

**DIAGNÒSTIC GENÈTIC  
PREIMPLANTACIONAL DE MALALTIES  
HEREDITÀRIES:  
FIBROSI QUÍSTICA I HEMOFÍLIA**

**TESI DOCTORAL  
JORGE SÁNCHEZ GARCÍA**

**DIRECTORS  
DRA. JOAQUIMA NAVARRO FERRETÉ  
DR. FRANCISCO VIDAL PÉREZ  
DR. JORDI BENET CATALÀ**

Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia  
Universitat Autònoma de Barcelona

MAIG 2009



La Dra. Joaquina Navarro Ferreté i el Dr. Jordi Benet Català, professors titulars del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, i el Dr. Francisco Vidal Pérez, Investigador del Banc de Sang i Teixits,

#### CERTIFIQUEN

Que Jorge Fernando Sánchez García ha fet sota la nostra direcció el treball d'investigació titulat "DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL DE MALALTIES HEREDITÀRIES: FIBROSI QUÍSTICA I HEMOFÍLIA", per optar al títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball ha estat fet a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i a la Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular del Banc de Sang i Teixits, Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona.

Dra. Joaquina Navarro  
Directora

Dr. Jordi Benet  
Director

Dr. Francisco Vidal  
Director

Bellaterra, maig de 2009



## Glossari

1. Introducció	1
1.1. Malalties hereditàries	3
1.1.1. Tipus d'herència	4
1.2. Fibrosi quística	7
1.2.1. Descripció	7
1.2.2. Manifestacions clíniques	8
1.2.2.1. Sistema respiratori	8
1.2.2.2. Sistema gastrointestinal	8
1.2.2.3. Altres sistemes afectats	8
1.2.3. Tractament	9
1.2.4. Bases moleculars de la fibrosi quística	9
1.2.4.1. El gen <i>CFTR</i>	9
1.2.4.2. Proteïna	9
1.2.4.3. Mutacions	11
1.3. Hemofília	13
1.3.1. Descripció	13
1.3.1.1. Coagulació	13
1.3.1.2. Hemofílies A i B	15
1.3.2. Manifestacions clíniques	16
1.3.3. Tractament	17
1.3.4. Bases moleculars	17
1.3.4.1. Bases moleculars de l'hemofília A	17
1.3.4.1.1. El gen <i>F8</i>	17
1.3.4.1.2. Proteïna FVIII	18
1.3.4.1.3. Mutacions	18
1.3.4.2. Bases moleculars de la hemofília B	18
1.3.4.2.1. El gen <i>F9</i>	18
1.3.4.2.2. Proteïna FIX	19
1.3.4.2.3. Mutacions	19
1.4. Diagnòstic de malalties hereditàries	19
1.4.1. Diagnòstic de portadors i consell genètic	19
1.4.2. Estratègies de diagnòstic molecular	20
1.4.2.1. Diagnòstic directe	20
1.4.2.1.1. Tècniques de cribatge de mutacions	20
1.4.2.1.2. Seqüenciació directa	21
1.4.2.2. Diagnòstic indirecte	21

1.4.2.2.1. Definició de polimorfisme	22
1.4.2.2.2. Polimorfismes utilitzats per al diagnòstic de FQ	22
1.4.2.2.3. Polimorfismes utilitzats per al diagnòstic d'HA	23
1.4.2.2.4. Polimorfismes utilitzats per al diagnòstic d'HB	23
1.4.3. Diagnòstic prenatal	24
1.4.4. Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP)	24
1.4.4.1. Tipus de DGP	25
1.4.4.1.1. Anàlisi del primer corpuscle polar (1CP)	25
1.4.4.1.2. Anàlisi de blastòmers	26
1.4.4.1.3. Anàlisi del blastocist	27
1.4.4.2. Indicacions del DGP	28
1.4.4.2.1. Detecció d'anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals	28
1.4.4.2.2. Detecció de malalties monogèniques	28
1.5. DGP de malalties monogèniques	30
1.5.1 Història i tècniques	30
1.5.2. Dificultats associades al DGP de malalties monogèniques	34
1.5.2.1. Fallades totals d'amplificació	34
1.5.2.2. <i>Allele drop-out</i> (ADO)	34
1.5.2.3. Contaminació	37
1.5.3. Amplificació total del genoma (WGA) a partir de cèl·lules aïllades	38
1.5.3.1. <i>Primer extension preamplification</i> (PEP-PCR)	39
1.5.3.2. <i>Degenerate oligonucleotide primed</i> PCR (DOP-PCR)	40
1.5.3.3. <i>Multiple displacement amplification</i> (MDA)	41
1.5.4. Estratègies actuals	42
2. Hipòtesi i Objectius	43
3. Materials i mètodes	47
3.1. Material biològic	49
3.2. Reactius i solucions	50
3.2.1. Reactius utilitzats en l'aïllament cel·lular	50
Tripsina	50
Àcid Tyrode	50
Solució d'aïllament	50
3.2.2. Reactius utilitzats en la lisi cel·lular	51
Solució de lisi	51

---

3.2.3. Reactius utilitzats en electroforesi en gel d'agarosa	51
50XTAE	51
Gel d'agarosa 2%	51
3.2.4. Reactius utilitzats en l'electroforesi capil·lar	52
Formamida Hi-DI	52
3.3. Mètodes	52
3.3.1. Obtenció i aïllament de cèl·lules	52
3.3.1.1. Cèl·lules bucals	52
3.3.1.2. Oòcits i 1CPs	54
3.3.2. Mètodes per evitar la contaminació	54
3.3.3. Lisi cel·lular	56
3.3.4. WGA mitjançant I-PEP-PCR	56
3.3.5. Mètodes de detecció de mutacions i de microsatèl·lits	57
3.3.5.1. <i>Cystic fibrosis assay</i> en cèl·lules aïllades	57
3.3.5.2. Amplificació i seqüenciació dels gens <i>F8</i> i <i>F9</i>	60
3.3.5.3. Detecció de mutacions específiques	63
3.3.5.4. Amplificació d'STRs	63
3.3.5.4.1. <i>Multiplex</i> d'STRs lligats al gen <i>CFTR</i>	64
3.3.5.4.2. <i>Multiplex</i> d'STRs lligats al gen <i>F8</i>	66
3.3.6. Anàlisi estadística	67
4. Resultats	69
4.1. Article 1: <i>Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells</i> . Sánchez-García JF, Benet J, Gutiérrez-Mateo C, Luís Sèculi J, Monrós E, Navarro J. <i>Mol Hum Reprod</i> . 2005 Jun;11(6):463-8.	71
4.2. Article 2: <i>Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid haemophilia A molecular diagnosis</i> . Sánchez-García JF, Gallardo D, Ramírez L, Vidal F. <i>Thromb Haemost</i> . 2005 Nov;94(5):1099-103.	79
4.3. Article 3: <i>A versatile strategy for preimplantation genetic diagnosis of haemophilia A based on F8-gene sequencing</i> . Sánchez-García JF, Gallardo D, Navarro J, Márquez C, Gris JM, Sánchez MA, Altisent C, Vidal F. <i>Thromb Haemost</i> . 2006 Dec;96(6):839-45.	87

5. Discussió	97
5.1. Estratègies diagnòstiques	100
5.2. Aspectes tècnics	103
5.2.1. Consideracions tècniques: WGA	103
5.2.2. Consideracions tècniques: detecció de mutacions i STRs	107
5.2.3. Consideracions tècniques: amplificació i ADO	108
5.3. DGP en corpuscles polars i blastòmers	110
5.4. DGP de malalties monogèniques	113
5.4.1. Fallades d'amplificació i ADO	114
5.4.2. Anàlisi indirecta i recombinació	115
5.4.3. Contaminació	116
5.5. Aplicació clínica	117
5.6. Perspectives de futur	118
6. Conclusions	123
7. Bibliografia	127



# GLOSSARI D'ABREVIATURES

1CP: primer corpuscle polar  
2CP: segon corpuscle polar  
ADO: fallada d'amplificació d'un dels al·lels  
CBAVD: absència congènita bilateral dels vasos deferents  
CGH: hibridació genòmica comparada  
cM: centimorgan  
DGGE: electroforesi en gel de gradient desnaturalitzant  
DGP: diagnòstic genètic preimplantacional  
DNA: àcid desoxiribonucleic  
DOP-PCR: PCR que utilitza oligonucleòtids degenerats  
DTT: ditionitritol  
EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic  
FAM: carboxifluoresceïna  
FISH: hibridació *in situ* fluorescent  
FIV: fecundació *in vitro*  
FIX: factor IX de coagulació  
FQ: fibrosi quística  
FVIII: factor VIII de coagulació  
HA: hemofília A  
HB: hemofília B  
HEX: hexacloro-6-carboxifluoresceïna  
hnRNA: àcid ribonucleic heteronuclear  
ICSI: injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides  
Kb: kilobase  
KDa: kilodalton  
KOH: hidròxid de potassi  
Mb: megabase  
MDA: Amplificació per desplaçament múltiple  
NED: 2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-tricloro-5-carboxifluoresceïna  
µl: microlitre  
µM: micromolar  
ng: nanograms  
OLA: assaig de lligació d'oligonucleòtids  
pb: parells de bases  
PBS: tampó fosfat salí  
PCR: reacció en cadena de la polimerasa  
PEP-PCR: preamplificació mitjançant l'extensió d'encebadors  
PVA: polivinil alcohol  
RFU: unitats de fluorescència relativa  
RNA: àcid ribonucleic  
ROX: 6-carboxirodamina  
SDS: dodecil sulfat sòdic  
SNP: polimorfisme de nucleòtid  
SSCP: polimorfisme de conformació de cadena senzilla  
STR: microsatèl·lit  
TAE: tris-acètic EDTA  
TAMRA: tetrametil-6-carboxirodamina  
TET: tetracloro-6-carboxifluoresceïna  
VNTR: minisatèl·lit  
WGA: amplificació total del genoma





# INTRODUCCIÓ



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. MALALTIES HEREDITÀRIES

Es consideren malalties rares aquelles patologies que es presenten amb una freqüència baixa en la població. S'estima que del 6 al 8% de la població mundial està afectada per algun tipus de malaltia rara; és a dir, uns 3 milions d'espanyols, uns 27 milions d'uropeus i uns 25 milions de nord-americans (FEDER, Federación Española de Enfermedades Raras).

Les malalties rares són, en gran part, cròniques i degeneratives. El 65% d'aquestes són greus i invalidants. Les característiques principals són l'aparició abans dels 2 anys d'edat (66%); dolors crònics (20%) i dèficit en el desenvolupament motor, sensorial o intel·lectual (33%). Prop del 50% del les causes de mortalitat infantil són atribuïbles a malalties rares.

Les malalties hereditàries s'inclouen dins el grup de malalties rares a causa de les seves baixes freqüències en humans (menys de 5 afectats per cada 10.000 individus; Instituto de Investigación de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III).

Les malalties hereditàries són les malalties genètiques caracteritzades pel fet que es transmeten a la descendència. Aquelles que estan causades per mutacions o alteracions en la seqüència de DNA d'un únic gen responsable, s'anomenen malalties monogèniques i moltes de les quals es transmeten segons les lleis de Mendel (Mendel 1865).

La Taula 1 mostra alguns exemples de malalties monogèniques i les seves freqüències.

<u>Malaltia</u>	<u>Incidència per cada 1.000 nounats</u>	<u>Malaltia (continuació)</u>	<u>Incidència per cada 1.000 nounats</u>
Hiperlipidèmia combinada familiar	5	Distròfia miotònica	0.2
Hipercolesterolèmia familiar	2	Poliposi adenomatosa familiar	0.1
Malaltia del ronyó poliquístic adult	0.8	Fenilcetonúria	0.1
Malaltia de Huntington	0.5	Atròfia muscular espinal	0.1
Síndrome del X fràgil	0.5	Anèmia falciforme	0.1
Neurofibromatosi	0.4	Hemofília A	0.1
Fibrosi quística	0.4	$\beta$ talassèmia	0.05
Distròfia muscular de Duchenne	0.3	Hemofília B	0.03
Deficiència d' $\alpha$ -1-antitripsina	0.2		

Taula 1. Freqüències aproximades d'algunes de les malalties monogèniques més comunes a la població de Gran Bretanya. Actualitzat al juny de 2008. Adaptat de: <http://www.gig.org.uk/education3.htm> -Genetic Interest

Group 2004/05

### 1.1.1. Tipus d'herència

Les malalties monogèniques es poden transmetre a la descendència segons diversos patrons hereditaris que segueixen les lleis de Mendel:

- Herència autosòmica dominant. La malaltia s'expressa fenotípicament com a conseqüència d'una mutació. Només cal que una de les còpies del gen estigui mutada perquè la persona, un individu portador heterozigot, pateixi la malaltia. Aquest individu té un risc del 50% de transmetre la malaltia a la seva descendència (Figura 1). Això fa que totes les generacions puguin presentar individus afectats. Mascles i femelles es veuen igualment afectats, i també tots dos hereten i transmeten la malaltia. Alguns exemples són la malaltia de Huntington, la neurofibromatosi i la síndrome de Marfan.

