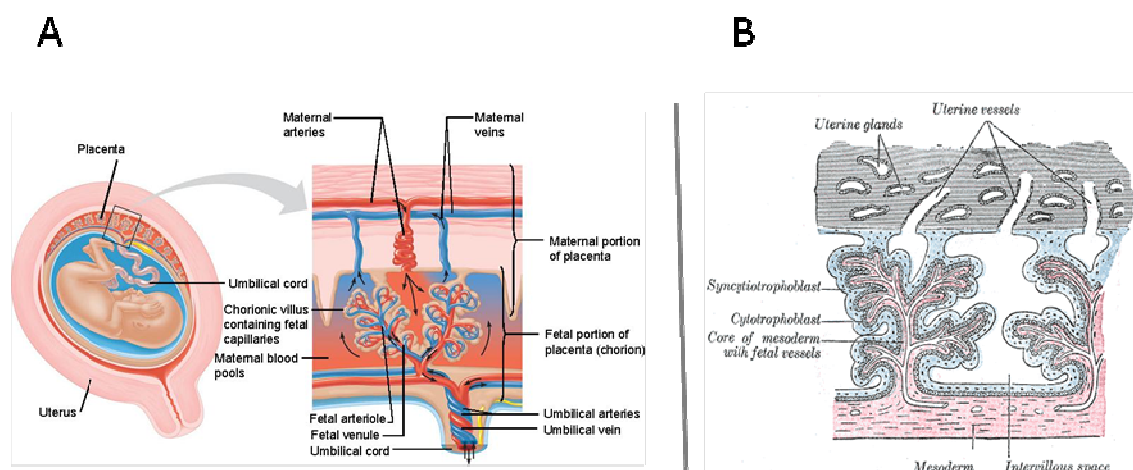


Figura 9. (A) Esquema de la circulació placentària. (B) Esquema de les vellositats coriòniques que formen la placenta i les capes cel·lulars trofoblàstiques que les revesteixen. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Cytotrophoblast>).

III.3.2.2.1.2.2. Cinètica de la concentració de l'ADN fetal lliure en plasma matern

L'ADN fetal comprèn al voltant del 3-6% de l'ADN total lliure present en plasma matern [Lo, et al., 1998] durant el primer i últim trimestre de la gestació respectivament; el 94-97% restant correspon a ADN matern. La concentració absoluta d'ADN fetal és similar en plasma i en sèrum però la diferència recau en la presència d'una major concentració d'ADN matern en sèrum comparada amb la que hi ha representada en plasma, la qual cosa pot interferir en l'anàlisi de la fracció d'ADN fetal [Bianchi, 2004].

S'ha observat que l'ADN fetal es detecta en plasma matern a partir de la quarta setmana de gestació [Illanes, et al., 2007] en dones sotmeses a un programa de

reproducció assistida, proporcionant així un coneixement precís del moment de la concepció, encara que no es consideren resultats fiables fins a la setena setmana de gestació. En un dels estudis es va detectar ADN fetal circulant en plasma a dia 18 post-concepció després de realitzar una transferència embrionària en un cicle de reproducció assistida [Guibert, et al., 2003]. La circulació fetoplacentària no s'estableix fins el dia 28-30 post-concepció i en aquest estudi cap el dia 28, el 80% dels subjectes de l'estudi tenien ADN fetal detectable en sang. Aquest fet reforça la idea de que la font d'ADN fetal no és hematopoètica i que és més probablement del trofoblast.

La concentració d'ADN fetal en plasma augmenta a mesura que la gestació avança [Lo, et al., 1998; Chan, et al., 2003], des de 16 equivalents genòmics per mil·lilitre de sang materna durant el primer trimestre fins a 80 en el tercer trimestre, apareixent en les últimes 8 setmanes un pic brusc de la concentració [Lo, et al., 1998; Birch, et al., 2005]. Per altra banda, la concentració d'ADN total en plasma incrementa aproximadament un 29.3% en cada setmana de gestació [Bischoff, et al., 2005], tot i que la fracció corresponent a l'ADN fetal suposa únicament d'un 3-6%. Cal tenir en compte també que existeix una gran variabilitat interindividual en la concentració d'ADN total lliure circulant en el plasma durant la gestació.

La concentració total d'ADN en plasma en adults sans (no embarassades) es troba en un rang de 10 a 100ng o bé, entre 103-104 GEq/ml [Bischoff, et al., 2005].

Després del part, l'ADN fetal s'elimina ràpidament de la circulació materna en qüestió de 16.3 minuts de mitjana (rang entre 4-30min) i a les dues hores postpart és indetectable [Lo, et al., 1999]. Alguns grups han proposat el sistema renal com a possible mecanisme d'eliminació de l'ADN fetal, donada la seva detecció en orina de gestants portadores d'un fetus masculí [Botezatu, et al., 2000; Al-Yatama, et al., 2001]. La presència d'ADN fetal s'ha trobat en altres fluids com en el líquid amniòtic i líquids cerebrospinal [Angert, et al., 2004] i peritoneal materns [Bianchi, 2004].

Amb l'excepció d'almenys una publicació aïllada que suggereix la persistència de l'ADN fetal extracel·lular en plasma matern [Invernizzi, et al., 2002], el consens en la literatura és que no persisteix a llarg termini.

III.3.2.2.1.3. Característiques dels àcids nucleics en plasma matern

Molts grups s'han centrat en el potencial de l'ADN fetal circulant per a les aplicacions diagnòstiques però hi ha poques publicacions que descriguin les característiques moleculars de l'ADN circulant. Chan i col·laboradors van demostrar que les molècules d'ADN fetal circulants són generalment més petites que les

molècules d'ADN matern. Aproximadament el 80% dels fragments d'ADN fetal lliures presents en plasma matern tenen una llargada inferior a 193 pb comparats amb els fragments d'ADN matern que tenen una llargada superior als 500pb. [Chan, al., 2004]. La diferència s'ha atribuït als distints mecanismes del procés apoptòtic entre el sincitiotrofoblast i la fisiologia materna. Per altra banda, aquests investigadors van trobar que les molècules d'ADN en el plasma de dones embarassades eren fragments més llargs que en dones que no estaven embarassades [Chan, et al., 2004]. A part de l'interès biològic intrínsec en la diferència de llargada entre els fragments d'ADN extracel·lular d'origen fetal i matern, aquestes dades han obert noves línies d'investigació per l'enriquiment de l'ADN fetal circulant en base a la separació per la seva mida.

III.3.2.2.1.4. Aplicacions clíniques de l'ADN lliure circulant en plasma matern

L'ADN fetal lliure en plasma matern pot donar informació molt valuosa de l'estat del fetus o de l'embaràs, ja sigui a nivell de l'estudi genètic del fetus o a través de la monitorització de la gestació. En l'actualitat i davant de les dificultats que es presenten alhora d'aïllar l'ADN d'origen fetal, l'anàlisi de l'ADN fetal lliure en plasma matern es limita a la seva quantificació i en la detecció de seqüències exclusives del fetus que la mare no presenta, com per exemple el gen RHD fetal en mares RhD negatiu, seqüències del cromosoma Y per al diagnòstic del sexe fetal o mutacions genètiques d'origen patern o *de novo* (Figura 10). És important tenir en compte que l'ADN fetal circulant representa una petita fracció de l'ADN total present en plasma i, per tant, es necessiten mètodes analítics altament sensibles i específics per diferenciar aquesta subpoblació d'ADN fetal del *background* d'ADN matern. No és sorprenent, per tant, que com l'edat gestacional es correlaciona positivament amb la quantitat d'ADN fetal en plasma, la taxa de detecció augmenti a mesura que avança la gestació. A més a més de disposar de mètodes sensibles, és important també tenir a l'abast tècniques d'extracció d'ADN molt eficients, com són els extractors d'ADN automàtics, no només per la baixa concentració d'ADN fetal present en plasma matern, sinó també per l'elevada variabilitat interindividual existent en quant aquesta concentració.

Actualment davant de les noves tecnologies d'alt rendiment que estan sorgint com la seqüenciació massiva es poden detectar simultàniament diferents seqüències d'origen fetal per a múltiples diagnòstics. Recentment s'ha descrit en la literatura la detecció d'aneuploidies utilitzant aquesta estratègia a partir de l'ADN fetal present en plasma matern. Aquestes noves tecnologies es troben en el seu inici però, sens dubte, revolucionaran el panorama en els propers anys [Jensen, et al., 2013; Benn, et al., 2013].

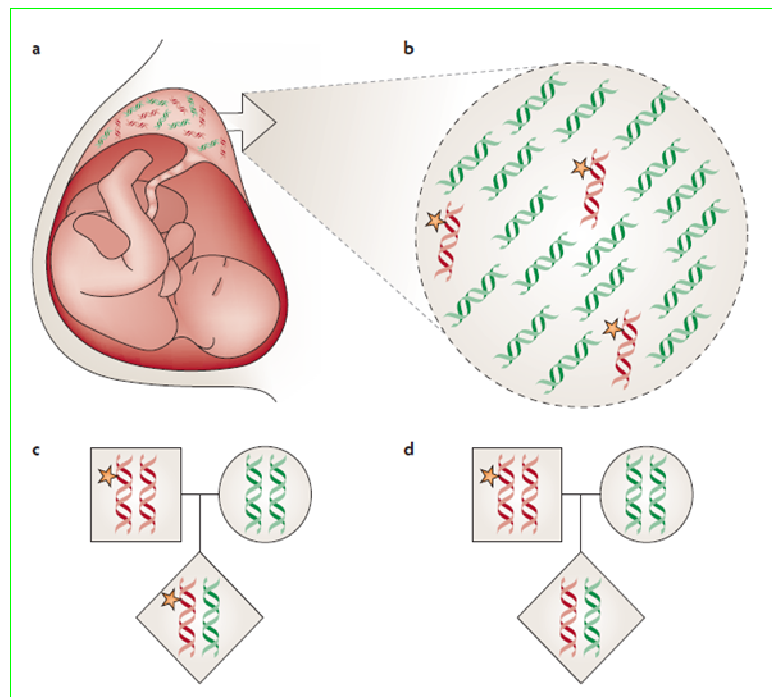


Figura 10. Principis de l'anàlisi de l'ADN fetal circulant en plasma matern: (a) Alliberació d'ADN fetal al torrent sanguini matern a través de la placenta. (b) En el plasma matern les molècules d'ADN fetal es troben en molta menor proporció que l'ADN matern. Els al·lels fetal específics d'origen patern (estrella), que no estan presents en l'ADN matern, són les seqüències més fàcilment detectables. Per exemple seqüències del cromosoma Y, seqüències del gen RHD en gestants RhD negatiu i mutacions o polimorfismes heretats per via paterna. (c,d) Es pot realitzar un diagnòstic prenatal no invasiu a partir de la detecció de dites seqüències fetal d'origen patern. [Lo and Chiu, 2007].

III.3.2.2.1.4.1. Determinació del sexe fetal

El diagnòstic del sexe fetal es pot determinar fenotípicament i de manera fiable per ecografia a les 13-14 setmanes de gestació. No obstant, en una edat gestacional molt primerenca no es pot realitzar aquesta prova perquè els genitals externs no s'han desenvolupat, de manera que abans d'aquest període s'havia de recórrer al diagnòstic genètic de sexe fetal mitjançant tècniques invasives. Gràcies a l'anàlisi de l'ADN fetal en circulació materna es pot determinar genèticament el sexe fetal a edats gestacionals primerenques, aproximadament a partir de la setena setmana de gestació [Wright and Burton, 2009]

Fins ara, la determinació del sexe fetal utilitzant l'ADN fetal extracel·lular com a font de material genètic ha sigut l'aplicació clínica més comuna del diagnòstic prenatal no invasiu, particularment en els casos de gestacions en risc d'heretar una malaltia recessiva lligada al cromosoma X, com ara l'hemofília o la distròfia muscular de Duchenne. En aquests casos, la utilització dels procediments invasius es reduiria a la meitat amb l'avantatge d'estalviar-ne l'aplicació innecessària d'aquestes tècniques en les gestacions corresponents a fetus femenins. Un altre dels exemples en què la determinació del sexe fetal és important és en el context de la hiperplàsia adrenal congènita, que es caracteritza per la masculinització dels

genitals externs dels fetus femenins i que es pot prevenir amb un tractament antenatal. En aquest últim cas, el coneixement del sexe fetal en estadis primerencs de la gestació permet evitar l'exposició als tractaments innecessaris, que d'altra banda s'administrarien, i als procediments invasius en la meitat dels embarassos que estarien gestant un fetus masculí [Lo and Chiu, 2007].

La determinació prenatal no invasiva del sexe fetal consisteix en la identificació de marcadors genètics del cromosoma Y per PCR a temps real a partir d'una mostra de sang materna, com és el gen SRY comunament utilitzat. En el primer trimestre de la gestació, la concentració d'ADN fetal en circulació materna s'apropa al límit de detecció de la tècnica, per la qual cosa es poden observar falsos negatius. L'amplificació d'una seqüència específica multicòpia del gen DYS14 ha permès obtenir límits de detecció deu vegades inferior als descrits amb el gen SRY augmentant la sensibilitat de la tècnica [Zimmermann, et al., 2005].

La sensibilitat i l'especificitat d'aquesta tècnica està contínuament sent perfeccionada pels diferents laboratoris, la majoria dels quals tenen una sensibilitat del 100% i una especificitat del 99,5% aproximadament durant el primer trimestre de la gestació [Fernández-Martínez, et al., 2012]. Si bé hi ha una manca d'uniformitat en quant a l'edat gestacional en la qual fer l'estudi sí que existeix un consens en quant a la tècnica emprada, la PCR a temps real.

III.3.2.2.1.4.2. Determinació del genotip fetal Rh(D)

Una de les aplicacions clíniques de l'ADN fetal que circula extracel·lularment en plasma matern estesa arreu d'Europa (Espanya, Holanda, França, Regne Unit) és la determinació del genotip Rh(D) fetal a partir de l'ADN present en plasma de dones RhD negatiu, una tècnica que s'ha consolidat i s'ha establert com a una prova diagnòstica de rutina pel diagnòstic prenatal no invasiu del genotip Rh(D) fetal. S'han descrit un gran nombre de protocols per a la tipificació Rh(D) fetal en sang materna però la majoria dels laboratoris utilitzen la PCR quantitativa a temps real amb sondes TaqMan™ específiques per a diferents regions del gen RHD. El protocol d'anàlisi inclou l'amplificació dels exons 5, 7 i, ocasionalment, exó 10 del gen RHD. S'utilitza la combinació d'aquests exons per la possibilitat que ofereixen de detectar algunes de les variants Rh existents en població caucàsica. Normalment aquest assaig va acompanyat de l'amplificació de marcadors d'ADN fetal com el gen SRY (fetus masculins) o el marcador epigenètic RASSF1A per evidenciar la presència d'ADN fetal en la mostra.

Les gestants RhD negatiu amb una parella heterozigota per aquest gen tenen una probabilitat del 50% de tenir un fetus RhD negatiu i, per tant, exempt de risc per a

la malaltia hemolítica del fetus i del nounat (MHFN). Aproximadament el 40% d'aquestes gestants reben un tractament antenatal innecessari amb immunoglobulines anti-D. Per tant, una de les avantatges del genotipatge Rh(D) fetal de forma no invasiva és que permet el maneig de la gestació d'una manera més racional aplicant un protocol profilàctic antenatal amb immunoglobulina anti-D restringit a les gestants RhD negatiu portadores d'un fetus RhD positiu.

El 15% de la població caucàsica és RhD negatiu [Lo and Chiu, 2007]. El gen RHD està deletat en els individus caucàsics RhD negatiu però en altres grups ètnics com en la població asiàtica, japonesa o africana negroide aquest fenotip està associat a petites variacions genètiques com són les mutacions puntuals o petites insercions però que, en tot cas, tindrien igualment presència del gen RHD. Aquest fet condiciona l'estratègia utilitzada però existeixen dissenys que permeten distingir aquests casos fàcilment.

III.3.2.2.1.4.3. Determinació d'altres polimorfismes de grup sanguini

A banda de la isoimmunització enfront de l'antigen RhD existeixen altres especificitats de grup sanguini que poden causar la malaltia hemolítica del fetus/nounat. En aquest context, la determinació del genotip fetal per altres polimorfismes de grup sanguini clínicament significatius, com són els antígens C, c i E del sistema Rh (localitzats en el gen RHCE) i l'antigen K(Kell) del sistema Kell es dur a terme de rutina en diferents centres europeus per a gestants amb incompatibilitat maternofetal per aquests antígens. Els centres de referència internacionals han desenvolupat i validat estratègies pel genotipatge fetal no invasiu a partir de l'ADN fetal en plasma, amb la dificultat intrínseca que comporta la detecció d'un únic canvi nucleotídic en aquest context en què l'al·lel homozigot matern està majoritàriament representat. [Finning, et al., 2007].

Molts d'aquests grups amb una llarga experiència en determinacions de genotip fetal a partir de l'ADN de plasma matern han utilitzat oligonucleòtids sintètics com els PNAs, anomenats també àcids nucleics peptídics (*Peptide Nucleic Acid*). Utilitzant aquestes molècules s'incorpora un pas addicional en la PCR, conegut com a *PCR clamping*, amb la finalitat de bloquejar o minimitzar l'amplificació inespecífica de l'al·lel majoritari i augmentar l'eficàcia de l'amplificació de la seqüència desitjada. L'oligonucleòtid PNA té una gran afinitat en la hibridació de la seva seqüència complementària i, a diferència d'un *primer* convencional, bloqueja el lloc d'unió de la Taq polimerasa impedit que tingui lloc el pas d'elongació. Una altra de les estratègies és la incorporació de LNAs (*Locked Nucleic Analogs*) en les sondes TaqMan o en el *primer*. Aquesta estratègia té la finalitat d'afavorir la discriminació

al·lèlica amb una major especificitat i sensibilitat que, a diferència del cas anterior, no té un efecte bloquejador de l'amplificació de l'al·lel majoritari.

III.3.2.2.1.4.4. Perspectives de futur

L'anàlisi genètic del fetus a partir de l'ADN present en plasma matern ha despertat sens dubte un gran interès com a font potencial per la seva aplicació en el diagnòstic prenatal d'aneuploïdies i de malalties monogèniques.

Pel que fa a la detecció d'anomalies cromosòmiques, molts dels estudis s'han centrat en la quantificació acurada de l'ADN fetal per associar-ho al guany o la pèrdua d'un dels cromosomes del fetus, ja que afecta directament als nivells d'ADN fetal lliure en la circulació materna. Un dels exemples més estudiat, en el qual s'hi han dedicat grans esforços, és la detecció de la presència d'una trisomia 21 en el fetus, de la que s'han demostrat uns nivells augmentats d'1.7 vegades els nivells d'ADN lliure en sèrum matern comparats amb els controls analitzats en paral·lel [Bischoff, et al., 2005].

Algunes de les estratègies per a la detecció d'aneuploïdies en el fetus es basen en l'estudi del ràtio al·lèlic de marcadors epigenètics, o bé, de l'ARNm extracel·lular derivat de la placenta i específic del cromosoma implicat en l'aneuploïdia. Tanmateix, diversos estudis recents proposen la determinació de la aneuploïdia del fetus a través de l'anàlisi directa de l'ADN fetal lliure en plasma matern. Alguns dels grups que hi treballen estan utilitzant noves eines diagnòstiques com la PCR digital [Zimmermann, et al., 2008] que permetin una quantificació més precisa de l'ADN fetal, capaces d'avaluar tant les possibles aneuploïdies com també les malalties monogèniques.

Recentment, molts grups s'estan centrant en una de les tecnologies més prometedores en aquest àmbit, la seqüenciació massiva paral·lela (MPS, *Massively parallel sequencing*), coneguda també com a seqüenciació de nova generació (NGS, *Next Generation Sequencing*) [Chiu and Lo, 2012; Lo and Chiu, 2012 review]. Aquest mètode, complementat amb la bioinformàtica, consisteix en la seqüenciació en paral·lel i en un sol *run* de milions d'àcids nucleics de fragments d'ADN. Fins ara, s'estan obtenint resultats molt prometedors utilitzant aquesta tecnologia amb una sensibilitat i especificitat del 99% [Palomaki, et al., 2011; Sehnert, et al., 2011]. Amb aquest mètode es poden detectar el síndrome de Down (trisomia 21), síndrome de Patau (trisomia 13) i el síndrome d'Edwards (trisomia 18) [Benn, et al., 2013]. A més a més, aquesta tecnologia té el potencial de detectar qualsevol tipus de variació genòmica, ja siguin diferències d'un únic nucleòtid, com insercions, delecions, duplicacions, inversions i translocacions.

La principal limitació de la seqüenciació massiva en paral·lel és el seu elevat cost que fa difícil implementar-la però, val a dir, que s'està reduint considerablement.

Per altra banda, cal destacar que el diagnòstic genètic prenatal està cobrant més importància a l'hora de confirmar un diagnòstic genètic preimplantacional (capítol III.4).

III.3.2.2.1.4.5. Anàlisi quantitativa

Les concentracions elevades d'ADN fetal present en plasma matern pot ser un valor diagnòstic per a la detecció precoç d'alguns trastorns associats a problemes en el creixement i desenvolupament de la placenta. Les alteracions de la funció placentària per factors externs com ara la hipòxia o les espècies reactives d'oxigen poden conduir a un augment significatiu del procés apoptòtic de la placenta. Una de les complicacions més coneguda és la preeclàmpsia que es manifesta aproximadament en el 2-5% de les gestacions [Hahn, et al., 2011]. Altres complicacions durant l'embaràs que es poden predir i que estan associades a alts nivells d'ADN fetal en circulació materna són la restricció del creixement intrauterí, polihidramnios, avortaments espontanis, part preterme, embarassos amb placenta invasiva i l'hiperemesis gravidarum.

III.3.2.2.2. ARNm circulant en plasma matern

La presència de ARNm fetal lliure en circulació materna es va demostrar per primera vegada l'any 2000 utilitzant els transcrits derivats del cromosoma Y dels fetus masculins [Poon, et al., 2000] procedents de la placenta [Ng., et al., 2003]. La detecció de seqüències d'ARNm circulants va ser inesperada, donada la seva coneguda labilitat i la presència de ribonucleases en plasma. Es va demostrar que l'estabilitat de les molècules d'ARNm es podria explicar per l'associació amb partícules en suspensió, com són els cossos apoptòtics, que protegeixen l'ARNm de la seva degradació de les RNases en plasma. Com s'ha explicat anteriorment en l'apartat referent a la fisiologia de l'ADN fetal circulant en plasma matern, l'ADN i l'ARNm s'empaqueten separatament en els cossos apoptòtics per a la seva degradació. Lo i col·laboradors van postular la hipòtesi de que la font principal de l'ARNm fetal circulant era la placenta i per demostrar-ho van amplificar dos transcrits específics de placenta del plasma matern: l'ARNm del gen de la gonadotropina coriònica humana (hCG) i el corresponent al lactògen placentari humà (hPL) [Ng., et al., 2003].

Anàlogament a l'ADN fetal circulant, l'ARNm fetal provinent de la placenta es pot arribar a detectar des de la quarta setmana de gestació i s'elimina ràpidament després del part [Chiu, et al., 2006].

III.4. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

El diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) és una forma molt primerenca de diagnòstic genètic prenatal que es va aplicar per primera vegada al 1990 per Handyside i col.laboradors amb l'objectiu d'evitar la transmissió de síndromes o malalties genètiques a la descendència [Handyside, et al., 1990]. Amb el diagnòstic genètic preimplantacional o preconcepcional es realitza una biòpsia de l'embrió o de l'òocit, aïllant un blastòmer o un corpuscle polar respectivament, per dur a terme un diagnòstic genètic, detectar les anomalies cromosòmiques o les malalties monogèniques i transferir a l'úter matern únicament aquells embrions lliures de malaltia. El DGP comporta una avantatge important vs el diagnòstic genètic prenatal, ja que en els casos en que el diagnòstic prenatal reveli la presència d'un fetus afecte, aquestes parelles es troben en la difícil circumstància de decidir si interrompre la gestació amb un avortament terapèutic, o bé, continuar l'embaràs fins al final. Amb el DGP ens anticipem al problema i suposa una avantatge per aquestes parelles portadores d'una malaltia genètica, de manera que es realitza el diagnòstic abans de la transferència i implantació de l'embrió a l'úter matern impedint que aquestes parelles hagin d'afrontar aquesta situació i prendre aquest tipus de decisions.

Des de la publicació de Handyside el número de casos de DGP ha crescut exponencialment en paral·lel amb el número de malalties estudiades i la varietat de mètodes aplicats que permeten incrementar la capacitat diagnòstica (detecció d'aneuploidies, malalties monogèniques, etc.) en els diferents laboratoris especialitzats en aquest camp. L'ús de tècniques altament especialitzades per aquest tipus de diagnòstic obliga gairebé als centres de reproducció assistida a derivar aquestes parelles a un laboratori extern dedicat exclusivament al DGP que estiguin formats per professionals de diferents disciplines: citogenetistes, genetistes moleculars, embriólegs etc.

III.4.1. Procediment del DGP

Tot procediment de DGP inclou un cicle de fecundació *in vitro* (FIV) per la generació d'embrions en el laboratori (Figura 11). Tot aquest procés implica un tractament hormonal previ de la dona per a l'obtenció d'òocits i la seva posterior fecundació *in vitro* o microinjecció amb un espermatozoide de la parella (ICSI, *Intracytoplasmic Sperm Injection*).

En la gametogènesi femenina, els òocits completen la maduració per meiosis en els fol·licles de l'ovari per arribar a ser òocits madurs capaços de ser fecundats.

Després de sotmetre a les pacients a una estimulació ovàrica controlada, els oòcits recuperats es mostren en diferents estadis de maduració meiòtica i únicament aquells que es trobin aturats en metafase II de la segona divisió meiòtica (MII) són aptes per fer una ICSI.

Els embrions que resultin de la fecundació *in vitro* es conserven en cultiu a dins d'un incubador. En el tercer dia de cultiu *in vitro*, es procedeix a la biòpsia embrionària d'un o dos blastòmers com a màxim per al seu estudi mitjançant sistemes de micromanipulació.

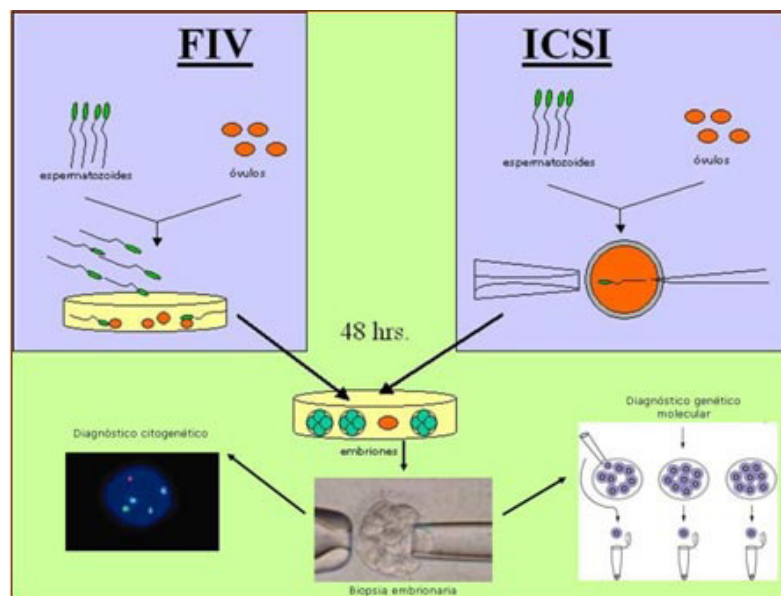


Figura 11. Esquema del procés de DGP. Imatge extreta de la web: <http://www.hemofilia.com>

III.4.1.1.1. Biòpsia dels corpuscles polars

L'any 1990 es va proposar un mètode alternatiu al DGP, anomenat inicialment diagnòstic genètic preconcepcional (DGPC), basat en la biòpsia i anàlisi del primer corpuscle polar (1CP) [Verlinsky, et al.,1990] (Figura 12).

El primer corpuscle polar, una cèl·lula petita que acompanya a l'oòcit madur, és el resultat de la primera divisió meiòtica de la gametogènesis femenina. Un dels cromosomes homòlegs que formen el bivalent se segrega al 1CP i l'altre es manté a l'oòcit. L'anàlisi del 1CP, que un cop extrusionat no té cap funció reproductiva, permet informar indirectament la constitució cromosòmica de l'oòcit corresponent perquè conté una dotació cromosòmica complementària a la de l'oòcit el qual acompanya.

En els casos en que durant la meiosi es produís una recombinació genètica i detectéssim el 1CP en heterozigosi, es podria biopsiar el segon corpuscle polar (2CP) després de la fertilització per a la detecció de les cromàtides que han sigut

extrusionades i predir així el genotip resultant de l'òocit i no tenir cap dubte respecte a la contribució materna en l'embrió.

No podem analitzar el material genètic de l'òocit directament perquè el destruiríem i un dels requeriments pel DGP consisteix en no destruir la viabilitat de l'òocit. Per tant, l'anàlisi del 1CP seria una opció de diagnòstic indirecte en els casos en què la dona sigui la portadora d'una anomalia genètica i que comporti un risc de transmetre-la a la descendència.

Un dels avantatges de l'anàlisi del 1CP és que no està afectat per la presència del mosaïcisme, un fenomen que es presenta freqüentment en les primeres divisions mitòtiques postembrionàries i que pot dificultar el DGP. Una altre dels aspectes que el fa convenient per a la seva aplicació és el temps de diagnòstic del que es disposa. La biòpsia del 1CP es realitza el mateix dia de la punció fol·licular i de la fecundació (dia 0), de manera que es disposen de tres o quatre dies per realitzar el diagnòstic genètic abans no es faci la transferència de l'embrió.

Per altra banda, un dels inconvenients que es presenten en aquest tipus d'anàlisi és que dona una informació parcial de l'embrió, ja que no hi queda reflectida la contribució genètica paterna. De la mateixa manera, els errors que hi puguin haver en la segona divisió meiòtica no es podrien detectar, tot i que és àmpliament conegut de que la majoria dels errors es produeixen en la primera divisió meiòtica.

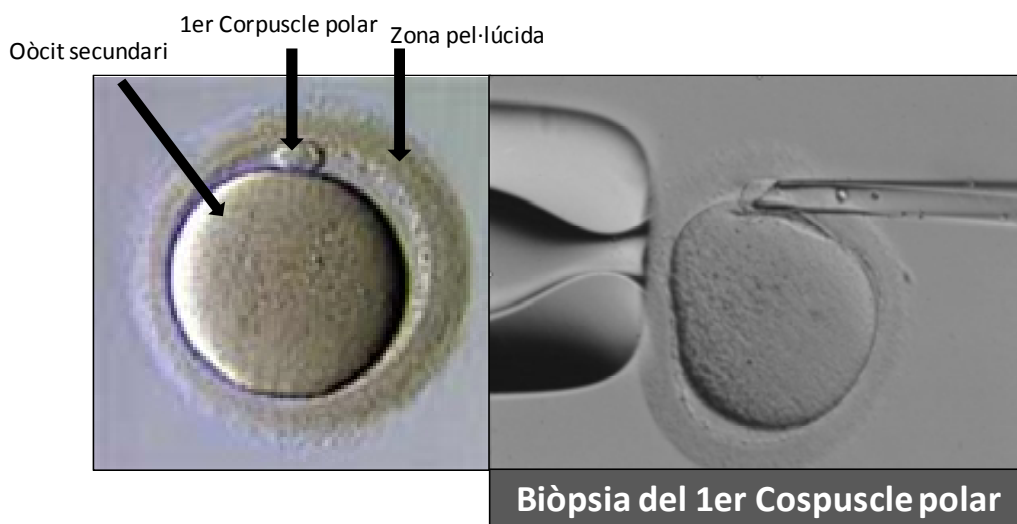


Figura 12. Biòpsia del primer cospuscle polar. Imatge extreta de la web: <http://www.reprogeneticsspain.com>

III.4.1.1.2. Biòpsia de blastòmers

L'anàlisi de blastòmers és la tècnica més utilitzada. La biòpsia embrionària es realitza en el dia +3 del desenvolupament quan l'estadi de l'embrió és de 6-10

cèl·lules (Figura 13). S'ha demostrat que el 70% dels embrions manipulats arriben a l'estadi de blastocist sense problemes [Hardy, et al., 1989].

L'avantatge principal de l'anàlisi de blastòmers és que la constitució genètica de l'embrió està totalment formada i, per tant, podem estudiar tan la contribució materna com la paterna en un estadi molt precoç si ho comparem amb el diagnòstic genètic prenatal. Normalment s'aïllen un o com a màxim dos blastòmers per l'estudi genètic en un medi lliure de calci i magnesi, per desestabilitzar les unions intercel·lulars i facilitar el seu aïllament (no hi ha efectes adversos per al desenvolupament de l'embrió). Quan s'obtenen els resultats, els embrions seleccionats poden ser transferits en el dia +3 /+4 o poden ser criopreservats (congelats) per a la seva transferència en el futur. Un dels grans inconvenients d'aquesta tècnica és el curt període del qual es disposa per a l'obtenció del diagnòstic genètic, equivalent a un dia i unes poques hores per a procedir posteriorment a la transferència embrionària. A més a més, i a diferència de la biòpsia del 1CP, podem trobar presència de mosaïcisme⁸embrionari com a conseqüència de les divisions mitòtiques postzigòtiques, la qual cosa pot interferir en el DGP.

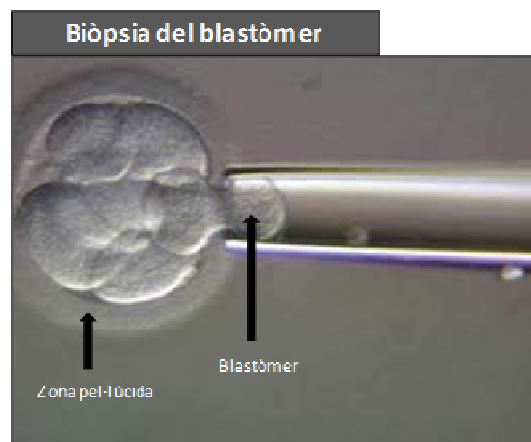


Figura 13. Biòpsia d'un blastòmer. Imatge extreta de la web: <http://www.mainlinefertility.com>

III.4.1.1.3. Biòpsia del blastocist

La biòpsia del blastocist és la més tardana que es pot realitzar i acostuma a fer-se aproximadament en el dia +5 post-fecundació *in vitro* (Figura 14). Aquesta tècnica té força avantatges respecte les anteriors: en primer lloc l'embrió en aquest estadi ja està diferenciat en la massa cel·lular interna (l'embrió *per se*) i el trofoblast, el qual és el teixit biopsiat. Es poden obtenir entre 10-30 cèl·lules sense afectar a la viabilitat de l'embrió mitjançant una o dos biòpsies seriades, la qual cosa augmenta

⁸ Mosaïcisme: presència de dos o més línies cel·lulars amb diferent constitució cromosòmica o en el genotip però que han sigut derivades d'un únic zigot.

la fiabilitat del diagnòstic [Dokras, et al., 1991]. A més a més, quan els embrions arriben a l'estadi de blastocist, significa que la selecció dels embrions més viables ja s'ha produït i s'esperaria que les taxes d'embaràs fossin més altes. Tanmateix, aquest tipus d'anàlisi és poc freqüent perquè molts dels centres tenen problemes amb el cultiu *in vitro* dels embrions fins a l'estadi de blastocist, tot i que hi ha grups que ja han practicat aquesta tècnica [McArthur, et al., 2008; Treff, et al., 2012]. Un altre dels inconvenients que se suma és que la transferència de l'embrió es pot fer com a màxim en el dia +6 del desenvolupament, de manera que hi ha poc marge de temps per a la determinació del diagnòstic genètic; com més tard es faci la biòpsia en el transcurs del desenvolupament de l'embrió, menys temps es disposa per determinar el diagnòstic genètic de l'embrió.

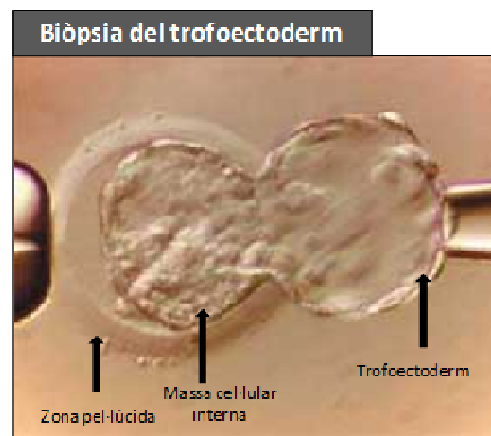


Figura 14. Biòpsia del blastocist. Imatge extreta de la web: <http://www.hamiltonthorne.com>

III.4.1.2. Diagnòstic genètic

L'estudi genètic del blastòmer es pot fer de dos tipus segons la indicació de DGP per a cada parella, ja sigui per a la detecció d'aneuploïdies cromosòmiques (estudis citogenètics), o bé, per a la detecció de malalties monogèniques (estudis moleculars).

III.4.1.2.1. Mètodes citogenètics

Existeixen dos tipus d'anomalies cromosòmiques: les anomalies numèriques i les estructurals. Les anomalies numèriques s'associen amb el guany o la pèrdua d'un o més cromosomes i reben el nom d'aneuploïdies. Per altra banda, les anomalies estructurals estan relacionades amb els reordenaments cromosòmics estructurals, com a conseqüència de trencaments cromosòmics i subsegüents agrupacions que comporten un canvi en la configuració dels cromosomes.

El DGP clàssicament s'ha emprat pel cribatge d'aneuploïdies en embrions per detectar si aquests són euploides (46 cromosomes), o bé, presenten alguna aneuploïdia cromosòmica.

Molts dels embrions que presenten anomalies cromosòmiques són inviàbles i es perden durant o després de la implantació de l'embrió en forma d'avortaments espontanis. La causa de més de la meitat dels avortaments espontanis són les anomalies cromosòmiques. Durant la meiosi es poden produir errors de no-disjunció per la mala segregació dels cromosomes originant importants desequilibris cromosòmics.

El PGS (*Preimplantation Genetic Screening*) és el DGP d'embrions centrat en el cribatge d'aneuploïdies amb l'objectiu d'incrementar la taxa d'implantació dels embrions transferits. Sobretot va dirigit en aquells casos d'edat materna avançada, avortaments espontanis de repetició i fallades recurrents en la implantació de l'embrió.

La hibridació *in situ* amb sondes fluorescents (FISH, *Fluorescence in situ Hybridation*) és la tècnica per excel·lència que s'empra en el PGS i s'aplica tant per corpuscles polars com per blastòmers, per analitzar de 5 a 9 cromosomes (cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) i també per la detecció d'embrions amb reordenacions cromosòmiques no equilibrades (guany o pèrdua de material genètic). La FISH combina la citogenètica convencional amb la biologia molecular, ja que es basa en la unió d'una sonda fluorescent amb la seva seqüència complementària localitzada en algun punt de l'extensió metafàsica.

III.4.1.2.2. Mètodes de diagnòstic molecular

Les malalties monogèniques són malalties hereditàries produïdes per la mutació o l'alteració en la seqüència d'ADN d'un sol gen responsable, moltes de les quals es transmeten segons les lleis de Mendel. El PGD s'ha aplicat a dia d'avui per a l'anàlisi de fins a 200 malalties monogèniques [Milunsky and Milunsky, 2010], entre les quals destaquen la fibrosi quística, la malaltia de Huntington, la distròfia muscular de Duchenne i l'hemofília com els exemples més coneguts. Les malalties monogèniques dominants, recessives i lligades al sexe més conegudes en les quals s'ha aplicat un protocol de DGP es mostren en la Taula 6. En aquests casos és important identificar la mutació de la que es tracta i obtenir un estudi familiar previ. Per tant, el PGD aplicat a malalties monogèniques redueix el risc de transmetre una malaltia a la descendència d'un 25% (malalties autosòmiques recessives) o d'un 50% (malalties autosòmiques dominants) a un <1%.

Val a dir que una de les noves tendències i que està sent una de les indicacions més atractives pel DGP és la tipificació HLA de l'embrió amb el propòsit de fer un transplantament amb cèl·lules mare a un germà afecte d'una malaltia hematològica o immunològica [Ingerslev and Hindkjer, 2012].

Disease	Genes
Dominant	
Huntington's disease	<i>HTT</i>
Myotonic dystrophy	Type 1, <i>DMPK</i> ; type 2, <i>ZNF9</i> (<i>CNBP</i>)
Charcot–Marie–Tooth disease	Type 1A, <i>PMP22</i>
Recessive	
β -Thalassemia	<i>HBB</i>
Cystic fibrosis	<i>CFTR</i>
Spinal muscular atrophy (Werdnig–Hoffman disease)	<i>SMN1</i>
Sickle cell disease	<i>HBB</i>
Sex-linked	
Fragile X syndrome	<i>FMR1</i>
Duchenne's muscular dystrophy	<i>DMD</i>
Hemophilia	Type A, <i>F8</i> ; type B, <i>F9</i>

Taula 6. Malalties monogèniques identificades per DGP [Bodurtha and Strauss, 2012].

Actualment existeixen diferents metodologies pel diagnòstic molecular en el DGP. La tècnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ha fet possible l'anàlisi de quantitats mínimes d'ADN obtingudes a partir d'una única cèl·lula (6pg aproximadament). Tradicionalment s'ha utilitzat la PCR *multiplex* (estudi de diversos loci simultàniament) en una primera ronda d'amplificació amb oligonucleòtids externs seguida d'una *nested* PCR, utilitzant una alíquota del producte de la primera PCR, amb *primers* interns específics per a la seqüència que es vol detectar amb una major especificitat. Un dels sistemes de diagnòstic que es combinen amb aquesta tècnica és la digestió del producte de PCR amb enzims de restricció.

La tècnica, però, que ha marcat el major avanç en la història del DGP de malalties monogèniques és sens dubte la PCR fluorescent que és molt més sensible que la PCR convencional [Findlay, et al., 1996]. L'addició d'un fluorocrom en només en un dels *primers* de la parella d'oligonucleòtids permet analitzar el producte de PCR en

una seqüenciador o un analitzador de fragments. El marcatge amb fluorescència confereix una alta sensibilitat i una alta resolució, ja que es pot arribar a distingir diferències d'un parell de bases en dos fragments diferents. La PCR *multiplex* acostuma a combinar-se amb una *nested* PCR fluorescent per les avantatges ja esmentades.

Una altra de les tècniques que ha guanyat molt de camp en el DGP és la PCR a temps real, en la qual s'utilitzen sondes fluorogèniques per guanyar més sensibilitat, s'evita el processament de post-PCR i el microtub no s'obre fins a la finalització de la reacció d'amplificació, de manera que s'eviten possibles contaminacions que es puguin produir.

La seqüenciació i la miniseqüenciació són altres mètodes que seguint aquesta línia es beneficien del marcatge fluorescent i la detecció per seqüenciadors.

El desenvolupament continu de noves tecnologies emergents permetrà l'anàlisi genètic dels corpuscles polars o dels blastòmers utilitzant plataformes de microarrays possibilitant l'anàlisi simultani del gen d'interès i dels múltiples marcadors moleculars lligats a aquest gen, així com també la presència d'anomalies cromosòmiques.

Recentment s'han introduït nous mètodes d'amplificació com és l'amplificació de la totalitat del genoma a partir de l'ADN d'una cèl·lula aïllada, anomenades també tècniques de WGA (*Whole Genome Amplification*) per utilitzar aquest producte amplificat com a ADN motlle per estudiar la regió del genoma d'interès. S'han descrit diferents estratègies al respecte: PEP-PCR (*Primer Extension Preamplification PCR*) [Zhang, et al., 1992], DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primed PCR*) [Telenius, et al., 1992] i MDA (*Multiple Displacement Amplification*) [Spits C., et al., 2006]. El següent apartat està dedicat d'una manera més extensa a la tècnica de MDA, ja que és l'escollida per l'estratègia de DGP com a prevenció de la TFNA.

III.4.1.2.3. Preamplificació total del genoma

En alguns camps del diagnòstic molecular i, no només en el DGP, sinó també en la medicina forense, el diagnòstic genètic prenatal i en l'oncogenètica, l'anàlisi de l'ADN es realitza a partir d'una única cèl·lula o un *pool* molt reduït de cèl·lules. L'escassa concentració d'ADN inicial suposa un inconvenient per aquest tipus d'anàlisi i fa que l'ADN de partida sigui sens dubte un factor limitant. Les tècniques de WGA s'han desenvolupat per resoldre precisament aquest problema amb l'objectiu d'amplificar i obtenir grans quantitats d'ADN a partir de concentracions mínimes d'ADN.

En el camp del DGP, l'amplificació inespecífica de la totalitat del genoma permet dur a terme molts assajos a partir de l'escassa concentració d'ADN procedent d'una única cèl·lula o blastòmer (6pg). Entre les diferents tècniques descrites, el mètode de MDA (*Multiple displacement Amplification*) ha estat reconegut com el més eficaç [Spits, et al., 2006; Coskun i Alsmadi, 2007]. Aquesta tècnica es va descriure l'any 2002 [Dean, et al., 2002] i mostra significativament una alta fidelitat de seqüència, una major sensibilitat i una major eficiència que els mètodes basats en la PCR. Amb aquest mètode es generen grans quantitats d'ADN, de l'ordre de micrograms, a partir de quantitats d'ADN limitants com a material genètic de partida, respectant al mateix temps la representació de la seqüència original. Tot i que s'han descrit protocols que reporten una concentració del producte de MDA equivalent a 35-40µg [Handyside, et al., 2004; Hellani, et al., 2004], hi ha d'altres autors que descriuen variants del protocol, dels quals s'obté una concentració d'1-2µg [Spits, et al., 2006] o de 4-7µg [Kumar, et al., 2008]

Utilitzant el producte de MDA com a ADN motlle per a una segona fase d'amplificació es poden genotipar múltiples loci en paral·lel per al diagnòstic genètic preimplantacional. Tot i que generalment es recomana per l'ús del MDA una quantitat d'ADN inicial aproximadament d'1ng (equivalent a 300 còpies del genoma), la seva aplicació ha sigut de gran interès i s'ha explotat en el camp del DGP. Hellani i col·laboradors van ser el primer grup en utilitzar el MDA pel DGP de la fibrosi quística i la β-talassèmia [Hellani, et al., 2005].

La tècnica de MDA (*Multiple Displacement Amplification*) per se no és una PCR, sinó que consisteix en una reacció isotèrmica a una única temperatura d'*annealing* i polimerització de 30°C. Per dur a terme la reacció s'empren una barreja de *primers* hexanucleòtids degenerats i l'enzim Phi29 ADN polimerasa. La reacció es basa en l'amplificació per desplaçament en cadena, de tal manera que mentre té lloc l'elongació i l'enzim es topa amb el *primer* següent, la cadena de nova síntesi és desplaçada mentre continua la polimerització alliberant-la com a cadena senzilla per poder ser copiada en un altre cicle catalític (Figura 15). La Phi29 ADN polimerasa, provinent d'un bacteriòfag, es caracteritza per posseir una alta processivitat⁹ (capaç d'incorporar fins a 70000 nucleòtids seqüencialment) [Mamone, 2003] i una alta activitat 5'-3' exonucleasa o autocorrectora (*proofreading activity*), de la qual es reporta una taxa d'error de 1×10^{-6} - 10^{-7} errors/pb que, comparat amb la Taq ADN polimerasa (1×10^{-4} - 2×10^{-5} errors/pb), és una taxa baixa [Blanco and Salas, 1996; Blanco, et al., 1989; Coskun and

⁹ La processivitat d'un enzim fa referència a la capacitat de l'enzim per realitzar múltiples cicles catalítics en comptes de dissociar-se en cada cicle. Així una polimerasa té una alta processivitat quan és capaç d'addicionar de mitjana un elevat nombre de nucleòtids abans de dissociar-se del motlle.

Alsmadi, 2007]. El kit comercial disponible en el mercat per dur a terme la tècnica de MDA és l'*illustra GenomiPhi V2* (GE Healthcare Life Science). Els hexanucleòtids d'aquest kit tenen una modificació consistent en l'addició de tiofosfats en l'extrem 3' del *primer* per protegir-los de la degradació de l'activitat 3'-5' exonucleasa de l'enzim Phi29 ADN polimerasa a mesura que avança la polimerització [Coskun and Alsmadi, 2007].

Una de les avantatges més rellevants que comporta l'ús del MDA és que, utilitzant el producte post-MDA per anàlisis subsegüents, l'ADN deixa de ser un factor limitant i es poden estudiar diferents loci per separat amb la possibilitat de repetir qualsevol PCR si fos necessari. D'aquesta manera s'aconsegueix obtenir un diagnòstic més acurat i una eficiència de les PCRs subsegüents superior.

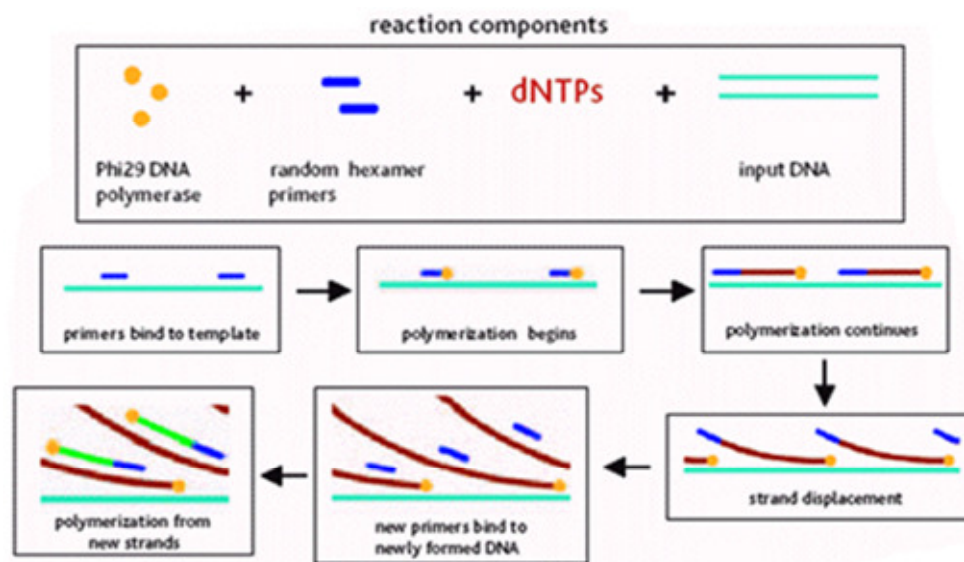


Figura 15. Diagrama de l'amplificació d'ADN pel mètode MDA utilitzant el kit GenomiPhi (GE Healthcare Life Science). Els primers hexàmers o hexanucleòtids degenerats hibriden en diferents punts del genoma després de la desnaturalització de l'ADN. La Phi 29 ADN polimerasa inicia la polimerització de nucleòtids. A mesura que avança la síntesi, es produeix el desplaçament de les noves cadenes sintetitzades, complementàries a l'ADN, i es generen noves cadenes senzilles per tornar a començar el cicle. Figura obtinguda de Amersham Biosciences [Mamone, 2003].

III.4.1.2.4. Inclusió de marcadors microsatèl·lits

Els microsatèl·lits o STRs (*Short Tandem Repeats*) són repeticions en tàndem de seqüències curtes d'ADN d'unitats formades entre 1-6 nucleòtids (>7 nucleòtids s'anomenen VNTR o minisatèl·lits) que es troben distribuïdes al llarg de tot el genoma, especialment en les regions no codificants. Els STRs més comuns són els dinucleòtids (repetició de dues bases), seguit dels mono-, els tri-, tetra-, penta- i hexanucleòtids, de més a menys freqüència a mesura que augmentem el nombre de bases del motiu de repetició. Els microsatèl·lits representen aproximadament el

3% de tot el genoma humà [International Human Genome Sequencing Consortium, 2001].

El nombre d'unitats repetitives determinen els diferents al·lels d'un locus microsatèl·lit; per exemple un dels STRs més comuns és la repetició del dinucleòtid adenina-citosina que s'expressaria com a $(CA)_n$, sent la "n" el nombre de repeticions. Com més variabilitat hi hagi en el nombre de repeticions d'un microsatèl·lit determinat i aquestes es mostrin com a diferències estables i heretables en una població direm que és un STR polimòrfic.

Existeix una gran variabilitat interindividual, interpoblacional i entre espècies en el nombre de repeticions que fan dels STRs uns marcadors molt útils per a nombroses aplicacions: estudis de lligament pel diagnòstic genètic, el mapatge genètic, estudis forenses, estudis de paternitat etc. Aquest tipus de marcadors moleculars són molt polimòrfics, són codominants, són molt fiables i són molt fàcils d'analitzar. A més a més, l'elevat grau de polimorfisme dels STRs permet identificar el perfil al·lèlic propi de cada individu, ja que és poc probable que al analitzar varis marcadors microsatèl·lits de dos individus agafats a l'atzar comparteixin tots els seus al·lels.

III.4.1.2.5. Consideracions importants pel DGP

La biòpsia del blastòmer s'acostuma a realitzar en el tercer dia post-fecundació, quan els embrions estan formats entre 6-10 cèl·lules. Les tècniques utilitzades per l'anàlisi genètic del blastòmer han de ser sensibles, específiques i ràpides per obtenir un diagnòstic genètic de l'embrió abans de les 36 hores. La transferència de l'embrió seleccionat lliure de malaltia es dur a terme en el dia +3 o +4 després de la fecundació *in vitro*.

Tots aquests aspectes s'han anat millorant amb l'experiència i amb el temps però encara hi ha complicacions que poden interferir en el diagnòstic genètic, com és la presència del fenomen d'*allele drop-out* (ADO) o les possibles contaminacions amb ADN extern.

Una de les recomanacions per evitar contaminacions d'origen matern (cèl·lules del *cumulus* que envolten el oòcit) o d'origen patern (espermatozoides adherits a la zona pel·lúcida) és la realització de la ICSI com a tècnica de fertilització *in vitro*, per evitar un diagnòstic erroni amb la coamplificació d'aquestes cèl·lules amb l'ADN del blastòmer o del corpuscle polar. Per altra banda, les contaminacions produïdes durant el processos de PCR o MDA es poden evitar separant les àrees de treball en pre-PCR i post-PCR, utilitzant sempre campanes de flux laminar i manipulant les mostres sota un ambient completament estèril (veure apartat VI.2).

Els problemes més rellevants característics de les PCRs unicel·lulars i àmpliament coneguts en el DGP són la fallada total de l'amplificació, l'amplificació preferencial (AP) d'un dels dos al·lels o la fallada de l'amplificació d'un dels dos al·lels quan el blastòmer es troba en heterozigosi, conegut com efecte *allele drop-out* (ADO).

L'absència d'amplificació pot ocórrer en un 2-7% dels blastòmers biopsiats [Piyamongkol, et al., 2003]. Normalment pot ser a causa de la pèrdua de la cèl·lula durant la seva transferència al microtub o el que comunament s'anomena "*tubing*"; per l'anàlisi d'una cèl·lula anucleada, per una lisi incompleta o per un blastòmer de mala qualitat que contingui l'ADN parcialment degradat.

L'amplificació preferencial implica la relativa sobreamplificació d'un dels al·lels en comparació amb l'altre quan l'embrió es troba en heterozigosi. Normalment s'observa quan s'analitzen una sèrie de STRs que estan pròxims entre ells i lligats a la mutació o l'SNP que es vol estudiar. En aquests casos s'acostuma a observar una amplificació preferencial al·leatòria d'un dels dos al·lels del locus microsatèl·lit que es troba en heterozigosi. És freqüent que els fragments més curts s'amplifiquin preferentment vs els llargs quan es tracta de dos al·lels que difereixen en llargada, simplement per una qüestió referent a la cinètica de la PCR.

El fenomen *d'allele drop-out* (ADO) es defineix com a la no-amplificació aleatòria d'un dels dos al·lels presents en una cèl·lula heterozigota aïllada. La presència d'aquest fenomen compromet sèriament la fiabilitat del DGP, ja que un embrió heterozigot per un locus determinat podria ser diagnosticat com a homozigot. Un dels principals objectius del DGP, i en el que s'estan concentrant gran part dels esforços, és l'intent de minimitzar o evitar aquest efecte d'ADO. S'han plantejat diversos factors que poden influir en l'aparició d'aquest fenomen:

- ❖ La lisi cel·lular és un pas crític que permet l'accés a l'ADN per a la seva amplificació, per tant, una lisi cel·lular incompleta podria retardar o evitar l'amplificació de l'ADN. S'han valorat diferents mètodes de lisi cel·lular concloent-ne que la lisi alcalina i la lisi amb proteïnasa K combinada amb SDS són els millors mètodes existents avui en dia [Thornhill, et al., 2001; Piyamongkol, et al., 2003].
- ❖ La baixa temperatura de desnaturalització de l'ADN.
- ❖ La degradació de l'ADN per tractar-se d'embrions de baixa qualitat o blastòmers amb un nucli poc clar.
- ❖ Condicions no òptimes de PCR o disseny subòptim dels encebadors.
- ❖ L'acció d'endonucleases que trenquin les cadenes d'ADN.
- ❖ Els amplicons llargs tenen una incidència d'ADO major, així com també una probabilitat de la fallada de l'amplificació total si ho comparem amb els

amplicons curts. Els fragments amb una llargada inferior als 40pb poden aproximar-se a una incidència d'ADO propera a 0 i en els nivells basals d'una fallada total en l'amplificació (2-7%)[Piyamongkol, et al., 2003].

Una de les solucions per minimitzar l'impacte d'ADO és augmentar el nombre de loci a estudiar. S'ha demostrat que la incidència d'ADO s'ha reduït un 50% quan en l'anàlisi s'inclou un marcador de lligament informatiu, un 75% quan s'inclouen dos i quan s'inclouen tres marcadors l'ADO es detecta pràcticament sempre [Verlinsky and Kuliev, 2000]. A més a més aquests marcadors proporcionen simultàniament un control per a les possibles contaminacions.

Una altra estratègia per incrementar les probabilitats de detectar l'ADO és analitzar més d'un blastòmer d'un mateix embrió. Alguns centres utilitzen la biòpsia de dos cèl·lules dels embrions formats per 8-10 cèl·lules en el dia +3 post-fertilització, tot i que encara sigui objecte de debat. Aquesta estratègia, gràcies als darrers avenços, podria ser factible amb la biòpsia del blastocist en el dia +4 o +5 del desenvolupament embrionari. Amb l'anàlisi de dos blastòmers es reduiria considerablement l'incidència d'ADO però per alguns loci s'arribaria al 100% de la eficiència d'amplificació amb la biòpsia de fins a 3 blastòmers i, per tant, una taxa d'ADO equivalent a zero.

Una altra possibilitat proposada per alguns autors per reduir la incidència d'ADO és incrementar el temps i la temperatura de desnaturalització en els primers 5-10 cicles de la PCR [Ray, et al., 1996], així com també utilitzar la PCR fluorescent, ja que és 1000 vegades més sensible que la PCR convencional i permet determinar un genotip més acurat.

Pel que fa el MDA, un dels inconvenients més evidents és la taxa relativament elevada d'ADO i la freqüent aparició d'al·lels preferentment amplificats. La mitjana d'ADO per MDA es del 25% comparat amb el 10% de cèl·lules no amplificades. De la mateixa manera s'ha reportat que l'amplificació preferencial apareix en un 25% de les cèl·lules. Es desconeixen les causes exactes de l'alta incidència d'ADO però podria deure's al propi mecanisme intrínsec del MDA o a l'enzim que catalitza la reacció. No obstant, la solució seria, com s'ha esmentat anteriorment, l'anàlisi d'un major nombre de loci que reduirien la taxa d'ADO a menys d'un 10% [Spits and Sermon, 2009].

Segons aquestes dades, la millor manera per reduir l'ADO és la biòpsia en fresc de dos blastòmers, utilitzar un buffer de lisis cel·lular eficient i amplificar fragments curts d'ADN que continguin la regió d'interès.

Els laboratoris més experimentats en el DGP poden mantenir una incidència d'ADO del 5-15% , tot i que no és infreqüent trobar taxes més altes i en alguns casos ha arribat a superar el 40% [Piyamongkol, et al., 2003]. No em de deixar de tenir en compte que és inevitable ara per ara obtenir un cert percentatge d'ADO degut a trencaments de les cadenes d'ADN. Per tant, s'ha de treballar en els protocols de DGP per intentar millorar-los permetent una baixa incidència d'ADO però trobant sempre les estratègies per a la seva fàcil detecció i evitar diagnòstics erronis.

III.4.2. Consideracions legals sobre les indicacions del DGP

La legislació en la que s'emmarca aquest treball per aplicar el diagnòstic genètic preimplantacional de la TFNA i la utilització de preembrions per a la investigació i la posta a punt d'aquest protocol es troben publicades a la pàgina web de la "Sociedad Española de Fertilidad "[<http://nuevo.sefertilidad.com/publicaciones.php>].

En el context de l'Estat espanyol la autorització de projectes d'aquest àmbit correspon a les diferents comunitats autònomes amb el suport tècnic i assessor de la "Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida", entitat a la que s'ha d'adreçar la sol·licitud d'un projecte per evaluar-ne les característiques i aprovar-lo.

En la llei 14/2006 s'especifica que els preembrions sobrants d'un cicle de reproducció assistida que no siguin transferits a la dona poden destinar-se a la investigació, sempre supeditats a la voluntat dels progenitors, en condicions estrictes d'autorització, seguiment i control per part de les autoritats sanitàries corresponents. En aquest cas es necessitaria un consentiment informat de la parella amb una breu explicació dels fins de la investigació i les implicacions que comporta.

Tal i com s'indica a l'article 12 d'aquesta llei es permetrà practicar el diagnòstic preimplantacional en centres de reproducció assistida autoritzats per a detectar malalties hereditàries greus, per a la detecció d'altres alteracions que comprometin la viabilitat de l'embrió, com és el cas de la TFNA i, per últim, per a qualsevol altra finalitat no esmentada anteriorment o per a la determinació dels antigens d'histocompatibilitat dels preembrions *in vitro* per a fins terapèutics a tercers, sempre amb l'autorització de l'autoritat sanitària corresponent i el vistiplau de la "Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida".

L'apartat de l'article 12 de la llei 14/2006 on s'englobarien els casos de TFNA és el següent: "*Los centros debidamente autorizados podrán practicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para la detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión. La aplicación de las técnicas de diagnóstico preimplantacional en estos casos deberá comunicarse a la autoridad*

sanitaria correspondiente, que informará de ella a la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.”

IV. HIPÒTESI

El programa profilàctic antenatal de la TFNA està dissenyat per a ser aplicat a les gestants HPA-1a negatiu sensibilitzades, que han desenvolupat anticossos anti-HPA-1a i que en la gestació en curs són portadores d'un fetus HPA-1a positiu. A la pràctica, però, el coneixement del genotip HPA-1 fetal requereix la utilització de tècniques invasives, com la biopsia corial o l'amniocentèsi, en les que al risc d'interrupció de l'embaràs s'hi ha de sumar el de la reimmunització materna. La tecnologia disponible avui dia en l'àmbit del diagnòstic prenatal i preimplantacional obre noves possibilitats que poden ajudar a millorar el maneig d'aquestes gestacions, i fins i tot a prevenir el quadre clínic. L'experiència del laboratori d'immunohematologia del BST en la determinació del genotip *RHD* fetal a partir del DNA de plasma, ens capacita per a posar a punt noves aplicacions de genotipificació fetal mitjançant aquesta aproximació no invasiva. A l'igual que succeeix amb la determinació antenatal del genotip *RHD* fetal en plasma matern, la genotipificació HPA-1a fetal no invasiva permetrà evitar el tractament innecessari de la gestant en aquells casos en els que el genotip fetal sigui HPA-1a negatiu. En aquest sentit, es important poder disposar d'un control de DNA fetal que permeti assegurar els resultats de genotipificació del fetus a partir del plasma matern, especialment en aquells casos en els que el resultat és HPA-1a negatiu. La descripció de marcadors epigenètics ens brinda l'oportunitat de posar a punt una estratègia de detecció específica del DNA d'origen fetal en el plasma de gestants.

Finalment, el desenvolupament d'un protocol de diagnòstic preimplantacional per determinar el genotip HPA-1 a partir de cèl·lules embrionàries, permetria seleccionar i transferir en un cicle de reproducció assistida, embrions compatibles amb la mare al·loimmunitzada. Aquest protocol tindria una aplicació potencial en aquelles parelles amb antecedents greus de TFNA i un alt risc de recurrència del quadre clínic, sent el pare heterozigot HPA-1a1b.

V. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és el desenvolupament de noves eines de diagnòstic molecular aplicables a la prevenció de la trombocitopènia fetal/neonatal al·loimmune (TFNA).

Els objectius específics són els següents:

- ❖ Posar a punt una tècnica no invasiva per a la tipificació de l'antigen plaquetar HPA-1a fetal a partir de l'ADN present en el plasma matern.
 - ❖ Avaluar diferents estratègies per a la detecció de SNPs a partir de l'ADN fetal present en plasma matern.
 - ❖ Recollir de forma prospectiva una sèrie de mostres de gestants HPA-1a negatiu en diferents setmanes de la gestació per a poder avaluar el protocol un cop desenvolupat en una cohort de mostres clíniques.
 - ❖ Realitzar una validació clínica amb les mostres recollides contrastant els resultats amb el genotip dels nadons i/o amb els resultats d'una amniocentesi amb l'objectiu d'avaluar la sensibilitat, l'especificitat i la fiabilitat del mètode desenvolupat.
- ❖ Incorporar al disseny de la tècnica un marcador epigenètic d'ADN fetal que com a marcador universal permeti evidenciar la presència d'ADN fetal en la mostra analitzada.
 - ❖ Optimitzar la detecció del marcador RASSF1A en mostres de plasma matern.
 - ❖ Avaluar la sensibilitat i la reproducibilitat de l'assaig RASSF1A en la seva aplicació prospectiva en mostres de diferents setmanes de gestació.
- ❖ Desenvolupar un protocol per a la detecció preimplantacional d'embrions HPA-1a negatiu, amb l'objectiu de prevenir la incompatibilitat HPA-1a maternofetal en gestants HPA-1a negatiu altament sensibilitzades i amb antecedents d'haver induït una trombopènia fetal/neonatal greu i/o hemorràgia intracranial en gestacions anteriors.
 - ❖ Avaluar i seleccionar una bateria de loci microsatèl·lit polimòrfics.
 - ❖ Posar a punt un protocol per a la tipificació del genotip HPA-1 a partir d'una sola cèl·lula.
 - ❖ Avaluar l'estratègia de *Multiple Displacement Amplification*.
 - ❖ Realitzar un estudi de validació del protocol desenvolupat a partir d'un número mínim de 50 blastòmers.

VI. MATERIAL I MÈTODES

VI.1. TIPIFICACIÓ DEL SISTEMA HPA-1

Per a la tipificació molecular del sistema HPA-1 de qualsevol individu es van seguir 3 passos bàsics: la obtenció del material genètic a partir de sang total o a partir de cèl·lules de mucosa bucal, l'amplificació per PCR-SSP de la seqüència del gen ITGB3 que conté el canvi nucleotídic T¹⁹⁶C característic del sistema HPA-1 i la visualització i la interpretació del genotip HPA-1 per presència o absència del producte amplificat en un gel d'agarosa.

VI.1.1. Extracció d'ADN genòmic

L'aïllament de l'ADN genòmic es va fer fonamentalment a partir de sang fresca però, en alguns casos, també es va realitzar a partir de cèl·lules de mucosa bucal. El rendiment en quant a la concentració d'ADN que s'obté utilitzant sang total com a material de partida és molt més alt comparat amb la quantitat d'ADN que s'obté utilitzant cèl·lules de l'epiteli bucal; tot i que aquest últim mètode resulta ser més senzill i menys invasiu per a l'obtenció d'ADN genòmic. La sang perifèrica es va obtenir per punció venosa utilitzant un tub Vacutainer amb anticoagulant EDTA (BD Vacutainer Systems, UK). Les cèl·lules de descamació de l'epiteli bucal es van recol·lectar utilitzant un bastonet higiènic, amb el que es va fer un raspap bucal resuspenent les cèl·lules en un tub eppendorf contenint PBS sense calci ni magnesi (Thermo scientific). La purificació d'ADN es va realitzar amb dos mètodes diferents: el mètode manual utilitzant el sistema de columnes QIAamp DNA Blood Mini Kit i el mètode automatitzat. En el cas de tenir cèl·lules de mucosa bucal com a font de material genètic, es va extreure l'ADN seguint el protocol manual. En cas d'obtenir una mostra de sang, l'extracció d'ADN es va fer generalment mitjançant un extractor d'ADN automàtic.

VI.1.1.1. Extracció d'ADN utilitzant el sistema de columnes QIAamp DNA Blood Mini Kit

El protocol que es descriu a continuació està dissenyat principalment per a l'extracció d'ADN genòmic a partir de sang total, tot i que en el nostre cas també es va utilitzar per a la purificació d'ADN de cèl·lules de la mucosa bucal. Per aquest procediment es va fer servir el kit comercial QIAamp® DNA blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya) seguint el següent protocol:

1. Transferir 200µL de la suspensió de cèl·lules de mucosa bucal a un tub eppendorf.
2. Afegir 20µL de proteïnasa K als 200µL previament dispensats.
3. Afegir 200µL del Buffer de lisi (AL). Agitar amb el vòrtex durant 15 segons.
4. Incubar a 56°C durant 10 minuts.
5. Fer un pols de centrifuga per a recuperar lo que hagi condensat en la tapa.
6. Afegir 200µL d'alcohol absolut (VWR International Eurolab). Agitar amb el vòrtex.
7. Aplicar cuidadosament tota la barreja preparada (aproximadament 600µL) sobre la columneta (QIAamp spin column) prèviament rotulada amb el corresponent número d'identificació.
8. Tapar la columneta i centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut.
9. Descartar el que queda al tub de recollida (collection tub) i col·locar la columneta en un tub nou.
10. Afegir 500µL de buffer de rentat (AW1). Tapar la columneta i centrifugar a 8000rpm durant 1 minut.
11. Descartar el que queda al tub de recollida (collection tub) i col·locar la columneta en un tub nou.
12. Afegir 500µL del segon buffer de rentat (AW2). Tapar la columneta i centrifugar a 13000rpm durant 3 minuts.
13. Descartar el que queda al tub de recollida (collection tub) i col·locar la columneta en un tub nou.
14. Centrifugar a 13000 rpm durant 1 minut.
15. Descartar el tub de recollida (collection tub) i col·locar la columneta en un tub eppendorf, prèviament rotulat amb la seva identificació.
16. Aplicar 100µL del buffer d'elució (AE) directament sobre la membrana de la columneta. Esperar 5 minuts i centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut.
17. Guardar l'ADN congelat a - 20°C

VI.1.1.2. Extracció d'ADN automatitzada

La disponibilitat al laboratori d'un equip automàtic per a la purificació d'àcids nucleics, l'extractor QIASymphony^{SP}(Qiagen), va permetre d'agilitzar les extraccions d'ADN genòmic a partir de sang total, especialment en el context del cribatge d'un nombre elevat de gestants per a identificar genotips de baixa freqüència.

Consisteix simplement en carregar les mostres de sang a l'extractor d'ADN, introduir les dades corresponents relacionades amb el tipus de tub del que es tracta

tant de partida (sang total) com d'elució (recollida de l'ADN genòmic purificat) i en marcar el protocol de treball programat.

El sistema robot comprèn 5 passos bàsics per a la purificació de l'ADN: la lisi cel·lular; la unió de les molècules d'ADN a unes partícules magnètiques o *beads*; la captura dels *beads* amb un imant que el sistema porta acoblat; una sèrie de rentats de la mostra per eliminar les impureses que puguin ser arrossegades en el procés i, finalment, el pas d'elució de l'ADN en 100µL de tampó d'elució (Figura 16). El kit que es va utilitzar es el QIAasymphony® DNA Mini kit (Qiagen, Alemanya).

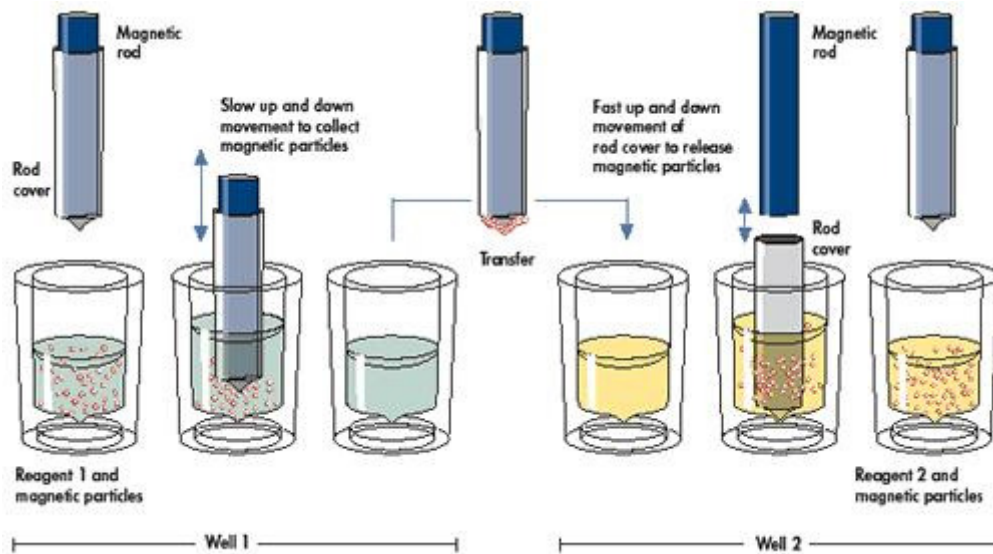


Figura 16: Il·lustració extreta de la pàgina web de Qiagen (<http://www.qiagen.com/products/qiasymphonydnakit.aspx#Tabs=t1>)

VI.1.1.3. Amplificació dels al·lels HPA-1 mitjançant PCR amb *primers* específics de seqüència (PCR-SSP)

El genotipatge del polimorfisme T¹⁹⁶C del gen ITGB3, que caracteritza el sistema bial·lèlic HPA-1, es va realitzar mitjançant una estratègia de PCR-SSP descrita per [Cavanagh, et al., 1997]. El fonament d'aquest mètode de genotipatge està explicat a l'apartat d'introducció (III.1.2.1).

Per a la tipificació HPA-1 d'un individu es preparen dues reaccions d'amplificació paral·leles, una específica per a la seqüència de l'al·lel HPA-1a i l'altre específica per la de l'al·lel HPA-1b diferenciades únicament entre elles pels *primers* al·lel específics corresponents. Cada microtub de PCR contindrà uns components comuns i la parella de *primers* al·lel específics corresponent. Les seqüències dels dos *primers* específics difereixen entre elles en l'extrem 3', que coincideix amb el polimorfisme

HPA-1a/1b i les dues comparteixen un *mismatch* intern consistent en la substitució d'una citosina per una guanina a la posició -4 des de l'extrem 3' de l'oligonucleòtid .

A la reacció de PCR també es van afegir un parell de *primers* específics per coamplificar un fragment de la seqüència del gen de la hormona del creixement com a control positiu intern de la reacció (Taula 7).

Locus	Nom	Seqüència dels primers	Longitud	Tm [°C]	Amplicó [pb]
ITGB3	HPA-1a	5'-TCACAGCGAGGTGAGGCCA-3'	19 MER	62	90
	HPA-1b	5'-TCACAGCGAGGTGAGGCCG-3'	19 MER	64	
	HPA-1c	5'-GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG-3'	21 MER	66	
HGH	HGH-1	5'-CAGTGCCTTCCAACCATTCCTTA-3'	25 MER	64.6	429
	HGH-2	5'-ATCCACTCACGATTCTGTTGTGTTTC-3'	28 MER	63.7	

Taula 7: Seqüències dels primers per a la PCR-SSP específica per a la tipificació HPA-1 d'un individu. Les sigles HGH corresponen als primers de la hormona del creixement. La base marcada en vermell correspon a la posició polimòrfica i la base marcada en blau correspon a un *mismatch* intencionat.

La reacció de PCR es va realitzar en un volum final de 10µL. Els reactius, les concentracions corresponents i els volums necessaris per un únic microtub de reacció (1X) es mostren en la Taula 8 següent:

Reactius	Mescla PCR HPA-1a específica	Mescla PCR HPA-1b específica
Components comuns	Volum per una reacció (µL)	Volum per una reacció (µL)
Buffer PCR 10X (Invitrogen)	1	1
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen)	0.3	0.3
dNTPs 2,5 mM (Promega)	0.3	0.3
Glicerol 99% (Sigma-Aldrich)	0.5	0.5
Cresol Red 10 mg/ml (Sigma-Aldrich)	0.1	0.1
HGH-1 8µM (Operon)	0.2	0.2
HGH-2 8µM (Operon)	0.2	0.2
Aigua destil·lada i autoclavada	5.82	5.92
ADN genòmic	1	1
Taq Platinum DNA polimerasa 5U/µL (Invitrogen)	0.08	0.08
Components específics		
Primer HPA-1A 40µM (Operon)	0.3	-
Primer HPA-1B 40µM (Operon)	-	0.2
Primer HPA-1C 40µM (Operon)	0.2	0.2
TOTAL	10	10

Taula 8: Reactius i concentracions per a la preparació de les dues reaccions de PCR al·lel específiques per al genotipatge del sistema HPA-1. Les sigles HGH corresponen als primers per amplificar el gen de la hormona de creixement. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

L'enzim Taq polimerasa (Taq Platinum) emprat per al genotipatge dels al·lels HPA-1a/1b és una Taq de les anomenades *Hot-start*, que roman inactiva a temperatura ambient per l'efecte d'un anticòs monoclonal i que s'activa a temperatura elevada a l'inici del programa de termociclat.

Les condicions de ciclat segueixen el següent programa de PCR:

Programa de PCR	
95°C 3min	
95°C 25seg	} 10 cicles
68°C 45seg	
72°C 30seg	
95°C 25seg	} 22 cicles
61°C 45seg	
72°C 30seg	
72°C 7min	

Atès que l'especificitat de la reacció d'amplificació és crítica per a la interpretació del resultat de genotipatge, és molt recomenable de processar en paral·lel mostres de genotip conegut, tant heterozigotes com homozigotes per a cadascun dels dos al·lels HPA-1.

VI.1.1.4. Separació electroforètica dels productes de PCR

Els productes d'amplificació de cada reacció es van separar per electroforesis en un gel d'agarosa al 2%(Ecogen). Per a preparar el gel d'agarosa es va dissoldre 2 grams d'agarosa en 100ml de buffer TAE 1X contenint 10µL de SYBER®safe concentrat 10.000X (Invitrogen), un agent que s'intercala en l'ADN i permet visualitzar-lo, sent menys genotòxic que el bromur d'etidi. En cada pouet del gel d'agarosa es carreguen els 10µL del producte de PCR i es deixar córrer l'electroforesi durant el temps suficient per a separar els diferents fragments. Conjuntament amb les mostres, es carrega un marcador de pes molecular d'ADN, *Ladder* 100pb (Invitrogen), com a referència per a confirmar el pes molecular dels fragments amplificats.

És important tenir en compte que el SYBER®safe és un producte sensible a la llum i que a l'hora de preparar el gel d'agarosa i realitzar l'electroforesi s'ha de protegir de la llum.

VI.2. MESURES NECESSÀRIES PER EVITAR CONTAMINACIONS PER AL DIAGNÒSTIC GENÈTIC PRENATAL I PREIMPLANTACIONAL

Tant per seguir protocols de diagnòstic genètic preimplantacional com de diagnòstic prenatal utilitzant , en aquest últim cas, ADN fetal lliure en plasma matern com a font de material genètic fetal, es imprescindible i necessari aplicar mètodes per evitar les possibles contaminacions amb ADN extern que es puguin arrossegar

durant el processament de la mostra (Tornhill and Snow 2002; Kwok and Higuchi 1989). A continuació s'anomenen les mesures que s'han pres en el laboratori:

- ❖ Separació física de diferents àrees de treball: àrea d'extracció d'ADN, àrea de pre-PCR i àrea de post-PCR, per tal d'evitar la contaminació de mostres amb productes prèviament amplificats. Cada zona disposa del seu equipament exclusiu (pipetes, puntes, reactius, gradetes, centrífugues i vòrtex).
- ❖ Manipulació de les mostres a processar sempre sota una campana de flux laminar (model CV-30/70, Telstar) que serà netejada abans i després de cada ús i quinzenalment tractada amb DNAzap™ (Applied Biosystems), una solució que elimina qualsevol traça d'ADN. A més, abans de treballar a la campana cal exposar la seva superfície amb llum ultraviolada (UV) durant un mínim de 10 minuts.
- ❖ Ús de puntes amb filtre i pipetes exclusives únicament per a cada tipus de mostra, siguin cèl·lules embrionàries o bé ADN extret de plasma.

VI.3. DIAGNÒSTIC PRENATAL NO INVASIU

Aprofitant la presència d'ADN fetal lliure circulant en el plasma de les gestants, s'han desenvolupat nombrosos mètodes per al genotipatge fetal no invasiu. En aquest apartat es descriu la metodologia desenvolupada en aquest treball de tesi per a la determinació prenatal del genotip HPA-1a fetal a partir del plasma matern.

VI.3.1. Obtenció de les mostres

VI.3.1.1. Mostres de gestants HPA-1a negatiu

En tots els casos es va obtenir el consentiment informat de les gestants per a la utilització de les mostres en el desenvolupament d'un nou protocol de diagnòstic prenatal no invasiu.

Les mostres de plasma es van obtenir a través de tres canals (Taula 9):

- ❖ Casos referits al laboratori d'Immunohematologia del Banc de Sang i Teixits per antecedents de trombopènia fetal al·loimmune greu. A través d'aquest canal es van obtenir 28 mostres corresponents a 14 gestants HPA-1b/1b.
- ❖ Gràcies a la col·laboració establerta amb el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, localitzat a Valladolid, que han proporcionat bona part de les mostres. A través d'aquesta via es van obtenir un total de 29 mostres provinents de 17 gestants HPA-1b/1b.