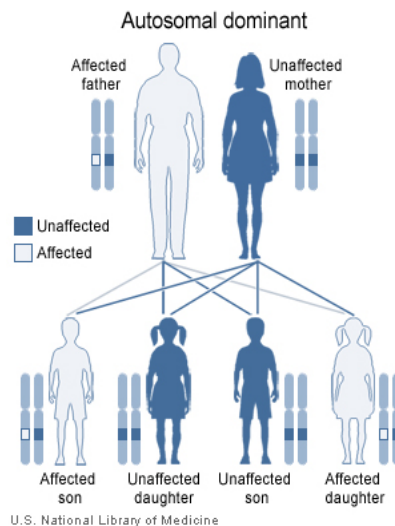


Figura 1: Esquema de l'herència autosòmica dominant.

- Herència autosòmica recessiva. Per tal que la malaltia es manifesti, calen dues còpies del gen mutat en la persona afectada, els pares de la qual no pateixen la malaltia però són portadors d'una còpia del gen mutat situat en qualsevol dels 22 cromosomes autosòmics. Per aquest motiu, la mutació pot passar desapercebuda al llarg de generacions a través de portadors no afectats, fins que es manifesta sobtadament. La probabilitat d'uns pares heterozigots no afectats de tenir un fill afectat és del 25% i la malaltia es manifesta i es transmet independentment del sexe (Figura 2). Exemples de malalties autosòmiques recessives són la fibrosi quística, la  $\beta$ -talassèmia i la deficiència de  $\alpha$ -1-antitripsina.

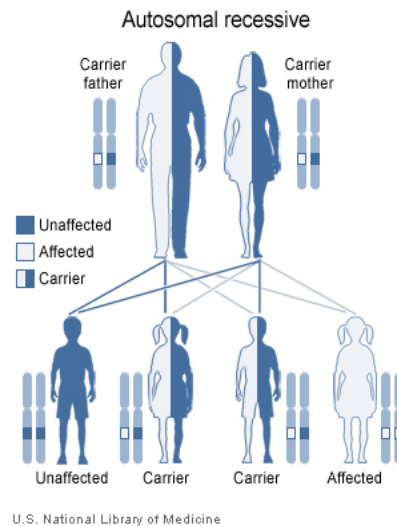


Figura 2: Esquema de l'herència autosòmica recessiva.

- Herència recessiva lligada al cromosoma X. El gen responsable de la malaltia està ubicat al cromosoma X. Hi ha molts més mascles afectats que femelles, els quals són individus hemizigots que han heretat, de la seva mare, la còpia mutada del gen. Aquestes mares portadores també acostumen a tenir pares o germans afectats. Un mascle afectat només pot tenir fills sans i filles portadores. Una dona portadora té un risc del 50% que un fill mascle estigui afectat (Figura 3). Hi ha tres situacions en les quals les dones portadores poden manifestar els símptomes de la malaltia: a causa del fenomen de lionització extrema o inactivació no a l'atzar (desequilibrada) d'un dels cromosomes X (Migeon i Kennedy 1975); per la síndrome de Turner (dones X0) (Kelsey *et al.* 2006) i per consanguinitat (Karimipour *et al.* 2008). Alguns exemples d'aquestes malalties són les hemofílies A i B i la distròfia muscular de Duchenne.

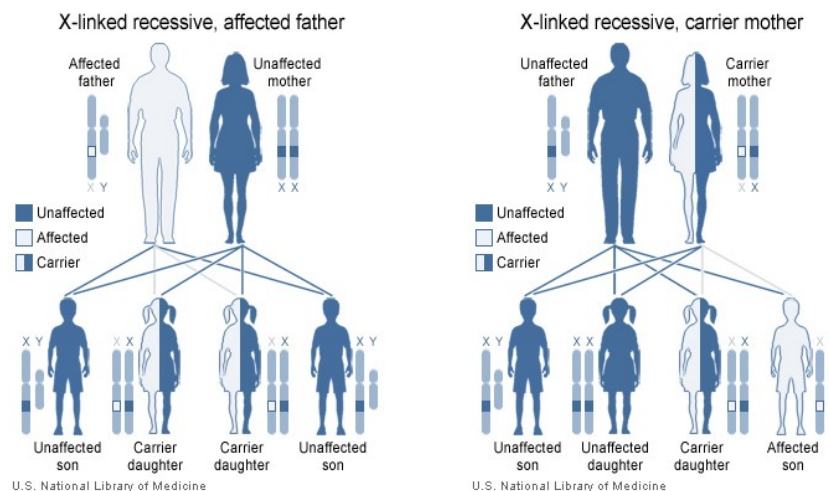


Figura 3: Esquemes de l'herència recessiva lligada al cromosoma X, transmissió via paterna o materna, respectivament.

- Herència dominant lligada al cromosoma X. Una mare afectada transmet la còpia del seu gen mutat situat al cromosoma X a la meitat de la seva descendència, independentment del sexe. En canvi, un pare afectat per la malaltia només la transmet a les seves filles, però no als seus fills (Figura 4). Els mascles, com que són hemizigots, es veuen més severament afectats que les femelles, que són heterozigotes. En aquestes, la manifestació de la malaltia també és variable com a conseqüència de la inactivació d'un dels cromosomes X. Presenten aquest tipus d'herència la *Incontinentia Pigmenti* i la síndrome de Rett.

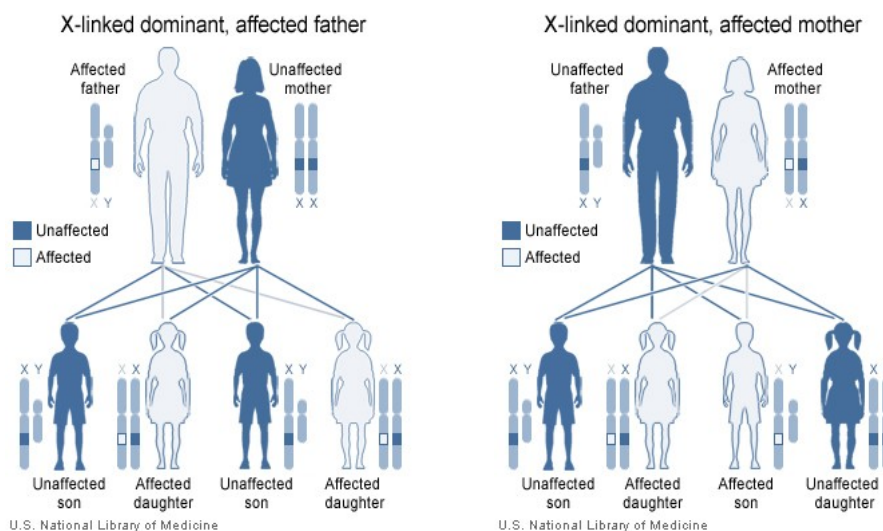


Figura 4: Esquemes de l'herència dominant lligada al cromosoma X, transmissió via paterna o materna, respectivament.

Un altre tipus d'herència mendeliana és la del cromosoma Y, que es transmet només via paterna als fills mascle. Un exemple de les malalties d'aquest grup és la infertilitat masculina deguda a microdelecions del cromosoma Y (Viswambharan *et al.* 2007).

També hi ha altres malalties genètiques que segueixen patrons d'herència atípics o no mendelians. Uns exemples poden ser el *imprinting* genòmic (Monk 1988), la disomia uniparental (Engel 2006), l'expansió de repeticions de triplets (Tsuji 1997) o l'herència mitocondrial (Chinnery i Schon 2003), la qual presenta una transmissió via materna.



Aquest treball s'ha centrat en dues malalties monogèniques, la fibrosi quística i l'hemofília, per tota una sèrie de raons. La fibrosi quística és la malaltia monogènica per la qual es realitzen més cicles de Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP) (Harper *et al.* 2008; Goossens *et al.* 2009). L'hemofília és una de les malalties d'herència lligada al cromosoma X que s'analitzen més freqüentment en DGP, tot i que tradicionalment s'ha estudiat mitjançant el sexatge d'embrions (Harper *et al.* 2008). A causa de la seva incidència en la població, aquestes dues malalties tenen una gran rellevància social i desperten interès de nombrosos grups de suport i associacions de malalts.

També és important la rellevància clínica d'aquestes malalties, atesa la necessitat de trobar teràpies eficients per a tractar els afectats, ja sigui mitjançant fàrmacs o amb alternatives més innovadores com ara la teràpia gènica. Els afectats d'aquestes malalties són diagnosticats, reben tractament i seguiment en hospitals vinculats a la universitat, de manera que es facilita que els diferents grups de recerca tinguin accés als pacients. Els coneixements científics i l'experiència dels grups investigadors i, finalment, l'existència de tècniques establertes per al diagnòstic molecular (mitjançant *kits* comercials i per seqüenciació) també van ser determinants per a la selecció d'aquestes dues malalties.

## 1.2. FIBROSI QUÍSTICA

### 1.2.1. Descripció

La fibrosi quística (FQ) (OMIM #219700) és la malaltia genètica autosòmica recessiva més freqüent i afecta, aproximadament, a un de cada 2.500 nounats (Cutting 1997). Aproximadament un de cada 25-30 individus caucàsians és portador de FQ. Les parelles en les quals ambdós progenitors són portadors d'una mutació al gen *CFTR* (regulador de la conductància transmembrana de la fibrosi quística) tenen un 25% de risc de tenir descendència afectada. Els símptomes principals de la malaltia són un augment d'ions clorur (Cl<sup>-</sup>) a la suor i obstrucció pulmonar i pancreàtica, a més d'infertilitat masculina causada per l'absència congènita bilateral dels vasos deferents.

També s'anomena mucoviscidosi, i provoca un trastorn generalitzat de les glàndules exocrines que dificulta el moviment de l'aigua a través dels epitelis. El transport deficient d'anions Cl<sup>-</sup> produeix secrecions anormalment denses de mucositat viscosa causants de tota una sèrie de complicacions associades a la malaltia. Els sistemes més afectats són el sistema respiratori i el sistema gastrointestinal (Cutting 2002).

## 1.2.2. Manifestacions clíniques

### 1.2.2.1. Sistema respiratori

L'acumulació de mucositat produeix una obstrucció de les vies aèries, per la qual cosa els afectats pateixen tos crònica. Aquest mucus viscos fa que la superfície del teixit bronquial es col·lapsi de manera que els cilis d'aquest epiteli tenen dificultats per eliminar els cossos que s'hi adhereixen. Per aquesta raó es produeixen infeccions recurrents de bacteris dels gèneres *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Haemophilus*, causants de bronquitis crònica que desemboca en una destrucció tissular i substitució per teixit fibrós i quists (Khan *et al.* 1995; *Cystic Fibrosis Foundation* 2001) .

### 1.2.2.2. Sistema gastrointestinal

Principalment es veu afectat el pàncrees exocrí, en el qual també s'acumula mucositat i es produeix obstrucció, cosa que fa que els enzims pancreàtics (tripsina, amilasa, lipasa) que no poden ser secretats destrueixin l'òrgan, i es forma teixit fibrós i quists. La destrucció progressiva del pàncrees fa que un 8% dels afectats pateixin diabetis (Kopelman *et al.* 1985). La manca d'aquests enzims produeix una absorció deficient de greixos, de proteïnes i de les vitamines A, D, E i K, i provoca malnutrició i retard en el creixement. Els aliments mal digerits causen obstrucció intestinal. De fet, la gran majoria de nounats afectats per FQ pateixen ili mecònic (obstrucció per la primera defecació), que s'ha de resoldre mitjançant intervenció una quirúrgica. La FQ també pot produir obstrucció biliar i cirrosi hepàtica.

### 1.2.2.3. Altres sistemes afectats

#### Glàndules sudorípares

El transport defectuós de clor fa que hi hagi un risc de deshidratació i de pèrdua d'electròlits. Als nadons sovint se'ls diagnostica que estan afectats de FQ perquè presenten una concentració d'ions Cl<sup>-</sup> a la suor superior a 60 mM.

#### Sistema reproductor

El 98% dels homes amb FQ són infèrtils a causa de l'absència congènita bilateral dels vasos deferents (CBAVD), tot i que l'espermatogènesi sigui correcta (Dodge 1995). Les dones, tot i que tenen una funció ovàrica normal, també poden tenir problemes d'infertilitat com a conseqüència de l'augment de la densitat del mucus cervical (Kopito *et al.* 1973).

### 1.2.3. Tractament

Els pacients han de rebre freqüentment fisioteràpia toràcica per tal d'impedir l'acumulació de mucus i afavorir la respiració per a facilitar-ne l'eliminació. Han de tenir una dieta variada amb un 140% d'aportació calòrica respecte a la normal, i evitar la deshidratació i la pèrdua d'electròlits. Se'ls han de subministrar els enzims pancreàtics que els manca, així com les vitamines de les quals són deficientes. Han de rebre tractament amb antibiòtics, broncodilatadors i fluidificants de la mucositat en forma d'aerosols (Ratjen *et al.* 2001; Auerbach *et al.* 1985). Com a últim recurs els malalts greus poden sotmetre's a un transplantament de pulmó (Bennett *et al.* 2000). Tot i l'existència de tractaments avançats de teràpia gènica amb vectors adenovírics recombinants, els fàrmacs "de disseny" són les alternatives més eficaces en l'actualitat (Ratjen 2007). S'entén com a fàrmac de disseny un medicament desenvolupat específicament en funció de les seves accions biològiques. L'objectiu d'aquests fàrmacs, com ara el Denufosol o el Moli1901, és la regulació positiva de canals de clor alternatius.

### 1.2.4. Bases moleculars de la fibrosi quística

#### 1.2.4.1. El gen *CFTR*

La FQ està causada per mutacions en el gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (OMIM \*602421) el qual va ser clonat el 1989 (Riordan *et al.* 1989). Aquest gen està situat al braç llarg del cromosoma 7 (banda 7q32.1) i té una grandària d'unes 250 kb (kilobases) (Collins 1992). El gen *CFTR* està organitzat en 27 exons que transcriuen un mRNA de 6.129 nucleòtids i que codifica una proteïna de 1.480 aminoàcids (Figura 5) (Tsui *et al.* 1991; Zielenski *et al.* 1991b).

#### 1.2.4.2. Proteïna

La proteïna CFTR pertany a la família de les proteïnes transportadores dependents d'ATP o *ABC transporters* (*ATP-Binding Cassette Transporters*) i presenta dues funcions: és un canal d'anions Cl<sup>-</sup> en membranes epitelials (Ratjen i Doring 2003) i regula altres canals iònics. Aquest canal s'encarrega de mantenir la hidratació de les secrecions de les vies aèries i dels conductes epitelials mitjançant la secreció d'ions clorur i inhibir l'absorció de sodi.

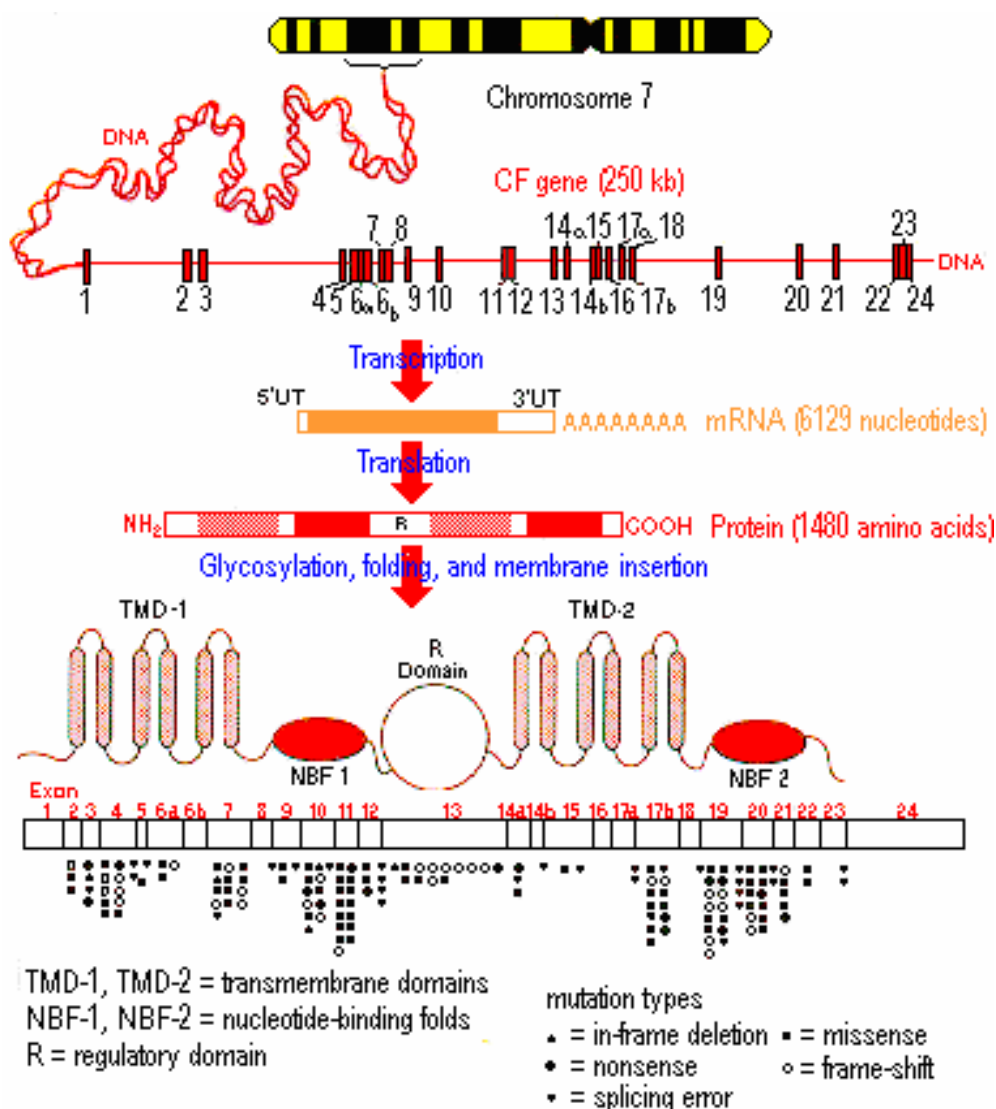


Figura 5. Diagrama de l'estructura del gen i de la proteïna CFTR.  
 Imatge obtinguda de <http://www.cystic-fibrosis-symptom.com>

El canal de clor està estructurat en els següents dominis (Figures 5 i 6):

- Dos dominis transmembrana (TMD-1/TMD-2) formats cadascun per sis segments hidrofòbics.
- Dos dominis d'unió amb ATP (NBF-1/NBF-2)
- Un domini regulador (R), el qual és fosforilat per la PKA i la PKC.

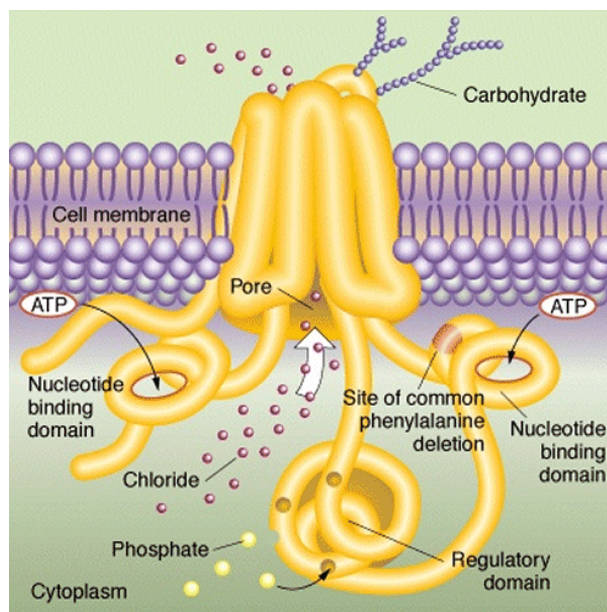


Figura 6. Dominis del canal CFTR. Imatge obtinguda de UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium.

### 1.2.4.3. Mutacions

S'han descrit més de 1.600 mutacions diferents en el gen *CFTR* (actualitzat al maig 2009) (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>). A la Taula 2 es presenta un llistat de les mutacions més freqüents, que causen des de nivells de transcripció reduïts o un canal de clor defectuós fins a l'absència de la proteïna a la membrana a causa d'un plegament anòmal (Consortium CFGP 1993).

La mutació més freqüent, però, és la delecció de tres parells de bases (pb) del codó de fenilalanina en la posició 508 de la proteïna ( $\Delta F508$ ), que es troba en aproximadament un 66% dels casos. Aquesta freqüència varia des del 32% a Turquia fins al 82% a Dinamarca (Morral *et al.* 1994). Aquesta mutació afecta les modificacions post-traduccionals, de manera que la proteïna no és glicosilada i no és transportada a la membrana. Altres mutacions freqüents són la G542X (que afecta el processament del hnRNA i la síntesi de la proteïna queda anul·lada), la G551D (que afecta el domini NBF i es produeix un bloqueig de l'activació del canal de clor) o la R117H (que produeix una alteració del flux iònic a causa d'una reducció del temps d'obertura del canal) (Taula 2).

Nom	Freqüència	(%)	Població prevalent	Situació al gen	Canvi de nucleòtid	Canvi d'aminoàcid
ΔF508	28,948	(66)		exó 10	deleció 3 pb	Deleció de Phe-508
G542X	1.062	(2,4)	Hispana	exó 11	G-1756→T	Gly-542→Stop
G551D	717	(1,6)	Anglesa	exó 11	G-1784→A	Gly-551→Asp
N1303K	589	(1,3)	Italiana	exó 21	C-4041→G	Asn-1303→Lys
W1282X	536	(1,2)	Jueus Askhenazi	exó 20	G-3978→A	Trp-1282→Stop
R553X	322	(0,7)	Alemanya	exó 11	C-1789→T	Arg-553→Stop
621+1G>T	315	(0,7)	Franco-Canadenca	intró 4	G-621 + 1→T	lloc 5' d' <i>Splicing</i>
1717-1G>A	284	(0,6)	Italiana	intró 10	G-1717-1→A	lloc 3' d' <i>Splicing</i>
R117H	133	(0,3)		exó 4	G-482→A	Arg-117→His
R1162X	125	(0,3)	Italiana	exó 19	C-3616→T	Arg-1162→Stop
R347P	106	(0,2)		exó 7	G-1172→C	Arg-347→Pro
R347H				exó 7	G-1172→A	Arg-347→His
3849+10kbC>T	104	(0,2)		intró 19	C-3849 + 10kb→T	<i>Splicing</i>
ΔI507	93	(0,2)		exó 10	deleció 3 pb	Deleció de Ile 507
394delTT	78	10-30%*	Nòrdica, Finlandesa	exó 3	Deleció de TT a 394	<i>Frameshift</i>
G85E	67			exó 3	G-386→A	Gly-85→Glu
R560T	67			exó 11	G-1811→C	Arg-560→Thr
A455E	62			exó 9	C-1496→A	Ala-455→Glu
1078delT	57			exó 7	deleció 1 pb	<i>Frameshift</i>
2789+5G>A	54		Hispana	intró 14b	G-2789 + 5→A	<i>Splicing</i>
3659delC	54			exó 19	deleció 1 pb	<i>Frameshift</i>
R334W	53			exó 7	C-1132→T	Arg-334→Trp
1898+1G>A	53			intró 12	G-1898 + 1→A	lloc 5' d' <i>Splicing</i>
711+1G>T	49		Franco-Canadenca	intró 5	G-711 + 1→T	lloc 5' d' <i>Splicing</i>
2183AA>G	40		Italiana	exó 13	deleció A-2184 i A-2183→G	<i>Frameshift</i>
3905insT	38	6-17%*	Suïssa, Amish	exó 20	inserció 1 pb	<i>Frameshift</i>
S549N	30			exó 11	G-1778→A	Ser-549→Asn
S549R				exó 11	T-1779→G	Ser-549→Arg
2184delA	29			exó 13	deleció A-2184	<i>Frameshift</i>
Q359K/T360K		87,5%*	Jueus georgians	exó 7	C-1207→ A i C-1211→A	Glu-359 →Lys i Thr-360→Lys
M1101K		69%*	Huterites	exó 17b	T-3434→ A	Met-1101→Lys
Y122X		48%*	Francesa, Illa Reunió	exó 4	T-498→A	Tyr-122→Stop
1898+5G>T		30%	Xinesa, Taiwan	intró 12	G-1898+5→T	<i>Splicing</i>
3120+1G>A		11%	Afroamericana	intró 16	G-3120+1→A	<i>Splicing</i>
I148T		9,1%	Franco-Canadenca	exó 4e	T- 575→C	Ile-148→Thr
Q493X				exó 10	C-1609→T	Gln-493→Stop
V520F				exó 10	G-1690→T	Val-520→Phe
3849 + 4A>G				intró 19	A-3849 + 4→G	<i>Splicing</i>

Taula 2. Localització, canvi de nucleòtid i d'aminoàcid de les mutacions del gen CFTR més comunes a escala mundial. Dades estadístiques obtingudes del Consorci d'anàlisi genètica de CF (CF Genetic Analysis Consortium, 1994). La freqüència es basa en el criatge de 43.849 cromosomes FQ, encara que no tots ells es van testar per a totes les mutacions indicades. Les mutacions van ser trobades en pacients d'origen caucàsic (excepte quan s'indica). La localització geogràfica o grup ètnic amb una prevalença destacable s'indica en algunes de les mutacions. Una estimació de la freqüència relativa, expressada en %\*, es mostra per aquelles poblacions estudiades en un nombre reduït d'individus o únicament en la població indicada. Adaptat de <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/resource/Table1.html> i Cystic Fibrosis Assay version 2.0 User's manual (Applied Biosystems).

## 1.3. HEMOFÍLIA

### 1.3.1. Descripció

L'hemofília és una deficiència en la coagulació de la sang. Aquesta deficiència es pot deure a l'alteració o absència d'un o més components involucrats en el procés de formació de coàguls sanguinis (Bolton-Maggs i Pasi 2003). El sagnat en l'hemofília es deu a alteracions de l'hemostàsia secundària. L'hemostàsia primària o formació del coàgul de plaquetes té lloc normalment, però l'estabilització del coàgul amb fibrina (hemostàsia secundària) és defectuosa atès que es generen quantitats insuficients de trombina (Ginsburg 2002).

#### 1.3.1.1. Coagulació

El sistema de coagulació manté la integritat dels vasos sanguinis mitjançant la regulació de l'equilibri entre l'estimulació i la inhibició de la formació del coàgul. Qualsevol alteració d'aquest equilibri desplaçaria l'hemostàsia fisiològica cap a estats patològics hemorràgics. Les proteases i cofactors proteics que componen la cascada de coagulació circulen pel torrent sanguini en forma de precursors inactius i s'han d'activar seqüencialment en el lloc de la lesió per formar el coàgul de fibrina.