- ❖ Mitjançant un cribatge sistemàtic de mostres de gestants referides al laboratori d'Immunohematologia del Banc de Sang i Teixits per escrutini d'anticossos irregulars o determinació del grup sanguini. Durant aquesta cerca activa i continuada realitzada en el propi laboratori, es van tipificar 391 gestants pel sistema HPA-1, de les quals es van identificar 12 gestants HPA-1b/1b. Malauradament i per circumstàncies alienes com és la interrupció de l'embaràs es va poder obtenir únicament un total de 9 mostres de plasma corresponents a 3 gestants HPA-1a negatiu.

Gestants HPA-1b/1b	Setmana de gestació
1	26 (1ra mostra)
	34 (2ona mostra)
2	15 (1ra mostra)
	20 (2ona mostra)
	25 (3ra mostra)
3	26 (1ra mostra)
	30 (2ona mostra)
4	24
5	20 (1ra mostra)
	28 (2ona mostra)
6	24
7	17 (1ra mostra)
	35 (2ona mostra)
8	12 (1ra mostra)
	22 (2ona mostra)
	31 (3ra mostra)
9	15 (1ra mostra)
	25 (2ona mostra)
10	8 (1ra mostra)
	29 (2ona mostra)
	33 (3ra mostra)
11	22
12	18
13	26 (1ra mostra)
	31 (2ona mostra)
14	12
15	19
16	18 (1ra mostra)
	22 (2ona mostra)
	24 (3ra mostra)
	37 (4a mostra)
17	14 (1ra mostra)
	18 (2ona mostra)
18	14 (1ra mostra)
	21 (2ona mostra)
	29 (3ra mostra)
19	18 (1ra mostra)
	22 (2ona mostra)
20	27 (1ra mostra)
	34 (2ona mostra)
	38 (3ra mostra)
21	26 (1ra mostra)
	33 (2ona mostra)
22	19 (1ra mostra)
	26 (2ona mostra)
23	15
24	20 (1ra mostra)
	24 (2ona mostra)
25	33
26	28
27	25
28	26
29	26
30	28
31	18 (1ra mostra)
	22 (2ona mostra)
	27 (3ra mostra)
	32 (4a mostra)
32	18 (1ra mostra)
	26 (2ona mostra)
	35 (3ra mostra)
33	13 (1ra mostra)
	18 (2ona mostra)
	23 (3ra mostra)
34	16 (1ra mostra)
	27 (2ona mostra)

	Edat gestacional	
	≤20 setmanes	>20 setmanes
Nº de mostres	23	43
Nº de gestants	20	29

Taula 9: Taula que mostra el número de gestants amb les corresponents mostres obtingudes en diferents setmanes de gestació. En la segona taula s'agrupen el número de gestants i de mostres obtingudes anteriors i posteriors a la setmana 20 de la gestació, ja que a partir d'aquesta setmana s'inicia el tractament de la gestant amb Ig.

VI.3.1.2. Mostres control

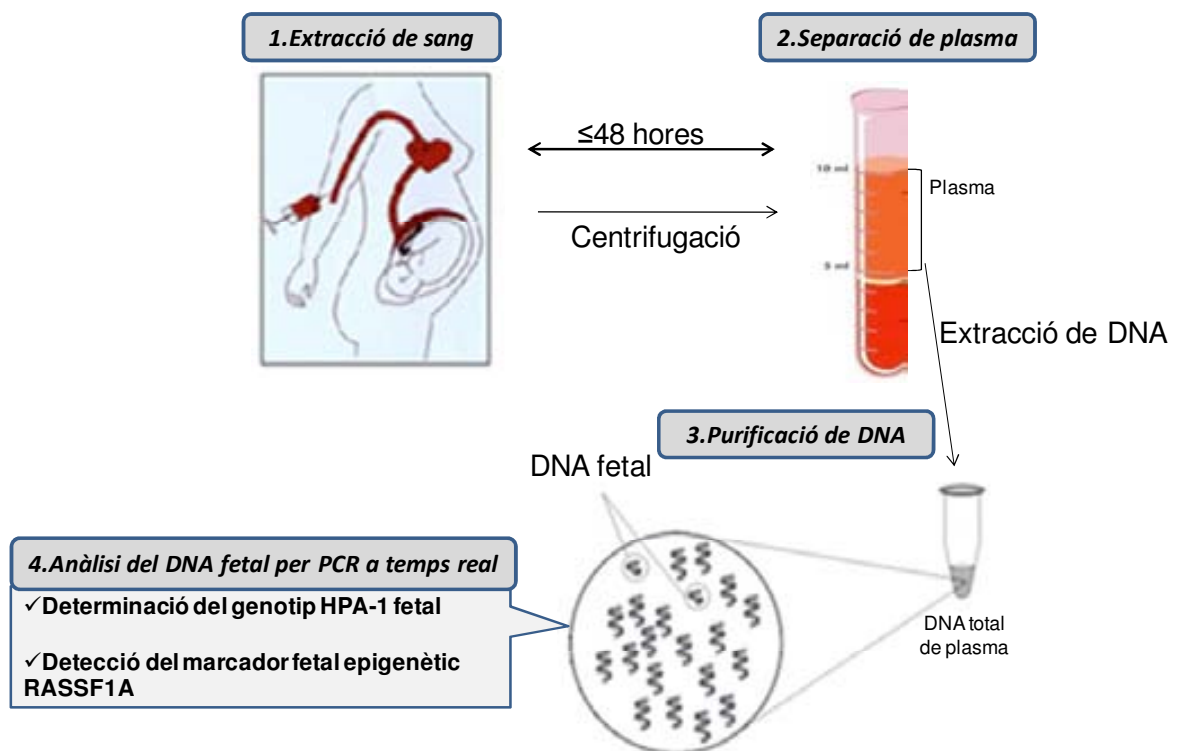
Per a cada determinació del genotip HPA-1a fetal hem inclòs un control positiu i un control negatiu.

Com a controls negatius es van utilitzar mostres de plasma de donants d'afèresi de plaquetes HPA-1a negatiu.

Paral·lelament i com a controls positius s'han utilitzat sempre que ha estat possible mostres de gestants HPA-1a negatiu portadores de fetus HPA-1a positiu prèviament caracteritzades.

VI.3.2. Processament de les mostres

L'esquema següent representa els diferents passos que abarca la determinació del genotip HPA-1a fetal a partir d'una mostra de sang perifèrica de la gestant:



VI.3.2.1. Separació del plasma

Un pas crític per tenir una bona sensibilitat per a la determinació del genotip fetal és el moment en què es dur a terme la separació del plasma. Generalment s'aconsella un termini de fins a 48h per a separar el plasma de la fracció cel·lular. En el cas que es retardés aquest pas, la concentració d'ADN extracel·lular d'origen

matern augmentaria considerablement degut a la lisi de cèl·lules maternes i contribuiria a diluir encara més la quantitat d'ADN fetal lliure en el plasma. A més a més, és estrictament imprescindible que es processi la mostra en una campana de flux laminar per evitar qualsevol contaminació que hi pugui haver d'ADN extern.

L'extracció de sang de les gestants HPA-1a negatiu es va realitzar utilitzant tubs Vacutainers amb EDTA com a anticoagulant (BD, Vacutainer Systems,UK) obtenint un volum de sang aproximat d'entre 10-20ml per a cada extracció.

La separació de plasma es va realitzar seguint el protocol que es descriu a continuació que inclou principalment dos passos de centrifugació; en el primer pas s'aplica una velocitat baixa de centrifugació i en el segon una alta velocitat de centrifugació per assegurar així l'eliminació de les cèl·lules nucleades maternes:

- 1) Centrifugar el tub de sang total durant 6 minuts a 3000 rpm (2.500 g) sense fre.
- 2) Trassvassar la fracció de plasma a un tub falcon estèril i homogenitzar bé el seu contingut. No apurar massa el plasma de la mostra (millor descartar una mica i no arrossegar leucòcits de la interfase).
- 3) Transferir a tubs eppendorf prèviament identificats alíquotes de 1300µL de plasma.
- 4) Centrifugar els tubs eppendorf a 13000 rpms (10.000 g) durant 10 minuts. Recuperar 1200µL i transferir-los a un nou tub rotulat amb el número d'identificació.
- 5) Guardar aquestes alíquotes congelades a -30°C fins al moment de procedir a l'extracció de l'ADN.

VI.3.2.2. Extracció d'ADN a partir de plasma

El pas d'extracció d'ADN a partir del plasma de gestants és també crític per intentar recuperar la màxima quantitat i qualitat d'ADN d'origen fetal possible. En aquest context, l'ús de l'extractor d'ADN automàtic QIASymphony ®(Qiagen) va representar una millora en quant a l'eficiència, rapidesa i reproducibilitat de l'extracció de l'ADN en plasma matern comparat amb el mètode manual tradicional.

Utilitzant aquest mecanisme automatitzat es van eluir 60µL d'ADN a partir d'1ml de plasma matern seguint les instruccions del fabricant (Qiagen). Per a l'extracció d'ADN es va utilitzar el kit comercial Virus/Bacteria Midi kit (Qiagen), a diferència del que s'utilitza en sang total i del que ja s'ha fet referència anteriorment.

VI.3.2.3. Genotipatge HPA-1a fetal a partir d'ADN de plasma matern

VI.3.2.3.1. PCR a temps real al·lel específica mitjançant l'assaig TaqMan

L'estratègia que es va desenvolupar i que finalment es va aplicar en l'estudi de validació per a la tipificació de l'al·lel HPA-1a fetal a partir de plasma matern combina la sensibilitat que ofereix la tècnica de PCR a temps real mitjançant l'assaig TaqMan i l'especificitat determinada per uns *primers* al·lel específics. Per a l'anàlisi del polimorfisme HPA-1a/1b en l'ADN de plasma, es va amplificar un fragment del gen ITGB3 utilitzant els mateixos *primers* al·lel específics descrits anteriorment i que s'empren comunament per a la tipificació del sistema HPA-1 a partir d'ADN genòmic [Cavanagh, et al., 1997]. El senyal de fluorescència que s'emet durant l'amplificació es detecta per l'hidròlisi d'una sonda TaqMan MGB dissenyada amb el software *Primer Express* versió 3.0 (Applied Biosystems) que hibrida amb una regió no polimòrfica del gen ITGB3 inclosa en el fragment amplificat (Figura 17). Les seqüències tant dels *primers* com de la sonda TaqMan MGB s'indiquen a la Taula 10. És important aliquidar en volums petits els reactius crítics com les sondes fluorogèniques o els *primers* al·lel específics per evitar processos de congelació i descongelació repetides vegades. Aquests processos poden afectar a la integritat de la sonda i, en conseqüència, a la detecció de la fluorescència que s'allibera en el pas d'elongació. Així mateix, també poden malmetre alguna de les bases que componen la seqüència dels *primers* i afavorir possibles amplifcacions inespecífiques.

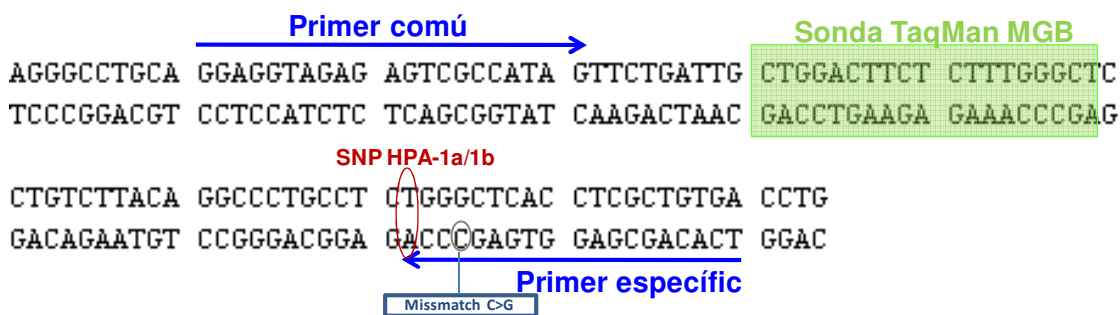


Figura 17: Representació gràfica de la seqüència corresponent a l'al·lel HPA-1a i la localització en ella de l'SNP, els primers i la sonda TaqMan MGB per a la determinació del genotip HPA-1 fetal.

Per a determinar el genotip HPA-1a fetal a partir de l'ADN de plasma, es realitzen en paral·lel dues reaccions d'amplificació, una per analitzar el polimorfisme HPA-1a i l'altra per analitzar el polimorfisme HPA-1b (que estarà present de forma segura tant en l'ADN d'origen matern com en l'ADN d'origen fetal). Per a tal fi, es preparen dues barreges de reacció que comparteixen tots els reactius i concentracions necessaris per a la PCR a temps real però que difereixen entre elles en el primer al·lel específic utilitzat (Taula 11). D'aquesta manera, s'analitza en paral·lel en una

mateixa mostra d'ADN de plasma tant la seqüència corresponent a l'al·lel HPA-1a com la corresponent a l'al·lel HPA-1b.

Locus	HPA	Especificitat	Seqüència	Longitud	Tm	primer /sonda	Producte amplificat (bp)
ITGB3	HPA-1	1a	5'-TCACAGCGAGGTGAGCCA-3'	19 MER	61°C	primer	90
		1b	5'-TCACAGCGAGGTGAGCCG-3'	19 MER	63°C	primer	
		Comú	5'-GGAGGTAGAGAGTCGCCATAG-3'	21 MER	61.8°C	primer	
		Comú	5'[6~FAM]CTGGACTTCTTTGGGCT (MGB)-3'	19 MER	70°C	sonda	

* MGB, de l'acrònim en anglès minor-groove binding

Taula 10: Seqüències dels primers al·lel específics i de la sonda TaqMan MGB per a la determinació del genotip HPA-1 fetal en plasma matern. La base marcada en vermell correspon a la posició polimòrfica i la base marcada en blau correspon a un mismatch intern deliberat per desestabilitzar la hibridació amb la seqüència de l'al·lel que no es complementària al primer.

La reacció d'amplificació es va fer en un volum final de 20µL amb la següent composició de cadascuna de les dues mesclades de reacció:

Reactius	Mescla PCR HPA-1a específica	Mescla PCR HPA-1b específica
Components comuns	Volum per una reacció (µL)	Volum per una reacció (µL)
TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)	10	10
Aigua destil·lada i autoclavada	0.6	0.6
Sonda HPA-1 MGB Comú 5µM (Applied Biosystems)	0.8	0.8
ADN de plasma (gestant)	8	8
Components específics		
Primer HPA-1A + 1C 30µM (Operon)	0.6	-
Primer HPA-1B + 1C 30µM (Operon)	-	0.6
TOTAL	20	20

Taula 11: Reactius i concentracions per a la preparació de les dues reaccions de PCR al·lel específiques per al genotipatge HPA-1a fetal a partir d'ADN de plasma matern. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

Les condicions de PCR van ser les següents:

Programa de PCR	
50°C 2min	} 45 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
64°C 1min	

VI.3.3. Anàlisi de marcadors d'ADN fetal

VI.3.3.1. Anàlisi del marcador epigenètic RASSF1A

Per a dur a terme l'anàlisi del marcador RASSF1A s'ha partit del protocol originalment descrit per Chan i col·laboradors [Chan, et al., 2006], que consisteix en un primer pas de digestió de l'ADN de plasma amb un enzim de restricció (*Bst*UI) sensible a metilació, seguit d'un segon pas d'amplificació d'aquest locus mitjançant PCR a temps real.

Com a control de l'assaig RASSF1A es processa en paral·lel i en les mateixes condicions que la mostra problema, un ADN extret de plasma d'una dona que no estigui embarassada, per tal de detectar, en cas que es produïssin, possibles falsos positius en l'amplificació del locus RASSF1A.

VI.3.3.1.1. Mostres de gestants utilitzades en l'avaluació

Es van recollir un total de 25 mostres de plasma de 24 gestants, en les que prèviament s'havia estudiat el genotip Rh(D) fetal o bé el genotip SRY (Taula 12).

Nº Gestant	Setmana de gestació
1	19
2	20
3	7
	15
4	16
5	19
6	24
7	24
8	23
9	16
10	NO DISPONIBLE
11	18
12	19
13	20
14	18
15	24
16	18
17	20
18	15
19	15
20	15
21	15
22	15
23	13
24	13

Taula 12: Mostres de plasma recollides a diferents setmanes de gestació d'un total de 24 gestants per realitzar l'assaig RASSF1A.

VI.3.3.1.2. Digestió enzimàtica de l'ADN de plasma amb l'endonucleasa *Bst*UI

L'ADN de plasma es tracta amb l'endonucleasa *Bst*UI (New England BioLabs, Ipswich, MA) que digereix específicament les seqüències CGCG d'ADN que no es troben metil·lades (ADN d'origen matern), mentre que les que es troben metil·lades (ADN d'origen fetal) queden protegides de l'activitat de l'enzim, tal i com es mostra en el diagrama de la Figura 18.

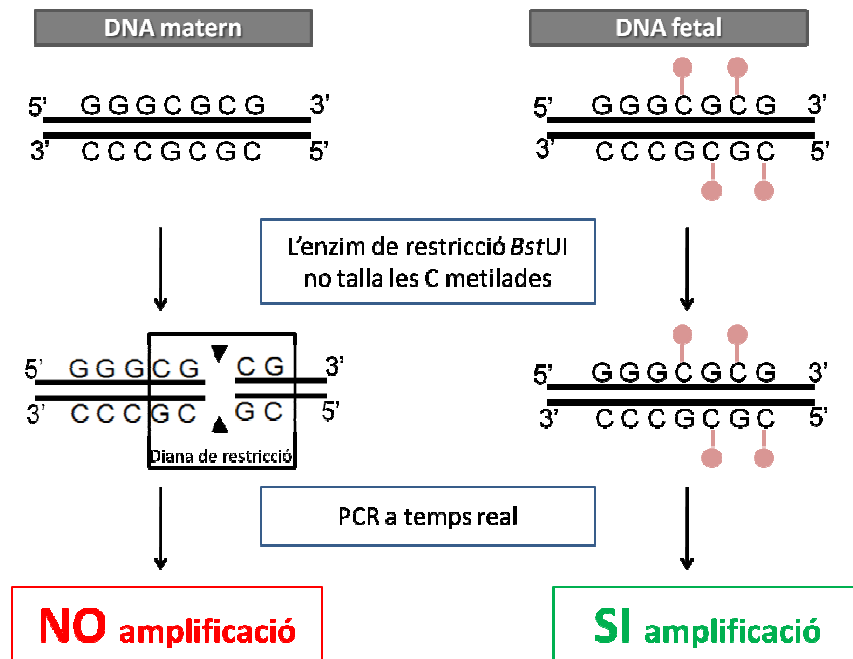


Figura 18: Il·lustració que representa la característica de l'enzim de restricció *Bst*UI de tallar específicament pel seu lloc de reconeixement (CGCG) quan les citosines no tenen un grup metil incorporat, representat amb un cercle rosa, impedit posteriorment l'amplificació d'un fragment que abarqui un punt de tall.

El protocol per a dur a terme la digestió utilitzant l'enzim de restricció *Bst*U I és el següent:

- ❖ Transferir 35µL d'ADN de plasma en un tub eppendorf prèviament identificat.
- ❖ Afegir 5µL del tampó específic per a aquest enzim de restricció (NEBuffer 4, New England BioLabs, Ipswich, MA).
- ❖ Afegir 5µL d'aigua autoclavada en el mateix tub eppendorf.
- ❖ Per últim afegir 5µL de l'enzim *Bst*UI 1000U/ml
- ❖ Agitar amb el vòrtex suaument
- ❖ Incubar a 60°C durant 16h.
- ❖ Fer un pols de centrífuga per a recuperar lo que hagi condensat en la tapa.
- ❖ Congelar a -20°C l'ADN digerit.

VI.3.3.1.3. Amplificació per PCR a temps real dels gens RASSF1A i β -Actina

A continuació de la digestió amb l'enzim *Bst*U I, es realitza una reacció de PCR a temps real per amplificar les seqüències d'ADN fetal resistents a l'actuació de l'enzim.

A la Figura 19 es representa la localització de les dianes de restricció de l'enzim *Bst*UI en la seqüència promotora i en l'exó 1 del gen RASSF1A. Existeixen quatre punts de tall en la seqüència compresa entre els *primers* emprats per a l'amplificació d'aquest fragment del gen. D'aquesta manera, les seqüències d'origen matern seran inaccessibles per a la seva amplificació després de la digestió enzimàtica.

No.	Exon / Intron	Start	End	Start	End	Length	Sequence
		Phase	Phase				
	5' upstream sequence					acaoggggatcttc cgcg tgg tgctttgoggttcgcccgtcgtttgtggccgtccggggtggggtgtgagagaggggacgaaggga gggaaggaagggaaggcgggggggggtctgagagag cgcg cccagcccggccttogggc cccacagtcctctgaccccaggtttccattg cgcg gctctcctcagctccttccgcgcgc
1	ENSE00001889507	50,377,987	50,378,343	-	1	357	CAGTCTGGATCCTGGGGAGGCGCTGAAGTCGGGGCCCGCCCTGTGGCCCGCCCGGCC GCCTTGTAGCGCCCAAGCCAGCGAAGCACGGGCCCAACCGGCCATGTGGGGGGG CTGAGCTCATTGAGCTGCGGGAGCTGGCACCCGCTGGG CGCG CTGGGAAGGGCCGACCC GGCTGGAGCGTGCCAA CGCG CTGCGCAT CGCG CGGGGCAC CGCG TGCAACCCACACCGGC AGCTGGTCCCTGGCCGTGGCCACCGCTTCCAGCC CGCG GGGCCCGCCACGCACAGTGGI GCGACCTCTGTGGCGACTTCATCTGGGGCGTCTGCGCAAGGCCCTGCAGTG CGCG C

Figura 19: Representació gràfica, extreta de la pàgina web <http://www.ensembl.org/index.html>, de la seqüència promotora i de l'exó 1 del gen RASSF1A marcant en color groc les dianes de restricció de l'enzim *Bst*UI. Els *primers* estan representats amb fletxes negres.

Per a evidenciar l'efectivitat de l'activitat enzimàtica, s'analitza en paral·lel el gen de la β -actina, un gen constitutiu que tant en l'ADN provinent de la mare com en el del fetus no es troba metil·lat. En el cas que la digestió enzimàtica sigui completa, únicament les seqüències hipermetilades del gen RASSF1A del fetus podran ser amplificades (Figura 20).

Si la digestió enzimàtica és incompleta, pot arribar a produir-se amplificació tant del gen RASSF1A com del gen de la β -actina a partir de seqüències no digerides d'origen matern o fetal. En aquest cas, les seqüències amplificades del gen RASSF1A no seran necessàriament específiques del fetus, sinó que poden correspondre tant a la mare com al fetus. L'amplificació del gen de la β -actina és doncs, un control intern molt útil per a posar en evidència una digestió incompleta amb l'enzim de restricció, donant com a resultat la detecció de productes amplificats en aquest locus i evitant així una malinterpretació de possibles falsos positius en el locus RASSF1A.

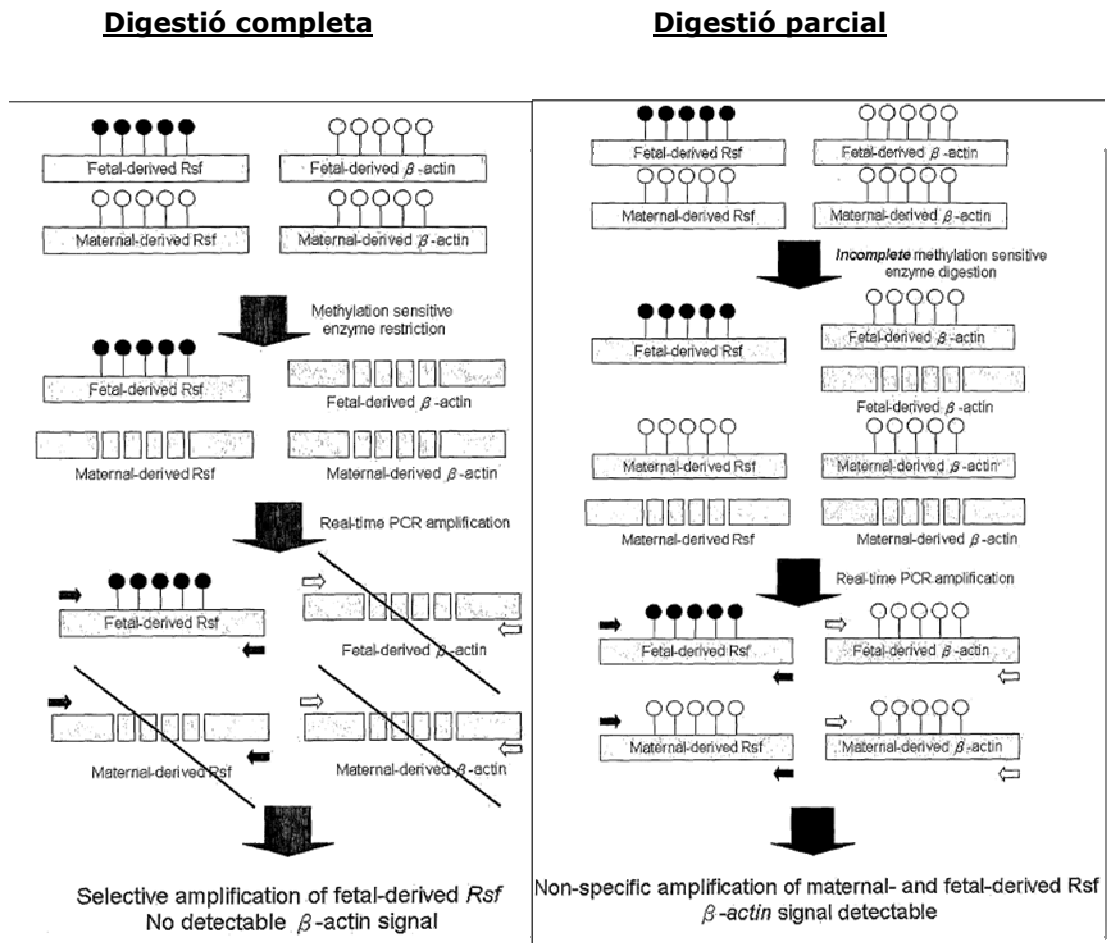


Figura 20: Figura extreta de la patent WO 2007/132166 A2 que representa gràficament una digestió completa i incompleta de l'ADN extret de plasma mitjançant l'endonucleasa *Bst*UI:

Les seqüències dels primers i de les sondes TaqMan MGB per dur a terme l'amplificació per PCR a temps real del fragment de l'exó 1 del gen RASSF1A i d'un segment del gen de la β -actina es mostren en la Taula 13.

Locus	Nom	Seqüència	primer /sonda	Longitud	Tm[°C]	Amplificó (pb)
RASSF1A	RASSF1A-F	5'-AGCCTGAGCTCATTGAGCTG-3'	primer	20MER	57	130
	RASSF1A-R	5'-ACCAGCTGCCGTGTGG- 3'	primer	16MER	55,9	
	RASSF1A-MGB	5'[VIC]CCAACGCGCTGCGCAT (MGB)-3' [*]	sonda	16MER	74	
β -actina	β -ACTIN-F	5'-GCGCCGTTCCGAAAGTT-3'	primer	17MER	58,4	137
	β -ACTIN-R	5'-CGGCGGATCGGCAAA-3'	primer	15MER	59,8	
	β -ACTIN-MGB	5'[6~FAM]ACCGCCGAGACCGCTC(MGB)-3' [*]	sonda	17MER	75	

^{*} MGB, de l'acrònim en anglès minor-groove binding

Taula 13: Seqüències dels primers i les sondes TaqMan MGB per a l'amplificació per PCR a temps real del gen RASSF1A i β -actina.

Es van preparar tres barreges de reacció de PCR per a cada mostra a analitzar: una per amplificar un fragment del gen RASSF1A afegint l'ADN de plasma digerit amb l'enzim *Bst*UI com a ADN motlle; una per amplificar un fragment del gen de la β -

actina afegint també l'ADN de plasma digerit com a ADN motlle i, per últim, es va preparar una barreja de PCR per a la coamplificació del gen RASSF1A i el gen de la β -actina utilitzant l'ADN de plasma sense digerir. Els components de reacció per a les tres PCR produïdes en paral·lel a un volum final de 20 μ L s'especifiquen en la Taula 14.

Reactius	Mescla PCR RASFF1A	Mescla PCR β -actina	Mescla PCR multiplex
Components comuns			
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	10	10	10
Aigua destil·lada i autoclavada	2,31	2,31	3,50
Components específics			
Primers RASSF1A-F+R 30 μ M (Operon)	0,20	-	0,20
Sonda RASSF1A-MGB 5 μ M (Applied Biosystems)	0,34	-	0,50
Primers ACTIN-F+R 30 μ M (Operon)	-	0,20	0,30
Sonda ACTIN-MGB 5 μ M (Applied Biosystems)	-	0,34	0,50
ADN digerit	7,15	7,15	-
ADN no digerit	-	-	5

Taula 14: Reactius i concentracions per a la preparació de les tres reaccions de PCR a temps real per a l'anàlisi del marcador RASSF1A i el gen de la β -actina a partir d'ADN de plasma matern. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

Cadascuna de les reaccions d'amplificació es va realitzar en un volum final de 20 μ L. Les condicions de ciclat són les següents:

Programa de PCR	
50°C 2min	} 50 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
60°C 1min	

VI.3.3.2. Anàlisi del gen SRY com a marcador del cromosoma Y

Tot i que l'assaig del gen RASSF1A és útil sobretot per a evidenciar ADN fetal en gestants portadores d'un fetus femení, la detecció de seqüències del gen SRY, com a marcador de fetus masculins, segueix sent important per a la confirmació de presència d'ADN fetal en la mostra d'ADN de plasma. El fet de no haver de tractar l'ADN de plasma amb enzims de restricció, com en el cas del marcador epigenètic fetal RASSF1A, sinó de tractar-se d'una amplificació directa de la seqüència del cromosoma Y, comporta una avantatge en el seu ús.

VI.3.3.2.1. Amplificació del gen SRY per PCR a temps real

Per a la detecció del gen SRY, es realitza l'amplificació d'un fragment d'aquest gen mitjançant PCR a temps real utilitzant la tecnologia TaqMan. En la Taula 15 s'especifiquen les seqüències tant de la sonda TaqMan MGB com dels primers.

Locus	Nom	Seqüència	primer /sonda	Longitud	Tm [°C]	Amplificó (pb)
SRY	SRY-F	5'-GAGCAGTCAGGGAGGCAGAT-3'	primer	20MER	58	63
	SRY-R	5'-GCAAAACATGGTAATTCAGTAACGTT- 3'	primer	26MER	58.6	
	SRY-MGB	5'[VIC]AGCAGGGCAAGTAGT(MGB)-3'*	sonda	15MER	69	

* MGB, de l'acrònim en anglès minor-groove binding

Taula 15: Seqüències dels primers i la sonda TaqMan MGB, marcada amb VIC, per a l'amplificació per PCR a temps real del gen SRY.

La reacció de PCR es va fer en un volum final de 20µL, amb la següent composició de la mescla de reacció (Taula 16):

Reactius	Volum per una reacció (µL)
TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)	10
Primers SRY 30µM (Operon)	0.2
Sonda SRY-MGB 5µM (Applied Biosystems)	0.8
ADN de plasma (gestant)	9
TOTAL	20

Taula 16: Reactius i concentracions per a la preparació de la reacció de PCR a temps real per a l'anàlisi del marcador SRY (fetus masculins) a partir d'ADN de plasma matern. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

Les condicions de PCR van ser les següents:

Programa de PCR	
50°C 2min	} 45 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
60°C 1min	

VI.3.3.2.2. Amplificació Multiplex del gen SRY i l'al·lel HPA-1b per PCR a temps real

Els primers i les sondes TaqMan MGB utilitzades per a la coamplificació dels dos locus es mostren a la Taula 14 i Taula 10. La reacció de PCR multiplex es va fer en un volum final de 20µL variant la concentració dels primers, amb la següent composició de la mescla de reacció (Taula 17):

Reactius	Volum per una reacció (µL)
TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)	10
Primers SRY 30µM (Operon)	0.2
Primers HPA-1B + 1C 30µM (Operon)	0,2
Sonda SRY-MGB 5µM (Applied Biosystems)	0.8
Sonda HPA-1 MGB 5µM (Applied Biosystems)	0.8
ADN de plasma (gestant)	8
TOTAL	20

Taula 17: Reactius i concentracions per a la preparació de la reacció de PCR a temps real per a la coamplificació del marcador SRY (fetus masculins) i l'al·lel HPA-1b a partir d'ADN de plasma matern. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

Les condicions de PCR van ser les següents:

Programa de PCR	
50°C 2min	} 45 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
64°C 1min	

VI.3.4. Quantificació de l'ADN total lliure en plasma matern

Per a quantificar la quantitat d'ADN total (d'origen matern + fetal) present en una mostra d'ADN extret del plasma d'una gestant, s'amplifica un gen diana constitutiu (en el nostre cas, el gen CCR5, *chemokine (C-C motif) receptor 5*) mitjançant una PCR a temps real quantitativa. Per a fer aquesta determinació, cal construir una corba patró a partir de dilucions seriades d'un ADN de concentració coneguda. Paral·lelament a l'amplificació dels estàndards, s'amplifica el locus CCR5 de les mostres a quantificar. A partir de la corba patró, s'extrapola la quantificació d'ADN de les mostres problema utilitzant el mateix software SDS d'Applied Biosystems.

VI.3.4.1. Preparació de la dilució seriada de l'estàndard

Per a construir la corba patró s'analitzen un mínim de quatre dilucions diferents de l'estàndard. Aquestes dilucions es preparen aplicant un factor de dilució 1:10 a partir d'una solució d'ADN de concentració 204 ng/µL comercial (Human Genomic DNA:Male referència G1471, Promega)(Figura 21).

Les dilucions seriades es preparen en una campana de flux laminar utilitzant una punta de pipeta nova cada vegada, per obtenir així la màxima precisió possible en l'experiment de quantificació. El protocol consisteix a:

- ❖ Preparar i rotular quatre tubs eppendorfs i afegir en cada un d'ells 900µL d'aigua autoclavada.

- ❖ Agitar la solució mare (204 ng/μL) en un vòrtex per homogenitzar bé l'ADN i fer, a continuació, un pols de centrifuga.
- ❖ S'afegeixen 100μL de l'ADN de la solució mare a un tub eppendorf prèviament identificat (estàndard 1) que conté 900μL d'aigua autoclavada. Agitar el tub de dilució en un vòrtex i, tot seguit, fer un pols de centrifuga.
- ❖ S'afegeixen 100μL de la dilució anterior (estàndard 1) en un tub eppendorf nou que conté també 900μL d'aigua autoclavada. Agitar el tub eppendorf de la nova dilució (estàndard 2) i fer, a continuació, un pols de centrifuga.
- ❖ S'afegeixen 100μL de la dilució 2 al tub rotulat com a estàndard 3 i que conté 900μL d'aigua autoclavada. Agitar el tub eppendorf de la nova dilució i fer, a continuació, un pols de centrifuga.
- ❖ S'afegeixen 100μL de la dilució anterior (estàndard 3) en un tub eppendorf nou que conté també 900μL d'aigua autoclavada. Agitar el tub eppendorf de la nova dilució i fer, a continuació, un pols de centrifuga.

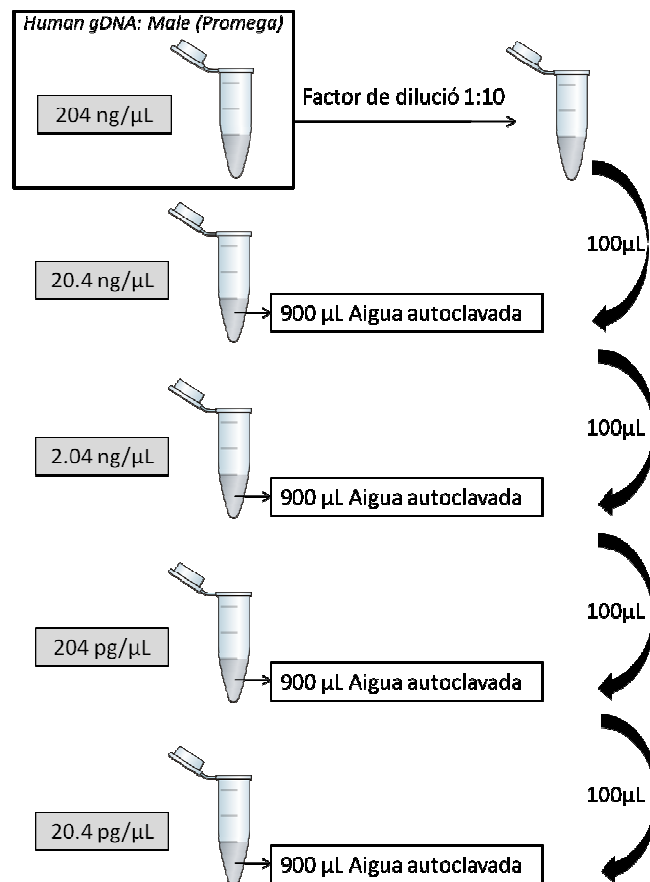


Figura 21: Representació de la dilució seriada de l'ADN comercial Human gDNA:Male Ref:G1471 (Promega) per a l'obtenció dels estàndards.

VI.3.4.2. Amplificació del gen CCR5 per PCR a temps real

La concentració d'ADN lliure total en plasma matern es va mesurar mitjançant l'amplificació per PCR a temps real del gen CCR5. Es van emprar una parella de *primers* i una sonda TaqMan MGB descrites originalment per Finning i col·laboradors [Finning, et al., 2007]; les seqüències s'especifiquen a la Taula 18. Les mostres d'ADN de plasma de les gestants HPA-1a negatiu a quantificar i els estàndards per a construir la corba patró, es van analitzar per duplicat en cada *run* de PCR.

Locus	Nom	Seqüència	primer /sonda	Longitud	Tm [°C]	Amplicó (pb)
CCR5	CCR5-F	5'-TACCTGCTCAACCTGGCCAT-3'	primer	20MER	59,1	91
	CCR5-R	5'-TTCCAAAGTCCCACTGGGC-3'	primer	19MER	59,5	
	CCR5-MGB	5'-[6~FAM]TTTCCTTCTACTGTCCCTTCTGGGCTC-(MGB)-3'*	sonda	29MER	79	

* MGB, de l'acrònim en anglès minor-groove binding

Taula 18: Seqüències dels *primers* i la sonda TaqMan MGB, marcada amb 6-FAM, per a l'amplificació per PCR a temps real del gen CCR5.

La reacció d'amplificació es va fer en un volum final de 20µL. La barreja de reacció es va preparar afegint els següents components (Taula 19):

Reactius	Volum per una reacció (µL)
TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)	10
Primers CCR5 30µM (Operon)	0.2
Sonda CCR5-MGB 5µM (Applied Biosystems)	0.4
ADN de plasma/ADNg estàndards	5
Aigua destil·lada i autoclavada	4.4
TOTAL	20

Taula 19: Reactius i concentracions per a la preparació de la reacció de PCR a temps real per a l'amplificació del locus CCR5 per a la quantificació de l'ADN extret de plasma a partir d'una corba patró construïda amb els ADNs estàndards. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

Les condicions del programa de PCR van ser les següents:

Programa de PCR	
50°C 2min	} 45 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
60°C 1min	

VI.3.4.3. Construcció d'una corba patró

Un cop finalitzada la PCR, l'anàlisi de les dades obtingudes es va realitzar de forma automàtica amb el software SDS Collection. Aquest programa construeix, a partir de les quatre dilucions de l'estàndard analitzades, la corba patró (Figura 22) que relaciona linealment el Ct (llindar del cicle) vs $\log C_0$ (concentració estàndard inicial d'ADN) utilitzant les dades quantitatives registrades durant la reacció d'amplificació.