La hipòtesi de la cascada clàssica de la coagulació proposa dues vies separades (Mann 1999), on els factors FVIII i FIX tenen un paper central en el procés de coagulació per l'adequada formació de trombina. Aquestes dues vies són l'extrínseca, que es dona en el traumatisme de la paret vascular, i la intrínseca, que té lloc a la sang pròpiament dita (Figura 7). En produir-se una ferida, la coagulació s'inicia quan el teixit danyat exposa el factor tissular (TF). El factor FVII s'uneix al TF i aquest complex intervé en l'activació del factor FX i també a una part de FIX. En presència de FXa (actiu), l'inhibidor de la ruta del FT (TFPI) inhibeix més formació de factors FXa i FIXa. Després d'aquesta inhibició, la quantitat de factor FXa és insuficient per a mantenir la coagulació. La formació addicional de factor FXa que permeti completar la coagulació es pot aconseguir només mitjançant els factors FVIII i FIX. Llavors ja s'ha generat prou trombina per a activar el factor FVIII, que junt amb el factor FIXa (activat per la via TF-FVIIa) produeixen més activació de factor FX. L'augment de l'activació del factor FIX ocorre via trombina mitjançant l'activació de la ruta del factor FXI. En absència de factor FVIII o FIX es produirà el sagnat, ja que l'amplificació i la consolidació de la formació de factor FXa és insuficient per a mantenir l'hemostàsia.

From **Protein Structure and Function**  
by Gregory A Petsko and Dagmar Ringe

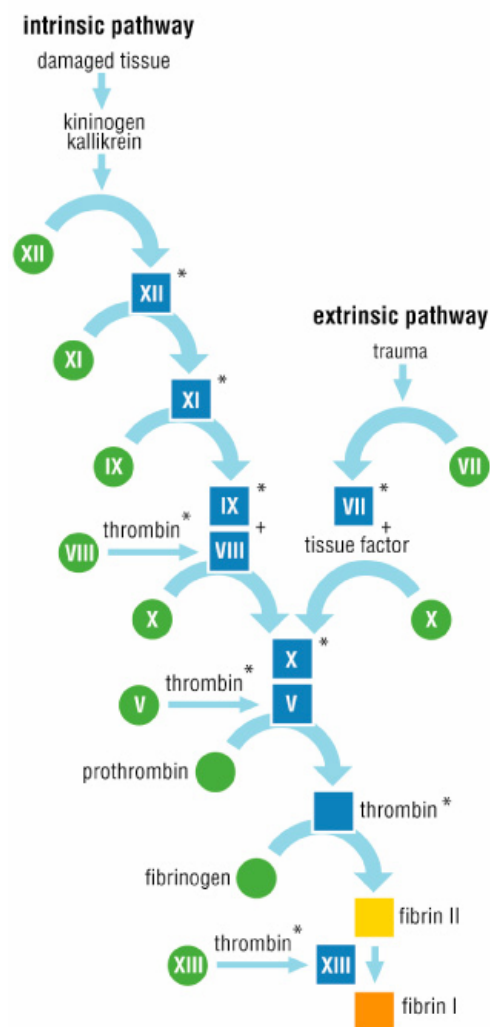


Figura 7. Esquema de la cascada de coagulació.

El FXa forma part d'un complex que intervé en l'activació de la protrombina a trombina, la qual transforma el fibrinogen en fibrina. Finalment els monòmers de fibrina s'uneixen per donar lloc a un reticle insoluble estabilitzat pel factor FVIIIa, resistent a la degradació i que engloba els glòbuls vermells, les plaquetes i el plasma per a formar el coàgul.

Tot i això, fins i tot en les hemofílies més severes, el coàgul es forma, però més lentament o de manera anòmala. La funció enzimàtica residual del complex FVIII-FIX depèn principalment del tipus de mutació als gens *F8* o *F9* i, d'aquesta activitat residual en depèn la severitat de la malaltia.



### 1.3.1.2. Hemofílies A i B

Les coagulopaties congènites de més impacte social i clínic en la població mundial són l'hemofília A i l'hemofília B, ambdues amb herència recessiva lligada al sexe.

L'hemofília A (OMIM +306700) es deu a una alteració o absència d'activitat del factor VIII de coagulació, i s'estima que la seva incidència és d'1 de cada 5.000-10.000 homes (Blanco 1992). Al seu torn, l'hemofília B (OMIM +306900) està causada per el dèficit d'activitat del factor FIX de coagulació, i la seva incidència és d'1 de cada 30.000–50.000 homes. Els fills mascles d'una dona portadora d'hemofília tenen un risc del 50% d'heretar la mutació materna i, per tant, de patir la malaltia.

Les hemofílies A i B presenten una gran similitud clínica, fet esperable ja que són el resultat d'alteracions moleculars que afecten la funció de dos components diferents però que formen part del mateix complex (Figura 8).

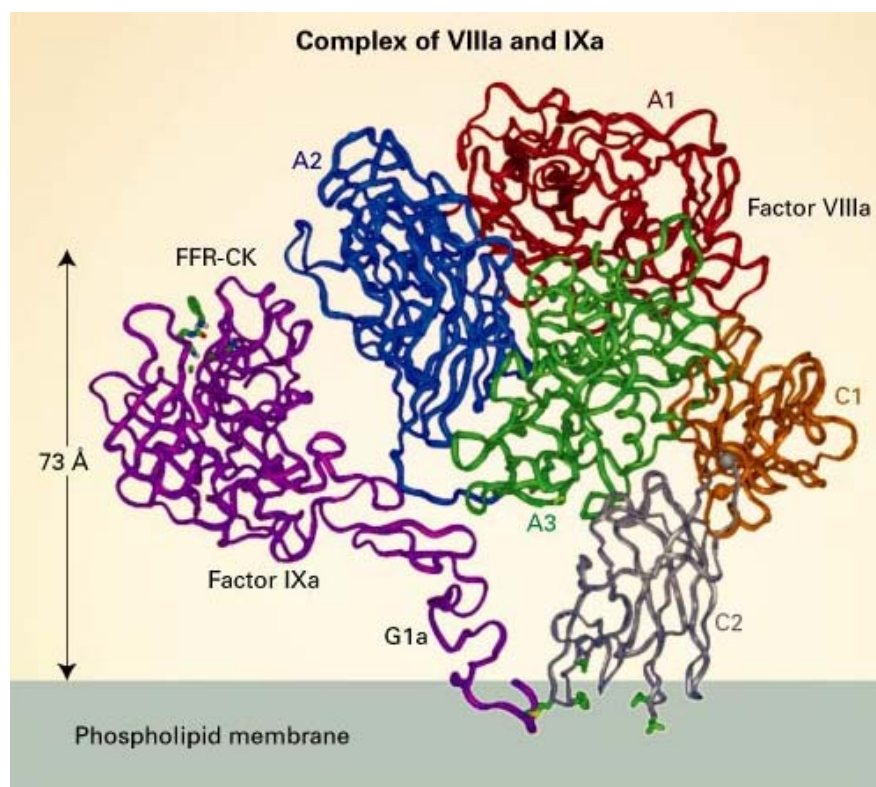


Figura 8. Model molecular del complex FVIIIa-FIXa. Imatge obtinguda del Departament de Bioquímica i Biofísica Molecular, Professor Roger Miesfeld, Universitat d'Arizona. (<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture25/Lecture25.html>)

## 1.3.2. Manifestacions clíniques

Les manifestacions clíniques varien en funció de la severitat i, per tant, tenen una repercussió notable en la qualitat de vida del pacient. La classificació clínica es basa en la detecció de l'activitat coagulant amb relació als nivells normals. Així, es considera que l'hemofília és de tipus greu quan els nivells d'activitat són inferiors a l'1%, moderada si es troben entre l'1% i el 5%, i de tipus lleu quan són superiors al 5% (Taula 3).

Hemofília greu	Hemofília moderada	Hemofília lleu
<1% del nivell d'activitat normal (<0,01 UI/ml)	1-5% del nivell d'activitat normal (0,01-0,05 UI/ml)	>5% del nivell d'activitat normal (0,05-0,4 UI/ml)
Freqüents hemorràgies espontànies a músculs i articulacions; sagnat després de ferides, accidents i cirurgia	Sagnat a músculs i articulacions per lesions insignificants, sagnat excessiu després de cirurgia i extraccions dentals	Hemorràgia no espontània per lesions severes, cirurgia, accidents
1-2 sagnats/setmana	1 sagnat/mes	Sagnat infreqüent
Hemartrosi (Figura 9)	Possible hemartrosi	Hemartrosi infreqüent

Taula 3: Classificació de les hemofílies en funció de la seva manifestació clínica. Adaptat de Protocols per al tractament de l'hemofília. Federació Mundial d'Hemofília 2006.

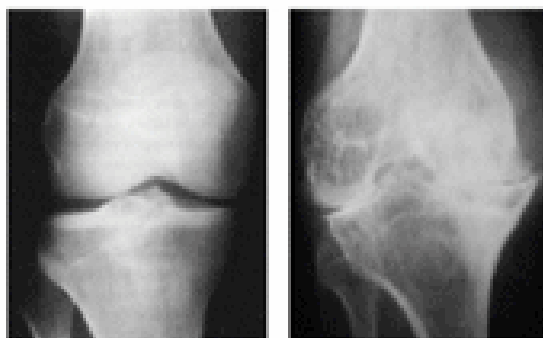


Figura 9: Radiografies d'un genoll normal (esquerra) i un genoll afectat d'hemartrosi hemofílica (dreta) causada pel sagnat intern freqüent.

Imatge de World Federation of Hemophilia, 2005.

Respecte la manifestació de la malaltia, un 43-70% dels afectats tenen hemofília A severa, un 15-26% moderada i un 15-31% tenen hemofília de tipus lleu ([www.patient.co.uk/showdoc/40024633](http://www.patient.co.uk/showdoc/40024633)). En el cas d'hemofília B, un 80% dels individus afectats són de tipus greu, un 5% moderat i un 15% lleu (Sadler i Davie 1994).

### 1.3.3. Tractament

En els últims anys, l'obtenció i purificació de concentrats dels factors de coagulació, tant d'origen plasmàtic com recombinant (que no presenten riscos de transmissió viral), han permès el desenvolupament de programes de tractament més amplis que els estrictament curatius. El tractament profilàctic, en pacients amb hemofília greu, es basa en l'administració continuada de factor deficitari (cada pocs dies, depenent del factor implicat i de cada pacient en concret) per obtenir, de manera constant, nivells del factor per sobre del 1-2%, per aconseguir emular així la simptomatologia de l'hemofília moderada. D'aquesta manera es prevé el sagnat de les articulacions i, per tant, les seves conseqüències a llarg termini (Van den Berg *et al.* 2001). Avui dia, també s'estan realitzant assajos clínics d'estudis de teràpia gènica (Chuah i Vandendriessche 2007).

### 1.3.4. Bases moleculars

#### 1.3.4.1 Bases moleculars de l'hemofília A

##### 1.3.4.1.1 El gen *F8*

La hemofília A (HA) està causada per mutacions al gen *F8*, el qual codifica el factor FVIII de coagulació. Aquest gen es troba en la porció telomèrica distal del braç llarg del cromosoma X, a la banda Xq28 (Poustka *et al.* 1991). Es va caracteritzar el 1984 (Gitschier *et al.* 1984) i va resultar ser el gen més gran i complex conegut fins llavors (Figura 10). Consta de 26 exons que s'estenen al llarg d'unes 186 kb i que donen lloc a un mRNA de 7.053 nucleòtids codificants (Toole *et al.* 1984; Wood *et al.* 1984).

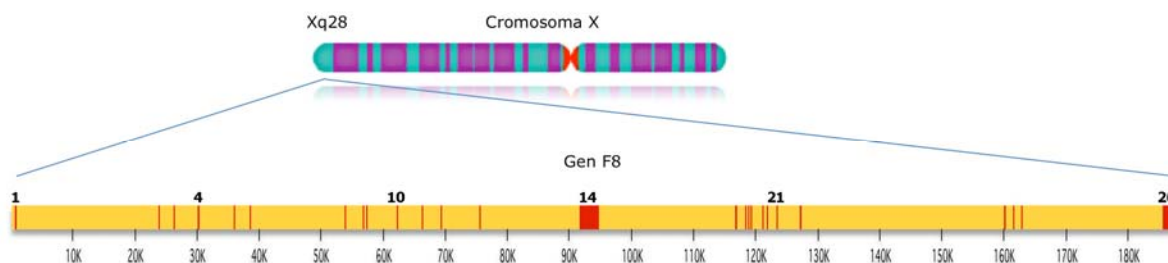


Figura 10. Organització i localització del gen del FVIII.

### 1.3.4.1.2. La proteïna FVIII

El FVIII de coagulació és una glicoproteïna que en la seva forma madura té una grandària de 2.332 aminoàcids i un pes molecular d'uns 265 KDa. Malgrat que òrgans com la melsa i el ronyó expressen quantitats similars de mRNA per gram de teixit als presentats pel fetge, la grandària d'aquest el converteix en la principal font de FVIII (Wion *et al.* 1985). El FVIII circula pel plasma associat al factor von Willebrand (FvW), tot assegurant-ne el seu correcte trànsit protegint-lo enfront la degradació proteolítica.

### 1.3.4.1.3. Mutacions

Les mutacions del gen *F8* inclouen delecions, insercions, inversions i substitucions (<http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>). La mutació més freqüent, però, és una inversió que elimina l'extrem carboxil terminal del FVIII (Antonarakis *et al.* 1995). Aquesta inversió de l'intró 22, que suposa el 25% de totes les hemofílies A i un 45% de les hemofílies A severes, és el resultat de la recombinació intracromosòmica entre una seqüència localitzada en aquest intró i una seqüència homòloga situada distalment al gen *F8*. Aquesta mutació, que implica la reorganització de dos grans seqüències genètiques (per sobre de 10 kb de grandària), té un origen pràcticament exclusiu en la línia germinal masculina (Rossiter *et al.* 1994).

## 1.3.4.2. Bases moleculars de l'hemofília B

### 1.3.4.2.1. El gen *F9*

El factor FIX de coagulació està codificat al gen *F9*, les mutacions del qual causen hemofília B (HB). El gen *F9* es troba localitzat a la regió telomèrica del braç llarg del cromosoma X, a la banda Xq27 (Chance *et al.* 1983). En posició distal hi ha els *loci* corresponents als gens *FMR-1* (responsable de la síndrome d'X Fràgil) i *F8* (Purrello *et al.* 1985). Tal com s'indica a la Figura 11, el gen *F9*, clonat el 1982, té una grandària propera a les 36 Kb i consta de 8 exons i 7 introns (Choo *et al.* 1982; Kurachi i Davie 1982; Anson *et al.* 1984; Yoshitake *et al.* 1985).

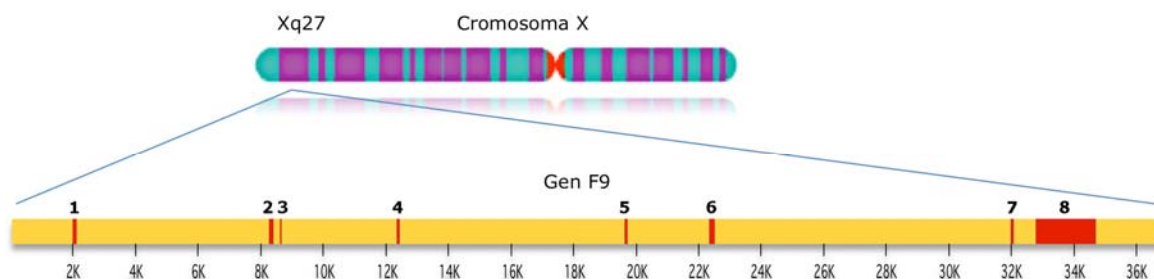


Figura 11. Organització i localització del gen del FIX.

Els vuit exons donen lloc a un total de 7 dominis funcionals i, pràcticament, cada exó codifica un domini. Així, l'exó 1 correspon al pèptid senyal, l'exó 2 al propèptid i a la regió Gla, l'exó 3 codifica una regió rica en aminoàcids aromàtics que fa de pont entre els dominis adjacents, l'exó 4 dóna lloc a la regió EGF-1, l'exó 5 a la regió EGF-2, l'exó 6 codifica el pèptid d'activació i, finalment, els exons 7 i 8 corresponen al domini proteasa o catalític (Roberts 1993).

#### 1.3.4.2.2. La proteïna FIX

El factor FIX és una serina-proteasa formada per una única cadena polipeptídica de 415 aminoàcids i uns 56 KDa, dels quals el 20% corresponen a carbohidrats. És sintetitzat al fetge i circula inactiu en plasma. La seva vida mitjana és d'unes 24 hores aproximadament (Nilsson 1994).

#### 1.3.4.2.3. Mutacions

S'han identificat tot tipus de mutacions al gen *F9* en pacients amb HB, però en contrast amb la freqüent inversió de l'intró 22 de HA, no s'ha identificat cap mutació més freqüent en el gen *F9* (Green 2004).

## 1.4. DIAGNÒSTIC DE MALALTIES HEREDITÀRIES

### 1.4.1. Diagnòstic de portadors i consell genètic

Els individus amb un historial familiar d'una malaltia hereditària han de conèixer si en són portadors per tal de saber si hi ha un risc de transmetre la malaltia a la seva descendència. El primer pas per a conèixer la seva condició de portadors consisteix en la realització d'un arbre genealògic de la família amb informació clínica fiable dels individus afectats. Si en una parella ambdós progenitors són portadors d'una mutació, per exemple, al gen *CFTR*, el risc de tenir fills afectats de FQ és del 25% (Casals *et al.* 1996). En el cas de les hemofílies, és possible diferenciar *a priori* entre portadores obligades i possibles portadores. Les portadores obligades són o bé filles de pares hemofílics o mares amb més d'un fill afectat. La condició de possible portadora es troba en casos com el de dones amb familiars hemofílics per línia materna, germanes d'hemofílics o dones amb un fill hemofílic sense que hi hagi antecedents familiars. En canvi, una dona no pot ser portadora si, procedint d'una família amb hemofílics per via paterna el seu pare no pateix la malaltia.

## 1.4.2. Estratègies de diagnòstic molecular

Un cop s'ha diagnosticat clínicament un individu afectat per una malaltia hereditària convé estudiar també el gen responsable per tal d'identificar la mutació concreta causant de la patologia.

Principalment hi ha dues estratègies diagnòstiques per a l'estudi molecular de les mutacions: les tècniques de diagnòstic directe i les de diagnòstic indirecte.

### 1.4.2.1. Diagnòstic directe

Es basa en la detecció concreta de la mutació responsable de la malaltia. Es poden aplicar tècniques que s'agruparien en:

#### 1.4.2.1.1. Tècniques de cribatge de mutacions

Mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'amplifiquen fragments concrets del gen, incloent-hi les mutacions que es pretenen estudiar. A continuació, aquests fragments s'analitzen de manera que es pugui distingir, a partir d'alguna característica fisicoquímica diferencial, entre un fragment normal i un altre fragment que contingui una mutació. Entre les diferents tècniques per al cribatge de mutacions es poden destacar les següents:

-Polimorfisme de la conformació de cadena senzilla (*single strand conformational polymorphism*, SSCP). Es basa en la diferent migració electroforètica de les seqüències de DNA de cadena senzilla en les que les mutacions puntuals alteren la seva estructura secundària (Orita *et al.* 1989).

-Electroforesi en gel de gradient desnaturalitzant (*denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE). Els fragments de DNA són separats en gels desnaturalitzants en gradient de urea/formamida. Les variacions entre seqüències homòlogues produeixen diferències en la seva temperatura de fusió i canvis de mobilitat en aquest tipus de gels (Fischer i Lerman 1980; Fischer i Lerman 1983).

-Sistemes combinats utilitzats per *kits* comercials. Actualment hi ha al mercat diversos *kits* que permeten la detecció simultània d'un nombre elevat de mutacions diferents (>30) per a determinats gens (per exemple *Cystic Fibrosis Assay, Abbot* ; *INNO-LiPA CFTR, Innogenetics*).

#### 1.4.2.1.2. Seqüenciació directa

Consisteix en l'anàlisi de les regions rellevants del gen mitjançant la determinació de la seqüència específica de nucleòtids. Les zones més rellevants acostumen a incloure els exons, les seqüències intròniques flanquejants i les regions implicades en la regulació de l'expressió (Costa *et al.* 2000). En un principi la complexitat i grandària de certs gens, així com la laboriositat de molts protocols de seqüenciació, van dissuadir diversos laboratoris de la utilització de la seqüenciació sistemàtica com a sistema de diagnòstic d'elecció (Paynton *et al.* 1991). Tot i així, actualment s'ha estès la utilització de la seqüenciació directa com a tècnica diagnòstica molecular de rutina (Vidal *et al.* 2001).

#### 1.4.2.2. Diagnòstic indirecte

Les tècniques de diagnòstic indirecte es basen en l'anàlisi del lligament entre un o més polimorfismes o marcadors i el gen responsable de la malaltia (Pillet i Schorderet 1994). Com que aquests polimorfismes poden estar localitzats intragènica o a prop de gens, en individus portadors o afectats de malalties hereditàries es pot estudiar el patró de segregació de l'al·lel del polimorfisme que s'hereta conjuntament amb l'al·lel mutant del gen. Aquesta tècnica ens permet detectar quins individus són portadors d'una malaltia dins una família de manera ràpida i fiable per a realitzar el consell genètic (Casals *et al.* 1996).

Per a aquests estudis és imprescindible disposar d'un nombre mínim de familiars portadors o afectats de la malaltia per tal d'estudiar el patró de segregació de l'al·lel del polimorfisme que s'hereta conjuntament amb l'al·lel mutant del gen, fet que permet l'anàlisi indirecta de la mutació. Cal destacar que, tot i ser possible realitzar un seguiment del cromosoma portador del gen defectuós, els polimorfismes no tenen cap relació amb l'anomalia i, per tant, no proporcionen informació sobre el tipus de mutació causant de la malaltia.

Hi ha tot un seguit de limitacions inherents en aquesta aproximació, com ara la impossibilitat d'obtenir mostres de parents clau per a l'estudi, els casos esporàdics en els quals l'absència d'història familiar per a la malaltia no permet determinar el cromosoma afectat, el risc de recombinació entre el marcador utilitzat i el gen afectat i la manca de informativitat dels marcadors utilitzats (Goodeve 1998).

#### 1.4.2.2.1. Definició de polimorfisme

Un locus és polimòrfic si presenta com a mínim dos al·lels amb freqüències superiors a l'1% en individus d'una població. S'han descrit diferents tipus de polimorfismes en humans, com són els d'un únic nucleòtid o SNP (*single nucleotide polymorphism*), els microsatèl·lits o STRs (*short tandem repeats*) i els minisatèl·lits o VNTR (*variable number of tandem repeats*). Els SNPs són substitucions d'un sol nucleòtid en el DNA i poden estar en regions no codificants o als exons dels gens, que a causa de la degeneració del codi genètic no impliquen un canvi de l'aminoàcid que codifiquen, o si aquest canvia, la funció de la proteïna resultant no queda afectada. Els STRs o microsatèl·lits són repeticions consecutives (en tàndem) d'una seqüència bàsica de 2 a 6 nucleòtids. A partir de 7 nucleòtids ja s'anomenen VNTR o minisatèl·lits. Els microsatèl·lits són seqüències de DNA generalment ubicades en regions no codificants repartides per tot el genoma, el nombre de repeticions de les quals és hipervariable entre individus i propi per a cada persona (DNA *fingerprinting*). Atesa la seva variabilitat, els STRs són emprats en nombroses aplicacions, com ara en medicina forense (Herber i Herold 1998; Sacchetti *et al.* 1999), en tests de paternitat (Ruitberg *et al.* 2001; Tracey 2001), en anàlisi de lligament (Georges *et al.* 1993), en mapatge genètic (Dixon *et al.* 1992, Roberts *et al.* 1999), en genètica de poblacions (Hughes i Queller 1993; Taylor *et al.* 1994) i en estudis d'evolució (Bowcock *et al.* 1994). La hipervariabilitat està causada pel fet que les seqüències simples repetides provoquen una elevada freqüència de guany o pèrdua de repeticions per confusió de la maquinària de replicació. La pròpia autocomplementarietat de les seqüències ajuda aquest procés.

Els microsatèl·lits es poden estudiar mitjançant PCR amb marcatge fluorescent i separació electroforètica amb detecció automatitzada (Kochhan *et al.* 1994) emprant encebadors que flanquegen la regió repetitiva. Quan un individu presenta dos al·lels diferents en un STR, és a dir, quan té un nombre diferent de repeticions d'aquell locus en cada cromosoma, es diu que aquell individu és informatiu.

#### 1.4.2.2.2. Polimorfismes utilitzats per al diagnòstic de fibrosi quística

S'han descrit quatre polimorfismes del tipus STR situats intragènica al gen *CFTR*. Aquest són: IVS6aGATT, IVS8CA, IVS17bTA i IVS17bCA (Zielenski *et al.* 1991a; Morral i Estivill 1992; Morral *et al.* 1992; Gelfi *et al.* 1994). Els seus noms indiquen tant l'intró on estan localitzats cadascun d'ells com la seva seqüència repetitiva; el marcador IVS6aGATT és un tetranucleòtid i la resta estan formats per repeticions d'un dinucleòtid. Els



microsatèl·lits IVS8CA i IVS17bTA són els més àmpliament emprats per a estudis indirectes (Casals *et al.* 1996).

També s'han utilitzat marcadors extragènics situats a prop del gen *CFTR* per a estudis de lligament (Dreesen *et al.* 2000). Aquest autors van emprar els marcadors D7S523, D7S486, D7S480 i D7S490 (Figura 12), tots ells formats per la repetició del dinucleòtid (CA)<sub>n</sub>.

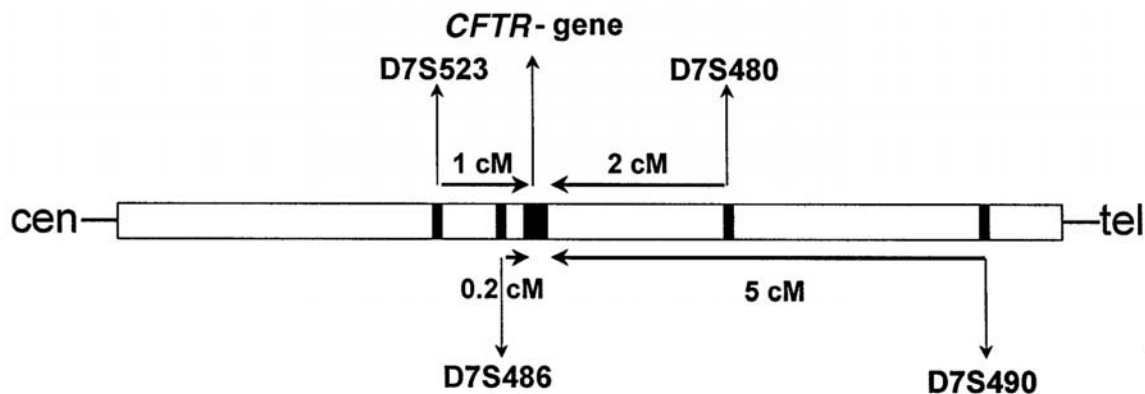


Figura 12. Microsatèl·lits flanquejants del gen *CFTR*. Imatge obtinguda de Dreesen *et al.* 2000.