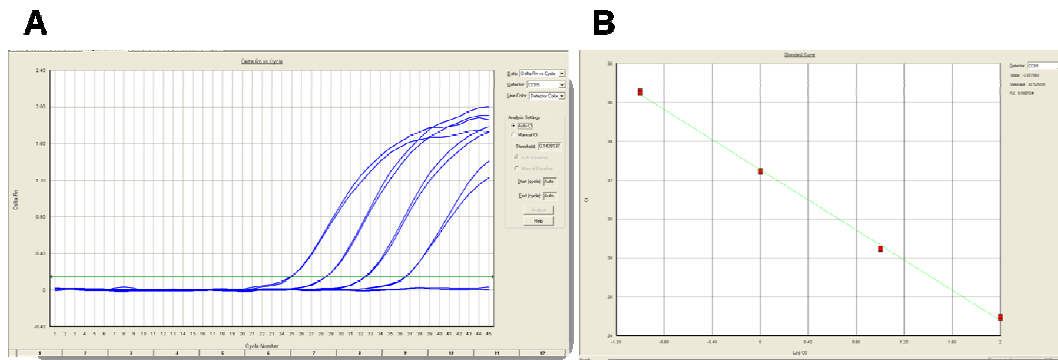
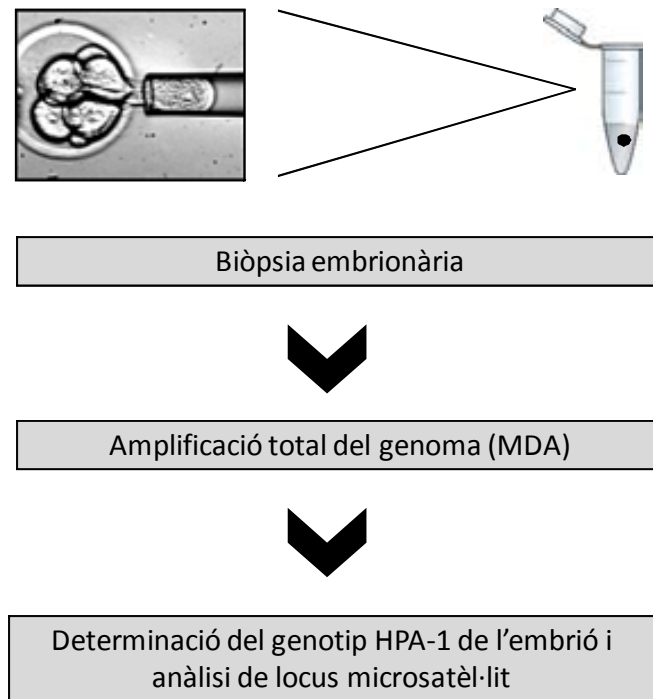


Figura 22: PCR a temps real quantitativa. A, plots d'amplificació del gen CCR5 corresponents a cadascuna de les dilucions de l'estàndard per PCR a temps real quantitativa . Cada corba d'amplificació correspon a una concentració particular d'ADN motlle: 100ng, 10ng, 1ng i 0.1ng seguint aquest ordre de menor a major Ct. L'eix de les X denota el nombre de cicles de la reacció de PCR quantitativa i l'eix de les Y indica la intensitat de fluorescència per sobre del fons (ARn) [Heid et al. 1996]. B, corba estàndard construïda a partir dels plots d'amplificació representats en A on es representa el Ct vs $\log C_0$. El coeficient de correlació és de 0.99 i la pendent de la recta és de -3.87.

VI.4. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

El protocol desenvolupat per a la genotipificació del sistema plaquetar HPA-1 a partir d'una cèl·lula embrionària es realitza seguint el següent esquema:



VI.4.1. Mostres biològiques

En l'estudi de validació d'aquest protocol es van utilitzar blastòmers procedents d'embrions descartats i cedits per parelles que es van sotmetre a un programa de Reproducció Assistida al laboratori d'embriologia de la Fundació Puigvert, grup amb qui hem col·laborat pel desenvolupament d'aquest projecte. Previ a la cessió dels embrions, s'obtenia el consentiment informat i una mostra de sang fresca dels corresponents progenitors per al seu anàlisi. La utilització d'aquestes cèl·lules per al desenvolupament d'aquest protocol, així com el model de consentiment informat emprat van ser prèviament aprovats per part del Comitè d'Ètica de la Fundació Puigvert i dels Hospitals Vall d'Hebron.

VI.4.2. Anàlisi dels blastòmers

VI.4.2.1. Obtenció i aïllament de cèl·lules

La biòpsia embrionària es va dur a terme per una especialista en embriologia de la Fundació Puigvert en el tercer dia del desenvolupament embrionari, quan els

embrions tenen entre 5 -10 cèl·lules. Per dur a terme aquest pas es prepara una placa de petri que conté una gota d'àcid Tyrode (pH 2,5, Sigma) i vàries gotes de rentat. (PBS sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} amb 0.1%PVA autoclavat). En primer lloc, l'embrió es transfereix mitjançant un capil·lar comercial de 140 μm de diàmetre (Cook) a la gota d'àcid Tyrode, un reactiu que digereix la zona pel·lúcida molt ràpidament. A continuació, s'aspira de nou l'embrió amb el capil·lar i es traspassa en una de les gotes de rentat per diferenciar, sota una lupa binocular, les cèl·lules disgregades amb presència de nucli. Amb un capil·lar nou, s'aïlla una de les cèl·lules nucleades i es transfereix d'una gota de rentat a una altra per eliminar les traces d'àcid Tyrode que es puguin arrossegar. El PBS desestabilitza les unions intercel·lulars facilitant l'aïllament d'una única cèl·lula i, per altra banda, el PVA impedeix que els blastòmers s'enganxin a la superfície de la placa de Petri.

Cadascun dels blastòmers aïllats s'introdueix en un microtub de PCR (0.2mL) que conté 3 μL de Sample Buffer, un reactiu que forma part del kit comercial *illustra GenomiPhi V2* (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA) que es descriu més àmpliament en el següent apartat.

VI.4.2.2. Tècnica del Multiple Displacement Amplification (MDA)

L'amplificació de la totalitat del genoma a partir de l'ADN d'una única cèl·lula (6.6pg) es va realitzar mitjançant la tècnica de MDA, seguint el protocol descrit per Kumar i col·laboradors [Kumar, et al., 2008]. Per a l'amplificació s'utilitzen els components del kit d'amplificació d'ADN *illustra GenomiPhi V2* (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA), els quals s'especifiquen en la Taula 20.

Components	Contingut
Sample Buffer	Random hexamers
Reaction Buffer	Sals dNTP _s
Enzyme Mix	Phi29 DNA polimerasa Random hexamers

Taula 20: Components del kit d'amplificació d'ADN *illustra GenomiPhi V2* (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA).

Després d'obtenir el blastòmer aïllat en el microtub de PCR (aproximadament 2 μL) resuspès en 3 μL de *Sample Buffer* del kit del GenomiPhi, s'afegeix al microtub 1.5 μL de la solució de lisi i es porta a 30°C durant 10 minuts per facilitar la lisi alcalina i la desnaturalització de l'ADN. Després d'aquest temps s'afegeix 1.5 μL de la solució de neutralització (Taula 21) , 4 μL de *Sample Buffer* addicionals , 9 μL del *reaction buffer* i, per últim, 1 μL de la solució d'enzim.

A.

Solució de lisi	
Component	Concentració
KOH (Fluka Biochemika)	600mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	10mM
DTT (Fluka Biochemika)	100mM

B.

Solució de neutralització	
Component	Concentració
Tris-HCl pH 8.0 (Sigma-Aldrich)	4 volums 1M
HCl (Sigma-Aldrich)	1 volum 3M

Taula 21: A, Components i concentracions de la solució de lisi. B, Components i concentracions de la solució de neutralització.

Tant el microtub que conté el blastòmer com els reactius del kit s'han de mantenir durant tot el procés de manipulació en gel per evitar la renaturalització de l'ADN. Després d'aquest últim pas, la reacció isotèrmica té lloc incubant el microtub a 30°C durant 3 hores seguida d'un últim pas a 65°C durant 10 minuts per inactivar l'activitat exonucleasa de la Phi29 ADN polimerasa, evitant així la possible degradació del producte amplificat. L'activitat polimerasa remanent que hi pugui haver en el tub pot interferir en els anàlisis genètics subsegüents, de manera que és molt important finalitzar el procés inactivant l'enzim. El producte d'amplificació es conserva a -20°C (Figura 23).

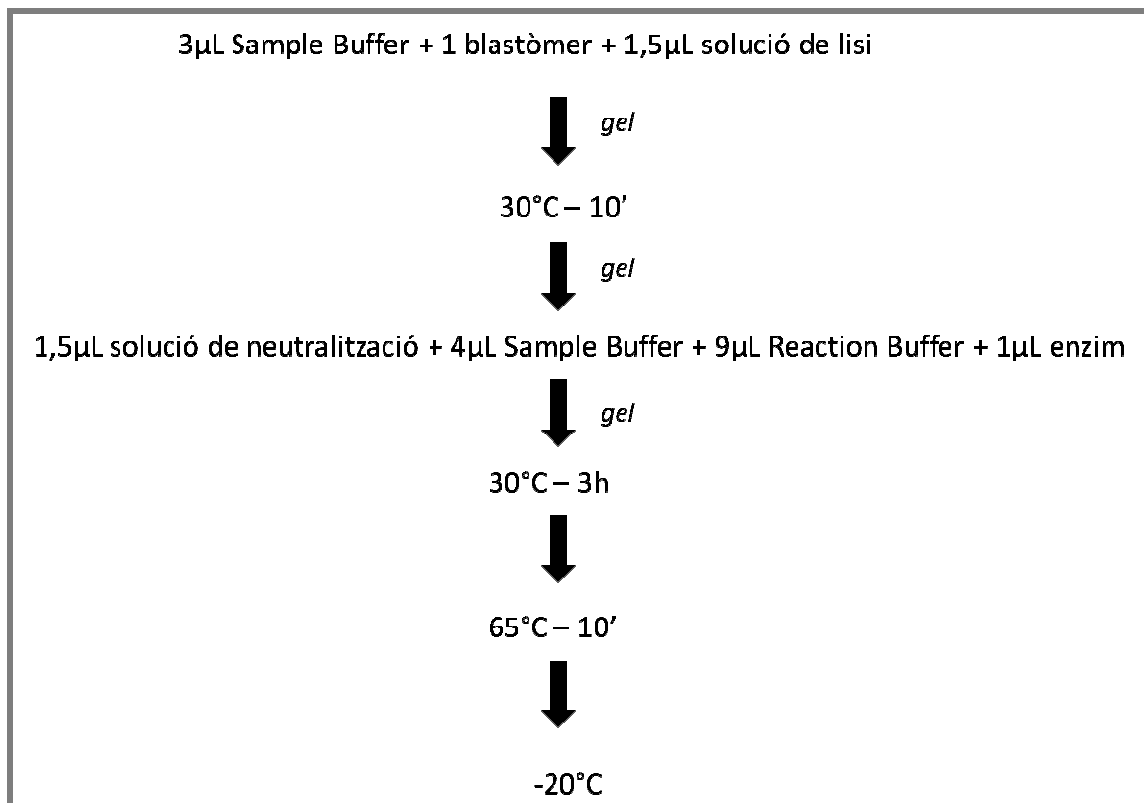


Figura 23: Esquema del protocol de MDA per a l'amplificació de l'ADN d'un únic blastòmer.

VI.4.2.3. Gel d'electroforesi

Per a comprovar que l'amplificació inespecífica de la totalitat del genoma d'un únic blastòmer hagi funcionat i per descartar possibles contaminacions, es realitza una electroforesi del producte amplificat en un gel d'agarosa (Ecogen) a una concentració del 2% en tampó TAE 1X (Qiagen). El gel es tenyeix amb SYBR® Safe (Invitrogen) i es visualitza el producte de MDA en un transil·luminador de llum blava.

VI.4.2.4. Detecció del polimorfisme HPA-1a/1b per PCR a temps real mitjançant sondes TaqMan MGB al·lel específiques

A partir del producte preamplificat obtingut mitjançant el mètode MDA, es va realitzar una segona amplificació específica del fragment que conté l'SNP HPA-1 mitjançant dues sondes TaqMan MGB al·lel específiques marcades amb dos fluorocroms diferents. La seqüència dels *primers* i de les sondes es detallen a la Taula 22.

Locus	HPA	Nom	Seqüència	Longitud	Tm [°C]	primer /sonda	Amplicó [pb]
ITGB3	HPA-1	HPA-1F	5'-TGCTGGACTTCTCTTTGGGCT-3'	21 MER	60°C	primer	88
		HPA-1R	5'-TATCCTTCAGCAGATTCTCCTTCA-3'	24 MER	58.2°C	primer	
		HPA-1a	5'[6~FAM]CCTGCCTCTGGGCT (MGB)-3'	14 MER	67°C	sonda	
		HPA-1b	5'[VIC]CCTGCCTC GGGCT (MGB)-3'	14 MER	69.°C	sonda	

Taula 22: Seqüències de les sondes i dels *primers* utilitzats en la rt-PCR.

La mescla de reacció es va preparar en una campana de flux laminar localitzada a l'àrea de pre-PCR. L'addició del producte preamplificat a la mescla de reacció es va realitzar en una segona campana, exclusivament per aquest ús, situada en una àrea de pre-PCR d'un altre laboratori.

La reacció d'amplificació es va efectuar en un volum final de 20µL. Els components de PCR utilitzats són els que formen el kit comercial TaqMan® PCR Core (Applied Biosystems). La composició de la mescla de reacció es detalla a la Taula 23.

Reactius	Volum per una reacció (µL)
Buffer A 1X (Applied Biosystems)	2
MgCl ₂ 25 mM (Applied Biosystems)	2.4
dNTPs 2mM (Applied Biosystems)	2
HPA-1F } HPA-1R } 30 µM (Applied Biosystems)	0.6
sonda HPA-1a MGB 5µM (Applied Biosystems)	0.8
sonda HPA-1b MGB 5µM (Applied Biosystems)	0.8
AmpliTaQ Gold®ADN polimerasa 100U (Applied Biosystems)	0.08
Aigua destil·lada i autoclavada	10.32
Producte preamplificat per MDA	1
TOTAL	20

Taula 23: Reactius i concentracions per a la preparació de la reacció de PCR a temps real per a la genotipificació HPA-1 del blastòmer biopsiat. Es fan constar les concentracions inicials dels diferents reactius emprats.

Les condicions de PCR van ser les següents :

Programa de PCR	
50°C 2min	} 45 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
60°C 1min	

VI.4.2.5. Anàlisi dels STRs

A partir del mateix producte de MDA, utilitzat també per al genotipatge HPA-1 de l'embrió, es van estudiar els diferents locus microsatèl·lit de la cèl·lula.

VI.4.2.5.1. Amplificació dels marcadors microsatèl·lits

El producte preamplificat obtingut mitjançant la tècnica de MDA s'utilitza com a ADN motlle per amplificar en una segona PCR uniplex tots els STRs que componen el panell de microsatèl·lits disponibles. Les seqüències dels *primers* emprats per aquestes reaccions es mostren en la Taula 24, en què el *primer forward* porta un fluorocrom conjugat en l'extrem 5' per a detectar l'amplímer generat per electroforesi capil·lar.

Nom	Seqüències primers forwards	Seqüències primers reverse	Producte amplificat(pb)
D17S1183	5'[5HEX]TTAGCTGTGACCATATTGTATTG-3'	5'-CAATTTAATATGTAGCTAGTGGCT-3'	123 - 165
D17S934	5'[5HEX]TCTGAATGGCCCTTGG-3'	5'-TCCTATCTGAGGTGGGGTAT-3'	170 - 190
intr66 [CT]	5'[6~FAM]AGCCATTGCTCCTAGTGGAG-3'	5'-AGAAGTTTCTCATGTATAAGC-3'	180 - 201
DS17S806	5'[5HEX]AGCTTTACTGCACTAGCCCC-3'	5'-GGAGATTGGGATTGGTGAC-3'	153 - 185
D17S1827	5'[6~FAM]GTGAGTGGAGATTGCACC-3'	5'-CACTGGGCTAAGGCTGT-3'	128 - 148
D17S1868	5'[5HEX]GCAAAATCCATCCAAGC-3'	5'-AGTCAAATTCAGCCTGGG-3'	190 - 202
D17S1795	5'[6~FAM]AGTGCCAGAGATATACCGTG-3'	5'-GTCTGCAAGGCAAGTTGTC-3'	167 - 177

Taula 24: Seqüències dels primers per a la amplificació dels locus STRs adjacents al gen ITGB3

Totes les reaccions de PCR es van realitzar en un volum final de 10µL. En la Figura 24 s'indiquen les condicions d'amplificació i el programa de ciclat optimitzat per a cadascun dels set STRs que formen el panell.

D17S1795/D17S806		
Reactius i concentracions finals		Programa de PCR
Buffer 1X	(Invitrogen)	94°C 5min 94°C 1min 59°C 1min 72°C 1min 72°C 20min } 30 cicles
MgCl ₂ 1mM	(Invitrogen)	
dNTPs 100µM	(Promega)	
Primers 0.5µM	(Izasa)	
Taq Platinum 0.4U	(Promega)	
Producte MDA 0,5µL		
Aigua autoclavada fins a un Vf de 10µL		
D17S1868		
Reactius i concentracions finals		Programa de PCR
Buffer 1X	(Invitrogen)	94°C 5min 94°C 1min 54°C 1min 72°C 1min 72°C 20min } 30 cicles
MgCl ₂ 1mM	(Invitrogen)	
dNTPs 100µM	(Promega)	
Primers 0.5µM	(Izasa)	
Taq Platinum 1U	(Promega)	
Producte MDA 0,5µL		
Aigua autoclavada fins a un Vf de 10µL		
D17S1827		
Reactius i concentracions finals		Programa de PCR
Buffer 1X	(Invitrogen)	94°C 5min 94°C 1min 60°C 1min 72°C 1min 72°C 20min } 30 cicles
MgCl ₂ 0.8mM	(Invitrogen)	
dNTPs 100µM	(Promega)	
Primers 0.5µM	(Izasa)	
Taq Platinum 1U	(Promega)	
Producte MDA 0,5µL		
Aigua autoclavada fins a un Vf de 10µL		

Dinucleòtid intró 6 / D17S1183 (CA47)	
Reactius i concentracions finals Buffer 1X (Invitrogen) MgCl ₂ 2mM (Invitrogen) dNTPs 100µM (Promega) Primers 0.5µM (Izasa) Taq Platinum 1U (Promega) Producte MDA 0,5µL Aigua autoclavada fins a un Vf de 10µL	Programa de PCR 94°C 5min 94°C 1min 55°C 1min } 30 cicles 72°C 1min 72°C 20min
Dinucleòtid D17S934	
Reactius i concentracions finals Buffer 1X (Invitrogen) MgCl ₂ 1.5mM (Invitrogen) dNTPs 0.1µM (Promega) Primers 0.5µM (Izasa) Taq Platinum 1U (Promega) Producte MDA 0,5µL Aigua autoclavada fins a un Vf de 10µL	Programa de PCR 94°C 5min 94°C 1min 56°C 1min } 30 cicles 72°C 1min 72°C 20min

Figura 24: Components i programa per a la PCR uniplex dels locus microsatèl·lit: D17S1795, D17S806, D17S1868, D17S1827, D17S1183, el dinucleòtid localitzat a l'intró del gen ITGB3 i el D17S934.

A diferència de l'anàlisi de marcadors microsatèl·lit en blastòmers, per la determinació del perfil al·lèlic dels marcadors STRs en els progenitors es va realitzar la PCR corresponent a cada STR variant únicament la concentració inicial d'ADN que s'afegeix a la reacció. En aquest cas s'afegeix 3ng d'ADN genòmic (extret a partir d'una mostra de sang fresca) a la reacció de PCR.

VI.4.2.5.2. Electroforesi capil·lar dels productes de PCR

El producte amplificat de cada locus microsatèl·lit s'analiza per electroforesi capil·lar en el seqüenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) per separar els diferents amplicons en funció de la seva longitud (pb). El marcador intern utilitzat per assignar els diferents tamanyes dels fragments amplificats va ser el ROX500 (Applied Biosystems). Per l'anàlisi de cada mostra es prepara la següent mescla: 20µL de formamida desionitzada (Hi-Di™ Applied Biosystems), un agent desnaturitzant d'ADN, 0.5µL de ROX500 (Applied Biosystems) i 0.5µL d'amplímer. La mescla es va incubar a 95°C durant 3 minuts per a la desnaturització de l'ADN i, tot seguit, es van carregar ràpidament en l'analitzador de fragments ABI PRISM 310. Les mostres s'han de protegir de la llum per a la fluorescència que contenen. La separació electroforètica dels diferents fragments es dur a terme en un capil·lar omplert de polímer POP-4™ (Applied Biosystems) a una temperatura de 60°C, a

15KV, i durant 24 minuts. Durant el transcurs de l'electroforesi, les molècules fluorescents unides a un dels *primers* són excitades per un làser d'argó provocant una emissió de llum captada per un detector, el qual permet visualitzar en un electroferograma els resultats en diferents colors (segons el fluorocrom).

Després de l'electroforesi, els resultats s'analitzen utilitzant el software GeneScan® v 3.1.2 (Applied Biosystems).

VII. RESULTATS

VII.1. DESENVOLUPAMENT D'UNA ESTRATÈGIA PER A LA DETERMINACIÓ DEL GENOTIP HPA-1A FETAL A PARTIR DEL PLASMA MATERN

VII.1.1.1. Consideracions tècniques importants per al disseny de l'estratègia

Existeixen una sèrie de consideracions tècniques que calia tenir en compte a l'hora de fer el disseny de l'estratègia:

- ❖ L'ADN lliure en plasma matern d'origen fetal representa únicament entre el 3-6% de l'ADN total extret del plasma.
- ❖ Existeix una gran variabilitat interindividual en la concentració de l'ADN lliure circulant en el plasma.
- ❖ La diferència genètica entre l'al·lel HPA-1a i HPA-1b és un únic SNP. A diferència d'altres determinacions de grups sanguinis en el fetus en què a la mare li manca el gen (RHD), la detecció del polimorfisme HPA-1a en el context d'un ADN majoritàriament HPA-1b1b és tècnicament més difícil. En aquests casos tant la mare com el fetus presenten l'al·lel HPA-1b que, per tant, està molt més representat que l'al·lel d'interès, l'al·lel HPA-1a.
- ❖ Resulta important incloure controls negatius corresponents a plasma d'individus HPA-1b1b (genotip molt poc freqüent a la població).

VII.1.1.2. Abordatge de diferents estratègies per a la determinació del genotip fetal mitjançant PCR a temps real

Atesa la dificultat de detectar l'SNP minoritari s'han avaluat diferents estratègies, entre les quals es troba la utilització de sondes TaqMan-MGB al·lel específiques com a primera aproximació i variants d'aquestes sondes que incorporen modificacions d'anàlegs de tipus LNAs. Com a últim abordatge es va intentar el bloqueig de l'amplificació de l'al·lel majoritari utilitzant PNAs anàlegs a la sonda oligonucleotídica. En tots els casos els resultats no van ser tan satisfactoris com es preveia en un inici.

VII.1.1.2.1. Estratègia de tipatge amb sonda TaqMan MGB al·lel específica

VII.1.1.2.1.1. Disseny

Atesa la dificultat de disposar de mostres de gestants portadores d'un fetus HPA-1a, donat que són mostres molt preuades i a l'hora escasses, es van utilitzar en l'avaluació de les diferents estratègies quimeres de plasma formades pel 5% de plasma d'un individu HPA-1a1b i el 95% de plasma d'un individu HPA-1b1b per simular un escenari lo més proper possible al que ens trobaríem si es tractés de l'ADN extret de plasma d'una gestant HPA-1a negatiu.

Es va avaluar un assaig TaqMan utilitzant la sonda HPA-1a específica en uniplex i la combinació de les dues sondes, la HPA-1a més la HPA-1b, per a la co-detecció dels dos al·lells utilitzant com a ADN motlle l'extret de la quimera de plasma.

Aquestes sondes TaqMan MGB al·lel específiques i els *primers* són els mateixos que les que es van emprar en el protocol del diagnòstic preimplantacional (Taula 22).

Les condicions de PCR van ser les estàndar en assajos TaqMan:

Programa de PCR	
50°C 2min	} 45 cicles
95°C 10min	
95°C 15seg	
60°C 1min	

VII.1.1.2.1.2. Resultats

Els resultats obtinguts en aquests assajos preliminars van evidenciar una especificitat molt limitada de la sonda HPA-1a que impedia la detecció de l'al·lel minoritari utilitzant aquesta estratègia (resultats no mostrats).

VII.1.1.2.2. Estratègia d'inclusió de LNAs en la sonda

VII.1.1.2.2.1. Disseny

Per tal d'avaluar una altra estratègia i a fi de millorar l'especificitat de l'assaig es va dissenyar un joc de sondes TaqMan al·lel específiques incorporant bases LNA (*Locked nucleic acids*) en la seva seqüència (

Nom	Seqüències de les sondes	Al·lel	Mida
LNA Mother	5'[HEX]CC[+]GCC[+]CCGGGCTCAC[BHQ1]	HPA-1b	17MER
LNA Fetal	5'[6FAM]CCCTGC[+]TC[+]GG[+]GCTCAC[BHQ1]	HPA-1a	18 MER

Taula 25). En la Figura 25 es mostra el disseny de l'estratègia.

Nom	Seqüències de les sondes	Al·lel	Mida
LNA Mother	5'[HEX]CC[+]GCC[+]CCGGGCTCAC[BHQ1]	HPA-1b	17MER
LNA Fetal	5'[6FAM]CCCTGC[+]TC[+]GG[+]GCTCAC[BHQ1]	HPA-1a	18 MER

Taula 25: Seqüències de les sondes TaqMan amb bases LNA incorporades marcades amb [+] utilitzades per a la discriminació al·lèlica del polimorfisme HPA-1a/1b. Les bases marcades en vermell corresponen al canvi nucleotídic característic del polimorfisme HPA-1a/1b.

Les sondes LNA es van testar inicialment utilitzant mostres químiques comentades en l'apartat anterior.

Per dur a terme les diferents proves de PCR a temps real amb aquestes sondes LNA es van utilitzar els mateixos primers que a la aproximació anterior i es van testar diferents temperatures d'*annealing* (60°C, 62°C, 65°C) en 45cicles.

Es van avaluar diferents mix disponibles en el mercat pel genotipatge de SNPs: el kit TaqMan® PCR Core (Applied Biosystems), la TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), i la TaqMan Environmental Master Mix (Applied Biosystems), però no es van obtenir resultats satisfactoris.

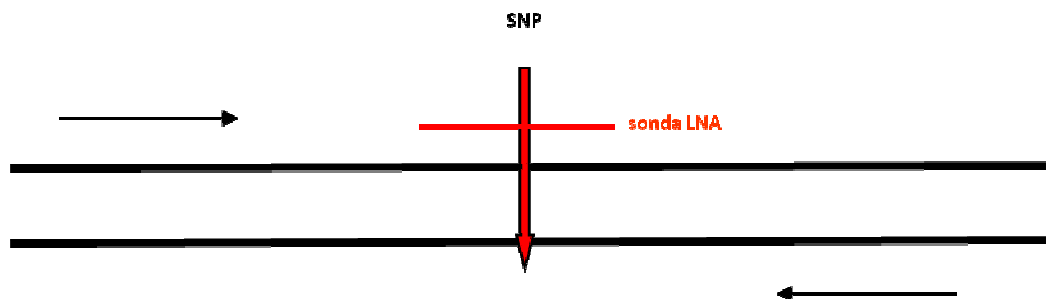


Figura 25: Representació esquemàtica de la base del funcionament de la PCR a temps real amb sondes LNA per a la discriminació al·lèlica d'un SNP.

VII.1.1.2.2.2. Resultats

Els resultats obtinguts no van ser satisfactoris i es van obtenir amplificacions inespecífiques (Figura 26).

En les diferents temperatures que es van testar no vam aconseguir eliminar del tot la unió inespecífica de la sonda HPA-1a.

Atesos als resultats insatisfactoris es va discontinuar aquesta estratègia i es van intentar estratègies alternatives.

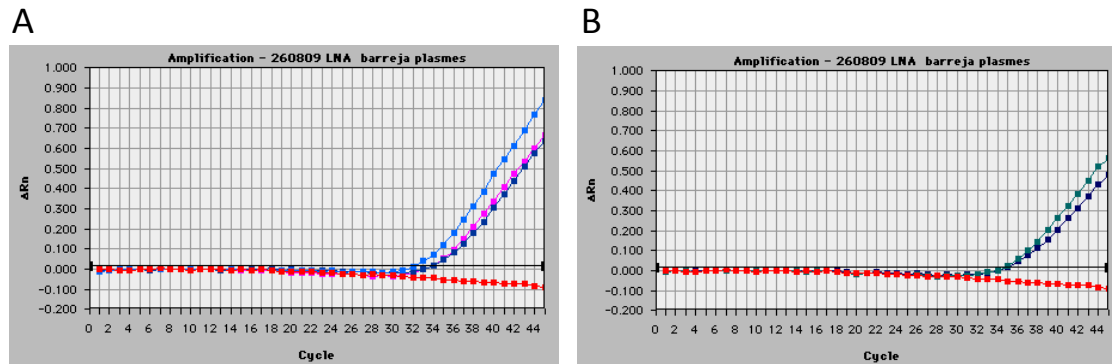


Figura 26: A, Amplificació per PCR a temps real utilitzant la sonda LNA fetal a partir de l'ADN extret d'una barreja química de plasma del 5% d'un individu heterozigot HPA-1a/1b i el 95% d'un individu homozigot HPA-1b/1b a una temperatura de 62°C. B, Amplificació per PCR a temps real utilitzant la sonda LNA fetal a partir de l'ADN extret de plasma d'un individu homozigot HPA-1b/1b.

VII.1.1.2.3. Estratègia bloqueig de l'amplificació amb PNAs

VII.1.1.2.3.1. Disseny

Un dels mètodes que permet l'anàlisi directe d'un SNP per PCR és basa en l'ús de PNAs (*peptide nucleic acids*). Els PNAs reconeixen i s'uneixen a la seva seqüència complementària amb major especificitat i estabilitat tèrmica que la corresponent seqüència d'ADN. Aquestes molècules no poden funcionar com a *primers* per a la Taq polimerasa, de tal manera que s'han dissenyat per unir-se al lloc d'unió del polimorfisme per permetre l'amplificació/supressió selectiva de seqüències diana que difereixen en un únic SNP. Es van dissenyar dos PNAs (PNA-S, *sense* i PNA-AS, *antisense*) complementaris a la seqüència de l'al·lel HPA-1b per dur a terme una amplificació selectiva de l'al·lel HPA-1a emprant els mateixos *primers* que al diagnòstic genètic preimplantacional (Taula 22) amb combinació de la sonda LNA fetal

(

Nom	Seqüències de les sondes	Al·lel	Mida
LNA Mother	5'[HEX]CC[+T]GCC[+T]CCGGGCTCAC[BHQ1]	HPA-1b	17MER
LNA Fetal	5'[6FAM]CCCTGC[+C]TC[+T]GG[+G]CTCAC[BHQ1]	HPA-1a	18 MER

Taula 25). A la Figura 27 es mostra el disseny de l'estratègia i en la Taula 26 les seqüències corresponents al PNA-S i -AS.

Nom	Seqüències de PNA en sentit N-terminal →C terminal	Mida
PNA-S	CCCTGCCTCCGGGCTC	16MER
PNA-AS	GTGAGCCCGGAGGCAGG	17 MER

Taula 26: Seqüències dels PNAs utilitzats per bloquejar l'amplificació de l'al·lel HPA-1b.

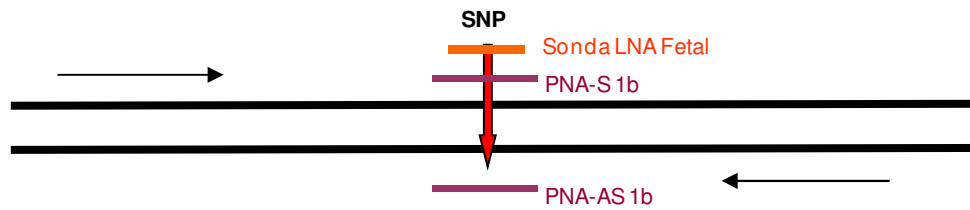


Figura 27: Competència de la sonda LNA Fetal amb el PNA per afavorir l'amplificació de l'al·lel HPA-1a bloquejant l'amplificació de l'al·lel HPA-1b mitjançant el PNA.

Es van avaluar diferents concentracions creixents de PNA (62 nM, 0.1 μ M, 0.15 μ M, 0.2 μ M, 0.35 μ M y 0.5 μ M), així com també diferents temperatures d'*annealing* (70°C, 75°C, 78°C y 80°C) per a la hibridació del PNA amb la seqüència complementària. A la Figura 28 es mostra un cicle de la PCR a temps real quan s'incorpora un PNA a la reacció, de tal manera que s'afegeix un pas més d'*annealing* perquè el PNA hibridi amb la seva seqüència complementària en un pas previ a la hibridació dels *primers* i de la sonda. Es va utilitzar l'ADN de plasma d'una dona homocigota HPA-1b1b per poder testar les condicions d'amplificació òptimes per a minimitzar l'amplificació inespecífica de l'al·lel HPA-1b.

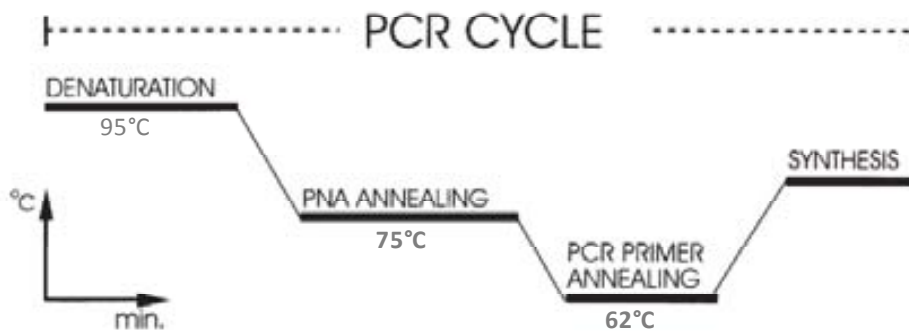


Figura 28: Esquema dels 4 passos del cicle de PCR que tenen lloc en l'estratègia de PCR clamping.

VII.1.1.2.3.2. Resultats

Els resultats no van ser satisfactoris, ja que es van evidenciar amplifcacions inespecífiques. Es va observar que a mesura que s'incrementa la concentració de PNA, l'amplificació d'ambdós al·lells es bloqueja i es perd especificitat en la reacció (Figura 29).

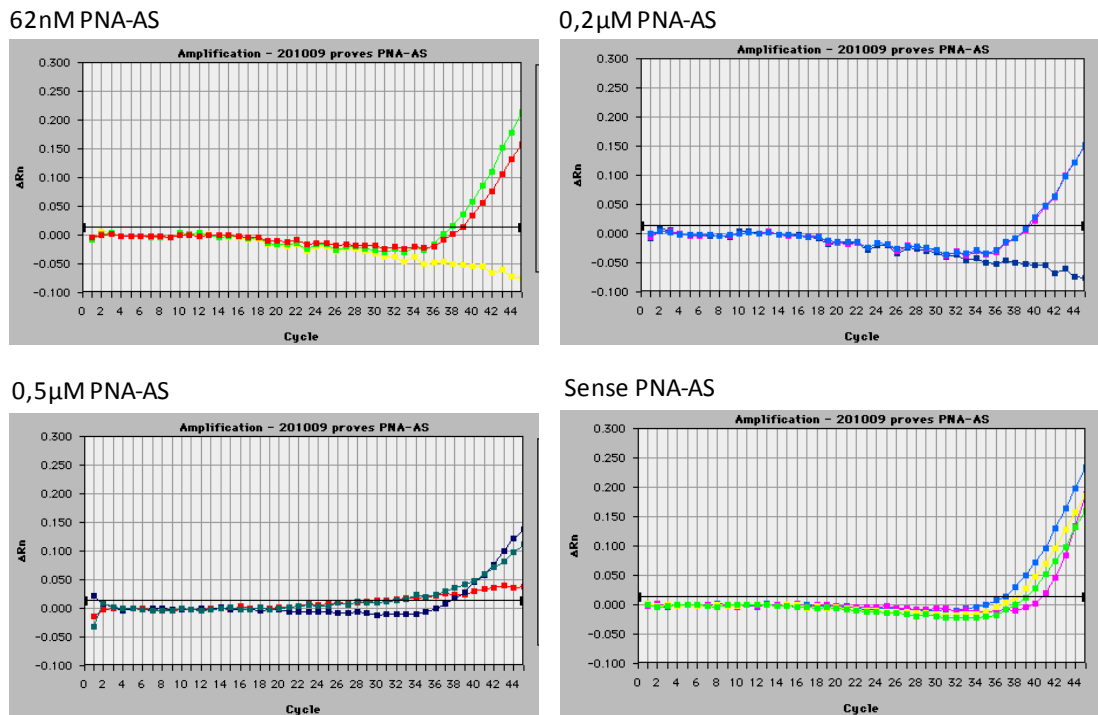


Figura 29: Plots corresponents a la PCR a temps real afegint la molècula PNA-AS a concentracions creixents (62nM, 0,2µM i 0,5µM) i sense PNA-AS a partir de l'ADN de plasma d'una dona HPA-1b1b. Es va aplicar una T⁰C d'annealing pels primers de 62°C i pel PNA de 75°C.

VII.1.1.2.4. Estratègia de digestió amb *HpaII*

Una de les estratègies que s'ha provat pel genotipatge HPA-1a fetal es basa en la digestió de l'ADN extret d'una barreja quimèrica de plasma (5% de plasma d'un individu HPA-1a/1b + 95% de plasma d'un individu HPA-1b/1b) mitjançant l'endonucleasa *HpaII*. Aquest enzim té com a diana de restricció ADN de doble cadena d'una seqüència no metilada CCGG (Figura 30), és a dir, coincident amb la seqüència corresponent a l'al·lel HPA-1b.

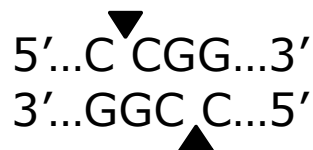


Figura 30: Esquema de la seqüència diana de l'endonucleasa *HpaII*.

Aquesta estratègia està dissenyada per a digerir les seqüències d'ADN corresponents a l'al·lel HPA-1b i afavorir així l'amplificació subsegüent de l'al·lel HPA-1a.

El protocol que es va seguir consisteix en la digestió, en un volum final de 50µL, de 35µL d'ADN extret de la quimera de plasmes, afegint en aquest tub eppendorf 5µL de NE Buffer 1, 5µL d'aigua destil·lada i 3µL d'enzim (30 unitats). Un cop afegits tots els components necessaris per dur a terme la digestió, s'escalfa el tub eppendorf en un bany maria a 37°C durant 5 hores. Després d'aquest temps,

s'afegeix en un segon pas 2µL més d'enzim *HpaII* i es deixa el tub durant tres hores més a 37°C. Per últim, i passades les 8 hores de digestió, s'escalfa el tub a 65°C durant 20 min per inactivar l'enzim *HpaII*.

A continuació es va realitzar una rt-PCR utilitzant com a ADN motlle el producte digerit per l'endonucleasa *HpaII* emprant els mateixos *primers* del diagnòstic genètic preimplantacional i afegint la sonda LNA Fetal i Mother per separat. La rt-PCR va constar de 45 cicles i es va dur a terme a una temperatura d'*annealing* de 62°C.

En la Figura 31 es mostra un esquema on s'indiquen les dianes de restricció de l'enzim *HpaII* i la localització dels *primers* respecte el polimorfisme.

```

aaagaccacaacaatttggttatgctccaatgtacggggtaaaactcttagctattggggaagtggtagggc
ctgcaggaggtagagagtgcccatagttctgatTgctggacttctctttgggctcctgttaccaggccc
tgctccgggctcacctcgctgtgacctgaaggagaatctgctgaaggataactgtgccccagaatccat
cgagtcccagtgagtgaggcccagtgactagaggacaggcccctcagcgacaagggctctggagacagc
tcccaggtcactcaagtcagtcccagaggattgcaactccggctccggccaggtagggctgggactcttt
gccatggggagagacctgaagcaggtgggcatagagcacaaggtggaggtctgaggaggaagtcttgggg
aagtagctcagaatggaaaTggggTgggaagacaaggaTgaggggggaggTgtgggcaagagaatggaag
aaaataagagacgttaggacttgagtcagaagatctgaggtgaatcttTactgtatcataatagctatt

```

- Primers HPA-1
- SNP T/C
- Dianes de restricció de l'endonucleasa *HpaII*

Figura 31: Seqüència genètica de l'al·lel HPA-1b, en la qual se senyala el polimorfisme, les seqüències diana de l'endonucleasa *HpaII* i els *primers* emprats per a l'amplificació per PCR a temps real.

Tot i ser una estratègia, a priori, molt prometedora, no es van obtenir resultats satisfactoris perquè es visualitzava ampliació de l'al·lel HPA-1b (resultats no mostrats).

VII.1.1.2.5. Estratègia *primers* específics i sonda genèrica

Aprofitant la nostra experiència en la genotipificació d'SNPs utilitzant *primers* al·lel específics mitjançant PCR-SSP, es va dissenyar una estratègia basada en l'amplificació per PCR a temps real de la seqüència del polimorfisme HPA-1a/1b utilitzant *primers* al·lel específics amb la combinació d'una sonda TaqMan-MGB genèrica (Taula 10 apartat VI.3.2.3.1). L'estratègia es va provar utilitzant una mostra d'ADN extret d'una quimera del 5% de plasma d'un individu heterozigot HPA-1a1b i un 95% de plasma d'un individu homozigot HPA-1b1b i es van obtenir resultats preliminars molt satisfactoris.

VII.1.1.3. Validació tècnica de l'estratègia de tipatge fetal

La validació tècnica es va realitzar mitjançant l'amplificació per PCR a temps real de la seqüència del polimorfisme HPA-1a/1b utilitzant *primers* al·lel específics en combinació amb una sonda comú a les seqüències d'ambdós al·lells. Es van provar diferents temperatures *d'annealing* (62°C, 64°C, 66°C, 67°C i 68°C) utilitzant ADN genòmic d'individus amb genotips HPA-1a1a, HPA-1a1b i HPA-1b1b i també ADN de plasma d'una barreja quimèrica del 5% d'ADN de plasma d'un individu heterozigot HPA-1a/1b amb el 95% d'ADN de plasma d'un individu HPA-1b1b. Per a la validació tècnica es van afegir controls corresponents a ADNs de plasma d'individus homozigots HPA-1b1b.