#### 1.4.2.2.3. Polimorfismes utilitzats per al diagnòstic d'hemofília A

Els marcadors STR més utilitzats en l'actualitat són les repeticions de dinucleòtids localitzades als introns 13 i 22 del gen *F8* (Yip *et al.* 1994; Dangerfield *et al.* 1997). Aproximadament el 75% de les dones de la majoria de grups ètnics són heterozigotes per a almenys un dels dos polimorfismes (Goodeve 1998).

La resta de polimorfismes intragènics consisteixen en SNPs que alteren dianes de restricció específiques. També s'han descrit marcadors extragènics que es poden utilitzar per a l'anàlisi indirecta de HA: DXS1073, DXS9901, G6PD, DXS1108 i DXS8087 (Gigarel *et al.* 2004).

#### 1.4.2.2.4. Polimorfismes utilitzats per al diagnòstic d'hemofília B

Onze polimorfismes corresponen a variacions dial·lèliques, un dels quals és multial·lèlic (Peake 1993, Figueiredo 1994). Tots es poden detectar mitjançant la tècnica de PCR i digestió amb enzims de restricció. Recentment s'ha descrit un treball en que s'utilitzen els marcadors extragènics DXS1232, DXS984 i DXS1192 per al diagnòstic indirecte de HB (Fiorentino *et al.* 2006).

### 1.4.3. Diagnòstic prenatal

Fins a principis dels anys setanta, la recomanació habitual per a les famílies portadores d'alguna malaltia hereditària era la d'abstenir-se de tenir fills. En canvi, en les últimes dècades el diagnòstic prenatal s'ha aplicat en parelles amb un risc elevat de transmetre la malaltia genètica a la seva descendència. El mètode més àmpliament utilitzat actualment per al diagnòstic molecular prenatal és la biòpsia de còrion, en la qual s'obté una mostra de vellositats coriòniques d'origen fetal (Brambati i Tului 2005). Un segon mètode és l'amniocentesi o obtenció del líquid amniòtic. La biòpsia corial permet un diagnòstic més precoç, ja que es pot realitzar a partir de les 10-11 primeres setmanes de gestació. En canvi, l'extracció de líquid amniòtic s'efectua a partir de la setmana 14, la qual cosa suposa un diagnòstic més tardà, fet que s'ha de considerar en termes mèdics i socials. Tanmateix, la biòpsia de vellositats coriòniques requereix una anàlisi morfològica addicional per a confirmar que el material extret és d'origen fetal i no matern, possibilitat que cal descartar completament per a evitar possibles errors de diagnòstic. A més a més, el risc d'avortament degut a la pràctica d'aquesta tècnica invasiva és lleugerament superior que el de l'amniocentesi (Mujezinovic i Alfirevic 2007). Sigui quina sigui la tècnica emprada, en el cas de detecció d'un fetus afectat els progenitors tenen dues alternatives: seguir endavant amb l'embaràs (tot i l'afectació del fetus) o l'avortament terapèutic (Tedgard 1998) dins de les 20 setmanes d'embaràs.

### 1.4.4. Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP)

Més recentment, les tècniques de reproducció assistida han possibilitat una alternativa de detecció més primerenca que el diagnòstic prenatal; l'anomenat Diagnòstic Genètic Preimplantacional (DGP) (Sermon *et al.* 2005), que es basa en la detecció d'anomalies cromosòmiques o malalties monogèniques mitjançant l'estudi de biòpsies embrionàries. Un cop s'han analitzat genèticament els embrions, els que són sans són seleccionats per a la seva transferència a l'úter matern (Sermon 2002). El DGP s'està aplicant àmpliament ja que permet reduir el risc d'embarassos amb descendència afectada. Tanmateix, el DGP només es pot realitzar en parelles sotmeses a un cicle de fecundació *in vitro*, tot i que a *priori* aquestes no presentin problemes de fertilitat.

El procediment consisteix en l'estimulació hormonal de la dona per tal d'aconseguir un nombre elevat d'oòcits, la punció fol·licular, la inseminació *in vitro* dels oòcits i el cultiu dels embrions resultants.

### 1.4.4.1. Tipus de DGP

Hi ha diferents estadis de desenvolupament embrionari en els quals es pot aplicar el DGP:

#### 1.4.4.1.1. Anàlisi del primer corpuscle polar (1CP)

El primer corpuscle polar (1CP) es forma durant la primera divisió meiótica de la gametogènesi femenina. Cadascun dels cromosomes homòlegs de la oogònia es segrega un a l'1CP i l'altre es manté a l'oòcit. L'1CP té, doncs, la dotació genètica complementària a la de l'oòcit en metafase II (MII), per tant, si es detecta la presència d'un al·lel mutant en l'1CP es pot deduir que l'oòcit tindrà l'al·lel normal per a la mutació (Figura 13), i viceversa. Com que l'1CP, un cop extrusionat, no té cap funció reproductiva, la seva biòpsia mitjançant micromanipulació i l'anàlisi posterior permet realitzar una caracterització genètica indirecta de l'oòcit (Verlinsky *et al.* 1992) (Figura 14).

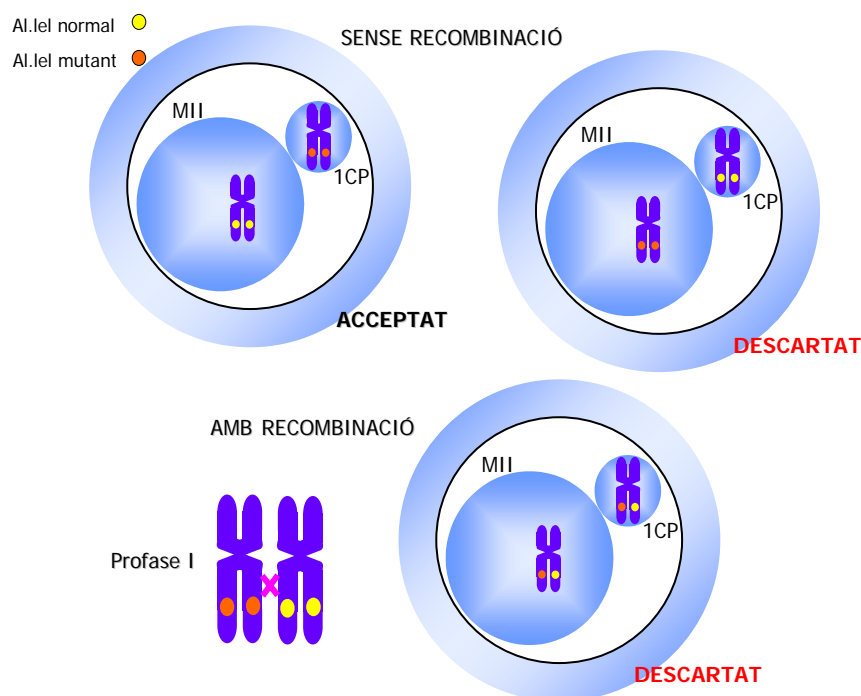


Figura 13. Esquema de la segregació meiótica entre l' 1CP i el corresponent oòcit en MII.

Un dels avantatges que presenta la biòpsia del 1CP és que aquesta es duu a terme el mateix dia que la punció fol·licular (Dia 0), la qual cosa implica que es disposa de tres a quatre dies per a fer l'anàlisi i donar un diagnòstic genètic abans de transferir els embrions (Dia +4 o +5). Atès que l'1CP és una cèl·lula d'origen femení, aquest tipus de diagnòstic

està especialment indicat per casos en que la dona és la portadora de l'anomalia genètica (Gitlin *et al.* 2003).

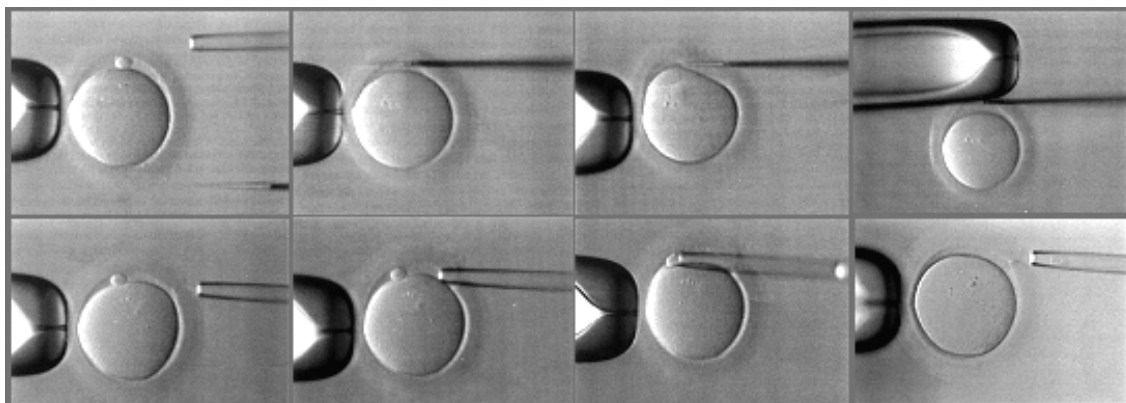


Figura 14. Seqüència de la biòpsia del 1CP d'un oòcit en metafase II amb la tècnica de dissecció parcial de la zona (PZD *partial zona dissection*). Mitjançant micromanipulació es realitza mecànicament un tall a la zona pel·lúcida amb una agulla i posteriorment s'insereix una micropipeta a l'obertura creada i es biòpsia l'1CP per succió (De Vos i Van Steirteghem 2001). Imatge obtinguda de <http://www.reproductivegenetics.com>.

#### 1.4.4.1.2. Anàlisi de blastòmers

És la tècnica de DGP més utilitzada (Goossens *et al.* 2009). Consisteix en la biòpsia d'un blastòmer el tercer dia del desenvolupament, en que l'embrió es troba en estadi de 6-10 cèl·lules (Figura 15). L'avantatge més evident és que s'analitzen tant la contribució paterna com la materna i és, per tant, comparable a un diagnòstic prenatal, però més precoç. Tanmateix, un desavantatge d'aquesta tècnica és el fet que com que la biòpsia es realitza el Dia +3, tan sols es disposa d'unes poques hores per a donar un diagnòstic i poder fer la transferència embrionària (Gianaroli *et al.* 1999). Un altre desavantatge important està lligat al fenomen anomenat mosaïcisme embrionari, que consisteix en la coexistència de línies cromosòmicament normals i línies aneuploides en els embrions com a conseqüència d'errors produïts en les divisions mitòtiques embrionàries. Aquest fet ha estat detectat en un percentatge considerable d'embrions (per sobre del 30%) (Harper *et al.* 1995; Wells *et al.* 2000; Voullaire *et al.* 2000; Munné *et al.* 2002).

Cap d'aquestes dues tècniques presenten efectes negatius sobre el desenvolupament embrionari (Magli *et al.* 2004; Cieslak-Janzen *et al.* 2006), sempre que es practiquin correctament (Munne *et al.* 2007).

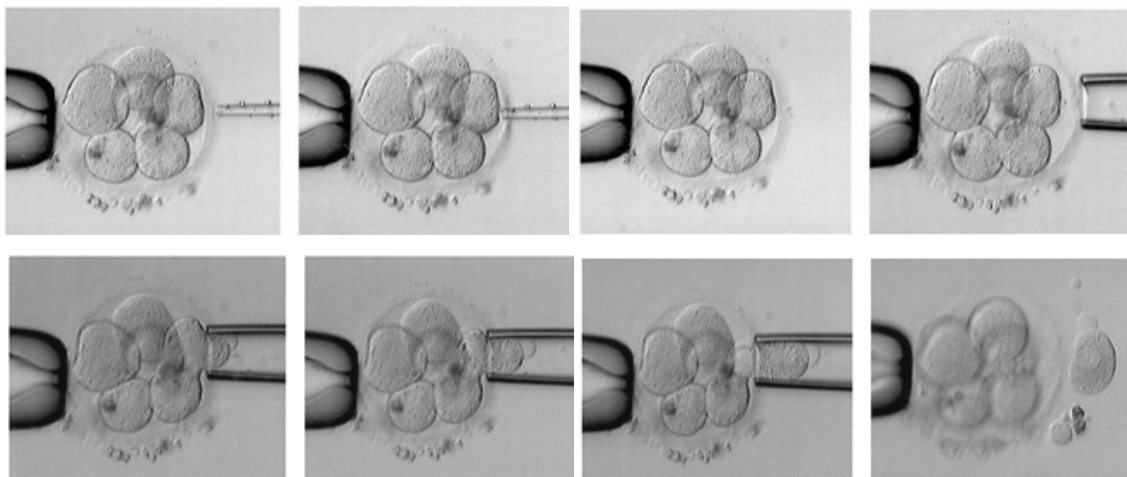


Figura 15. Seqüència de la biòpsia d'un blastòmer d'un embrió. En aquest cas es digereix localment la zona pel·lucida amb àcid Tyrode (pH 2,5) i es crea un forat per on s'extraurà la cèl·lula mitjançant aspiració (De Vos i Van Steirteghem 2001). Imatge obtinguda de <http://www.sbvfv.com>.