Els millors resultats es van obtenir amb una temperatura d'hibridació de 64°C i van ser resultats altament satisfactoris (Figura 32).

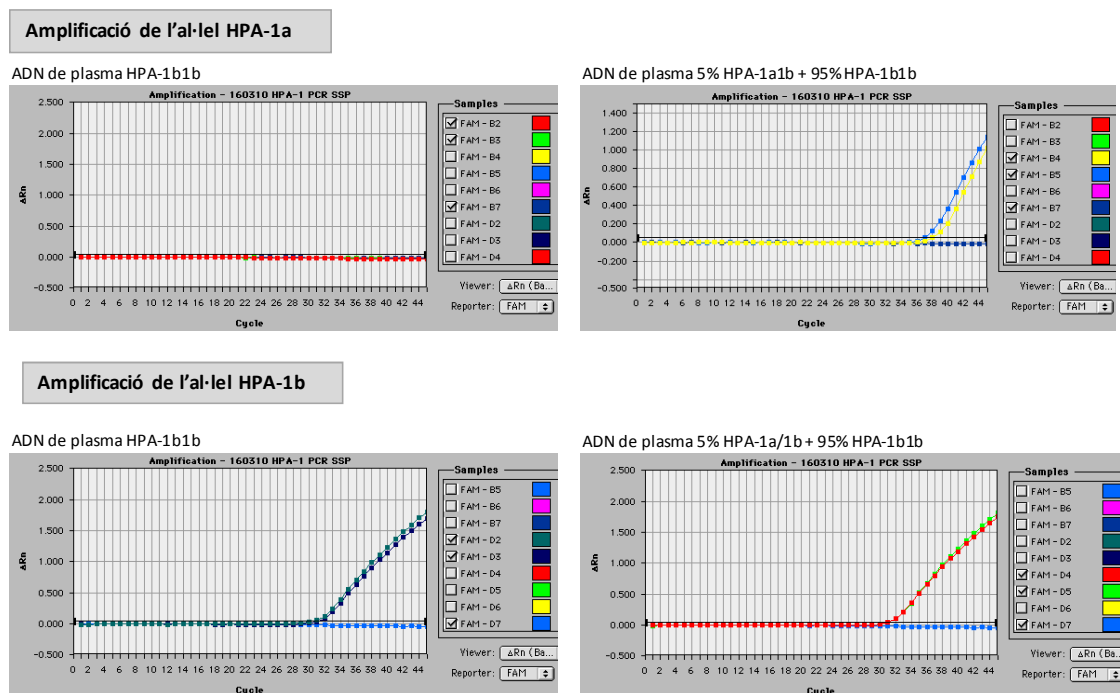


Figura 32: Representació dels plots corresponents a l'amplificació per PCR a temps real de l'al·lel HPA-1a i HPA-1b d'una quimera artificial composta pel 5% de plasma d'un individu HPA-1a1b en el plasma d'un individu HPA-1b1b a una T.A.=64°C. A l'assaig s'inclou com a control negatiu l'amplificació del polimorfisme a partir de l'ADN extret del plasma d'un individu HPA-1b1b.

VII.1.1.4. Validació clínica amb mostres de gestants HPA-1b1b a diferents setmanes de gestació

Després d'obtenir resultats preliminars tan satisfactoris en la validació tècnica per al genotipatge HPA-1a fetal en quant a sensibilitat i especificitat de l'estratègia, es van testar mostres de gestants HPA-1b1b a diferents setmanes de gestació.

VII.1.1.4.1. Mostres recollides

Per a l'estudi de validació, es van analitzar un total de 66 mostres de plasma de 34 gestants HPA-1a negatiu corresponents a diferents setmanes de gestació, entre 8 i 38 setmanes, per a la determinació del genotip HPA-1a fetal a partir de plasma matern (Taula 9 de l'apartat VI.3.1.1).

VII.1.1.4.2. Resultats obtinguts

Els resultats obtinguts del genotipatge HPA-1 del fetus utilitzant un procediment no invasiu es plasmen en la Taula 27. L'al·lel HPA-1a d'origen fetal es va detectar a setmana 8 de la gestació, la qual cosa indica una alta sensibilitat de l'assaig. Cinquanta-quatre mostres corresponen a dones portadores d'un fetus HPA-1a positiu, de les que es va confirmar el resultat posteriorment en totes elles. En tots aquests casos es va detectar satisfactòriament l'al·lel HPA-1a i no es va observar cap amplificació inespecífica en els controls negatius (ADN extret de plasma d'individus HPA-1b1b) processats en paral·lel en les mateixes condicions (exemple mostrat en la Figura 33). En les 12 mostres restants no es va poder confirmar el genotip del fetus.

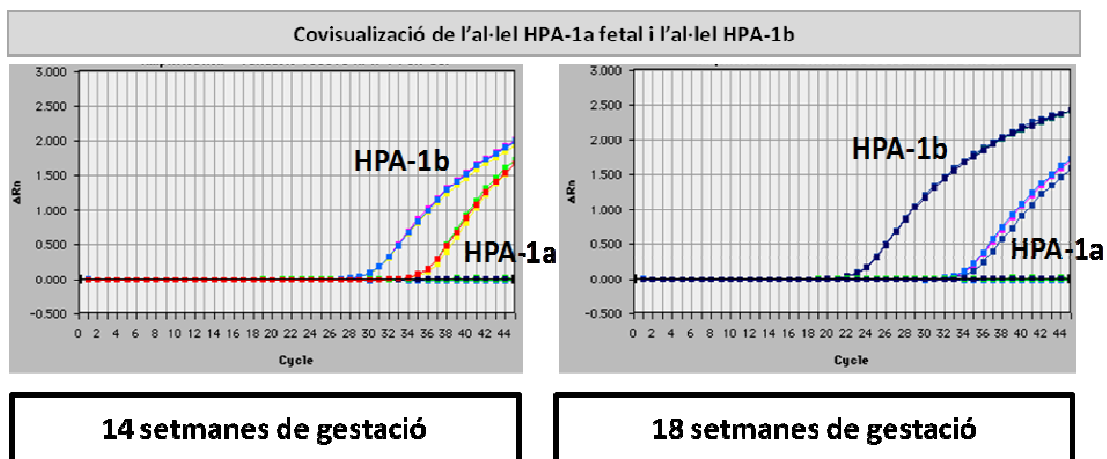


Figura 33: Detecció específica de l'al·lel HPA-1a a partir d'ADN extret de plasma d'una mateixa gestant a 14 i 18 setmanes de gestació.

En tres mostres de plasma (de les 12 mostres de les que no es va poder confirmar el genotip fetal) obtingudes de dos gestants HPA-1b1b no es va observar amplificació per PCR a temps real de la seqüència de l'al·lel HPA-1a suggerint, per

tant, un genotip fetal HPA-1a negatiu del fetus. En aquests casos es van analitzar els marcadors d'ADN fetal amb la finalitat d'evidenciar la presència d'ADN fetal en aquestes mostres. El resultat de la determinació del genotip HPA-1 fetal en una d'aquestes dues gestants va ser discrepant. Es van obtenir mostres de plasma a setmana 18, 26 i 35 de la gestació suggerint un resultat de genotip fetal HPA-1a negatiu a setmana 18 i positiu en les setmanes més avançades de la gestació.

Gestants HPA-1b1b	Data de les mostres obtingudes	Setmana de gestació	genotip HPA-1 Marit	genotip HPA-1 Fetus	Genotip DRB3*01:01 POSITIU/NEGATIU	Presència d'Ac anti-HPA-1a SI/NO
1	16/04/2007	26 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
	11/05/2007	34 (2ona mostra)				
2	15/05/2007	15 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
	21/06/2007	20 (2ona mostra)				
	20/07/2007	25 (3ra mostra)				
3	12/11/2007	26 (1ra mostra)	1a1b	1a1b	POSITIU	SI
	14/12/2007	30 (2ona mostra)				
4	05/08/2008	24	1a1b	1a1b	POSITIU	SI
5	21/08/2008	20 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
	21/10/2008	28 (2ona mostra)				
6	18/11/2008	24	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
7	10/12/2008	17 (1ra mostra)	1a1b	1a1b	POSITIU	SI
	08/04/2009	35 (2ona mostra)				
8	22/01/2009	12 (1ra mostra)	1a1b	1a1b	POSITIU	NO
	02/04/2009	22 (2ona mostra)				
	03/06/2009	31 (3ra mostra)				
9	16/02/2009	15 (1ra mostra)	1a1b	1a1b	POSITIU	SI
	20/04/2009	25 (2ona mostra)				
10	23/03/2009	8 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	NEGATIU	NO
	19/08/2009	29 (2ona mostra)				
	16/09/2010	33 (3ra mostra)				
11	16/07/2009	22	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
12	14/10/2009	18	1a1a	1a1b	POSITIU	NO
13	14/10/2009	26 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
	19/11/2009	31 (2ona mostra)				
14	01/03/2010	12	1a1a	1a1b	NEGATIU	autoanticòs
15	05/03/2010	19	1a1b	1a1b	NEGATIU	NO
16	09/03/2010	18 (1ra mostra)	1a1b	1a1b	NEGATIU	NO
	05/04/2010	22 (2ona mostra)				
	05/05/2010	24 (3ra mostra)				
	15/07/2010	37 (4a mostra)				
17	01/04/2010	14 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	NEGATIU	NO
	05/05/2010	18 (2ona mostra)				
18	07/04/2010	14 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	NO
	27/05/2010	21 (2ona mostra)				
	21/07/2010	29 (3ra mostra)				
19	21/04/2010	18 (1ra mostra)	NO DISPONIBLE	1a1b	NEGATIU	NO
	21/05/2010	22 (2ona mostra)				
20	26/04/2010	27 (1ra mostra)	1a1b	1a1b	NEGATIU	NO
	17/06/2010	34 (2ona mostra)				
	14/07/2010	38 (3ra mostra)				
21	26/04/2010	26 (1ra mostra)	NO DISPONIBLE	1a1b	NEGATIU	NO
	09/06/2010	33 (2ona mostra)				
22	11/05/2010	19 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	NO
	23/06/2010	26 (2ona mostra)				
23	10/05/2010	15	NO DISPONIBLE	1a1b	NEGATIU	NO
24	19/05/2010	20 (1ra mostra)	NO DISPONIBLE	1b1b	NEGATIU	NO
	14/07/2010	24 (2ona mostra)				
25	17/06/2010	33	NO DISPONIBLE	1a1b	NEGATIU	SI
26	21/06/2010	28	1a1a	1a1b	NEGATIU	NO
27	15/07/2010	25	1a1a	1a1b	POSITIU	NO
28	15/07/2010	26	NO DISPONIBLE	1a1b	NEGATIU	SI
29	20/07/2010	26	NO DISPONIBLE	1a1b	POSITIU	NO
30	21/07/2010	28	1a1a	1a1b	NEGATIU	NO
31	06/09/2010	18 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	NO
	05/10/2010	22 (2ona mostra)				
	08/11/2010	27 (3ra mostra)				
	14/12/2010	32 (4a mostra)				
32	19/11/2010	18 (1ra mostra)	NO DISPONIBLE	1b1b	POSITIU	NO
	17/01/2011	26 (2ona mostra)		1a1b		
	23/03/2011	35 (3ra mostra)		1a1b		
33	06/04/2011	13 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	POSITIU	SI
	10/05/2011	18 (2ona mostra)		1a1b		
	20/06/2011	23 (3ra mostra)		1a1b		
34	15/04/2011	16 (1ra mostra)	1a1a	1a1b	NEGATIU	NO
	30/06/2011	27 (2ona mostra)		1a1b		

Taula 27: Taula que representa totes les mostres recollides per a la validació clínica de l'estratègia utilitzada per a la determinació del genotip HPA-1a fetal a partir de plasma matern. S'indica el n° total de gestants que han participat en l'estudi amb presència/absència de l'al·lel DRB3*01:01 i amb presència/absència d'Ac anti-HPA-1a, el n° total de mostres recollides i la data d'obtenció, el genotip HPA-1 del marit i els resultats obtinguts del genotip HPA-1 fetal a partir del protocol que s'ha posat a punt.

VII.1.1.4.3. Anàlisi de la concordança amb el genotip del nadó

Per tal de confirmar la validesa de l'estratègia posada a punt es van contrastar els resultats amb el genotip HPA-1 del nadó o mitjançant la tècnica d'amniocentesi. A la Taula 28 es mostren els resultats.

Edat gestacional	8 - 14 setmanes de gestació		15 - 28 setmanes de gestació		29 - 39 setmanes de gestació	
Predicció del genotip HPA-1a fetal	Negatiu	Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu	Positiu
Resultats concordants*	0	6	0	36	0	14
Resultats pendents de confirmar	0	0	3	5	0	2

*Resultats concordants amb el genotip HPA-1 del nadó al néixer o per amniocentesi.

Taula 28: Taula que mostra els resultats concordants i pendents de confirmar contrastant els resultats de l'anàlisi del genotip HPA-1a fetal a partir de plasma matern del total de mostres recollides a diferents setmanes de gestació amb els resultats obtinguts del genotip del nadó i/o utilitzant la tècnica d'amniocentesi.

En tots els resultats en els que s'ha pogut confirmar el resultat s'ha observat una concordança del 100%. El valor predicitiu positiu i negatiu no s'han pogut calcular perquè per una banda totes les mostres en les que s'ha confirmat el resultat eren mostres de gestants portadores d'un fetus HPA-1a positiu i per l'altra, perquè el genotip HPA-1b1b es troba en una freqüència tan baixa en la població que no ha permès calcular aquest valor en les mostres estudiades.

VII.1.1.5. Quantificació de l'ADN de plasma

VII.1.1.5.1. Resultats de la quantificació d'ADN total en plasma de gestants HPA-1b1b

Els resultats de la quantificació d'ADN total present en plasma matern de les 66 mostres de plasma analitzades en total per a la determinació del genotip HPA-1a fetal es mostren en la Taula 29. Les dades recollides en cada *run* de l'amplificació del gen CCR5 dels estàndards en paral·lel amb les mostres d'ADN de les diferents gestacions es van analitzar amb el software v1.2.3. Applied Biosystem.

En cada *run* es va construir una recta de regressió a partir de 4 punts corresponents als estàndards (4 dilucions d'un ADN comercial, Promega). Un dels paràmetres de la recta que es té en compte és el coeficient de correlació (R²) que mesura la proximitat de l'ajust entre la recta de regressió i els 4 punts dels Ct de la reacció d'amplificació dels estàndards. És desitjable que s'obtinguin valors de coeficients de correlació superiors a 0.99. Un altre paràmetre que es té en compte és la pendent de la recta de regressió, que indica el nivell d'eficiència en la reacció d'amplificació. Si s'obté una pendent pròxima a -3.3 significa que l'eficiència de la PCR és del 100% [Guía de introducción *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*-Experimentos de Curva Estándar, 2010]. En els resultats s'ha evidenciat una alta variabilitat en la concentració d'ADN present en plasma en les

diferents setmanes de gestació provinents de les 34 gestants incloses en l'estudi (Figura 34).

RESULTATS DE LA QUANTIFICACIÓ DEL DNA PRESENT EN PLASMA MATERN MITJANÇANT L'AMPLIFICACIÓ DEL GEN CCR5								
Gestant	Setmana de gestació	Ct	Quantitat (ng)	Mitjana quantitat(ng)	ng/μL	ng totals extracció 60μL	ng/mL	
1	26	26,40	36,99	36,99	7,40	443,88	443,88	
	34	29,87	4,87	4,87	0,97	58,44	58,44	
2	15	30,54	3,30	3,13	0,66	39,60	39,60	
		30,72	2,96		0,59	35,52	35,52	
	20	28,09	13,76	13,76	2,75	165,12	165,12	
	25	26,00	46,62	46,62	9,32	559,44	559,44	
3	26	30,36	3,66	3,91	0,73	43,92	43,92	
		30,14	4,15		0,83	49,80	49,80	
	30	33,77	0,50	0,56	0,10	6,02	6,02	
		33,39	0,62		0,12	7,49	7,49	
4	24	30,52	3,34	2,81	0,67	40,08	40,08	
		31,17	2,28		0,46	27,36	27,36	
5	20	33,86	0,31	0,24	0,06	3,66	3,66	
		34,94	0,17		0,03	2,03	2,03	
	28	30,07	2,44	2,50	0,49	29,28	29,28	
		29,98	2,56		0,51	30,72	30,72	
6	24	26,11	21,42	20,58	4,28	257,04	257,04	
		26,25	19,74		3,95	236,88	236,88	
7	17	33,31	0,63	0,43	0,13	7,56	7,56	
		33,77	0,48		0,10	6,00	6,00	
		34,24	0,34		0,07	4,03	4,03	
		34,57	0,28		0,06	3,34	3,34	
	35	32,53	0,89	0,85	0,18	10,73	10,73	
		32,71	0,81		0,16	9,66	9,66	
8	12	33,86	0,31	0,29	0,06	3,66	3,66	
		34,07	0,27		0,05	3,26	3,26	
	22	31,56	1,08	0,97	0,22	12,96	12,96	
		31,96	0,87		0,17	10,39	10,39	
	31	32,37	0,69	0,59	0,14	8,30	8,30	
		33,00	0,49		0,10	5,87	5,87	
9	15	34,21	0,39	0,43	0,08	4,64	4,64	
		33,88	0,47		0,09	5,64	5,64	
	25	25,13	77,24	73,01	15,45	926,88	926,88	
		25,33	68,78		13,76	825,36	825,36	
10	8	34,35	0,25	0,32	0,05	2,98	2,98	
		33,57	0,39		0,08	4,69	4,69	
	29	32,26	0,83	1,06	0,17	9,98	9,98	
		31,50	1,29		0,26	15,48	15,48	
	33	30,95	1,78	1,75	0,36	21,36	21,36	
		31,02	1,71		0,34	20,52	20,52	
11	22	32,23	0,85	0,86	0,17	10,19	10,19	
		32,17	0,88		0,18	10,54	10,54	
12	18	32,81	0,61	0,87	0,12	7,30	7,30	
		31,72	1,14		0,23	13,68	13,68	
13	26	34,25	0,33	0,28	0,07	4,01	4,01	
		34,91	0,23		0,05	2,76	2,76	
	31	34,71	0,26	0,24	0,05	3,10	3,10	
		34,90	0,23		0,05	2,77	2,77	
14	12	31,87	1,30	1,51	0,26	15,60	15,60	
		31,38	1,71		0,34	20,52	20,52	
15	19	29,22	4,85	4,99	0,97	58,20	58,20	
		29,13	5,13		1,03	61,56	61,56	
16	18	35,03	0,37	0,36	0,07	4,43	4,43	
		35,08	0,36		0,07	4,31	4,31	
	22	35,31	0,32	0,40	0,06	3,79	3,79	
		34,54	0,48		0,10	5,81	5,81	
	24	34,91	0,39	0,55	0,08	4,72	4,72	
		33,87	0,70		0,14	8,45	8,45	
	37	37	33,04	1,12	0,98	0,22	13,44	13,44
			33,54	0,85		0,17	10,14	10,14

RESULTATS DE LA QUANTIFICACIÓ DEL DNA PRESENT EN PLASMA MATERN MITJANÇANT L'AMPLIFICACIÓ DEL GEN CCR5							
Gestant	Setmana de gestació	Ct	Quantitat (ng)	Mitjana quantitat(ng)	ng/ μ L	ng totals extracció 60 μ L	ng/mL
17	14	34,10	0,62	0,83	0,12	7,42	7,42
		33,18	1,03		0,21	12,36	12,36
	18	25,45	77,73	75,09	15,55	932,76	932,76
		25,57	72,46		14,49	869,52	869,52
18	14	30,22	2,77	2,55	0,55	33,24	33,24
		30,54	2,32		0,46	27,84	27,84
	21	28,95	5,65	5,97	1,13	67,80	67,80
		28,76	6,29		1,26	75,48	75,48
	29	32,96	0,60	0,75	0,12	7,19	7,19
		32,25	0,89		0,18	10,69	10,69
19	18	26,12	27,45	26,90	5,49	329,40	329,40
		26,20	26,34		5,27	316,08	316,08
	22	32,00	1,03	1,94	0,21	12,36	12,36
		31,42	1,42		0,28	17,04	17,04
		30,51	2,48		0,50	29,76	29,76
		30,32	2,78		0,56	33,36	33,36
		30,69	2,16		0,43	25,92	25,92
		31,01	1,77		0,35	21,24	21,24
		33,24	0,51		0,10	6,17	6,17
		32,84	0,64		0,13	7,69	7,69
20	27	31,12	1,68	1,62	0,34	20,16	20,16
		31,24	1,57		0,31	18,84	18,84
	38	24,43	70,67	63,93	14,13	848,04	848,04
		24,81	57,19		11,44	686,28	686,28
21	26	34,43	0,26	0,35	0,05	3,16	3,16
		33,51	0,44		0,09	5,29	5,29
	33	30,52	0,60	0,60	0,12	7,20	7,20
22	19	35,35	0,20	0,27	0,04	2,41	2,41
		34,39	0,34		0,07	4,03	4,03
	26	27,59	12,86	14,86	2,57	154,32	154,32
		27,08	16,87		3,37	202,44	202,44
23	15	33,81	0,46	0,48	0,09	5,50	5,50
		33,67	0,49		0,10	5,93	5,93
	20	33,17	0,65	0,51	0,13	7,76	7,76
24	20	34,20	0,37	0,51	0,07	4,46	4,46
		31,27	1,79		0,36	21,48	21,48
	24	32,05	1,18	1,48	0,24	14,16	14,16
25	33	31,50	1,58	1,52	0,32	18,96	18,96
		31,64	1,46		0,29	17,52	17,52
26	28	30,76	2,35	2,24	0,47	28,20	28,20
		30,94	2,13		0,43	25,56	25,56
27	25	29,80	3,94	3,29	0,79	47,28	47,28
		30,54	2,64		0,53	31,68	31,68
28	26	29,00	6,04	4,37	1,21	72,48	72,48
		30,50	2,70		0,54	32,40	32,40
29	26	26,57	43,33	45,32	8,67	519,96	519,96
		26,42	47,31		9,46	567,72	567,72
	28	34,56	0,45	0,39	0,09	5,34	5,34
31	18	35,05	0,34	0,26	0,07	4,02	4,02
		35,00	0,18		0,04	2,15	2,15
		33,41	0,45		0,09	5,42	5,42
		34,06	0,26		0,05	3,16	3,16
		34,26	0,23		0,05	2,78	2,78
		35,79	0,22		0,04	2,63	2,63
	36,04	0,19	0,04	2,27	2,27		
	22	35,32	0,29	0,29	0,06	3,46	3,46
		32,87	0,73	0,75	0,15	8,78	8,78
	22	32,80	0,76	0,75	0,15	9,16	9,16
		36,55	0,14	0,16	0,03	1,70	1,70
	27	36,22	0,17	0,16	0,03	2,05	2,05
		32	33,73	0,72	0,57	0,14	8,58
	34,35		0,50	0,10		5,99	5,99
	33,42		0,59	0,12		7,08	7,08
33,79	0,47		0,09	12,00		12,00	
32	18	34,95	0,39	0,34	0,08	4,67	4,67
		34,52	0,48		0,10	5,78	5,78
		35,74	0,15		0,03	1,81	1,81
		34,39	0,33		0,07	4,01	4,01
	26	31,00	2,83	2,82	0,57	33,96	33,96
		30,93	2,93		0,59	35,16	35,16
		30,99	2,47		0,49	29,64	29,64
		30,63	3,05		0,61	36,60	36,60
35	26,29	30,21	31,57	6,04	362,52	362,52	
	26,17	32,21		6,44	386,52	386,52	
	26,61	32,56		6,51	390,72	390,72	
	26,68	31,28		6,26	375,36	375,36	
33	13	33,03	1,07	1,11	0,21	12,84	12,84
		32,90	1,15		0,23	13,80	13,80
	23	32,30	1,20	1,20	0,24	14,40	14,40
		32,45	1,49	1,29	0,30	17,88	17,88
34	16	33,00	1,09	0,39	0,22	13,08	13,08
		34,47	0,47		0,09	5,60	5,60
	27	34,06	0,37	0,39	0,07	4,46	4,46
		34,28	0,33		0,07	3,95	3,95
27	31,00	0,60	0,60	0,12	7,20	7,20	

Taula 29: Resultats de la quantificació de l'ADN total extret de les 66 mostres de plasma a diferents setmanes de gestació incloses en l'estudi de validació del genotipatge HPA-1a fetal.

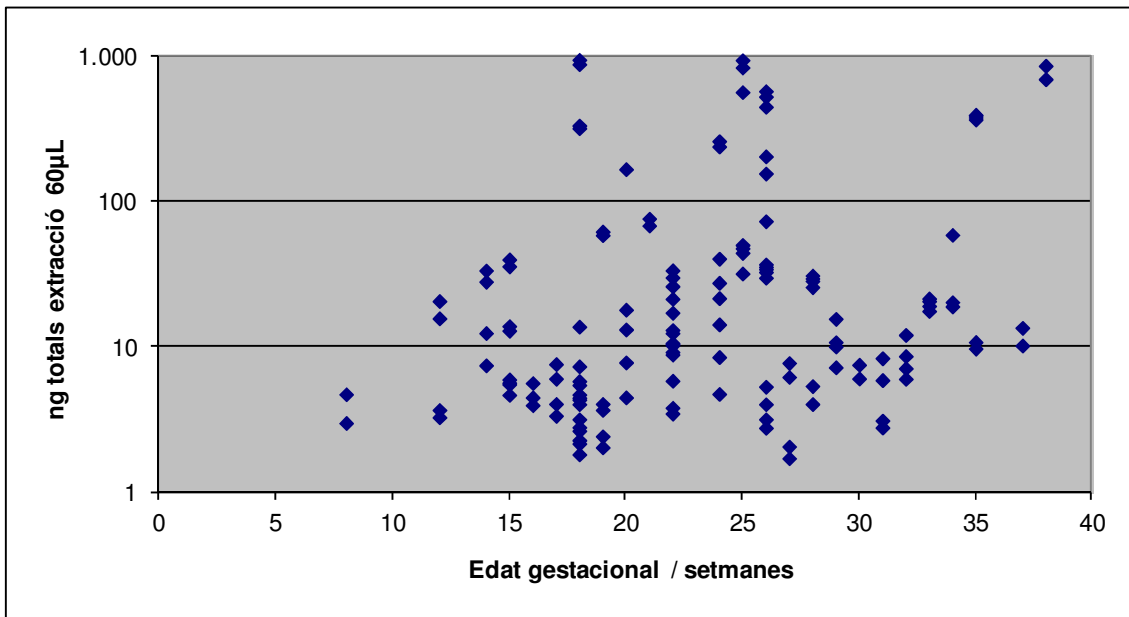


Figura 34: Gràfic que representa la variabilitat en la concentració d'ADN present en plasma matern de les 66 mostres de plasma analitzades a diferents setmanes de gestació i procedents de 34 gestants.

VII.1.1.5.2. Resultats de la quantificació d'ADN total present en els controls negatius

La concentració d'ADN expressada en ng/ml de plasma es va mesurar en tots els ADN extrets de plasma de 24 individus HPA-1a negatiu i corresponents als controls negatius que es van utilitzar per a la determinació del genotip HPA-1a fetal en plasma matern. En total es van quantificar diverses rèpliques de cadascuna de les 24 mostres d'ADN de plasma analitzades, resultats dels quals es mostren a la Taula 30.

RÉSULTATS DE LA QUANTIFICACIÓ DE L'ADN PRESENT EN PLASMA MATERN MITJANÇANT L'AMPLIFICACIÓ DEL GEN CCR5						
Nº Control neg.	Ct	Quantitat (ng)	Mitjana quantitat (ng)	ng/ μ L	ng totals extracció 60 μ L	ng/mL
1	34,67	0,28	0,26	0,06	3,40	3,40
	35,00	0,23		0,05	2,80	2,80
2	35,00	0,15	0,25	0,03	1,78	1,78
	34,36	0,22		0,04	2,60	2,60
	33,90	0,19		0,04	2,30	2,30
	34,00	0,18		0,04	2,16	2,16
	32,90	0,37		0,07	4,38	4,38
	32,88	0,37		0,07	4,45	4,45
3	33,66	0,33	0,29	0,07	3,95	3,95
	34,13	0,25		0,05	2,98	2,98
4	33,00	0,49	0,51	0,10	5,83	5,83
	33,57	0,35		0,07	4,16	4,16
	33,54	0,52		0,10	6,20	6,20
	33,76	0,46		0,09	5,47	5,47
	33,65	0,48		0,10	5,81	5,81
	32,92	0,74		0,15	8,84	8,84
5	33,14	0,45	0,37	0,09	5,38	5,38
	33,46	0,37		0,07	4,44	4,44
	33,95	0,33		0,07	3,98	3,98
	33,99	0,32		0,06	3,89	3,89
6	34,04	0,26	0,28	0,05	3,14	3,14
	33,80	0,30		0,06	3,64	3,64
7	35,11	0,14	0,24	0,03	1,67	1,67
	35,20	0,13		0,03	1,58	1,58
	33,53	0,36		0,07	4,27	4,27
	34,23	0,24		0,05	2,82	2,82
	34,57	0,29		0,06	3,42	3,42
	34,58	0,28		0,06	3,41	3,41
8	32,75	0,57	0,38	0,11	6,78	6,78
	32,53	0,64		0,13	7,72	7,72
	34,25	0,28		0,06	3,35	3,35
	34,82	0,20		0,04	2,42	2,42
	33,35	0,27		0,05	3,28	3,28
	33,13	0,31		0,06	3,77	3,77
9	33,24	0,62	0,53	0,12	7,38	7,38
	33,24	0,61		0,12	7,37	7,37
	33,46	0,54		0,11	6,48	6,48
	34,12	0,37		0,07	4,43	4,43
10	33,70	0,47	0,32	0,09	5,64	5,64
	34,37	0,32		0,06	3,84	3,84
	33,70	0,22		0,04	2,63	2,63
	33,85	0,20		0,04	2,38	2,38
	32,84	0,38		0,08	4,54	4,54
	33,11	0,32		0,06	3,83	3,83
11	33,38	0,57	0,58	0,11	6,80	6,80
	33,31	0,59		0,12	7,08	7,08
12	33,57	0,51	0,39	0,10	6,10	6,10
	33,16	0,64		0,13	7,69	7,69
	36,88	0,06		0,01	0,75	0,75
	35,99	0,10		0,02	1,25	1,25
	32,76	0,40		0,08	4,79	4,79
	32,35	0,52		0,10	6,23	6,23
13	32,53	0,46	0,12	0,09	5,56	5,56
	35,53	0,14		0,03	1,62	1,62
	36,34	0,09		0,02	1,02	1,02
	35,58	0,13		0,03	1,57	1,57
	36,30	0,09		0,02	1,04	1,04
	35,46	0,14		0,03	1,69	1,69
	36,00	0,10		0,02	1,24	1,24
	36,00	0,10		0,02	1,24	1,24
14	35,22	0,16	0,49	0,03	1,93	1,93
	33,50	0,43		0,09	5,15	5,15
15	33,07	0,55	0,15	0,11	6,58	6,58
	34,27	0,15		0,03	1,81	1,81
16	34,35	0,14	0,40	0,03	1,73	1,73
	32,76	0,40		0,08	4,79	4,79
17	33,60	0,41	0,40	0,08	4,94	4,94
	33,72	0,39		0,08	4,62	4,62
18	31,90	1,12	1,21	0,22	13,44	13,44
	31,65	1,29		0,26	15,48	15,48
19	34,18	0,29	0,32	0,06	3,50	3,50
	33,94	0,34		0,07	4,04	4,04
20	31,01	1,89	1,78	0,38	22,68	22,68
	31,22	1,66		0,33	19,92	19,92
21	33,00	0,59	0,61	0,12	7,03	7,03
	32,88	0,63		0,13	7,56	7,56
22	34,14	0,30	0,31	0,06	3,59	3,59
	34,00	0,33		0,07	3,90	3,90
23	33,20	0,52	0,52	0,10	6,26	6,26
	33,23	0,51		0,10	6,12	6,12
24	33,14	0,54	0,69	0,11	6,47	6,47
	32,37	0,85		0,17	10,18	10,18

Taula 30: Resultats de la quantificació de l'ADN total extret de les 82 mostres de plasma d'individus HPA-1^a negatiu utilitzats com a controls negatius en l'estudi de validació per a la determinació del genotip HPA-1a fetal.

VII.1.1.6. Incorporació d'uns marcadors d'ADN fetal

La incorporació de marcadors d'ADN fetal en l'assaig pel genotipatge HPA-1a fetal és important per evidenciar la presència d'ADN fetal en la mostra de plasma d'una gestant. Es van realitzar proves per a la multiplexació de la seqüència del gen SRY amb la seqüència de l'al·lel HPA-1b i també es va analitzar el marcador RASSF1A.

VII.1.1.6.1. Multiplexació amb gen SRY

La coamplificació de la seqüència de l'al·lel HPA-1b i el gen SRY en les condicions astringents per a la determinació del genotip HPA-1 fetal (temperatura d'*annealing* 64°C) no va donar els resultats desitjats. Com s'observa en la Figura 35, l'amplificació del gen SRY no es troba afavorida en aquestes condicions de multiplex, únicament aplicant les mateixes condicions de reacció i sense la coamplificació d'un altre gen en paral·lel que hi pugui interferir es va visualitzar el producte amplificat d'aquest gen per PCR a temps real. Val a dir, i tal i com s'observa en la Figura 36, les condicions de reacció òptimes per l'amplificació d'aquesta seqüència es dona a una temperatura d'*annealing* de 60°C.

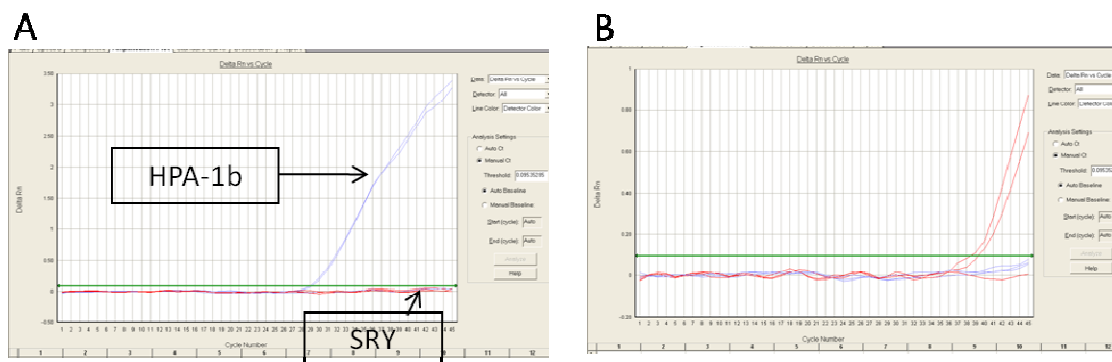


Figura 35: Anàlisi en paral·lel del genotip HPA-1a fetal i gen SRY a una T.A.=64°C. A, Amplificació per multiplex mitjançant PCR a temps real de la seqüència HPA-1b i gen SRY utilitzant sondes TaqMan-MGB. B, Amplificació en uniplex mitjançant PCR a temps real de la seqüència del gen SRY.

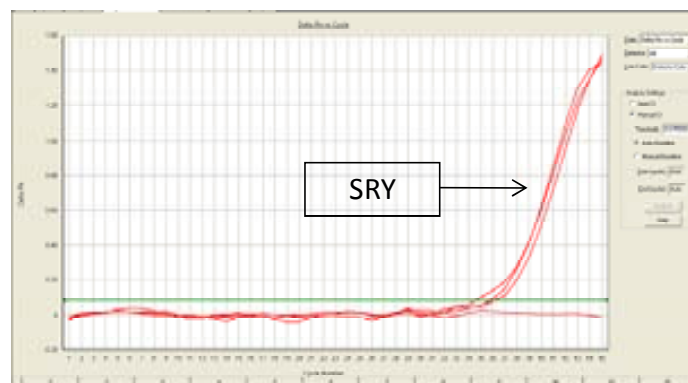


Figura 36: Amplificació per PCR a temps real de la seqüència del gen SRY utilitzant la sonda SRY TaqMan-MGB i aplicant una T.A.=60°C.

VII.1.1.6.2. Detecció del marcador epigenètic RASSF1A

VII.1.1.6.2.1. Posta a punt de l'assaig RASSF1A

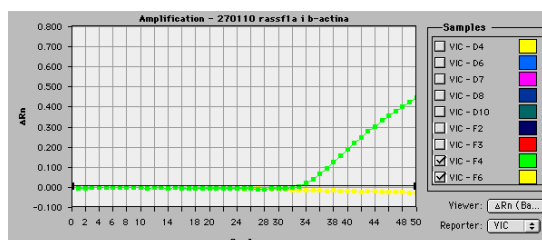
Per posar a punt l'assaig RASSF1A es va seguir el protocol descrit en la publicació d'Allen Chan i col·laboradors [Allen Chan, et al., 2006] (veure apartat VI.3.3.1) per a la detecció del marcador epigenètic a partir de mostres de plasma de gestants a diferents setmanes de gestació.

En un inici es va provar de dur a terme una digestió a partir de 21µL d'ADN de plasma matern en un volum final de 30µL però es van obtenir millors resultants digerint 35µL d'ADN de plasma en un volum final de 50µL. En paral·lel i com a control de l'assaig s'analitza l'ADN de plasma sense digerir. En primer lloc es va provar d'analitzar l'ADN no digerit sota les mateixes condicions que les de digestió excepte per l'addició al tub eppendorf de l'endonucleasa. Finalment i com es descriu en la publicació de Chan i col·laboradors, es va analitzar l'ADN sense digerir amplificant directament 5µL de l'ADN extret de plasma.

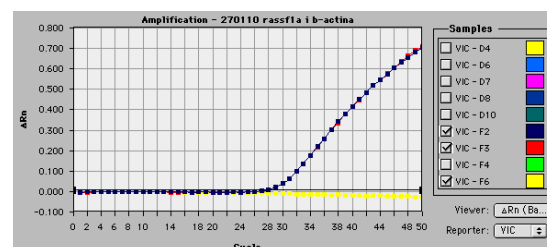
En la Figura 37 es mostra un exemple dels resultats de l'amplificació del gen RASSF1A.

Detecció específica de l'ADN d'origen fetal

Anàlisi del locus RASSF1A en ADN de plasma sense digerir

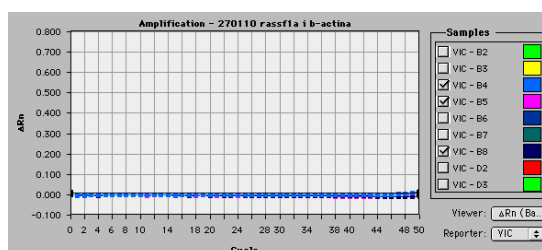


Dona HPA-1b1b no embarassada

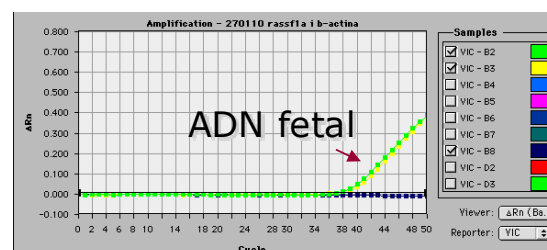


Gestant- setmana 19 de gestació

Anàlisi del locus RASSF1A en ADN de plasma digerit



Dona HPA-1b1b no embarassada



Gestant- setmana 19 de gestació

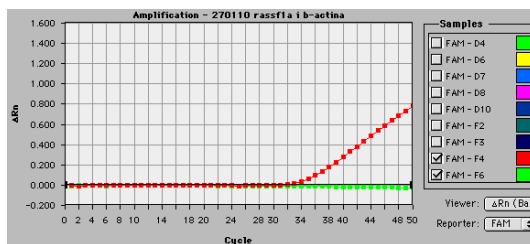
Figura 37: Amplificació del gen RASSF1A a partir de l'ADN de plasma digerit i sense digerir d'una mostra obtinguda a setmana 19 de la gestació. El control utilitzat és l'anàlisi en paral·lel de l'ADN extret de plasma d'una dona no embarassada.

VII.1.1.6.2.2. Inclusió dels controls β -actina

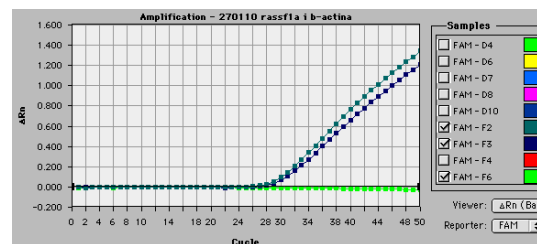
El gen de la β -actina es troba hipometil·lat tant en l'ADN d'origen matern com fetal. La digestió de les seqüències d'aquest gen mitjançant l'endonucleasa *Bst*UI permet ser un control de l'eficiència de la digestió enzimàtica. Els resultats de la digestió i de la posterior amplificació del gen de la β -actina van ser molt satisfactoris, tal i com es mostra en l'exemple de la Figura 38.