#### 1.4.4.1.3. Anàlisi del blastocist

És la variant de DGP que analitza cèl·lules obtingudes en la biòpsia embrionària més tardana possible (Dokras *et al.* 1990). Consisteix en un cultiu *in vitro* de l'embrió fins a l'estadi de blastocist (aproximadament Dia +5) (Figura 16) i la biòpsia de fins a 30 cèl·lules del trofèctoderm. El gran avantatge és que es disposa de més d'una cèl·lula per a l'anàlisi i que el cultiu fins a blastocist ja de per si, permet seleccionar els embrions més viables (Sandalinas *et al.* 2001). Un dels desavantatges és el poc marge de temps que queda per al diagnòstic, ja que la transferència embrionària es pot fer com a màxim el Dia +6 (Committee PGD 2002). Encara que hi ha pocs centres al món que practiquin aquesta tècnica, ja es comencen a publicar treballs a on s'han utilitzat blastocists per a dur a terme el DGP (Kokkali *et al.* 2005; McArthur *et al.* 2008).



Figura 16. Imatge d'un blastocist el Dia +5 del desenvolupament. D'esquerra a dreta es poden observar: la massa cel·lular interna, que donarà lloc a l'embrió; la cavitat blastocèlica; i cèl·lules del trofèctoderm on es realitza la biòpsia. Imatge obtinguda de Braude *et al.* 2002.

### 1.4.4.2. Indicacions del DGP

Les indicacions més importants de les diferents variants de DGP són:

#### 1.4.4.2.1. Detecció d'anomalies cromosòmiques numèriques i estructurals

És l'aplicació més estesa del DGP (Sermon *et al.* 2004). Les dones d'edat materna avançada tenen un elevat risc de concebre embrions aneuploides (Munné *et al.* 1995). També està descrita una major incidència d'anomalies cromosòmiques en parelles joves que no s'han aconseguit l'embaràs després de tres cicles de fecundació *in vitro* i en parelles que han patit més de dos avortaments espontanis (Gianaroli *et al.* 2001). La utilització del DGP per a cribatge d'aneuploidies permet identificar anomalies cromosòmiques en gàmetes i embrions mitjançant la hibridació *in situ* amb sondes fluorescent (FISH) (Figura 17) per a l'estudi dels cromosomes més implicats en descendència trisòmica (Munné *et al.* 1998; Kuliev *et al.* 2003; Wilton *et al.* 2003) i també per a la detecció d'embrions desequilibrats en parelles portadores de reorganitzacions cromosòmiques (principalment translocacions robertsonianes i recíproques) (Durban *et al.* 2001; Munné 2002; Pujol *et al.* 2006).

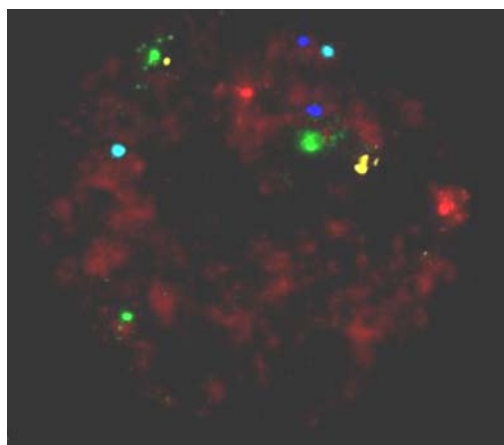


Figura 17. Imatge d'una FISH multicolor en un blastòmer. Les tres senyals verdes indiquen trisomia 21. Imatge obtinguda de Reprogenetics, NJ, USA.

#### 1.4.4.2.2. Detecció de malalties monogèniques

Les parelles portadores de malalties hereditàries tenen un elevat risc de tenir descendència afectada. El DGP de malalties monogèniques es basa en la identificació dels embrions lliures de les mutacions que porten els seus progenitors. Potencialment és possible realitzar el DGP de qualsevol malaltia genètica de la qual el gen responsable ha estat caracteritzat, independentment del seu patró d'herència autosòmica dominant, autosòmica recessiva o lligada al X. Idealment, convé que la mutació responsable hagi estat identificada i/o que familiars de la parella hagin estat també estudiats.

Fins a l'actualitat, s'ha aplicat el DGP per a l'anàlisi de més de 160 malalties monogèniques diferents (PGDIS 2008) (Taula 4).

<p>Achondroplasia; ACH          Acyl-CoA dehydrogenase, very long-chain; ACADVL          Adenomatous polyposis of the colon; APC          Albinism, ocular, type I; OA1          Alpers diffuse degeneration of cerebral gray matter with hepatic cirrhosis          Alpha 1 antitrypsin deficiency (AAT)          Amyloidosis I, hereditary neuropathic          Ataxia-telangiectasia; AT          Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus; BPES          Brachydactyly, Type B1; BDB1          Breast cancer, BRCA1          Bruton agammaglobulinaemia tyrosine kinase; BTK          Ceroid lipofuscinosis, neuronal 2, late infantile; CLN2          Charcot-Marie-Tooth disease, demyelinating, type 1A; CMT1A          Charcot-Marie-Tooth disease, X-linked, 1; CMTX1          Chondrodysplasia punctata 1, X-linked recessive; CDPX1          Citrullinaemia, classic          Colorectal cancer, hereditary non-polyposis, type 1; HNPCC1          Congenital adrenal hyperplasia (CAH)          Currarino syndrome          Cystic Fibrosis; CF          Darier-White disease; DAR          Diamond-Blackfan anaemia; DBA          Dystrophia myotonica 1          Ectodermal dysplasia 1, anhidrotic; ED1          Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate syndrome 1; EEC1          Emery-Dreifuss muscular dystrophy, X-linked; EDMD          Epidermolysis bullosa lethalis          Epiphyseal dysplasia, multiple, 1; EDM1          Fabry disease          Fanconi anaemia, complementation group C; FANCC          Fanconi anaemia, complementation group F; FANCF          Fanconi anaemia, complementation group J          Fragile site mental retardation 1          Friedreich ataxia 1; FRDA          Gangliosidosis, generalized GM1, type I          Glomovenous malformation (GVM)          Glycogen storage disease VI          Haemoglobin-alpha locus 2; HBA2          Hemophagocytic lymphohistiocytosis, familial, 2          Hemophilia B          Homocystinuria due to deficiency of N(5,10)-methylene tetrahydrofolate reductase activity          Huntington disease; HD          Hydrocephalus, X-linked; L1CAM          Hypophosphatasia, infantile          Immunodeficiency with hyper-IgM, type 1; HIGM1          Isovaleric acidaemia; IVA          Leigh syndrome; LS          Li-Fraumeni syndrome 1; LFS1          Long-chain 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase deficiency;HADHA          Marfan syndrome; MFS          Metachromatic leukodystrophy          Methylmalonic aciduria and homocystinuria (MMACHC)          Migraine, familial hemiplegic, 1; FHM1          Mucopolysaccharidosis type II (Hunter) Hunter-McAlpine craniosynostosis syndrome          Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency; MADD          Multiple endocrine neoplasia, type IIA; MEN2A          Muscular dystrophy, Duchenne type; DMD          N-acetylglutamate synthase deficiency          Neurofibromatosis, type II; NF2          Niemann-Pick Disease          Oculocutaneous albinism, type I; OCA1          Omenn syndrome          Ornithine transcarbamylase deficiency          Osteogenesis imperfecta congenita; OIC          Osteopetrosis, autosomal recessive          Pelizaeus-Merzbacher-like disease; PMLD          Phenylketonuria          Polycystic kidney disease 2; PKD2          Popliteal pterygium syndrome; PPS          Retinitis pigmentosa          Retinoblastoma; RB1          Rhesus blood group, CcEe antigens; RHCE          Sandhoff disease          Smith-Lemli-Opitz syndrome; SLOS          Spinal muscular atrophy, type I; SMA1          Spinocerebellar ataxia 2; SCA2          Spinocerebellar ataxia 7; SCA7          Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency          Tay-Sachs disease; TSD          Treacher Collins-Franceschetti syndrome; TCOF          Tuberous sclerosis type 2          Ulnar-mammary syndrome; UMS          Wiskott-Aldrich Syndrome; WAS</p>	<p>Acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain, deficiency          Adenosine deaminase deficiency; ADA          Adrenoleukodystrophy; ALD          Alopecia universalis congenita; ALUNC          Alport syndrome, X-linked; ATS          Androgen receptor; (testicular feminization; spinal and bulbar muscular atrophy; Kennedy disease)          Angioedema, hereditary; HAE          Basal cell nevus syndrome; BCNS (Gorlin)          Blood group - Kell-Cellano system          Brain tumour, posterior fossa of infancy, familial          Breast cancer, BRCA2          Canavan disease          Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2E          Charcot-Marie-Tooth disease, demyelinating, type 1B; CMT1B          Cholestasis, progressive familial intrahepatic 2          Choroideraemia; CHM          Collagen, type IV, alpha-5; COL4A5          Colorectal cancer, hereditary non-polyposis, type 2; HNPCC2          Craniofacial dysostosis, type I; (CFD1)          Cutis laxa, autosomal recessive, type I          Cystinosis, nephropathic; CTNS          Deafness, neurosensory, autosomal recessive 1; DFNB1          Dysautonomia, familial          Early-onset familial Alzheimer disease          Ectodermal dysplasia, anhidrotic          Emery-Dreifuss muscular dystrophy, autosomal recessive; EDMD3          Epidermolysis bullosa dystrophica, Pasini type          Epidermolysis bullosa simplex and limb-girdle muscular dystrophy          Exostoses, multiple, type I          Facioscapulohumeral muscular dystrophy 1A; FSHMD1A          Fanconi anaemia, complementation group E; FANCE          Fanconi anaemia, complementation group G          Fanconi anaemia, complementation group A; FANCA          Fragile site, folic acid type, rare, FRA(X)(q28); FRAXE          Galactosaemia          Gaucher disease, type I          Glutaric acidaemia I          Haemoglobin-alpha locus 1; HBA1          Haemoglobin-beta locus; HBB          Hemophilia A          HLA matching genotyping          Hoyeraal-Hreidarsson syndrome; HHS          Hurler syndrome          Hyperinsulinemic hypoglycaemia, familial, 1; HHF1          Hypophosphatemic rickets, X-linked dominant          Incontinentia pigmenti; IP          Krabbe disease          Leukoencephalopathy with vanishing white matter; VWM          Loeys-Dietz syndrome; LDS          Machado-Joseph disease; MJD          Meckle-Gruber Syndrome          Metaphyseal chondrodysplasia, schmid type; MCDS          Microcoria-congenital nephrosis syndrome          Morquio syndrome, non-keratosulfate-excreting type          Multiple endocrine neoplasia, type I; MEN1          Muscular dystrophy, Becker type; BMD          Myotubular myopathy 1; MTM1          Neurofibromatosis, type I; NF1          Neuropathy, hereditary sensory and autonomic, type III; HSN3          Norrie disease; NDP          Oculocutaneous albinism, type II; OCA2          Optic atrophy 1; OPA1          Osteogenesis imperfecta congenita; OIC          Osteopetrosis, autosomal recessive          Pancreatitis, hereditary; PCTT          Peutz-Jeghers syndrome; PJS          Polycystic kidney disease 1; PKD1          Polycystic kidney disease, autosomal recessive; ARPKD          Propionic acidaemia          Retinitis pigmentosa 3; RP3          Rett syndrome; RTT          Rhesus blood group, D antigen; RHD          Sickle cell anaemia          Sonic hedgehog; SHH          Spinocerebellar ataxia 1; SCA1          Spinocerebellar ataxia 6; SCA6          Stickler syndrome, type I; STL1          Symphalangism, proximal; SYM1          Torsion dystonia 1, autosomal dominant; DYT1          Tuberous sclerosis type 1          Tyrosinaemia, type I          Von Hippel-Lindau syndrome; VHL          Zellweger syndrome; ZS</p>
---	--

*Taula 4. Llistat de les malalties monogèniques per les quals s'ha realitzat DGP. Dades obtingudes de Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS 2008).*

## 1.5. DGP DE MALALTIES MONOGÈNIQUES

### 1.5.1. Història i tècniques

El DGP de malalties monogèniques es realitza principalment mitjançant la tècnica de la PCR. Descrita per Saiki i col·laboradors al 1985 (Saiki *et al.* 1985) va revolucionar el camp del diagnòstic molecular aplicant-se a tot tipus d'estudis. Es basa en l'amplificació de seqüències curtes de DNA emprant una DNA polimerasa termostable (la més utilitzada és la Taq DNA polimerasa). D'aquesta manera, es poden aconseguir milions de còpies d'un fragment diana flanquejat per una parella d'encebadors de seqüència coneguda. Aquest producte obtingut és analitzat de diferents maneres per a determinar per exemple la presència de la mutació, polimorfisme o microsatèl·lit.

Pocs anys després de l'aparició de la PCR ja se'n va començar a plantejar l'ús en cèl·lules aïllades (Jeffreys *et al.* 1988), en noves aplicacions com la tipificació de l'esperma (*sperm typing*) (Li *et al.* 1988) o en la caracterització d'embrions en parelles de risc mitjançant el DGP.