Anàlisi del gen de la β -actina: control de la digestió enzimàtica

Anàlisi del locus β -actina en ADN de plasma sense digerir

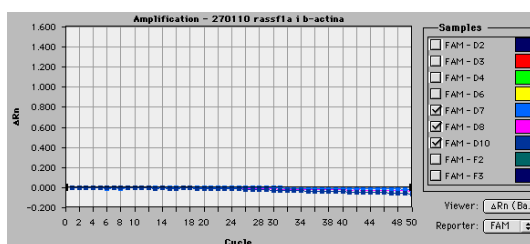


Dona HPA-1b1b no embarassada

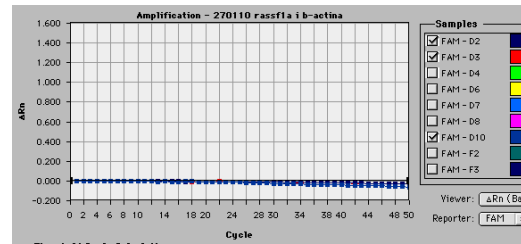


Gestant- setmana 19 de gestació

Anàlisi del locus β -actina en ADN de plasma digerit



Dona HPA-1b1b no embarassada



Gestant- setmana 19 de gestació

Figura 38: Amplificació del gen de la β -actina com a control de l'efectivitat de la digestió enzimàtica. S'analitza una mostra d'ADN de plasma a setmana 19 de la gestació digerit i sense digerir i, en paral·lel, l'ADN d'una dona HPA-1b1b no embarassada en les mateixes condicions.

VII.1.1.6.2.3. Avaluació amb mostres de gestants

En les 25 mostres analitzades s'ha obtingut un patró d'amplificació conclouent, observant-ne una amplificació sensible i reproduïble del marcador RASSF1A de procedència fetal en totes elles. Paral·lelament i com a control negatiu s'ha analitzat ADN de plasma de dones no embarassades i en cap cas s'ha detectat un fals positiu (Taula 31).

Nº Gestant	Setmana de gestació	Ct	Control digestió completa
1	19	38	negatiu
2	20	38	negatiu
3	7	39	negatiu
	15	42	negatiu
4	16	38	negatiu
5	19	38	negatiu
6	24	38	negatiu
7	24	38	negatiu
8	23	38	negatiu
9	16	39	negatiu
10	NO DISPONIBLE	39	negatiu
11	18	38	negatiu
12	19	38	negatiu
13	20	38	negatiu
14	18	39	negatiu
15	24	38	negatiu
16	18	39	negatiu
17	20	38	negatiu
18	15	40	negatiu
19	15	40	negatiu
20	15	40	negatiu
21	15	40	negatiu
22	15	40	negatiu
23	13	40	negatiu
24	13	40	negatiu

Taula 31: Resultats de l'amplificació del gen RASSF1A a partir de l'ADN d'origen fetal de mostres d'ADN extret de plasma matern. En la taula es mostra el nº de mostres analitzades, la corresponent setmana de gestació i el valor Ct obtingut de la PCR a temps real.

VII.2. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

VII.2.1. Selecció i avaluació dels marcadors STRs

VII.2.1.1. Localització i informació disponible

Per a la selecció del panell de STRs es van seguir els criteris següents:

- ❖ Localització cromosòmica del STR pròxima al gen ITGB3 (a una distància $\leq 3\text{Mb}$) per evitar possibles recombinacions entre els loci incloent-hi un mínim de tres marcadors: dos loci STRs extragènics flanquejant el gen ITGB3 per l'extrem 5' i 3' i un locus intragènic.
- ❖ Contingut d'un alt grau de polimorfisme i del valor d'heterozigocitat o H_0 .
- ❖ Preferiblement i molt recomanable la tria d'aquells STRs de tipus tetranucleòtids, ja que donen resultats més robusts i fàcils d'interpretar.

Després d'una cerca bibliogràfica i en bases de dades es van identificar una bateria de marcadors microsatèl·lits polimòrfics adjacents al gen ITGB3, com es mostra en la Figura 39, es van seleccionar de forma que complissin al màxim les característiques desitjades (Taula 32).

	Marçador	Tipus	Localització (bp)	nº al·lels	Heterozigositat	Unitat de repetició	Referència bibliogràfica
Extrem 5'	D17S1185	extragènic	40.553.561-40.553.785	16	0.91	[AGGG]n	Bennett-Baker, et al., 1996
	D17S1340	extragènic	41.015.530-41.016.034	13	0.93	[TTTC]n	Bennett-Baker, et al., 1996
	D17S1339	extragènic	41.734.330-41.734.694	15	0.80	[TTTC]n	Bennett-Baker, et al., 1996
	D17S1184	extragènic	42.112.004-42.144.103	10	0.75	[CA]n	Miki, et al., 1994
	D17S1183	extragènic	42.435.053-42.435.181	14	0.56	[CA]n	Miki, et al., 1994 Shayakul, et al., 2004
	D17S934	extragènic	43.057.680-43.057.853	10	0.84	[CA]n	Gyapay, et al., 1994
	D17S950	extragènic	43.260.171-43.260.360	12	0.76	[CA]n	Gyapay, et al., 1994
intró 6	intragènic		8		[CT]n	Stoffel, et al., 1992 Denomme, 1998	
Gen de referència: ITGB3 (45.331.208-45.518.678 bp)							
Extrem 3'	D17S806	extragènic	45.811.845-45.812.021	16	0.90	[CA]n	Gyapay, et al., 1994
	D17S1827	extragènic	46.638.484-46.638.615	11	0.84	[CA]n	http://www002.upp.so-net.ne.jp/kyama-Q/MS.html
	D17S1868	extragènic	47.184.853-47.185.044	8	0.79	[CA]n	http://www002.upp.so-net.ne.jp/kyama-Q/MS.html
	D17S733	extragènic	47.580.128-47.580.320	6	0.89	[GGAA]n	Albertsen, et al., 1994
D17S1795	extragènic	47.924.994-47.925.165	8	0.52	[CA]n	http://www002.upp.so-net.ne.jp/kyama-Q/MS.html	

Taula 32: Panell dels marcadors microsatèl·lits lligats al gen ITGB3 amb les seves característiques corresponents: localització cromosòmica (segons la base de dades *Ensembl*), grau de polimorfisme, heterozigositat, unitat de repetició i número de referència de l'SNP.

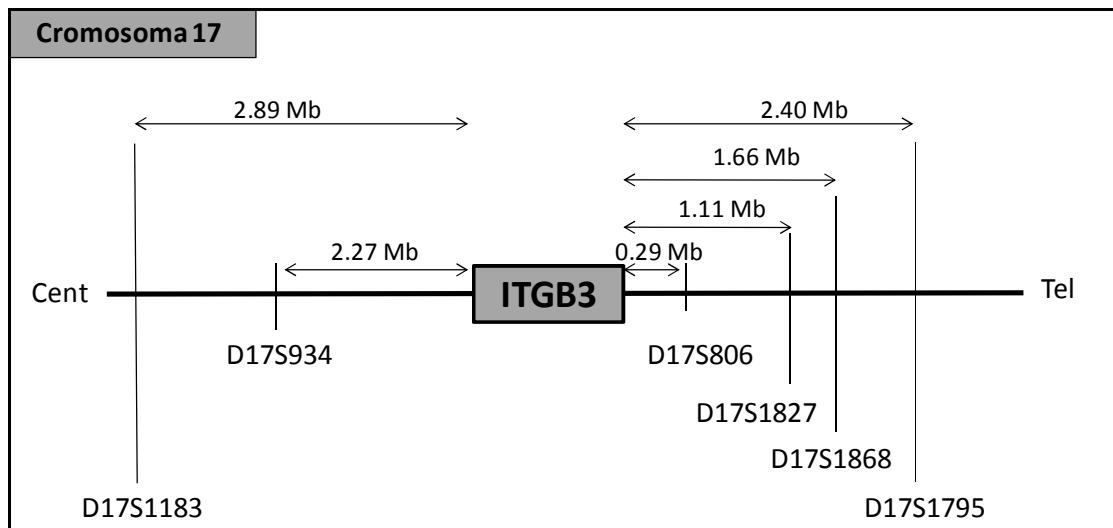


Figura 39: Esquema de la disposició dels marcadors microsatèl·lit polimòrfics respecte el gen ITGB3 en el cromosoma 17.

VII.2.1.2. Amplificació i anàlisi del perfil al·lèlic d'aquests marcadors

Les diferents PCRs dels marcadors microsatèl·lits es van optimitzar ajustant les concentracions de clorur de magnesi i les condicions de termociclador apropiades per a l'amplificació de cada STR a partir d'ADN genòmic de diferents individus HPA-1a negatiu, heterozigots HPA-1a/1b i HPA-1b negatiu. Les seqüències dels *primers* es van extreure de les referències indicades a la Taula 32. La visualització del producte amplificat es va fer en un gel d'agarosa i posteriorment es va avaluar la qualitat dels electroferogrames corresponents, tal i com es mostra a la Figura 40 i Figura 41 alguns dels exemples.

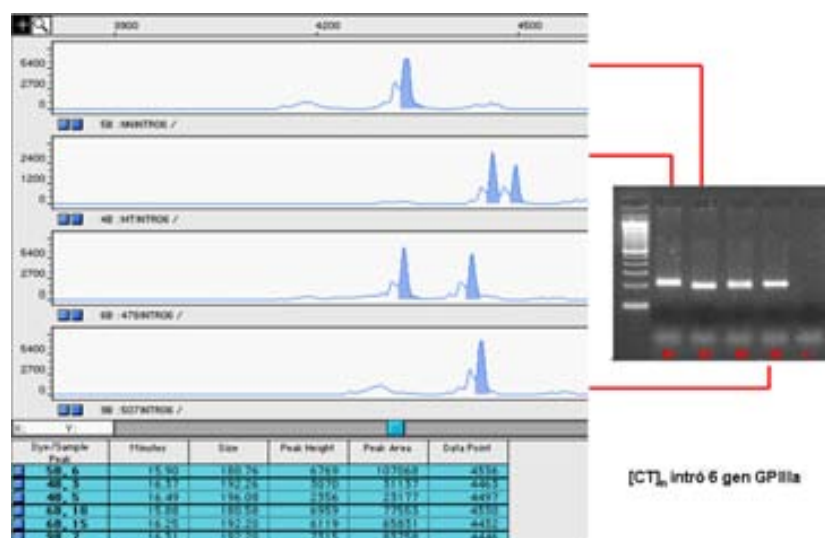


Figura 40: Electroferograma i gel d'agarosa de l'amplificació a partir d'ADN genòmic del dinucleòtid [CT]_n localitzat a l'intró 6 del gen ITGB3. En les mostres 4B i 6B es visualitza un perfil al·lèlic d'individus heterozigots i en les mostres 5B i 9B es visualitzen perfils al·lèlics d'individus homozigots.

Les condicions de les PCRs dels loci microsatèl·lit es van poder estandaritzar i es va posar a punt l'amplificació per a cada locus de forma reproducible. No obstant, l'amplificació dels marcadors STRs D17S1185, D17S1339, D17S1340, D17S1184, D17S950 i D17S733 va presentar molts problemes. Amb tota la informació disponible d'aquests marcadors microsatèl·lits i després d'avaluar la sensibilitat, especificitat i eficiència de les PCRs corresponents es van descartar els 6 STRs que van presentar problemes de la bateria de marcadors inicialment proposada. Les seqüències dels *primers* dels microsatèl·lits seleccionats es mostren en la Taula 24 (apartat VI.4.2.5.1).



Figura 41: Electroferograma de l'amplificació del dinucleòtid localitzat a l'intró 6 del gen ITGB3, D17S1183 i D17S806 (3 ng d'ADN motlle).

VII.2.1.3. Estudi d'informativitat amb 10 parelles

Per a comprovar i analitzar el grau de polimorfisme dels diferents marcadors STRs seleccionats, com també avaluar el seu grau d'informativitat en el context d'aplicació que ens interessava es va determinar el perfil al·lèlic per aquests microsatèl·lits en 10 parelles consistents en dones homozigotes HPA-1b1b i homes heterozigots HPA-1a1b. En els casos en que disposàvem d'ADN genòmic de les parelles amb antecedents de TFNA i del fill afecte de les mateixes es va poder estudiar el lligament entre els al·lèls del sistema HPA-1 i els al·lèls corresponents als diferents loci microsatèl·lits.

En la Taula 33 següent es mostren els resultats dels genotips dels loci microsatèl·lit de les 10 famílies.:

		MARCADORS MICROSATÈL-LIT						
FAMÍLIA		D17S1183	D17S934	intró 6 [CT]	D17S806	D17S1827	D17S1868	D17S1795
A	Mare	123/123	169/175	180/180	150/166	126/140	193/195	169/171
	Pare	123/123	167/167	180/192	166/174	134/140	191/195	169/171
	Nadó	-	-	180/192	150/174	126/134	191/193	169/169
B	Mare	123/137	177/177	180/180	152/160	126/132	191/191	163/165
	Pare	123/125	167/179	180/192	152/168	132/138	191/191	165/169
	Nadó	125/137	177/179	180/192	152/168	126/138	-	165/165
C	Mare	123/123	167/175	180/180	150/154	120/134	187/193	165/165
	Pare	123/141	167/171	180/192	152/172	120/130	187/191	163/169
	Nadó	ADN NO DISPONIBLE						
D	Mare	123/143	169/169	180/180	160/168	124/132	187/191	163/169
	Pare	123/123	169/179	180/192	148/168	122/132	191/195	163/165
	Nadó	ADN NO DISPONIBLE						
E	Mare	123/143	169/171	180/180	150/150	122/136	191/193	163/169
	Pare	123/143	167/175	180/192	144/150	122/130	187/193	169/169
	Nadó	ADN NO DISPONIBLE						
F	Mare	123/147	175/179	180/180	154/166	132/142	191/193	163/169
	Pare	123/123	167/179	180/184	166/168	116/122	187/187	165/169
	Nadó	-	167/175	180/184	166/168	116/142	-	163/169
G	Mare	123/139	165/167	180/180	148/148	120/138	173/189	161/165
	Pare	123/141	175/177	180/192	164/174	128/132	191/193	163/169
	Nadó	ADN NO DISPONIBLE						
H	Mare	123/123	167/169	180/180	156/164	122/138	187/193	163/169
	Pare	123/123	169/179	180/192	154/156	122/126	193/195	163/169
	Nadó	-	169/179	180/192	156/164	122/126	193/195	163/163
I	Mare	123/131	171/173	174/180	150/162	116/132	181/189	167/169
	Pare	123/145	167/177	180/190	154/168	120/138	191/191	169/171
	Nadó	123/123	167/171	174/190	150/154	132/138	-	169/169
J	Mare	123/145	173/175	180/180	148/174	134/136	189/189	165/169
	Pare	123/145	167/177	180/192	154/164	124/138	187/193	169/169
	Nadó	123/145	-	180/192	164/174	136/138	187/189	169/169

Taula 33: Taula que representa els perfils genètics dels diferents marcadors STRs de les deu famílies estudiades. Les caselles que contenen un guió corresponen a mostres que no van poder ser amplificades pel locus en qüestió.

En la Taula 34 es confirma l'elevat grau de polimorfisme de cada marcador STR com a resultat de l'anàlisi de les mostres d'ADN.

Microsatèl·lit	Nº al·lels descrits	Nº al·lels detectats
D17S1183	14	9
D17S934	10	8
[CT] intró6	8	5
D17S806	16	13
D17S1827	11	13
D17S1868	8	7
D17S1795	8	6

Taula 34: Número d'al·lels detectats en l'estudi preliminar per a l'avaluació del grau de polimorfisme de cada STR comparat amb el número d'al·lels ja descrits en la literatura.

Cadascuna de les parelles va tenir un fill HPA-1a1b però malauradament només va ser possible disposar d'ADNg de sis d'aquests nadons. Per aquesta raó i per avaluar la informativitat dels STRs es van fer dues classificacions per a cada locus a estudiar observant el perfil genètic de cadascuna de les famílies: famílies amb marcadors informatius i famílies amb marcadors potencialment informatius (Taula 35). Val a dir que alguns dels locus microsatèl·lit no van poder ser amplificats utilitzant l'ADNg dels nadons segurament a causa de la poca quantitat de mostra obtinguda i també per una possible degradació de l'ADN a causa de la seva conservació durant un llarg període de temps (des del 2003-2004).

Microsatèl·lit	Famílies marcador informatiu	Famílies marcador potencialment informatives	Total famílies estudiades
D17S1183	1	2	10
D17S934	7	2	
[CT] intró6	6	4	
D17S806	9	1	
D17S1827	7	3	
D17S1868	3	4	
D17S1795	3	1	

Taula 35: Taula que representa la informativitat de cada locus microsatèl·lit segons l'estudi realitzat amb deu famílies amb antecedents de TFNA.

VII.2.2. Disseny i posta a punt d'una estratègia de tipificació HPA mitjançant PCR a temps real a partir d'una sola cèl·lula

El primer pas que es va dur a terme en aquest estudi i, després d'haver fet proves preliminars a partir d'una concentració de 20pg d'ADN genòmic, va ser posar a punt l'estratègia per a la tipificació HPA-1 mitjançant PCR a temps real a partir d'una cèl·lula de mucosa bucal amb genotip HPA-1 conegut, preferiblement d'un individu heterozigot. Un cop validat aquest pas es va procedir a l'experimentació amb blastòmers provinents d'embrions no transferibles.

L'aïllament d'una única cèl·lula de mucosa bucal es va realitzar utilitzant un sistema de micromanipulació i sota una lupa binocular. Es va posar a punt una PCR

convencional per amplificar el fragment que inclou el dimorfisme HPA-1a/1b utilitzant uns *primers* dissenyats amb el programa Primer 3. A partir del producte amplificat obtingut es va fer una amplificació per PCR a temps real utilitzant les mateixes condicions de PCR i disseny d'oligonucleòtids que es descriu en l'apartat VI.4.2.4. En aquesta última PCR s'utilitzen uns *primers* interns amb combinació d'unes sondes TaqMan^{TN}-MGB al·lel-específiques (Figura 42).

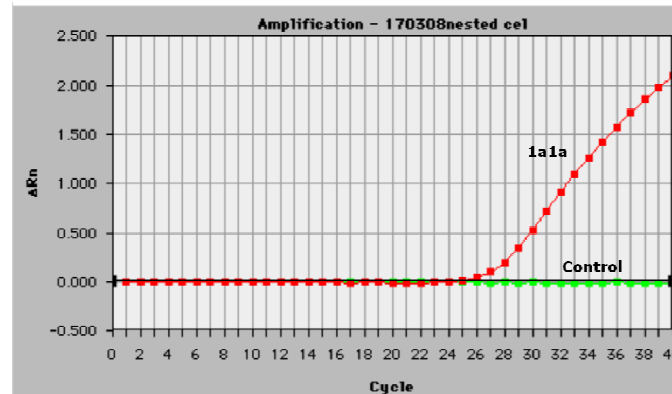


Figura 42: Representació del plot corresponent a l'amplificació per PCR a temps real de l'al·lel HPA-1a (línia vermella) a partir d'una cèl·lula de mucosa bucal d'un individu HPA-1a1a. A l'assaig s'inclou aigua com a control negatiu (línia verda).

VII.2.3. Avaluació d'un protocol de preamplificació total del genoma mitjançant MDA

Després de posar a punt la PCR a temps real pel genotipatge HPA-1 a partir de l'ADN d'una cèl·lula, es va avaluar la preamplificació de la totalitat del genoma a partir d'una única cèl·lula de mucosa bucal i després es va implementar aquesta tècnica en l'estudi de validació a partir del genoma dels blastòmers d'embrions descartats i cedits per les 13 parelles participants de l'estudi.

L'ADN d'aquestes cèl·lules es va amplificar en una primera ronda d'amplificació mitjançant el mètode de MDA amb la finalitat d'obtenir una gran quantitat d'ADN inicial pels anàlisis subsegüents dels loci d'interès. En la Figura 43 es mostra un exemple d'un dels gels d'electroforesi que es va realitzar per a la comprovació i visualització del producte amplificat per MDA. És possible que en algunes reaccions control (medi compostat per PBS amb el 0.1% de PVA) es generin artefactes d'ADN d'alt pes molecular [Kumar, et al., 2008; patent WO 2008/051928 A2; patent n° US20040248105 A1, 2004].

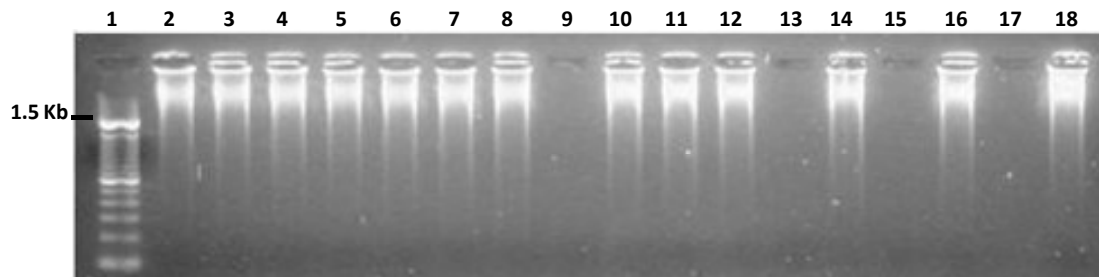
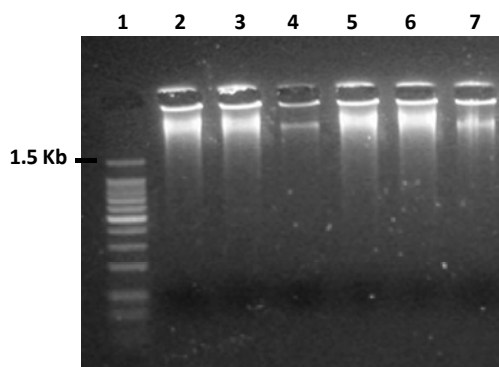
A

Figura 43: Migració electroforètica dels productes de MDA.

B

A, El carril 1 correspon al marcador de pes molecular (100-1500 pb). Els carrils 2-8, 10-12, 14, 16 i 18 corresponen cadascun al DNA d'un blastòmer amplificat pel mètode MDA. Els carrils 9, 13, 15 i 17 corresponen als controls negatius (medi cel·lular).

B, El carril 1 correspon al marcador de pes molecular (100-1500pb). Els carrils 2, 3, 5 i 6 corresponen cadascun a l'amplificació pel mètode MDA del DNA d'un únic blastòmer. Els carrils 4 i 7 corresponen als control negatius, en els quals apareix una banda amb baixa intensitat corresponent a DNA artefacte.

VII.2.4. Estudi de validació

VII.2.4.1. Criteris de selecció

Per a l'estudi de validació es van utilitzar blastòmers procedents d'embrions descartats i cedits per parelles que es van sotmetre a un programa de Reproducció Assistida al laboratori d'embriologia de la Fundació Puigvert, grup amb qui hem col·laborat pel desenvolupament d'aquest projecte. S'ha obtingut el consentiment informat de les 13 parelles que han participat en l'estudi i una mostra de sang fresca per a la tipificació molecular tant del sistema HPA-1 com dels marcadors microsatèl·lit.

VII.2.4.1.1. Determinacions en els progenitors

Per poder avaluar els resultats subsegüents, tant de tipatge HPA-1 com dels loci microsatèl·lit, obtinguts en l'anàlisi de les cèl·lules embrionàries, es va determinar prèviament el genotip HPA-1 i el perfil al·lèlic per a cada STR de totes les parelles que participaven en l'estudi.

VII.2.4.1.1.1. Tipatge HPA-1

Els resultats de la tipificació HPA-1 molecular per PCR-SSP de les 13 parelles van ser els següents (Taula 36):

- ❖ Cinc parelles estan formades per dos progenitors homozigots HPA-1a1a.
- ❖ Cinc parelles consten d'un progenitor homozigot HPA-1a1a i un progenitor heterozigot HPA-1a1b.
- ❖ Dues parelles estan formades per dos progenitors heterozigots HPA-1a1b.
- ❖ Una parella està formada per un progenitor homozigot HPA-1a1a i un progenitor homozigot HPA-1b1b.

VII.2.4.1.1.2. STRs

De tot el panell de STRs, es van seleccionar tres dels marcadors polimòrfics: dos flanquejant el gen *ITGB3*, a l'extrem 3' (D17S1183) i a l'extrem 5' (D17S806) del gen, i un tercer d'intragènic (localitzat a l'intró 6 del gen *ITGB3*). De cadascuna de les parelles es va realitzar l'anàlisi inicial d'aquests tres marcadors per tal d'avaluar si amb el perfil al·lèlic dels progenitors en el conjunt de tots els loci s'obtenia la informativitat necessària per poder analitzar la concordança amb els resultats obtinguts en blastòmers corresponents a cada parella.

A la Taula 36 es mostren els resultats del genotipatge dels tres loci microsatèl·lit seleccionats com a primer bloc d'anàlisi. En tots els casos es van obtenir resultats satisfactoris quant a la informativitat dels STRs i no va caldre recórrer a altres marcadors microsatèl·lit del panell.

Identificació	Parelles	Marcadors microsatèl·lit		
		D17S1183	[CA] _n intró 6	D17S806
1	Dona HPA-1a/1a	123/145	184/201	168/170
	Home HPA-1a/1b	139/150	180/184	152/160
2	Dona HPA-1a/1a	139/143	184/194	164/176
	Home HPA-1a/1b	123/123	180/192	146/152
3	Dona HPA-1a/1a	143/150	180/192	168/168
	Home HPA-1a/1b	123/147	180/192	140/148
4	Dona HPA-1a/1a	123/123	192/192	170/170
	Home HPA-1a/1a	123/123	192/192	152/152
5	Dona HPA-1a/1b	123/123	180/180	154/168
	Home HPA-1a/1a	135/150	192/192	170/172
6	Dona HPA-1a/1b	123/139	180/192	150/166
	Home HPA-1a/1b	123/123	180/192	148/176
7	Dona HPA-1a/1b	123/123	180/201	146/164
	Home HPA-1a/1b	123/139	180/184	150/166
8	Dona HPA-1a/1b	139/141	180/190	148/172
	Home HPA-1a/1a	123/139	184/192	152/164
9	Dona HPA-1a/1a	123/123	192/192	154/164
	Home HPA-1a/1a	125/150	180/194	164/168
10	Dona HPA-1a/1a	123/143	192/192	164/166
	Home HPA-1a/1a	123/139	184/194	162/164
11	Dona HPA-1a/1a	139/145	180/192	146/174
	Home HPA-1b/1b	141/150	180/180	146/148
12	Dona HPA-1a/1a	123/143	180/192	160/170
	Home HPA-1a/1a	123/147	180/180	148/156
13	Dona HPA-1a/1a	123/123	188/201	168/170
	Home HPA-1a/1a	123/123	192/196	164/168

Taula 36: Perfil al·lèlic dels STRs D17S1183, el dinucleòtid [CT] de l'intró 6 del gen ITGB3 i D17S806 del total de les 13 parelles que van participar en l'estudi de validació per al genotipatge HPA-1 d'embrions.

VII.2.4.1.2. Determinacions en blastòmers

En total s'han analitzat 61 blastòmers biopsiats de 31 embrions, dels quals 51 s'han analitzat seguint el protocol optimitzat i en un subgrup de 10 cèl·lules s'ha aplicat el mateix protocol però modificant-ne les condicions per tal de reduir l'incidència d'ADO, tal i com es descriu més endavant a l'apartat VII.2.5.1.. Es van obtenir un total de 27 controls negatius, corresponents a la solució tamponada en la que es troben resuspeses les cèl·lules a l'hora d'aïllar-les en un microtub, dels quals en 8 d'ells (29.6%) es va evidenciar l'existència de producte artefacte però sempre es van obtenir resultats negatius en totes les amplificacions, descartant la presència de contaminació amb ADN extern. En una fase subsegüent a la preamplificació del

genoma dels blastòmers per MDA es va analitzar el genotip HPA-1 i els marcadors microsatèl·lit adjacents.

VII.2.4.1.2.1. Tipatge HPA-1

El genotipatge HPA-1 dels blastòmers es va realitzar per PCR a temps real a partir del producte MDA preamplificat (Figura 44).

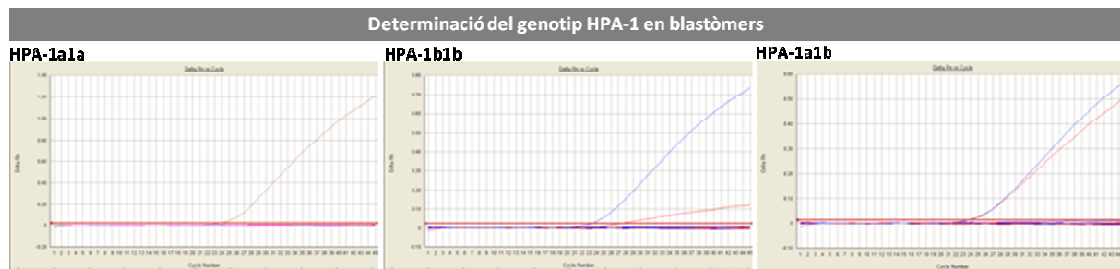


Figura 44: Determinació del genotip HPA-1 a partir d'un blastòmer mitjançant el protocol desenvolupat. El color vermell correspon a l'al·lel HPA-1a i el blau a l'al·lel HPA-1b.

En 51 blastòmers del total de cèl·lules analitzades es va detectar un genotip HPA-1a1a, en 5 de les cèl·lules un genotip HPA-1a1b i en les 4 cèl·lules restants un genotip HPA-1b1b. Per altra banda, només en un únic blastòmer (nº12) no es va visualitzar producte amplificat específic del locus HPA-1 però sí producte de MDA. A la Taula 37 es mostren els resultats del genotip HPA obtingut per a cadascuna de les cèl·lules embrionàries aïllades.

Parelles	Genotip HPA-1	Nº embrió	Nº Blastòmer i Controls negatius	Genotip HPA-1	Parelles	Genotip HPA-1	Nº embrió	Nº Blastòmer i Controls negatius	Genotip HPA-1					
1	1a1a/1a1b	1	1	1a1a	11	1a1a/1b1b	26	45	1a1b					
			Control negatiu	-				46	1b1b					
2	1a1a/1a1b	2	2	1b1b	12	1a1a/1a1a	27	47	1a1b					
			3	1a1a				48	1a1b					
			4	1a1a				Control negatiu	-					
		3	1a1a/1a1b	3				5	1a1a	28	1a1a/1a1a	28	49	1a1a
								Control negatiu	-				50	1a1a
								6	1a1a				51	1a1a
								7	1a1a				Control negatiu	-
3	1a1a/1a1b	5	8	1a1a	13	1a1a/1a1a	29	52	1a1a					
			Control negatiu	contaminació				53	1a1a					
			9	1a1b				54	1a1a					
			Control negatiu	-				55	1a1a					
			10	1a1a				Control negatiu	-					
4	1a1a/1a1a	8	11	1a1a	30	1a1a/1a1a	30	56	1a1a					
			Control negatiu	-				57	1a1a					
			12	X				Control negatiu	-					
			Control negatiu	-				58	1a1a					
			9	Control negatiu				-	59	1a1a				
5	1a1b/1a1a	11	13	1a1a	31	1a1a/1a1a	31	60	1a1a					
			14	1b1b				61	1a1a					
			15	1a1a				Control negatiu	-					
			Control negatiu	-										
			16	1a1a										
6	1a1b/1a1b	14	17	1a1a										
			Control negatiu	-										
			15	21	1b1b									
7	1a1b/1a1b	16	Control negatiu	-										
			22	1a1a										
			23	1a1b										
8	1a1b/1a1a	17	24	1a1a										
			25	1a1a										
			26	1a1a										
			27	1a1a										
			Control negatiu	-										
9	1a1a/1a1a	19	28	1a1a										
			29	1a1a										
			Control negatiu	-										
			30	1a1a										
			31	1a1a										
		20	1a1a/1a1a	20	32	1a1a								
					Control negatiu	-								
					33	1a1a								
					34	1a1a								
					35	1a1a								
10	1a1a/1a1a	21	Control negatiu	-										
			36	1a1a										
			Control negatiu	-										
			37	1a1a										
			38	1a1a										
		23	1a1a/1a1a	23	39	1a1a								
					Control negatiu	-								
					40	1a1a								
					41	1a1a								
					Control negatiu	-								
24	1a1a/1a1a	24	42	1a1a										
			43	1a1a										
			44	1a1a										
			Control negatiu	-										
			44	1a1a										

Taula 37: Taula que representa el genotip HPA-1 dels individus de cada parella inclosa en l'estudi, el número d'embrións biopsiats de cada parella i el número de blastòmers analitzats amb el protocol original i el protocol modificat (addició de *primers* específics - color marró). Els requadres vermells indiquen la presència d'ADO. La creu en vermell indica la fallada de l'amplificació per PCR a temps real.

VII.2.4.1.2.2. STRs

Paral·lelament a la determinació del genotip HPA-1 dels blastòmers, es va obtenir el perfil al·lèlic de cadascun dels blastòmers dels tres marcadors microsatèl·lit seleccionats com a primer bloc d'anàlisi. La Taula 38 mostra els resultats dels genotips dels marcadors microsatèl·lit de cada blastòmer analitzat.

Parelles	Genotip HPA-1	Nº embrió	Nº Blastómer i controls neg	Marcadors microsatèl·lit		
				D17S1183	[CT] intró 6	D17S806
1	1a1a/1a1b	1	1	139/145	180/201	152/170
			Control negatiu	-	-	-
2	1a1a/1a1b	3	2	123/139	180/180	152/152
			3	123/123	192/194	152/176
			4	123/139	192/194	152/176
			5	139/139	194/194	152/176
		Control negatiu	-	-	-	
		4	6	143/143	No concloent	152/176
			7	123/143	No concloent	152/176
Control negatiu	-	-	-			
3	1a1a/1a1b	5	8	123/143	192/192	140/168
			Control negatiu	-	-	-
		6	9	X	180/192	148/168
			Control negatiu	-	-	-
		7	10	123/150	192/192	140/140
Control negatiu	-	-	-			
4	1a1a/1a1a	8	11	123/123	192/192	152/152
			Control negatiu	-	-	-
		9	12	123/123	192/192	X
			Control negatiu	-	-	-
		10	13	123/123	192/192	152/152
Control negatiu	-	-	-			
5	1a1b/1a1a	11	14	123/123	180/180	154/154
			15	X	180/192	172/172
			Control negatiu	-	-	Contaminació
		12	16	123/123	192/192	No concloent
			17	No concloent	X	No concloent
		Control negatiu	-	-	-	
		13	18	135/135	X	168/168
19	123/123		180/180	168/168		
Control negatiu	-	-	-			
6	1a1b/1a1b	14	20	123/139	X	166/176
			Control negatiu	-	-	-
		15	21	123/123	180/180	150/150
Control negatiu	-	-	-			
7	1a1b/1a1b	16	22	123/123	201/201	164/164
			23	123/139	180/201	150/164
		17	24	123/123	201/201	164/164
8	1a1b/1a1a	18	25	123/123	184/190	172/172
			26	123/141	190/190	152/172
			27	141/141	190/190	No concloent
		Control negatiu	-	-	-	

Parelles	Genotip HPA-1	Nº embrió	Nº Blastòmer i controls neg	Marcadors microsatèl·lit		
				D17S1183	[CT] intró 6	D17S806
9		19	28	123/150	180/192	164/168
			29	123/150	180/192	164/168
			Control negatiu	-	-	-
		20	30	123/125	192/194	154/168
			31	123/123	192/194	154/154
			32	123/125	192/192	154/168
			Control negatiu	-	-	-
		21	33	123/150	180/192	164/164
			34	123/150	180/192	154/164
			35	123/150	180/192	154/164
			Control negatiu	-	-	-
		10	1a1a/1a1a	22	36	123/123
Control negatiu	-				-	-
23	37			123/123	X	164/164
	Control negatiu			-	-	-
	38			123/123	192/194	164/164
24	39			123/139	192/194	164/164
	40			123/123	184/192	No conclouent
	41			123/143	184/192	No conclouent
	Control negatiu			-	-	-
25	42			123/139	192/194	164/164
	43			139/139	No conclouent	164/164
	44			139/139	192/192	164/164
11	1a1a/1b1b	26	45	139/139	180/180	146/148
			46	141/141	180/180	148/148
			Control negatiu	-	-	-
		27	47	139/141	180/180	146/148
			48	139/141	180/180	146/148
			Control negatiu	Contaminació	-	-
12	1a1a/1a1a	28	49	143/147	180/192	160/160
			50	143/147	180/192	160/160
			51	147/147	180/192	148/148
			Control negatiu	-	-	-
		29	52	143/143	180/192	156/160
			53	123/123	180/192	No conclouent
			54	123/143	180/192	156/160
			55	123/143	180/192	160/160
13	1a1a/1a1a	30	56	123/123	196/196	164/164
			57	123/123	188/196	164/170
			58	123/123	188/196	164/170
			Control negatiu	-	-	-
		31	59	123/123	188/196	164/170
			60	123/123	196/196	X
			61	123/123	188/188	170/170
			Control negatiu	-	-	-

Taula 38: Perfil al·lèlic dels STRs , D17S1183, el dinucleòtid [CT] de l'intró 6 del gen ITGB3 i D17S806 del total dels 61 blastòmers biopsiats per a l'estudi de validació. En color marró es mostren el subgrup de blastòmers (10 en total) analitzats afegint una modificació en el protocol de MDA incorporant *primers* específics complementaris a la seqüència dels loci d'interès en la barreja de *random primers* hexàmers. Els requadres vermells indiquen la presència d'ADO. La creu en vermell indica la fallada de l'amplificació de la PCR.

VII.2.4.1.3. Estimació de l'incidència d'ADO

Coneixent el tipatge HPA-1 dels progenitors i el perfil al·lèlic pels tres loci microsatèl·lit, s'ha pogut estimar la incidència d' *allele drop-out* (ADO) per a cada locus.

La incidència d'ADO s'ha calculat a partir dels blastòmers que podien potencialment presentar un genotip HPA-1 heterozigot i, per tant, corresponents a parelles en les que, com a mínim, un dels dos progenitors fos heterozigot. Un total de 28 blastòmers dels 61 analitzats (no s'inclou cap cèl·lula analitzada amb el protocol modificat) complien aquesta característica. En 5 d'aquests blastòmers s'ha obtingut un genotip heterozigot HPA-1a/1b. En 5 blastòmers es va evidenciar el fenomen d'ADO en el locus HPA-1, així que s'ha estimat una incidència d'ADO del 17.8% per aquest locus (Taula 38). En 11 blastòmers el resultat del genotip HPA-1 és compatible amb el genotip dels progenitors i amb el genotip dels loci STRs que serien informatius per evidenciar el fenomen d'ADO en el locus HPA-1, en cas de que s'hagués produït. Tot i així, en 7 blastòmers s'ha obtingut un resultat no conclouent tenint en compte els resultats del conjunt dels loci microsatèl·lit.

Per altra banda, si ens fixem en la incidència d'ADO individualment per a cada locus microsatèl·lit, sense incloure cap cèl·lula del subgrup de 10 analitzades amb el protocol modificat, s'ha estimat una incidència del 35% pel locus D17S1183 (18 blastòmers amb evidència d'ADO), una incidència del 25% pel dinucleòtid [CT] de l'intró 6 (13 blastòmers amb evidència d'ADO) i una incidència del 35% pel locus D17S806 (18 blastòmers amb evidència d'ADO).

VII.2.5. Optimització d'un protocol de DGP

VII.2.5.1. Modificació del protocol MDA amb inclusió de *primers* específics

En 10 cèl·lules de les 61 totals analitzades (Taula 38) es va afegir una modificació en el protocol de MDA per tal de minimitzar l'efecte d'*allele drop-out*. Aquest canvi consisteix en la incorporació de *primers* específics complementaris a la seqüència dels loci d'interès en la barreja de random *primers* hexàmers per assegurar la representació d'aquestes seqüències en el producte final amplificat. Aquests *primers* específics de seqüència contenen una modificació química de tipus fosforotioat (PTO) en dos dels enllaços fosfat que uneixen els nucleòtids de l'extrem 3' (Figura 45). Aquesta modificació protegeix els primers de la seva degradació per l'activitat exonucleasa 5'-3' de l'enzim Phi29 ADN polimerasa, tal i com es descriu en la patent internacional: "Target oriented whole genome amplification of nucleic acids" WO 2008/051928 A2. Dins de la mesura possible es va intentar obtenir com

a mínim dos blastòmers del mateix embrió per analitzar-los en paral·lel mitjançant el protocol modificat i el protocol original.

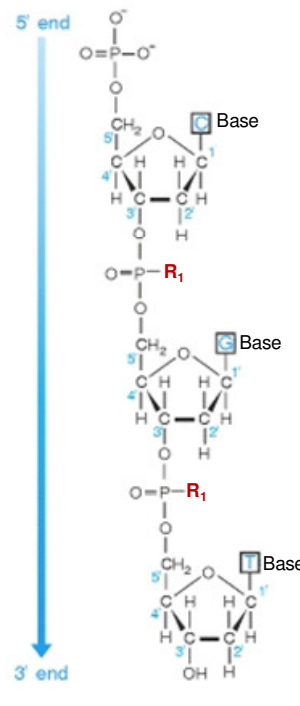


Figura 45: Modificació química en el fosfat internucleotídic. Quan en R_1 l'àtom d'oxigen (O) es reemplaça per un àtom de sofre (S) s'anomena fosforotioat:

Les seqüències dels *primers* específics emprats per afavorir l'amplificació específica de la regió del gen ITGB3 que conté el polimorfisme HPA-1a/1b i el marcador microsatèl·lit localitzat en l'intró 6 del mateix gen durant la reacció de MDA es mostren en la Taula 39. Es van utilitzar *primers* octàmers per a cada locus afegint la modificació en els enllaços internucleotídics de l'oligonucleòtid en l'extrem 3'. Les reaccions d'amplificació es van realitzar seguint el protocol original i, per tant, afegint un volum final de 7 μ L de *Sample Buffer* contenint els *primers* específics per a la reacció de MDA a una concentració de 2,5 pmols/ μ L de cadascun dels *primers*.

Locus	Nom	Seqüències primers	Mida	Tm [°C]
ITGB3	oct-HPA-1-S	5'-GCTATT*G*G-3'	8 MER	24
	oct-intró6 [CT]-S	5'-CATTGC*T*C-3'	8 MER	24

* Modificació Fosforotioat (PTO)

Taula 39: Seqüències dels *primers* específics afegits a la barreja de random *primers* que conté el *Sample Buffer* del kit GenomiPhi.

VIII. DISCUSSIÓ

VIII.1. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PRENATAL

El diagnòstic genètic prenatal no invasiu comporta algunes dificultats tècniques, ja que la fracció d'ADN fetal circulant en sang materna és tan sols del 3-6%, de manera que la discriminació entre l'ADN d'origen fetal vs el d'origen matern no és tan fàcil. En aquest context, les primeres aplicacions en el diagnòstic genètic prenatal es van dur a terme per analitzar marcadors genètics heretats del pare presents en el fetus i absents en la mare. En aquest sentit, el laboratori d'Immunohematologia del BST té una àmplia experiència en el genotipatge Rh(D) fetal en gestants RhD negatiu (prova implementada des de l'any 2003) i en la determinació del sexe fetal mitjançant l'amplificació de seqüències del cromosoma Y. Seguint aquesta línia i gràcies a l'experiència adquirida en el genotipatge fetal a partir de sang materna utilitzant la tècnica de la PCR a temps real es va poder posar a punt la determinació del genotip HPA-1a fetal a partir de l'ADN de plasma matern. Aquesta determinació va suposar des d'un inici complicacions tècniques, ja que la diferència a nivell de seqüència genètica entre l'ADN matern i fetal és d'un únic SNP.

Es van provar diverses estratègies introduint la diferència nucleotídica en el disseny de *primers* o en el disseny de les sondes TaqMan-MGB al·lel específiques marcades amb dos fluorocroms diferents.

Abordatge de diferents estratègies per a la determinació del genotip fetal mitjançant PCR a temps real

Es van abordar diferents estratègies per a la detecció de l'al·lel HPA-1a fetal en el context del plasma matern però algunes d'aquestes estratègies no van donar els resultats lo suficientment satisfactoris. Per aquest motiu, aquestes estratègies preliminars no s'han inclòs amb detall en l'apartat de material i mètodes però si que les hem volgut incloure en el contingut d'aquesta tesi perquè les dificultats tècniques de l'assaig que volíem desenvolupar justificaven l'aplicació de diferents abordatges. Algunes d'aquestes aproximacions són estratègies novadores que podien haver funcionat i per motius d'interès científic-acadèmic s'han inclòs en l'apartat de resultats incloent-ne tan el disseny específic com els resultats obtinguts.

Tal i com es comenta a resultats i atesa la dificultat de disposar de mostres d'ADN de plasma de gestants HPA-1b1b, s'han preparat barreges químiques de plasma

per avaluar les diferents estratègies, ja que és lo habitual per posar a punt un protocol en el context del diagnòstic genètic prenatal no invasiu. La proporció concentració que hem utilitzat en general ha estat d'un 5% de plasma d'un individu heterozigot i un 95% d'un individu HPA-1b1b.

En primer lloc es va provar el disseny de les sondes TaqMan-MGB al·lel específiques dissenyades pel diagnòstic genètic preimplantacional d'embrions HPA-1a negatiu. Els resultats a partir d'ADN extret de plasma d'una barreja quimèrica equivalent a la proporció d'ADN fetal i matern esperada en sang d'una gestant no van ser satisfactoris perquè es van observar amplificacions inespecífiques. Es van realitzar proves afegint a la PCR les dues sondes (HPA-1a i HPA-1b) i afegint únicament la sonda TaqMan-MGB HPA-1a però no es va obtenir la suficient especificitat per a la detecció de fetus HPA-1a positiu.

Cercant en la bibliografia altres grups que treballaven en el genotipatge de SNPs i per tal d'avaluar altres estratègies, es van dissenyar oligonucleòtids de tipus LNA i PNA amb l'objectiu sobretot d'augmentar l'especificitat de la tècnica.

La incorporació d'aquest tipus de modificació permet millorar la detecció específica de SNPs en variants al·lèliques augmentant l'especificitat del mètode i afavorint l'amplificació de seqüències minoritàries d'interès clínic [Ugozzoli, et al., 2004]. La substitució de les bases LNA coincideix en la posició polimòrfica i en les posicions -3 i +3 respecte l'SNP en la sonda HPA-1a específica. L'ús de sondes LNA augmenta considerablement la Tm del dúplex LNA/ADN permetent augmentar la temperatura d'*annealing* i elongació de l'assaig TaqMan millorant l'especificitat de les sondes. La substitució de residus LNA en l'oligonucleòtid milloren igualment l'estabilitat i l'afinitat per la seva seqüència complementària mantenint una unió forta entre les dues cadenes nucleotídiques.

L'estratègia coneguda com a "PCR Clamping" és un altre mètode que es basa en l'amplificació selectiva d'una seqüència minoritària que difereix únicament per un SNP amb una altra seqüència majoritàriament representada. En el context del genotipatge HPA-1a fetal a partir d'ADN lliure circulant en plasma matern, es va plantejar l'ús de "Peptide Nucleic Acids" (PNA) per bloquejar l'amplificació de l'al·lel HPA-1b tan d'origen matern com fetal permetent la detecció de l'al·lel HPA-1a d'origen fetal.

Per tal de minimitzar l'amplificació inespecífica de l'al·lel HPA-1b i augmentar la sensibilitat i l'eficàcia de l'amplificació de l'al·lel HPA-1a fetal es va aplicar l'estratègia del "PCR clamping" dissenyant dos oligonucleòtids PNAs, un en sentit *sense* i l'altre en sentit *anti-sense* complementaris a la seqüència que conté el polimorfisme HPA-1b. Tot i que és una estratègia descrita i utilitzada per altres

grups en a la detecció de SNPs, no es van obtenir resultats satisfactoris en el context del genotipatge HPA-1a fetal a partir de plasma matern. A mesura que s'augmentava la concentració de PNA en la PCR es bloquejava l'amplificació d'ambdós al·lels, de tal manera que s'hauria d'ajustar en cada cas la concentració de PNA adequada per al bloqueig específic de l'amplificació de l'al·lel HPA-1b en funció de la concentració d'ADN lliure present en sang per a cada gestant. Es va desestimar aquesta estratègia, ja que la gran variabilitat intrínseca en aquest tipus de mostres, tant en la concentració total d'ADN lliure en plasma com en la proporció relativa d'ADN fetal dificulta molt l'estandardització d'unes condicions d'assaig que permetin detectar de forma fiable l'al·lel HPA-1a fetal present en l'ADN de plasma matern.

Una altra de les estratègies que s'ha avaluat consisteix en l'amplificació de la regió genòmica que conté el polimorfisme HPA-1a/1b a partir de l'ADN de plasma digerit mitjançant l'endonucleasa *HpaII*. Aquest enzim té la peculiaritat de que la seva diana de restricció coincideix amb la seqüència de l'al·lel HPA-1b (-CCGG-) i també el fet de ser sensible a la metilació de la seqüència, de manera que per digerir-la no poden presentar-se citosines metilades. Aquesta aproximació no només semblava una bona opció per afavorir la detecció de l'al·lel HPA-1a fetal, sinó també per digerir únicament les seqüències d'origen matern i mantenir intacte l'ADN d'origen fetal. L'enzim de restricció *MspI* és un altre dels enzims que s'ha provat com a una aproximació alternativa a la basada en l'enzim *HpaII*, tenint en compte que és una estratègia en la que un grup holandès pioner en aquest camp hi ha treballat més i hi té més experiència [Scheffer, et al., 2011]. La diferència entre les dues endonucleases es basa en que la *MspI* digereix indistintament la seva diana de restricció estigui o no metilada la citosina més interna. Els resultats d'aquestes estratègies no van ser satisfactoris i per això es van desestimar. Més recentment un altre grup europeu ha treballat en una altra estratègia utilitzant sondes FRET per al genotipatge HPA-1a fetal en plasma matern però els resultats no van ser molt òptims [Le Toriell, et al., 2013].

Validació tècnica de l'estratègia de tipatge fetal

Els millors resultats per al genotipatge HPA-1a fetal es van obtenir mitjançant una PCR a temps real utilitzant *primers* al·lel específics amb combinació d'una sonda TaqMan-MGB complementaria a una regió no polimòrfica del gen ITGB3. La validació tècnica es va dur a terme a partir de l'ADN extret de barreges químiques de plasma compostes per un 5% de plasma d'un individu HPA-1a/1b i el 95% de plasma d'un individu HPA-1b/1b. Es van obtenir resultats amb una sensibilitat i una especificitat molt alta de la tècnica a una temperatura d'*annealing* de 64°C, així que

es va procedir a la validació clínica de la tècnica. L'avantatge d'aquesta estratègia consisteix en que és una detecció directa de l'al·lel HPA-1a fetal, sense cap tractament previ de l'ADN de plasma amb algun enzim de restricció. Tot això comporta menys manipulació de la mostra i alhora menys risc de possibles contaminacions. A més a més aquesta estratègia també demora menys temps a l'hora d'informar un diagnòstic prenatal.

Validació clínica amb mostres de gestants HPA-1b1b a diferents setmanes de gestació

Gràcies als resultats tan satisfactoris de la validació tècnica de l'estratègia, es va procedir a la validació clínica utilitzant mostres d'ADN de plasma matern de gestants HPA-1b1b a diferents setmanes de gestació (entre 8 i 38 setmanes). S'han analitzat 3 rèpliques de cadascuna de les mostres, ja que és lo habitual en el context del diagnòstic genètic prenatal per la poca proporció d'ADN fetal present en plasma matern. Tot i que a la setmana 8 de la gestació la sensibilitat de la tècnica baixa considerablement, s'ha pogut detectar el genotip HPA-1a del fetus en dos de les tres rèpliques analitzades. A partir de la setmana 12 de la gestació hem comprovat que el genotipatge HPA-1a fetal és del tot fiable tan per la alta sensibilitat com especificitat de l'estratègia. Per altra banda, s'ha comprovat que l'ADN de plasma extret amb un sistema automatitzat com és l'extractor QIAasymphony^{SP}(Qiagen), s'obté amb més qualitat i permet anàlisis més acurats. En edats gestacionals més avançades s'obtenien Ct més baixos, d'acord amb el que cal esperar quan la concentració d'ADN lliure en plasma matern alliberada incrementa a mesura que avança la gestació.

En 56 mostres del total de les 66 mostres de plasma estudiades s'han obtingut resultats concordants amb el genotip del nadó i/o amb el diagnòstic prenatal per amniocentesi. En tots aquests casos hem pogut detectar satisfactòriament l'al·lel HPA-1a i no hem observat en cap cas amplificació inespecífica. Les 10 mostres restants han quedat pendents de confirmar el resultat amb el genotip HPA-1 del nadó per les dificultats que s'han presentat a l'hora de contactar amb les mares d'aquests nadons. Tres d'aquestes 10 mostres corresponen a dues gestants portadores d'un fetus suposadament HPA-1a negatiu. En una de les gestants, el resultat HPA-1a negatiu es va reproduir en l'anàlisi de les mostres de plasma subsegüents evidenciant la presència d'ADN fetal en totes elles mitjançant l'amplificació del gen RASSF1A. En el cas de la segona gestant, el resultat del genotip HPA-1a fetal és discrepant i ha quedat pendent de contrastar amb el genotip HPA-1 del nadó.

Com en el primer cas i tenint en compte que el sexe del fetus era masculí, es va amplificar el gen SRY com a marcador d'ADN fetal però malauradament no disposàvem de suficient mostra per arribar a resultats concloents.

Els resultats de la validació clínica han demostrat una alta sensibilitat i especificitat de la tècnica. Tot i així, en aquest estudi ha faltat més casuística per a l'anàlisi de mostres de plasma de gestants HPA-1b1b portadores d'un fetus HPA-1a negatiu.

Per altra banda i per tal de preservar millor les cèl·lules maternes, prevenir la degradació dels glòbuls blancs (fet que alliberaria ADN matern) i estendre el termini per al processament del plasma es van provar els tubs Cell-Free DNA™ BCT (Streck BCTs) [Fernando, et al., 2010; Wong, et al., 2013], ja que estan tractats amb agents estabilitzants per evitar la degradació de les cèl·lules maternes i inhibir les nucleases. Per avaluar aquests tubs es va realitzar una extracció de sang d'una gestant a setmana 20 de la gestació i es recollir sang total en tubs STRECK i tubs EDTA. Es va procedir a la separació de plasma a les 48h, a +5 dies i +9 dies posteriors a l'extracció. No es van obtenir diferències significatives en quant a la quantificació de la concentració total d'ADN en plasma matern.

Quantificació de l'ADN de plasma

Existeix una alta variabilitat en la concentració total d'ADN present en plasma matern. La presència d'un possible excés d'ADN matern en les mostres corresponents a setmanes de gestació més avançades podria interferir en l'especificitat de l'assaig (fenòmen ja descrit per altres grups en l'anàlisi d'altres SNPs de grup sanguini) mostrant falsos positius. Per aquest motiu, es va quantificar l'ADN total extret de plasma mitjançant l'amplificació del gen CCR5 per PCR a temps real utilitzant una recta patró construïda amb un ADN de concentració coneguda. Els resultats mostren una alta variabilitat en la concentració total d'ADN en plasma matern en les diferents setmanes de gestació: de 2ng/ml a 900ng/ml, tot i que no és lo habitual i s'ha trobat en poques mostres una concentració tan elevada corresponent a l'ordre de 800-900ng/ml. La concentració estàndard es troba entre 2-30ng/ml. Les fluctuacions en quant a la concentració total d'ADN en plasma de les diferents gestants es pot deure no només a la variabilitat interindividual de la concentració d'ADN en plasma sinó també a l'estat de la gestació en aquell moment (condicions fisiològiques i patològiques).

Incorporació d'uns marcadors d'ADN fetal

Per tal d'evidenciar la presència d'ADN fetal en l'assaig, es van avaluar dos marcadors: el gen SRY i el gen RASSF1A.

Per intentar determinar en el mateix assaig el genotip HPA-1a fetal i el gen SRY (com a marcador de fetus masculins), es van realitzar proves per multiplexar aquestes dues reaccions d'amplificació sota les mateixes condicions de ciclat (temperatura d'*annealing* 64°C) però no es van obtenir resultats satisfactoris, així que per avaluar aquest marcador s'ha d'aplicar el protocol estàndard a una T°C d'*annealing* de 60°C en PCR uniplex.

Per altra banda es va avaluar el marcador universal epigenètic d'ADN fetal RASSF1A per incorporar-lo com a control intern en les determinacions de genotip de grup sanguini fetal a partir del l'ADN de plasma. Es va seguir el protocol descrit per Chan i col·laboradors [Chan, et al., 2006] i de les mostres analitzades es va obtenir un patró d'amplificació concloent. El gen RASSF1A és un marcador molt útil per evidenciar la presència d'ADN fetal en plasma matern en gestants portadores tan de fetus femenins com de masculins. D'aquesta manera i especialment en els casos de genotipatge de fetus femenins en què no es pot utilitzar el marcador SRY ajudaria a la interpretació dels resultats confirmant la presència d'ADN fetal en la mostra. És a dir, que en el context de gestants portadores de fetus femenins en que s'obtingués un resultat negatiu del genotipatge fetal per a un determinat marcador (exemple: RHD) evitaria errades en la interpretació dels resultats (falsos negatius), ja que podria haver-se donat per la baixa sensibilitat de la tècnica degut a l'escassa concentració inicial d'ADN fetal present en plasma.

La utilització del marcador SRY per a la determinació del sexe fetal és un protocol que està estandarditzat en la rutina del laboratori però l'assaig RASSF1A s'ha avaluat amb poques mostres (protocol descrit en la bibliografia) per implementar-lo en rutina.

VIII.2. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

L'interès per a desenvolupar un protocol de DGP per a la prevenció de la TFNA sorgeix davant la problemàtica d'aquelles dones al·loimmunitzades, amb un marit heterozigot HPA-1a1b, amb antecedents de TFNA greu en un fill anterior i amb un alt risc de repetir el quadre clínic en una segona gestació. Tot i que actualment la tendència és evitar els procediments invasius emprats anteriorment i es camina més cap a un consens de tractament i maneig estratificant el risc en base als antecedents, encara hi ha excepcions i qualsevol de les opcions terapèutiques no garanteix el 100% la possibilitat de que es torni a donar una TFNA greu.

En aquest sentit, i coincidint amb els avenços tecnològics que permeten genotipar a partir d'una sola cèl·lula en el context de malalties monogèniques, es va plantejar des del laboratori d'Immunohematologia del Banc de Sang i Teixits (laboratori de

referència per al diagnòstic d'aquest quadre clínic) la possibilitat de posar a punt un protocol de diagnòstic genètic preimplantacional per a oferir una alternativa a aquestes parelles, en les que després d'haver esgotat totes les possibilitats terapèutiques, es podrien beneficiar d'aquest últim recurs per a concebre un fill sa. Per a emprendre el desenvolupament i la validació d'aquest protocol es va establir una col·laboració amb laboratori d'embriologia de la Fundació Puigvert.

En el camp del DGP existeixen diferents metodologies aplicades a malalties monogenètiques, entre les quals es troba la PCR a temps real, tècnica que aplicada al diagnòstic és amb la que tenim més experiència en el nostre laboratori. Tot i així, és molt important i necessari complementar la determinació de l'SNP HPA-1 amb l'anàlisi de marcadors polimòrfics adjacents al gen. Aquests marcadors són molt útils per detectar possibles contaminacions amb ADN extern i per confirmar el resultat de genotip HPA-1 de l'embrió. Malgrat que lo idoni es que siguin marcadors tetranucleòtids, la majoria dels STRs que es van seleccionar eren dinucleòtids perquè precisament dels tetra- no es van obtenir bons resultats i es van descartar. La localització cromosòmica d'aquests marcadors pròxima entre ells i en relació amb el gen ITGB3 permet augmentar la probabilitat de que s'heretin conjuntament. S'estima que amb una distància d'1Mb hi ha 1% de recombinació, així doncs, i segons la distància del marcador més allunyat del panell de STRs disponible respecte el gen ITGB3 (3Mb), acceptem un risc teòric d'un 3% de recombinació. Afortunadament, hi ha un marcador intragènic que és molt informatiu i permetrà establir el lligament entre el polimorfisme HPA-1a/b i els al·lels en aquest locus. Un cop identificada la bateria de STRs disponibles per l'estudi es va seleccionar un subgrup de STRs en base a l'eficiència i a la reproducibilitat en la seva amplificació i detecció.

Estudi d'informativitat

Per tal d'avaluar la utilitat pràctica d'aquests marcadors microsatèl·lits en el context d'aplicació del nostre protocol de DGP, es va dur a terme un estudi d'informativitat d'aquests STRs en 10 famílies corresponents a casos de TFNA prèviament diagnosticats en el laboratori d'Immunohematologia. Aquests 10 casos familiars corresponen tots ells a parelles en les que la mare presenta genotip HPA-1b1b i anticossos anti-HPA-1a en el sèrum i el pare és heterozigot HPA-1a1b. En la majoria dels casos es disposava també de mostra del nadó afecte de TNA (genotip HPA-1a1b, prèviament identificat), tot i que no es tenia ADN disponible de tots ells.

En aquest estudi es va incloure l'anàlisi de tots els STRs del subgrup seleccionat.

Resultats de l'estudi d'informativitat

Aquells loci microsatèl·lit amb resultat heterozigot en el pare i que els 2 al·lels paterns no coincidissin amb el genotip de la mare, eren considerats informatius en el context d'aquell estudi familiar. Quan el pare i la mare comparteixen 1 dels al·lels, però el genotip del nadó mostra que ha heretat l'al·lel no compartit d'algun dels dos progenitors, també es considera un marcador informatiu. Quan en aquest últim escenari, no es disposava de mostra del nadó afecte, el marcador microsatèl·lit es considerava potencialment informatiu.

Tots els marcadors analitzats han resultat informatius en alguna de les famílies com a mínim, tal com es pot veure en la Taula 35, tot i que alguns d'ells destacaven per la seva informativitat.

L'anàlisi del marcador de l'intró 6 en el conjunt de les 10 famílies estudiades ha posat de manifest un cert desequilibri de lligament entre l'al·lel 192 d'aquest marcador i el polimorfisme HPA-1a (patern).

Curiosament, del marcador D17S1827, hem arribat a detectar fins a 13 al·lels diferents, quan en la descripció original constaven 11.

Qualsevol d'aquests marcadors pot ser d'utilitat en el pre-anàlisi d'una parella candidata a sotmetre's al protocol de PGD, i en aquest sentit, les condicions per a la seva amplificació i anàlisi han estat establertes. No obstant això, per a dur a terme l'estudi de validació amb cèl·lules embrionàries, es va acotar el nombre de microsatèl·lits que serien co-analitzats paral·lelament al polimorfisme HPA-1a/1b d'interès. De tot el panell de STRs, es va acotar l'anàlisi a tres dels marcadors microsatèl·lit: un flanquejant l'extrem 5' del gen ITGB3, un altre flanquejant l'extrem 3' i un d'intragènic.

Com a primer pas per al desenvolupament del protocol de DGP, es va abordar la detecció del polimorfisme HPA-1a/1b mitjançant PCR a temps real. Proves preliminars realitzades en el laboratori indicaven que aquesta aproximació tenia una sensibilitat i una especificitat elevades. Atès que el material de partida es una única cèl·lula, i que aquest ha de rendir no només per a l'anàlisi del SNP HPA-1, sinó també per a co-analitzar els marcadors microsatèl·lit adjacents, es va intentar com a primera aproximació una amplificació en dos passos: un primer pas (en el que potencialment es podria multiplexar la PCR del locus HPA-1 amb la PCR dels STRs) i un segon pas de PCR a temps real utilitzant *primers* interns del gen ITGB3 i dues sondes específiques per cadascuna de les variants HPA-1.

Donada la dificultat per la multiplexació eficient dels diferents loci d'interès, es va valorar la possibilitat d'aplicar el mètode de MDA com a alternativa, ja que permetia

la preamplificació total del genoma sense alterar la composició genètica. L'aplicació recent de la tècnica de MDA en protocols de DGP, tot i que es té menys experiència comparada amb altres estratègies, suposa una simplificació del protocol. L'amplificació total del genoma a partir de l'ADN d'una sola cèl·lula permet obtenir una gran concentració de material genètic de partida per analitzar múltiples loci en una segona ronda d'amplificació, sense que la quantitat d'ADN inicial sigui un factor limitant.

Malgrat que un dels inconvenients més rellevants de l'estratègia de MDA és l'elevada incidència d'ADO (una mitjana del 25%, una incidència de 3-5 vegades més alta que els protocols basats en PCR), una dada descrita en la segona edició del llibre "Molecular Diagnostics" [Patrinos and Ansorge, 2010], es va considerar que aquest efecte negatiu quedava contrarestat amb l'anàlisi dels 7 marcadors microsatèl·lits disponibles, una bateria de STRs prou àmplia per a obtenir un diagnòstic fiable. Finalment, considerant les possibles avantatges que suposa l'aplicació d'aquest mètode més la combinació dels diferents marcadors STRs i la innovació que representa l'aplicació del MDA en protocols de DGP es va optar per aquesta estratègia.

Es va posar a punt el primer pas d'amplificació mitjançant MDA, seguint com condicions basals les descrites en la referència de Kumar i col·laboradors [Kumar, et al., 2008], en la que aplicaven el mètode MDA a una sola cèl·lula.

En la nostra experiència, aquesta preamplificació ha funcionat de forma eficient en tots els casos excepte en 4 cèl·lules, en les que no es va visualitzar producte amplificat i que no es van incloure en l'estudi de validació. Una possible explicació de que no s'hagués produït la reacció seria la manca de nucli del blastòmer aïllat o bé la pèrdua de la cèl·lula durant el procés de manipulació.

L'anàlisi en paral·lel de controls negatius és d'especial importància per a detectar possibles contaminacions, en cas de que es produïssin, i evitar errors en la interpretació dels resultats. No obstant, en el nostre estudi hem detectat producte artefacte del MDA en aproximadament un 30% dels controls negatius, un fenomen descrit en la literatura [patent nº US20040248105 A1, 2004: "Method of whole genome amplification with reduced artifact production"]. L'ADN artefacte generat durant la reacció de MDA està produït principalment pels *random primers* hexàmers i l'activitat de l'enzim Phi29 ADN polimerasa que està afavorida per la baixa temperatura en que té lloc la reacció isotèrmica (30°C). Tot i que a priori la presència d'ADN artefacte en les reaccions control sembla un motiu per a desestimar l'estratègia, en cap cas la generació d'artefactes ens va interferir en els resultats, ja que en els anàlisi subsegüents no es detectava producte amplificat.

Després del pas de preamplificació per MDA, es van analitzar per un costat, el locus HPA-1 per PCR a temps real (utilitzant els *primers* interns) i, en paral·lel, els diferents marcadors microsatèl·lit per PCR convencional utilitzant *primers* fluorescents per a la visualització posterior de l'amplicó per electroforesi capil·lar. En aquesta etapa es va optimitzar el nombre de cicles d'amplificació i la quantitat de producte de MDA òptim per aquestes PCRs subsegüents.

Estudi de validació

Un cop optimitzada la metodologia, es va dur a terme un estudi de validació en col·laboració amb la Fundació Puigvert. Aquest estudi es va portar a terme utilitzant blastòmers enlloc d'altres tipus cel·lulars, com limfòcits o cèl·lules de mucosa bucal, gràcies a la possibilitat d'accedir en el laboratori d'embriologia de la Fundació Puigvert a embrions descartats per a la seva transferència.

En aquest sentit, la validació s'ha fet amb cèl·lules equivalents a les que s'utilitzaran en un cas real, i s'ha pogut obviar els possibles problemes derivats de l'estat semiapoptòtic de cèl·lules de descamació de mucosa bucal.

Per poder avaluar els resultats obtinguts en l'anàlisi de blastòmers, tant de tipatge HPA-1 com dels loci microsatèl·lit, i poder valorar la incidència d'ADO, es va determinar prèviament el genotip HPA-1 i el perfil al·lèlic per a cada STR de totes les parelles que participaven en l'estudi.

Donada la baixa freqüència de l'al·lel 1b respecte de l'1a, se'ns plantejava la dificultat de disposar de parelles amb, com a mínim, un dels dos progenitors heterozigot. Afortunadament, vam tenir sort en les parelles incloses en l'estudi perquè 8 de les 13 parelles tenien aquestes característiques.

Per a l'estudi de validació, es van seleccionar 3 loci (2 extragènics i un intragènic) de tot el panell, per a acotar les dianes d'anàlisi simultani en el protocol de PGD. Es van seleccionar aquest tres, per la localització cromosòmica, per les condicions d'amplificació i per la seva informativitat (valorada segons l'estudi prèviament realitzat). En aquest sentit, cal dir que el marcador D17S1183, tot i no ser el que semblava més informatiu en aquell estudi, sí que es va incloure perquè les condicions per a la seva amplificació coincidien amb les del marcador intragènic i es va considerar convenient d'avaluar la seva inclusió en l'estudi de validació. Finalment i després de genotipar a tots els progenitors vam trobar que dels 26 individus (13 parelles), 17 eren heterozigots pel locus D17S1183, 18 eren heterozigots pel dinucleòtid de l'intró 6 i 23 eren heterozigots pel locus D17S806, així que són microsatèl·lits força informatius.

En qualsevol cas, la bateria més amplia de marcadors microsatèl·lit seleccionats inicialment pot arribar a ser d'utilitat en un escenari real en el que s'analitzés el perfil al·lèlic dels dos progenitors en tots aquests loci i es seleccionessin els més informatius per cada parella. Aquests s'analitzarien aleshores, junt amb el genotip HPA-1 de cada embrió, en l'anàlisi dels diferents blastòmers.

Resultats de l'estudi de validació

Tal com ja s'ha comentat i es va fer durant la optimització del protocol, en l'estudi de validació es van analitzar en paral·lel als blastòmers controls negatius recollits en cada tanda d'obtenció de les cèl·lules embrionàries. Aquests controls són molt importants en el context d'utilitzar blastòmers biopsiats, ja que corresponen al tampó on es troben resuspendos els embrions. En aquest sentit, la incidència de resultats no concloents per sospita de contaminació ha estat mínima (3 de 51 blastòmers analitzats).

En la totalitat de les cèl·lules s'ha visualitzat producte de MDA. Només en una d'elles (12), malgrat l'evidència de producte MDA, no es va obtenir producte d'amplificació dels diferents loci en el pas subsegüent. En tots els altres casos, l'anàlisi del genotip HPA-1 i del perfil al·lèlic pels diferents microsatèl·lits, es va poder realitzar de forma satisfactòria.

Coneixent el genotip dels progenitors per a cada locus, s'ha pogut analitzar la concordança dels resultats obtinguts en els blastòmers i això ens ha permès d'estimar la incidència del ADO (veure l'apartat VII.2.4.1.3) en el conjunt del nostre estudi de validació. Malgrat que l'ADO calculat individualment per a cada locus és prou significatiu, i això concorda en certa manera amb *reports* previs, el coanàlisi dels tres marcadors polimòrfics en paral·lel amb el locus HPA-1 ha permès d'obtenir resultats concloents en 44 dels 51 casos (tots menys 7 blastòmers), entre els quals hi ha 11 casos en que el resultat de genotip HPA del blastòmer era concordant a priori però no es podia excloure que s'hagués produït ADO, tot i que els locus STRs haguessin sigut informatius per evidenciar-ho en cas de que s'hagués produït. Tots els STRs han ajudat a identificar l'evidència d'efecte ADO com a advertència per a evitar un diagnòstic erroni.

En conjunt, els resultats obtinguts són prou satisfactoris per a encoratjar la seva aplicació en casos reals.

Modificació del protocol incorporant *primers* específics

Donada la incidència d'ADO, tenint en compte que aquest fenomen és avui en dia la principal preocupació i punt feble dels protocols de DGP, es va intentar d'implementar una modificació descrita en la patent : "Target oriented whole

genome amplification of nucleic acids" WO 2008/051928 A2. del protocol de preamplificació per MDA. El fonament es basa en afegir *primers* octàmers específics a la barreja de *primers* hexàmers del kit *illustra GenomiPhi V2* (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA) per afavorir l'amplificació del locus HPA-1 i del microsatèl·lit [CA]_n de l'intró 6 del gen ITGB3 i minimitzar així l'efecte ADO. Hem dut a terme una avaluació d'aquest protocol amb 10 cèl·lules, de manera que la mostra no és prou gran per treure resultats estadísticament significatius. Les dues parelles que van cedir els embrions per l'estudi eren HPA-1a homozigots, així que no es va poder avaluar l'efecte ADO per aquest locus. En el cas de l'anàlisi del dinucleòtid [CA]_n de l'intró 6 es va evidenciar efecte ADO en dos cèl·lules (20%), però són pocs blastòmers per treure conclusions i, per altra banda, caldria treballar més en aquest protocol per ajustar adequadament les concentracions dels *primers* octàmers específics i donar una oportunitat a aquesta estratègia que sembla prometedora a l'hora de reduir l'efecte ADO.

Tot i que ha sigut una experiència molt limitada, obre una porta a una possible millora del protocol desenvolupat.

Perspectiva de futur

El diagnòstic genètic preimplantacional aplicat a la TFNA va adreçat a aquelles parelles en que la mare és homozigota per l'al·lel HPA-1b i el pare és heterozigot HPA-1a1b, que ja tenen un fill afecte anterior de TFNA i que, per tant, tenen un 50% de possibilitats d'engendrar un segon fill amb la incompatibilitat HPA-1a plaquetar.

El marc legal permet aplicar el protocol de PGD descrit en aquest treball a les parelles que es trobin amb aquesta problemàtica. En aquests casos es farà una avaluació prèvia de cada cas i es disposarà del genotip de la parella i del fill afecte anterior, tant pel sistema HPA-1 com pels STRs.

Fins a dia d'avui, no s'ha aplicat cap protocol de diagnòstic genètic preimplantacional a una parella amb antecedents greus de TFNA. La implementació d'aquest protocol impulsat pel laboratori d'Immunohematologia del BST representarà, com a Laboratori de Referència, un gran pas endavant per oferir una alternativa a aquestes parelles que es troben en aquest context. En aquest sentit, és necessari establir una relació amb un laboratori de reproducció assistida per aplicar aquest protocol en centres adequats, especialitzats i acreditats amb la infraestructura que es requereix en aquest àmbit del diagnòstic.

IX. CONCLUSIONS

- ❖ El protocol de diagnòstic genètic prenatal desenvolupat ha estat validat amb una alta sensibilitat per al genotipatge HPA-1a fetal a partir de plasma matern.
- ❖ Tot i que els controls negatius de mostres de dones HPA-1b1b no embarassades han mostrat una alta especificitat en l'assaig, no s'ha pogut avaluar en gestacions reals perquè en l'estudi de validació no s'ha pogut disposar de mostres de plasmes de gestants portadores de fetus HPA-1b1b.
- ❖ S'han avaluat estratègies alternatives (PNAs, LNA, enzims de restricció) per posar a punt el protocol de diagnòstic genètic prenatal definitiu però han estat desestimades per la baixa especificitat de les diferents tècniques en aquest context.
- ❖ La inclusió de marcadors d'ADN fetal en tècniques de genotipatge fetal és molt útil i necessària per a evidenciar la presència d'ADN fetal.
- ❖ S'ha avaluat i demostrat l'eficiència, sensibilitat i reproduïbilitat del mètode descrit per Chan i col·laboradors per a detectar el marcador RASSF1A com a marcador epigenètic, utilitzant mostres d'ADN de plasma de gestants, prèviament estudiades pel gen RHD o pel gen SRY.
- ❖ El protocol de DGP que desenvolupat durant aquest treball ha estat validat i és fiable per a la detecció i transferència d'embrions HPA-1a negatiu, per evitar així la incompatibilitat fetomaterna per aquest antigen.
Tot i que obtenim una incidència d'ADO del 17.8% pel sistema HPA-1, es conclou que l'estratègia en conjunt, complementada amb el co-anàlisi dels loci microsatèl·lit, ens permetria donar un diagnòstic fiable i detectar els falsos negatius.
- ❖ L'anàlisi i la disponibilitat de set marcadors microsatèl·lit polimòrfics adjacents al gen ITGB3 permet confirmar el genotip HPA-1 de l'embrió, detectar el fenomen d'ADO i detectar possibles contaminacions amb ADN extern de forma segura.
- ❖ La tècnica de MDA permet simplificar els protocols de DGP obtenint un producte preamplificat de tot el genoma per a l'estudi subsegüent de múltiples loci d'interès, sense que la quantitat d'ADN inicial sigui un factor limitant.
- ❖ La modificació del protocol de diagnòstic genètic preimplantacional afegint *primers* octàmers específics en el mètode MDA és una possibilitat poc

explorada en aquest treball però obre una porta per a reduir l'incidència d'ADO en els protocols de DGP.

X. ANNEXOS

PROTOCOL D'ACTUACIÓ EN GESTANTS AMB ANTECEDENTS DE TROMBOCITOPÈNIA FETAL / NEONATAL AL·LOIMMUNE (TFNA)

Dr. Eduardo Muñoz-Díaz

Dra. Núria Nogués.

Dra. Carmen Canals

Laboratori d'Immunohematologia

Banc de Sang i Teixits. Barcelona.

Dr Manel Casellas

Servei de Ginecologia i Obstetrícia

Hospital Materno-Infantil de la Vall de Hebrón. Barcelona.

Dr Juan Parra

Servei de Ginecologia i Obstetrícia

Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Desembre-2011

Introducció

La trombopènia fetal-neonatal al·loimmune (TFNA) es produeix per la destrucció de les plaquetes del fetus induïda per anticossos produïts per la mare que van dirigits contra antigens plaquetaris d'origen patern. És una eventualitat que té lloc aproximadament en 1 de cada 1.000 naixements, i és la causa més freqüent de trombopènia greu en fetus i nounats. La TFNA és el resultat de l'existència d'una incompatibilitat materno-fetal en els antigens plaquetaris (HPA; *Human Platelet Antigens*) i de la sensibilització de la gestant que produeix anticossos anti-HPA de tipus IgG, que travessen la barrera placentària. La TFNA seria, doncs, una situació homologable a la malaltia hemolítica del fetus i nounat per incompatibilitat Rh (D), però, a diferència d'aquesta, es pot produir en un 30-50% de casos en la 1^a gestació. Tot i que el grau de trombopènia és variable, la TFNA pot ser potencialment molt greu (<20.000 plaquetes/ μ L), comportant un risc d'hemorràgia intracranial (HIC) en un 10-30% de casos. Més del 50% de HIC es produeixen durant la vida intrauterina, habitualment entre les 30 i 35 setmanes de gestació, però, a vegades, tant prematurament com a les 20 setmanes de gestació.

La majoria de TFNA son degudes a una al·loimmunització enfront l'antigen HPA-1a. En l'Annex 1 es mostren els sistemes HPA més rellevants per aquesta patologia, la seva localització en les diferents glicoproteïnes de la membrana plaquetar i la freqüència de cada antigen en la població caucàsica. Menys d'un 3% d'aquesta població és HPA-1a negatiu (HPA1b1b) mentre que més del 97% és HPA-1a positiu (HPA1a1a o HPA1a1b). L'al·loimmunització enfront l'antigen HPA-1a és la causa en més del 75% dels casos de TFNA descrits. Amb una freqüència menor, la causa és una immunització enfront els antigens HPA-5b o HPA-15b, o d'altres. Tot i que existeix una incompatibilitat per l'antigen HPA-1a aproximadament en una de cada 350 gestacions, només en 1:1.000 naixements es produeix una trombopènia. La capacitat d'al·loimmunitzar-se enfront l'antigen HPA-1a en las gestants

HPA-1a negatiu està molt lligada al sistema HLA; les dones HLA DRB3*0101 positiu tenen un risc molt superior de sensibilitzar-se que aquelles que no tenen aquest al·lel HLA. Entre un 25 i un 30% de dones HPA1b1b DRB3*0101 es sensibilitzen, mentre que el risc per les dones que no tenen aquest al·lel es inferior al 2 %.

Les gestants immunitzades amb anticossos anti-HPA i amb antecedents de TFNA en una gestació anterior, presenten un risc molt elevat de recidiva, que pot arribar a més del 95% en els casos més greus. D'altra banda, s'ha observat també que en les successives gestacions, la gravetat de la trombopènia tendeix a augmentar. Aquestes evidències justifiquen el plantejar un tractament preventiu en les gestants amb antecedents de TFNA, i molt especialment en aquells casos en que es va produir una HIC en el fetus/nadó. El tractament òptim per aquestes pacients és encara un tema controvertit. Una possible aproximació consisteix en l'administració a la gestant de dosis altes d'immunoglobulines (Igs) e.v. i/o corticoides. Una aproximació alternativa a aquesta, consisteix en realitzar transfusions intrauterines setmanals de plaquetes compatibles. Aquesta darrera opció, que ha estat també utilitzada amb èxit en alguns casos, és una teràpia invasiva amb molts riscos associats. La tendència actual és evitar, d'entrada, les cordocentesi i donar a la gestant un tractament adaptat al grau de risc en cada cas. En general, és aconsellable programar el part per cesària, planificant-la al voltant de la setmana 34 a 37 segons el cas, tenint preparades plaquetes compatibles, per si el nounat precisa ser transfós. El Banc de Sang i Teixits (BST) disposa d'un panell de donants de plaquetes tipificats, per poder subministrar unitats antígen negatiu, que siguin compatibles amb el sèrum de la mare en cada cas.

Proposem un protocol pel maneig de les gestants amb antecedents de TFNA, al·loimmunitzades enfront l'antigen HPA-1a o d'altres especificitats, en que l'actuació s'adaptarà al grau de risc en cada

cas. Per valorar el grau de risc s'han de tenir en consideració una sèrie de factors, sent els més importants la gravetat de la trombopènia en la gestació anterior i el desenvolupament, o no, d'una HIC en el fetus. El seguiment del títol d'anticossos anti-HPA aporta informació de l'evolució del cas i pot ser d'interès per modificar l'actitud terapèutica en alguns casos, tot i que no sempre existeix una correlació entre el títol de l'anticòs en el sèrum de la gestant i el grau de trombopènia en el fetus. D'altra banda, l'especificitat implicada també ajuda a valorar el grau de risc del cas. En general, una sensibilització enfront dels antigens HPA-1a i/o HPA-3a s'associa a un major risc de trombopènia greu i complicacions hemorràgiques. Les incompatibilitats en els sistemes HPA-5 i HPA-15 són més rarament causa de trombopènies greus.

- ❖ **L'actitud a adoptar en gestants** amb antecedents d'haver induït trombopènia fetal/neonatal en una gestació anterior, en les que es va sospitar una causa al·loimmune, però **en que els estudis no van detectar anticossos anti-HPA** en la mare, s'individualitzarà en funció de la incompatibilitat existent i del grau de gravetat clínica del cas anterior. Si es tracta de gestants HPA1b1b, es recomanarà sempre la determinació del DRB3*0101, per avaluar el grau de risc de sensibilització. En tots els casos es realitzaran controls periòdics, sol·licitant una investigació d'al·loanticossos antiplaquetaris per estudiar una possible sensibilització.

- ❖ **El protocol proposat a continuació està dirigit al maneig de les gestants amb antecedents de TFNA, en les que existeix una al·loimmunització enfront l'antigen HPA1a o d'altres especificitats.** En cas que la parella sigui heterozigota pel sistema HPA implicat, es confirmarà l'existència de la incompatibilitat entre la mare i el fetus en la gestació actual. En cas de confirmar-se la incompatibilitat, la gestant entrarà en el protocol. En tot els casos,

abans d'administrar cap tractament a la gestant, aquesta signarà un consentiment informat.

El protocol proposa unes mesures terapèutiques inicials per cada grup de risc, així com uns controls periòdics a les gestants. En funció de l'evolució, l'obstetra i l'hematòleg valoraran, de forma individualitzada, la necessitat d'intensificar el tractament o la conveniència de practicar una cordocentesi per conèixer el grau de trombopènia fetal.

--- Protocol d'actuació en les gestants sensibilitzades amb antecedents de TFNA ---

1. Consideracions generals:

1.1. Confirmar l'existència d'incompatibilitat materno-fetal en la gestació actual si el pare és heterozigot pel sistema HPA implicat:

Per evitar l'administració de tractaments innecessaris, es recomanarà confirmar sempre la incompatibilitat abans de començar el tractament, sobretot en els casos amb antecedents de trombopènia greu (<50.000 plaquetes/ μ L) en el fetus anterior.

1.1.1. Incompatibilitat HPA-1a: en gestants HPA1b1b amb una parella 1a1b, es pot sol·licitar al Laboratori d'Immunohematologia del BST, la tipificació **HPA-1a fetal en plasma matern**. Aquesta determinació permetrà conèixer si el fetus és portador o no de l'antigen HPA-1a evitant tècniques invasives, com l'amniocentesi o la biòpsia de còrion. La determinació del genotip HPA1a fetal en plasma matern es

podrà realitzar en aquestes gestants entre la setmana 16 i 18 de gestació.

1.1.2. Altres incompatibilitats: S'aconsellarà a la pacient fer una **amniocentesi**, entre la setmana 16 i 18 de gestació, per estudiar el genotip plaquetar del fetus.

En aquells casos en que la gravetat dels antecedents en gestacions anteriors o altres circumstàncies ho justifiquin, es pot plantejar el realitzar una **biòpsia de còrion**, per conèixer més precoçment el genotip plaquetar del fetus.

Si l'antecedent és d'una trombopènia moderada, no inferior a 50.000 plaquetes/ μ L, es valorarà el risc/benefici de fer o no l'amniocentesi o administrar el tractament sense confirmar la incompatibilitat.

1.2. Consentiment informat:

Abans d'iniciar cap tractament, les gestants hauran de signar en tots els casos un *Consentiment Informat*, després d'haver rebut la corresponent informació per part del seu metge. Veure Annex 2.

1.3. Controls analítics al Laboratori d'Immunoematologia:

Es farà una determinació del títol d'anticossos abans d'iniciar el tractament, i un seguiment periòdic del títol. Veure Annex 3.

1.4. Coordinació entre els Serveis d'Obstetrícia i el BST per disposar de donants de plaquetes compatibles:

Es notificarà al Laboratori d'Immunoematologia del BST el dia en que es programa la cesària, com a mínim amb una setmana d'antelació, per

a poder citar donants de plaquetes compatibles. Així mateix, es notificarà com a mínim amb una setmana d'antelació, en el cas que es programi una cordocentesi.

2. Tractament i maneig de la gestant en funció del grup de risc:

Es consideraran els següents grups de risc en funció dels antecedents d'hemorràgia intracranial (HIC) i del grau de trombopènia en el fetus anterior:

- **2.1.** Gestants amb antecedents d'HIC en el fetus o nounat anterior
- **2.2.** Gestants sense antecedents d'haver induït HIC en el fetus o nounat, però sí una trombopènia greu, de < 20.000 plaquetes/ μL
- **2.3.** Gestants sense antecedents de fetus o nounats amb HIC, però sí de trombopènia entre 20.000 i 50.000 plaquetes/ μL
- **2.4.** Gestants sense antecedents d'haver induït HIC, però sí una trombopènia de > 50.000 plaquetes/ μL

2.1. Gestants amb antecedents d'HIC en el fetus anterior:

Aquest és el grup de pacients considerades de més alt risc. L'actitud en aquests casos serà la següent:

- Determinar el títol d'anticossos anti-HPA abans d'iniciar el tractament antenatal.
- A partir de la **setmana 20*** de gestació iniciar el tractament de la gestant amb Igs e.v. $1\text{gr}/\text{kg}/\text{setmana}$ i Prednisona $0.5\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$.
- Control del títol d'anticossos: 1 cop / mes

- Davant d'un augment significatiu del títol (>2 dilucions) plantejar la conveniència de practicar una cordocentesi per valorar el grau de trombopènia fetal. Si el fetus presenta una trombopènia greu (<50.000 pl/ μ L), es transfondran plaquetes compatibles i s'intensificarà el tractament a la gestant augmentant la dosi d'Igs a 2gr/kg/setmana.
- Realitzar un control ecogràfic cada mes, des de la setmana 20.
- Programar la cesària entre les **setmanes 34-36**, amb administració d'una dosi d'Igs dins les 24-48 hores prèvies.
- Comunicar sempre al BST, una setmana abans, la data de la cesària.

* Si hi ha evidència que en el fetus anterior la HIC va tenir lloc abans de la setmana 28 de gestació, iniciar el tractament amb Immunoglobulines més precoçment, a partir de la setmana 16 de gestació, afegint la prednisona a partir de la setmana 20.

2.2. Gestants sense antecedents d'HIC en el fetus anterior, però sí de trombopènia greu, de < 20.000 plaquetes/ μ L:

- Determinar el títol d'anticossos anti-HPA abans d'iniciar el tractament.
- A partir de la **setmana 20** de gestació: tractament amb Igs e.v. 1gr/kg/setmana
- Control del títol d'anticossos: 1 cop / mes
- Davant d'un augment significatiu del títol (> 2 dilucions), afegir tractament amb Prednisona 0.5mg/Kg/dia.
- Si el títol s'incrementa significativament en el següent control, plantejar la conveniència de practicar una cordocentesi. Si el fetus presenta una trombopènia greu (<50.000 pl/ μ L), es

transfondran plaquetes compatibles i s'intensificarà el tractament a la gestant augmentant la dosi d'Igs a 2gr/kg/setmana.

- Es realitzarà un control ecogràfic cada mes, des de la setmana 20.
- Programar cesària entre les **34-36 setmanes**, amb administració d'una dosi d'Igs dins les 24-48 hores prèvies.
- Comunicar sempre al BST, una setmana abans, la data de la cesària.

2.3. Gestants sense antecedents d'HIC en el fetus anterior, però amb una trombopènia al néixer entre 20.000 - 50.000 plaquetes/ μ L

- Determinar el títol d'anticossos anti-HPA abans d'iniciar el tractament.
- A partir de la **setmana 24** de gestació: tractament amb Igs e.v. 1gr/kg/setmana
- Control títol Ac: 1 cop / mes
- Davant d'un augment significatiu del títol (> 2 dilucions), afegir tractament amb Prednisona 0.5mg/Kg/dia.
- Si el títol s'incrementa significativament en el següent control, plantejar la conveniència de practicar una cordocentesi. Si el fetus presenta una trombopènia greu (<50.000 pl/ μ L), es transfondran plaquetes compatibles i s'intensificarà el tractament a la gestant augmentant la dosi d'Igs a 2gr/kg/setmana.
- Realitzar un control ecogràfic cada mes, des de la setmana 20.
- Programar cesària entre les **35-36 setmanes**, amb administració d'una dosi d'Igs dins les 24-48 hores prèvies.
- Comunicar sempre al BST, una setmana abans, la data de la cesària.

2.4. Gestants sense antecedents d'HIC en el fetus anterior, però amb una trombopènia al néixer no inferior a 50.000 plaquetes/ μ L:

- Determinar el títol d'anticossos anti-HPA abans d'iniciar el tractament.
- A partir de la **setmana 28** de gestació: tractament amb Igs e.v. 1gr/kg/setmana
- Control títol Ac: 1 cop / mes
- Davant d'un augment significatiu del títol (> 2 dilucions) afegir tractament amb Prednisona 0.5mg/Kg/dia.
- Si el títol s'incrementa significativament en el següent control, plantejar la conveniència de practicar una cordocentesi. Si el fetus presenta una trombopènia greu (<50.000 pl/ μ L), es transfondran plaquetes compatibles i s'intensificarà el tractament a la gestant augmentant la dosi d'Igs a 2gr/kg/setmana.
- Realitzar un control ecogràfic cada mes, des de la setmana 20.
- Programar cesària al voltant de la **setmana 37** de gestació, amb administració d'una dosi d' Igs dins les 24-48 hores prèvies.
- Comunicar sempre al BST, una setmana abans, la data de la cesària.

3. Recomanacions pel maneig de la TFNA en el nounat:

- En la majoria dels casos, si s'ha aconseguit una bona resposta amb el tractament antenatal de la mare, el nen no presentarà trombopènia greu al néixer. En qualsevol cas, s'aconsella monitoritzar la xifra de plaquetes durant 3 o 4 dies, ja que la trombopènia pot agreujar-se els primers dies de vida.

- Caldrà administrar una transfusió de plaquetes HPA compatibles (20 ml/Kg) sempre que la xifra de plaquetes sigui menor de 50.000// μ L
- Si el nen està trombopènic, fer una ecografia cerebral els primers dies de vida.
- En cas d'hemorràgia intracranial, o d'altres complicacions hemorràgiques importants, s'ha de transfondre amb xifres de plaquetes inferiors a 100.000/ μ L.
- Si la trombopènia és greu, administrar també al nen Igs e.v. 1g/kg/d, durant 2 dies.

- **Annex 1. Sistemes HPA (*Human Platelet Antigens*) i freqüències antigèniques en la població caucàsica.**

SISTEMA	Antígens	Glicoproteïna	Freqüència dels antígens
HPA-1	HPA 1a	GPIIIa	97.9
	HPA-1b	GPIIIa	28.8
HPA-2	HPA 2a	GPIba	>99.9
	HPA-2b	GPIba	13.2
HPA-3	HPA 3a	GPIIb	80.95
	HPA-3b	GPIIb	69.8
HPA-4	HPA 4a	GPIIIa	>99.9
	HPA-4b	GPIIIa	<0.1
HPA-5	HPA 5a	GPIa	99.0
	HPA-5b	GPIa	19.7
HPA-15	HPA 15a	CD109	74
	HPA-15b	CD109	81

Annex 2. CONSENTIMENT INFORMAT

La trombopènia és una disminució de la xifra de plaquetes circulants en la sang. Les trombopènies greus poden produir complicacions hemorràgiques que poden ser de diversa gravetat, des de petites hemorràgies cutànies fins a hemorràgies internes greus, com la hemorràgia intracranial.

La trombopènia neonatal al·loimmune és una eventualitat infreqüent, que té lloc en aproximadament 1 de cada 1.000 naixements, en que el nen presenta una trombopènia al néixer deguda a la destrucció de les plaquetes induïda per anticossos materns. Es produeix per l'existència d'una incompatibilitat materno-fetal en els antigens plaquetaris (HPA) i per la sensibilització de la mare, que produeix anticossos anti-plaquetaris, que travessen la placenta i arriben al fetus. Tot i que el grau de trombopènia és variable, pot ser potencialment molt greu (<20.000 plaquetes/ μ L), comportant un risc d'hemorràgia intracranial en un 10-30% de casos. Aquesta complicació es pot produir en el moment del part, però també pot tenir lloc en el fetus, a nivell intrauterí.

Les dones que tenen un antecedent de trombopènia fetal-neonatal al·loimmune en una gestació anterior, tenen un alt risc de recidiva en la següent gestació. Per això, és important que rebin un tractament preventiu en cas d'una nova gestació. Li proposem seguir un protocol de tractament, amb l'objectiu de disminuir la producció d'anticossos anti-plaquetaris i reduir el risc de trombopènia greu en el fetus. El tractament dependrà del grau de risc en cada cas, que es valora fonamentalment per la gravetat de la trombopènia i el desenvolupament o no d'una HIC en el fetus de la gestació anterior. El tractament es basa en l'administració d' Immunoglobuline, i en alguns casos s'associa també tractament amb Prednisona. Les pautes a seguir, dosis, temps d'administració, etc.. dependran del grau de risc de cada gestant.

Immunoglobulines

- Son components de la sang humana que s'han utilitzat pel tractament de moltes malalties infeccioses o inflamatòries, en pacients amb immunodeficiències, processos autoimmunes, i d'altres patologies, amb bons resultats.
- S'extreuen a partir de sang de molts donants sans, controlats per que no puguin transmetre cap infecció, i seguint uns processos de fabricació que garanteixen al màxim la seva seguretat. No obstant això, al ser derivats sanguinis de procedència humana, no es pot garantir el risc "0".
- L'administració és per via endovenosa i s'ha de fer a un hospital, habitualment un cop per setmana.
- En general no produeixen cap trastorn al pacient, però en alguns casos poden produir mal de cap, calfreds, nàusees i malestar general durant la infusió. Els símptomes disminueixen o desapareixen alentint la velocitat d'infusió. Algun cop poden produir febre, que s'autolimita en 24 hores. Molt més excepcionalment s'ha descrit irritació de les meninges, trastorns de la coagulació o reaccions al·lèrgiques. Els metges estudiaran i controlaran qualsevol efecte que es pugui produir

Prednisona

- És un medicament (corticosteroide) semblant a la cortisona. És un potent antiinflamatori e immunosupressor, molt utilitzat en el tractament de malalties al·lèrgiques, inflamatòries i en processos autoimmunes. És el tractament d'elecció com a fàrmac immunosupressor en gestants amb artritis reumàtica, Lupus,

etc.. en les que s'ha utilitzat sense que s'hagin produït reaccions adverses sobre la salut del fetus o del nounat.

- S'administra per via oral.
- Els efectes secundaris més freqüents durant la seva administració són: augment de la gana, irritabilitat, insomni, molèsties gàstriques, feblesa muscular, diabetis i HTA. En les gestants pot associar-se a diabetis gestacional, HTA i ruptura precoç de membranes. Els metges estudiaran i controlaran qualsevol efecte que es pugui produir durant el tractament.

Tenint en consideració els seus antecedents, el tractament que li serà administrat a vostè segons el protocol serà:

.....

.....

a partir de la setmana de gestació.

El tractament es mantindrà fins al moment del part, que serà per cesària programada al voltant de la setmana

Se li faran els controls periòdics necessaris durant tot el tractament. En funció de l'evolució, pot ser necessari modificar el tractament.

CONSENTIMENT:

Jo,
com a pacient

EXPOSO:

Que he sigut degudament INFORMADA pel Dr.....
de que es aconsellable que rebi el tractament abans especificat i que he estat informada del mateix, havent pogut aclarir qualsevol dubte plantejat.

MANIFESTO:

Que he entès les explicacions que he rebut i DONO el meu consentiment per rebre el tractament proposat, i per que així consti, signo el present document.

Signatura

Nom de la Pacient

DNI de la pacient:

....., a de de

Annex 3. Informació de les mostres que caldrà remetre al Laboratori d'Immunoematologia:

Mostres pels controls del títol d'Ac anti-HPA:

- 1 tub de 10 ml de sang sense anticoagulant (sèrum) + 1 tub EDTA de 10 ml
- Sempre que una gestant estigui rebent Ig e.v., l'extracció s'haurà de fer just abans de l'administració d'una dosi de Ig.
- Enviar al Laboratori d'Immunoematologia a l'adreça:

Laboratori d'Immunoematologia

Banc de Sang i Teixits

Edifici Doctor Frederic Duran i Jordà

Passeig Taulat, 116

08005 Barcelona

Els telèfons de contacte són:

BST : 93 557 35 00

Extensions

Dr Muñiz: 6650

Dra Nogués: 6652

Dra Canals: 6653

Les adreces de correu:

emuniz@bst.cat

nnogues@bst.cat

ccanals@bst.cat

Referències

1. Nomenclature of human platelet antigens. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH et al. *Vox Sang*. 2003;85:240-245.
2. Diagnostic evaluation of FNAIT. E. Muñoz-Diaz ISBT Science Series. 2007;2:48-55.
3. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Arnold DM, Smith JW, Kelton JG. *Transfus Med Rev*. 2008;22(4):255-67.
4. Frequencies of maternal platelet alloantibodies and autoantibodies in suspected fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia, with emphasis on human platelet antigen-15 alloimmunization. Mandelbaum M, Koren D, Eichelberger B et al. *Vox Sang*. 2005;89(1):39-43.
5. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Ghevaert C, Campbell K, Walton J et al. *Transfusion*. 2007;47:901-910.
6. Will it ever be possible to balance the risk of intracranial haemorrhage in fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia against the risk of treatment strategies to prevent it? C. M. Radder, A. Brand & H. H. H. Kanhai. *Vox Sanguinis*. 2003;84:318-325.
7. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh et al. *Haematologica*. 2008;93(6):870-7.
8. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia. Bertrand G, Martageix C, Jallu V et al. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 4:628-637.
9. European collaborative study of the antenatal management of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Birchall JE, Murphy MF, Kaplan et al. European Fetomaternal Alloimmune Thrombocytopenia Study Group. *Br J Haematol*. 2003;122(2):275-88.
10. Antenatal interventions for fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Rayment R, Brunskill SJ, Soothill PW et al. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;1. CD004226. DOI:10.1002/14651858.CD004226.pub2

11. Antenatal management of alloimmune thrombocytopenia with intravenous gamma-globulin: A randomized trial of the addition of low-dose steroid to intravenous gamma-globulin James B. Bussel MD, Richard L. Berkowitz MD et al. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1996;174(5):1414-23.
12. Parallel randomized trials of risk-based therapy for fetal alloimmune thrombocytopenia. Berkowitz RL, Kolb EA, McFarland JG et al. *Obstet Gynecol*. 2006;107(1):91-6.
13. Management of alloimmune thrombocytopenia. International Forum. *Vox Sang*. 2007;93 (4):370-85.
14. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates James B. Bussel, Andrea Primiani. *Blood Reviews*. 2008;22:33-52.
15. Intracranial hemorrhage in alloimmune thrombocytopenia: stratified management to prevent recurrence in the subsequent affected fetus. James B. Bussel MD, Richard L. Berkowitz MD et al. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2010;203:1-14.
16. Fetal alloimmune thrombocytopenia: is less invasive antenatal management safe? Agnes Mechoulan, Cecile Kaplan, Jean Yves Muller et al. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2010; on line publication 1-4
17. Prediction of the fetal status in noninvasive management of alloimmune thrombocytopenia. Gerald Bertrand, Moustapha Drame, Corine Martageix and Cecile Kaplan. *Blood*. 2011; 117:3209-3213.
18. Immunosuppressive drug use in pregnancy. Petri M. *Autoimmunity*. 2003;36(1):51-6.
19. The effects of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy, and lactation. Janssen NM, Genta MS. *Arch Intern Med*. 2000;160(5):610-19.
20. Intravenous Immunoglobulin: An Update on the Clinical Use and Mechanisms of Action. Negi V, Elluru, S, Siberil S et al. *Journal of Clinical Immunology*. 2007;27(3):233-245.

Resum del tractament assignat inicialment segons el grup de risc.

Grup de Risc	Tractament inicial recomanat	Setmana d'inici del tractament	Cesària a la setmana
Antecedents d'HIC*	Ig e.v 1 gr/kg/setmana + PDN 0.5mg/kg/dia	Setmana 20	Setmana 34-36
* Si la HIC va tenir lloc abans de la setmana 28	Ig e.v 1 gr/kg/setmana PDN 0.5mg/kg/dia	Setmana 16 Setmana 20	Setmana 34-36
No HIC < 20.000 plaq	Ig e.v. 1gr/kg/setmana	Setmana 20	Setmana 34-36
No HIC 20.000-50.000 plaq	Ig e.v. 1gr/kg/setmana	Setmana 24	Setmana 35-36
No HIC 50.000-100.000 plaq	Ig e.v. 1gr/kg/setmana	Setmana 28	Setmana 37

XI. BIBLIOGRAFIA

Ahlen, M.T., et al., *The development of severe neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a antibodies is correlated to maternal ABO genotypes*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**:156867.

Ahmed, Y., et al., *Retrospective analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and in pre-eclampsia*. Br J Obstet Gynaecol, 1993. **100**(3): p. 216-20.

Alberry, M., et al., *Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast*. Prenat Diagn, 2007. **27**(5): p.415-8.

Albertsen, H., et al., *Genetic Mapping of the BRCA I Region on Chromosome 17q21*. Am J Hum Genet, 1994. **54**: p. 516-525.

Al-Yatama, M.K., et al., *Detection of Y chromosome-specific DNA in the plasma and urine of pregnant women using nested polymerase chain reaction*. Prenat Diagn, 2001. **21**(5): p. 399-402.

Antsaklis, A., et al., *Fetal blood sampling-indication-related losses*. Prenat Diagn, 1998. **18**(9): p. 934-40.

Applied Biosystems, *Guía de introducción Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System-Experimentos de Curva Estándar*, 2010.

Arnold, D.M., J.W. Smith and J.G. Kelton, *Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopeni*. Transfus Med Rev, 2008. **22**(4): p. 255-67.

Attwood, H.D. and W.W. Park, *Embolism to the lungs by trophoblast*. J Obstet Gynaecol Br Commonw, 1961. **68**: p. 611-7.

Babochkina, T., et al., *Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character*. Haematologica, 2005. **90**(6): p. 740-5.

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

Bennett, P.R., et al., *Potential for pre-implantation determination of human platelet antigen type using DNA amplification: a strategy for prevention of allo-immune thrombocytopenia*. Fetal Diagn Ther, 1994. **9**(4): p. 229-32.

- Bennet-Baker, P.E., et al., *Isolation of tetranucleotide repeat polymorphisms flanking the BRCA1 gene*. Genomics, 1996. **32**(1): p. 163-7.
- Béroud, C., *Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by genetic analysis of circulating fetal cells*. Lancet, 2003. **361**(9362): p. 1013-4.
- Bianchi, D.W., et al., *Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood*. Proc Natl Acad Sci USA, 1990. **87**(9): p. 3279-83.
- Bianchi, D.W., *Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis*. Br J Haematol, 1999. **105**(3): p. 574-83.
- Bianchi, D.W., et al., *PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies*. Am J Hum Genet, 1997. **61**(4): p. 822-9.
- Bianchi, D.W., *Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review*. Placenta, 2004. **25**(Suppl. A): S93-S101.
- Birch, L., et al., *Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation*. Clin Chem, 2005. **51**(2): p. 312-20.
- Bischoff, F.Z., D.E. Lewis and J.L. Simpson. *Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(1): p. 59-67.
- Blanco, L., et al., *Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 8935-40.
- Blanco, L. and M.Salas, *Relating structure to function in phi29 DNA polymerase*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8509-12.
- Bodurtha, J. and J.F. Strauss, *Genomics and perinatal care*. N Engl J Med, 2012. **366**(1): p. 64-73.
- Botezatu, I., et al., *Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism*. Clin Chem, 2000. **46**(8): p. 1078-84.
- Buscaglia, M., et al., *Percutaneous umbilical blood sampling: indication changes and procedure loss rate in a nine years' experience*. Fetal Diagn Ther, 1996. **11**(2): p. 106-13.

- Bussel, J. and C. Kaplan, *The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia*. Baillieres Clin Haematol, 1998. **11**(2): p. 391-408.
- Bussel, J.B. and A. Primiani, *Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates*. Blood Rev, 2008. **22**(1): p. 33-52.
- Bussel, J., *Diagnosis and management of the fetus and neonate with alloimmune thrombocytopenia*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(Suppl. 1): p. 253-7.
- Bussel, J.B. and A. Primiani, *Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates*. Blood Rev, 2008. **22**(1): p. 33-52.
- Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2396-402.
- Campagnoli, C., *Expandability of haemopoietic progenitors in first trimester fetal and maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis*. Prenat Diagn, 2002. **22**(6): p. 463-9.
- Cavanagh, G., et al., *HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations*. Transfus Med, 1997. **7**(1): p. 41-5.
- Chan, L.Y., et al., *Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy*. Clin Chem, 2003. **49**(4): p.678-80.
- Chan, L.Y., et al., *Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma*. Clin Chem, 2004. **50**(1): p. 88-92.
- Chan, K.C., et al., *Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis*. Clin Chem, 2006. **52**(12): p. 2211-8.
- Chim, S.S., et al., *Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14753-8.
- Chiu, R.W., et al., *Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma*. Clin Chem, 2006. **52**(2): p. 313-6.
- Chiu, R.W. and Y.M. Lo, *Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing*. Prenat Diagn, 2012. **32**(4): p. 401-6.

- Chow, M.P., et al., *Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to HLA-A2 antibody*. Acta Haematol, 1992. **87**(3): p. 153-5.
- Coskun, S. and O. Alsmadi, *Whole genome amplification from a single cell: a new era for preimplantation genetic diagnosis*. Prenat Diagn, 2007. **27**(4): p. 297-302.pag 55,56
- Denomme, G.A., *An adenine trimer precedes a C/G polymorphism in the 3'-amplimer region of the human platelet glycoprotein IIIa intron 6 CT repeat*. Hum Hered, 1998. **48**(2): p. 115-8.
- Dokras, A., *Human trophoctoderm biopsy and secretion of chorionic gonadotrophin*. Hum Reprod, 1991. **6**(10): p. 1453-9.
- Fernández-Martínez, F.J., et al., *Noninvasive fetal sex determination in maternal plasma: a prospective feasibility study*. Genet Med, 2012. **14**(1): p. 101-6.
- Fernando, M.R., et al., *A new methodology to preserve the original proportion and integrity of cell-free fetal DNA in maternal plasma during sample processing and storage*. Prenat Diagn, 2010. **30**(5): p. 418-24.
- Findlay, I., et al., *Fluorescent PCR: a new technique for PGD of sex and single-gene defects*. J. Assist Reprod Genet, 1996: **13**(2): p 96–103.
- Finning, K., et al., *Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma*. Transfusion, 2007. **47**(11): p. 2126-33.
- Guibert, J., et al., *Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique*. Hum Reprod, 2003. **18**(8): p. 1733-6.
- Gyapay, G., et al., *The 1993-94 Genethon human genetic linkage map*. Nat Genet, 1994. **7**(2 Spec No): p. 246-339.
- Hahn, S., et al., *Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia*. Placenta, 2011. **32** Suppl: S17-20.
- Hahnemann, J.M., and L.O. Vejerslev, *European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)--fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy*. Am J Med Genet, 1997. **70**(2): p. 179-87.

Handyside, A.H., et al., *Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification*. Nature, 1990. **344**(6268): p. 768-70.

Handyside, A.H., et al., *Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(10): p. 767-72.

Hardy, K., A.H. Handyside and R.M. Winston, *The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro*. Development, 1989. **107**(3): p. 597-604.

Hawes, C.S., et al., *A morphologic study of trophoblast isolated from peripheral blood of pregnant women*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **170**(5 Pt 1): p. 1297-300.

Hellani, A., et al., *Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications*. Mol Hum Reprod, 2004. **10**(11): p. 847-52.

Hellani, A., et al., *Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis*. Reprod Biomed Online, 2005. **10**(3): p. 376-80.

Herzenberg, L.A, et al., *Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**(3): p. 1453-5

Illanes, S., et al., *Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma*. Early Hum Dev, 2007. **83**(9): p. 563-6.

Ingerslev, H.J. and J. Hindkjaer, *Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching - a way to save a child*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2012. **91**(7): p.765-8.

International Human Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.

Invernizzi, P., et al., *Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy*. Hum Genet, 2002. **110**(6): p. 587-91.

Jensen, T.J., et al., *High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma*. PLoS One, 2013. **8**(3):e57381.

Kamphuis, M.M., et al., *Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review*. BJOG, 2010. **117**(11): p. 1335-43.

- Kamphuis, M.M. and D. Oepkes, *Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: prenatal interventions*. Prenat Diagn, 2011. **31**(7): p.712-9.
- Kaplan, C., *Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopaenia*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**:39.
- Kaplan, C., *Neonatal alloimmune thrombocytopenia*. Haematologica, 2008. **93**(6): p. 805-7.
- Koh, Y., et al., *The first two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with the low-frequency platelet antigen HPA-21bw (Nos) in Japan*. Transfusion, 2012. **52**(7): p. 1468-75.
- Kumar, G., et al., *Improved multiple displacement amplification with phi29 DNA polymerase for genotyping of single human cells*. Biotechniques, 2008. 44(7): p. 879-90.
- Kutyavin, I.V., et al., *3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): p. 655-61.
- Kwok, S. and R. Higuchi, *Avoiding false positives with PCR*. Nature, 1989. **339**(6221): p. 237-8.
- Lapaire, O., et al., *Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation*. Placenta, 2007. **28**(1): p. 1-5.
- Leon, S.A., et al., *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*. Cancer Res, 1977. **37**(3): p. 646-50.
- Le Toriellec, E., C. Chenet and C.Kaplan. *Safe fetal platelet genotyping: new developments*. Transfusion, 2013. **53**(8): p. 1755-62.
- Livak, K.J., *Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay*. Genet Anal, 1999. **14**(5-6): p. 143-9.
- Lo, Y.M., et al., *Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4390-5.
- Lo, Y.M., et al., *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*. Lancet, 1997. **350**(9076): p. 485-7.

- Lo, Y.M., et al., *Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(4): p. 768-75.
- Lo, Y.M., et al., *Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(4): p. 768-75.
- Lo, Y.M., et al., *Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(1): p. 218-24.
- Lo, Y.M., *Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **945**: p. 1-7.
- Lo, Y.M. and R.W. Chiu, *Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 71-7.
- Lo, Y.M. and R.W. Chiu, *Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2012. **13**: p. 285-306.
- Mamone, J.T., *A Method for Representatively Amplifying Genomic DNA*. Genomic/Proteomic Technology, 2003. Amersham Biosciences.
- Mandel, P. and P. Metais, *Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme*. C R Acad Sci Paris, 1948. **142**: p. 241-3.
- Masuzaki, H., et al., *Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism*. J Med Genet, 2004. **41**(4): p. 289-92.
- McArthur, S.J., et al., *Blastocyst trophectoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations*. Prenat Diagn, 2008. **28**(5): p. 434-42.
- McQuilten, Z.K., et al., *A review of pathophysiology and current treatment for neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) and introducing the Australian NAIT registry*. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2011. **51**(3): p. 191-8
- Metcalf, P., et al., *Nomenclature of human platelet antigens*. Vox Sang, 2003. **85**(3): p. 240-5.
- Milunsky, A. and J. Milunsky, *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment*. Wiley-Blackwell, 2010.

Miki, Y., et al., *A physical map encompassing GP2B, EPB3, D17S183, D17S78, D17S1183, and D17S1184*. Genomics, 1994. **25**(1): p. 295-7.

Newman, P.J., R.S. Derbes and R.H. Aster, *The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1778-81.

Ng, E.K., et al., *mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(8): p. 4748-53.

Nomura, M.L., et al., *Fetal genotyping for platelets antigens: a precise tool for alloimmune thrombocytopenia: case report and literature review*. Arch Gynecol Obstet, 2010. **282**(5): p. 573-5.

Norton, A., D.L. Allen and M.F. Murphy, *Review: platelet alloantigens and antibodies and their clinical significance*. Immunohematology, 2004. **20**(2): p. 89-102.

Orozco, A.F., et al., *Hypoxia-induced membrane-bound apoptotic DNA particles: potential mechanism of fetal DNA in maternal plasma*. Ann NY Acad Sci, 2006. **1075**: p. 57-62.

Palomaki, G.E., et al., *DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study*. Genet Med, 2011. **13**(11): p. 913-20.

Parano, E., et al., *Noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by isolation and analysis of fetal cells from maternal blood*. Am J Med Genet, 2001. **101**(3): p.262-7.

Patrinou, G.P., and W. Ansorge, *Molecular Diagnostics*. Elsevier, 2010.

Peterson, J.A., et al., *New platelet glycoprotein polymorphisms causing maternal immunization and neonatal alloimmune thrombocytopenia*. Transfusion, 2012. **52**(5): p. 1117-24.

Peterson, J.A., et al., *Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management*. Br J Haematol, 2013. **161**(1): p. 3-14.

Piyamongkol, W., et al., *Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(7): p. 411-20.

Poon, L.L., et al., *Presence of fetal RNA in maternal plasma*. Clin Chem, 2000. **46**(11): p. 1832-4.

Ray, P.F. and A.H. Handyside, *Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(3): p.213-8.

Rosa, J.P., et al., *Cloning of glycoprotein IIIa cDNA from human erythroleukemia cells and localization of the gene to chromosome 17*. Blood, 1988. **72**(2): p. 593-600.

Scheffer, P.G., et al., *Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a*. BJOG, 2011. **118**(11): p. 1392-5.

Sehnert, A.J., et al., *Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood*. Clin Chem, 2011. **57**(7): p. 1042-9.

Shayakul, C., et al., *Characterization of a highly polymorphic marker adjacent to the SLC4A1 gene and of kidney immunostaining in a family with distal renal tubular acidosis*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(2): p. 371-9.

Skogen, B., *Reconsidering fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia with a focus on screening and prevention*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(5): p. 559-66.

Spits, C., et al., *Whole-genome multiple displacement amplification from single cells*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1965-70.

Spits, C. and K. Sermon, *PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology*. Prenat Diagn, 2009. **29**(1): p. 50-6.

Stoffel, M. and G.I. Bell, *Microsatellite polymorphism in the human platelet glycoprotein IIIa gene (GP3A) on chromosome 17*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(5): p. 1172.

Strickland, S. and W.G. Richards, *Invasion of the trophoblasts*. Cell, 1992. **71**(3): p. 355-7.

Tabor, A., C.H. Vestergaard and Ø Lidegaard, *Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009. **34**(1):p. 19-24.

- Tan, E.M., et al., *Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1966. **45**(11): p. 1732-40.
- Telenius, H., et al., *Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer*. Genomics, 1992. **13**(3): p. 718-25.
- Thornhill, A.R., et al., *A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis*. Prenat Diagn, 2001. **21**(6): p. 490-7.
- Thornhill, A.R. and K. Snow, *Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis*. J Mol Diagn, 2002. **4**(1): p. 11-29.
- Thude, H., et al., *Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by human leucocyte antigen-B27 antibody*. Transfus Med, 2006. **16**(2): p. 143-9.
- Traeger-Synodinos J., *Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases*. Mol Aspects Med, 2006. 27(2-3): p. 176-91.
- Treff, N.R., et al., *Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening*. Fertil Steril, 2012. **97**(4): p. 819-24.
- Ugozzoli, L.A., et al., *Real-time genotyping with oligonucleotide probes containing locked nucleic acids*. Anal Biochem, 2004. **324**(1): p. 143-52.
- Van den Akker, E.S. and D. Oepkes, *Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2008. **22**(1): p. 3-14.
- Van den Veyver, I.B., et al., *Molecular analysis of human platelet antigen system 1 antigen on single cells can be applied to preimplantation genetic diagnosis for prevention of alloimmune thrombocytopenia*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **170**(3): p. 807-12.
- Van Wijk, I.J., et al., *Enrichment of fetal trophoblast cells from the maternal peripheral blood followed by detection of fetal deoxyribonucleic acid with a nested X/Y polymerase chain reaction*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(3): p. 871-8.
- Verlinsky, Y., et al., *Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis*. Hum Reprod, 1990. **5**(7): p. 826-9.
- Verlinsky, Y., and A. Kuliev, *Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis*. Parthenon, 2009.

Von dem Borne, A.E. and F. Décary, *ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens*. Vox Sang, 1990. **58**(2): p. 176.

Walknowska, J., F. A. Conte and M. M. Grumbach, *Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer*. Lancet, 1969. **1**(7606): p. 1119-22.

Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.

Wilhelm, J. and A. Pingoud, *Real-time polymerase chain reaction*. Chembiochem, 2003. **4**(11): p. 1120-8.

Wong, D., et al., *Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing*. Clin Biochem, 2013. **46**(12): p. 1099-104.

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

Zhang, L., et al., *Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5847-51.

Zimmermann, B., *Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma*. Clin Chem, 2005. **51**(9): p. 1598-604.

Zimmermann, B.G., et al., *Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis*. Prenat Diagn, 2008. **28**(12): p. 1087-93.

Patents

QIAGEN GmbH. *Method of whole genome amplification with reduced artifact production*. Kumar, G. US, US2004/0248105 A1. 09 Desembre 2004

The Chinese University of Honk Kong. *New fetal Methylation markers*. Lo, Y.M., et al. China, Int, WO 2007/132166 A2. 22 Novembre 2007.

The Salk Institute for Biological Studies. *Target oriented whole genome amplification of nucleic acids*. Sandler, V. and F.H. Gage. US, Int, WO 2008/051928 A2. 02 Maig 2008

Pàgines webs

<http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/index.html>

http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html

<http://www.qiagen.com/products/qiasymphonydnakit.aspx#Tabs=t1>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://nuevo.sefertilidad.com/publicaciones.php>

AGRAÏMENTS

A la Dra. Núria Nogués, la directora de la meva tesi, per confiar en mi des d'un inici per desenvolupar aquest projecte i donar-me el seu suport i bons consells en tot moment. Gràcies a ella he après moltíssimes coses i la considero no només una extraordinària professional, sinó també una extraordinària persona. Durant aquest període hem pogut compartir les ganes i la il·lusió d'investigar, en resum fer ciència!. És per això que li vull agrair el estar sempre disposada a escoltar les meves idees perquè poc a poc i gràcies a tot l'aprenentatge que he anat adquirint al llarg d'aquests anys ha fet possible el meu creixement professional. No podré expressar tot el meu agraïment amb paraules però es mereix, sens dubte, tot el meu reconeixement i respecte.

Al Dr. Eduard Muñiz, el cap del servei del laboratori d'Immunoematologia del BST, l'oportunitat de formar part del seu equip perquè de no haver sigut per ell, res hagués sigut possible. Des d'un inici va apostar per mi i li estic eternament agraïda.

A tot l'equip que forma part del laboratori d'Immunoematologia, especialment a la Cecília que ha compartit amb mi taula, ordinador i moltes xerrades. A tots ells els hi vull agrair d'una manera molt especial tot el suport diari que m'han donat al llarg d'aquest temps: Carme, Rosa, Montse, Eli, Imma, Merche, Marta, Neus, Espe, Raquel, Jose, Marcel i Chari. M'he sentit molt afortunada de rodejar-me de persones de tanta qualitat professional com humana.

Al Dr. Ricardo Pujol, el tutor de la tesi, pels seus suggeriments i comentaris en aquest treball.

A la Fundació Puigvert i, en especial a la Dra. Olga Martínez, per la seva paciència i dedicació i per proporcionar-nos els blastòmers per fer possible la realització d'aquest treball.

Al "Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y Leon (Valladolid)" i, en especial, a la Dra. Isabel González per la seva constant col·laboració i disposició en aquest projecte.

A tots els meus companys de Sysmex, pels ànims que m'han donat i per totes les vegades que m'han escoltat parlar dels alts i baixos de la tesi. Gràcies a tot l'equip.

A les persones que més m'estimo i que són les que m'han animat constantment en aquest procés. Vull dedicar molt especialment aquesta tesi a l'Isidre que comparteix amb mi el dia a dia i ha patit la tesi al meu costat, gràcies a això ell ja sap lo que és una PCR. La seva constant insistència i preocupació en aquest procés han sigut clau

per arribar fins al final i defensar la tesi. Els ànims que m'ha donat, el suport i el sacrifici han sigut imprescindibles. L'ajuda, els consells i el suport moral dels meus pares també han sigut una part molt important perquè han sigut la veu de l'experiència per arribar sempre als meus objectius. Gràcies a la meua germana Mar, al Sebas i al petit Rogeret que forma part de la portada d'aquesta tesi per tota l'energia i carinyo que m'heu donat sempre.

Per últim, no vull deixar de nombrar a la família Abelló Viñas que des del primer dia han viscut la tesi en primera persona i m'han fet sentir una més de la família. Els hi vull donar les gràcies pel seu interès, suport i la seva disposició a ajudar sempre.

Finalment per totes aquelles persones i amics que han estat al meu costat al llarg d'aquest camí.

A tots, moltes gràcies.