Una cèl·lula diploide aïllada conté tan sols dues còpies d'un gen autosòmic, la qual cosa obliga a aplicar molts cicles d'amplificació i mètodes de gran sensibilitat per fer possible la detecció de seqüències úniques. El primer protocol publicat va ser el de malalties lligades al sexe (entre elles l'hemofília), que consistia en el sexatge d'embrions mitjançant l'amplificació de seqüències repetitives del cromosoma Y (Handyside *et al.* 1990). La utilització de seqüències repetitives va fer possible que amb un nombre reduït de cicles d'amplificació es poguessin visualitzar els productes de PCR amb un gel tenyit amb bromur d'etidi. Quan s'obtenia producte del fragment esperat, l'embrió era diagnosticat com a mascle i es considerava llavors que un embrió era femella quan no s'obtenia ampliació d'un blastòmer. Aquesta estratègia, però, va originar un error de diagnòstic atesa la transferència d'un embrió mascle que va fallar l'amplificació i que va ser diagnosticat erròniament com a femella (Handyside i Delhanty 1993). Per tal de millorar la fiabilitat del protocol posteriorment es va aplicar l'amplificació simultània de seqüències dels cromosomes X i Y (Grifo *et al.* 1992; Levinson *et al.* 1992). Malgrat les millores aconseguides, la tècnica que va ser més estesa per al sexatge d'embrions va ser la hibridació *in situ* amb sondes fluorescents (FISH) (Munne *et al.* 1993; Griffin *et al.* 1994). Aquesta tècnica és més fàcilment aplicable, evita certs problemes de la PCR en cèl·lules aïllades i, a més permet enumerar fins a 13 cromosomes en una sola cèl·lula (Abdelhadi



*et al.* 2003), entre ells els cromosomes X i Y per tal de determinar el sexe dels embrions (Figura 18).

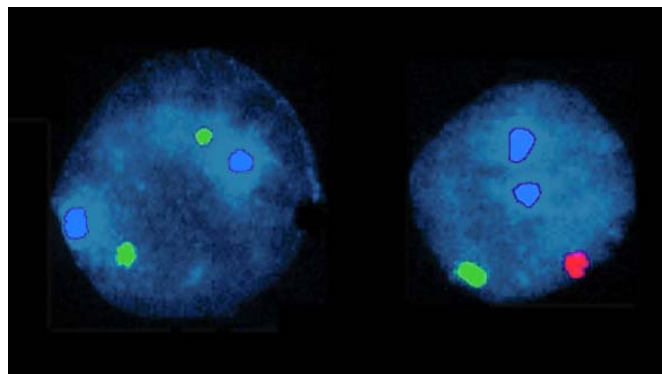


Figura 18. FISH multicolor emprant sondes per als cromosomes 21 (blau), X (verd) i Y (vermell). La cèl·lula de l'esquerra correspon a un embrió femella i la de la dreta prové d'un embrió mascle. Imatge obtinguda de Braude *et al.* 2002.

Tanmateix, totes aquestes estratègies basades en el sexatge d'embrions no permeten la detecció de la mutació. Això implica la transferència únicament d'embrions femelles (malgrat que la meitat són portadors) i que es descartin sistemàticament tots els embrions mascles (tot i que el 50% seran sans). Protocols de DGP que permeten la detecció directa o indirecta de les mutacions proporcionen una alternativa per a aquelles parelles que cerquen la transferència d'embrions sans, independentment del sexe.

El primer protocol que va permetre l'anàlisi directa d'una mutació va ser descrit per un grup britànic, el qual permetia la detecció de la mutació  $\Delta F508$  del gen *CFTR* en blastòmers d'embrions (Coutelle *et al.* 1989). Els primers naixements aconseguits amb aquest protocol es van produir uns anys després (Handyside *et al.* 1992).

Posteriorment es va descriure un mètode d'amplificació de cèl·lules aïllades, la *nested* PCR (Kemp *et al.* 1989), que consisteix en una primera ronda d'amplificació d'un fragment de certa mida i, tot seguit, emprar aquest producte com a motllo en una segona reacció utilitzant encebadors interns als emprats en la primera ronda, de manera que s'aconseguia incrementar l'especificitat de l'amplificació i, alhora s'obtenia més quantitat de producte de PCR. Aquesta tècnica ha estat àmpliament emprada i s'ha combinat amb l'ús d'enzims de restricció per a l'anàlisi directa o indirecta de mutacions (Kuliev *et al.* 1998; Strom *et al.* 1998; Ray *et al.* 1999; Chamayou *et al.* 2002). L'anàlisi indirecta es pot aconseguir mitjançant l'estudi de polimorfismes de restricció (RFLP). El diagnòstic directe

es pot fer quan la mutació crea o elimina una diana de restricció. El fragment digerit serà d'una mida diferent al complet i es podrà distingir en un gel d'electroforesi (Figura 19).

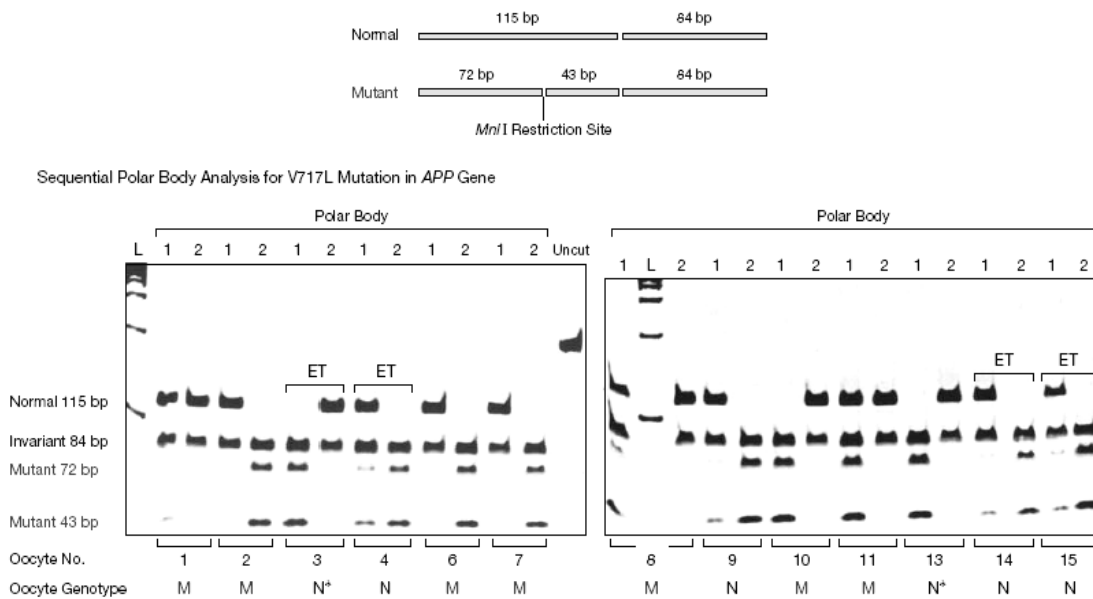


Figura 19. Anàlisi en gel de poliacrilamida de la digestió amb *Mnl I* per a la detecció de la mutació V717L del gen APP, responsable de la malaltia d'Alzheimer precoç. L'estratègia emprada en aquest DGP és l'anàlisi seqüencial del primer i el segon corpuscles polars. ET indica els embrions resultants transferits. Imatge obtinguda de Verlinsky et al. 2002b.

En aquella primera època es van produir diversos errors en el diagnòstic per part de tots els grups implicats en DGP, i la majoria de casos van ser deguts a la fallada d'amplificació d'un dels al·lels d'embrions heterozigots compostos de dues mutacions diferents (Grifo et al. 1994; Harper i Handyside 1994; Verlinsky 1996).

Una altra estratègia desenvolupada per a l'anàlisi genètica de cèl·lules aïllades és l'amplificació total del genoma cel·lular (*whole genome amplification*, WGA), a la qual es dedicarà un capítol apart.

Un avenç important en el camp va ser l'aplicació de la PCR fluorescent (Findlay et al. 1995b). En aquesta amplificació un dels encebadors està marcat amb un fluorocrom, de manera que es generarà un producte fluorescent que podrà ser analitzat en un seqüenciador de DNA. La sensibilitat de la PCR fluorescent és al voltant de 1.000 vegades major que la visualització amb bromur d'etidi (Hattori et al. 1992) i presenta també una resolució molt alta, atès que pot ser emprada per a la detecció de fragments amb una diferència de tan sols un parell de bases (Figura 20).

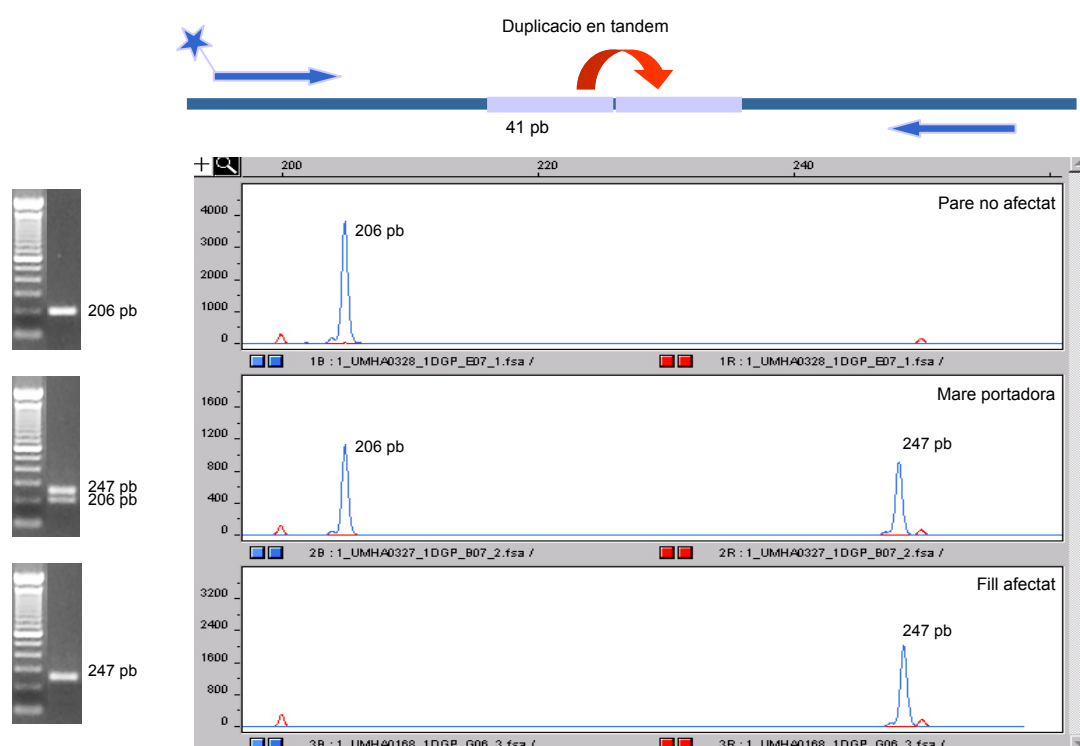


Figura 20. Comparació d'un gel d'agarosa (esquerra) vs. electroforesi capil·lar (dreta) per a la resolució de dos fragments de PCR de 41 pb de diferència. La mateixa mostra es va sotmetre en paral·lel als dos tipus d'electroforesi. Els fragments de 206 i 247 pb corresponen a l'al·lel normal i al mutant, respectivament.

La gran majoria de protocols de DGP de malalties monogèniques utilitzen la PCR *multiplex* (Rechitsky *et al.* 1999; Rechitsky *et al.* 2001). Aquesta tècnica es basa en la utilització conjunta de diverses parelles d'encebadors de manera que es poden estudiar diversos *loci* simultàniament. Això ens permet, per exemple, l'anàlisi directa del *locus* en el que es troba la mutació juntament amb un o més microsatèl·lits (Dreesen *et al.* 2000; Goossens *et al.* 2003). Aquesta estratègia acostuma a combinar-se amb la PCR fluorescent per tota la sèrie d'avantatges que presenta (Findlay *et al.* 1995b).

Altres tècniques, com per exemple les emprades en el cribatge de mutacions, com ara la DGGE en el gen de la  $\beta$ -talassèmia també han estat aplicades per a l'anàlisi de diverses mutacions (el-Hashemite *et al.* 1997). Aquestes tècniques però, poden presentar certa complexitat tant per a la posada a punt com per a la interpretació dels resultats.

Un altre dels avenços més recents és l'aplicació de la PCR a temps real (*Real Time-PCR*) en la qual s'utilitzen diversos tipus de marcatge fluorescent que permeten la monitorització de l'aparició dels productes de PCR a mesura que aquests es van generant (Pierce *et al.* 2000 ; Rice *et al.* 2002; Pierce *et al.* 2003; Vrettou *et al.* 2004).

Més recentment, s'han descrit protocols de seqüenciació i miniseqüenciació per al DGP (Hussey *et al.* 2002; Bermudez *et al.* 2003; Fiorentino *et al.* 2003). La seqüenciació presenta l'avantatge que un mateix procediment pot ser emprat per a la detecció de (teòricament) totes les diferents mutacions possibles compreses dins del fragment amplificat, mentre que la miniseqüenciació s'ha d'utilitzar per a la detecció de mutacions puntuals concretes o per a l'anàlisi indirecta amb SNPs. Totes dues tècniques, però, es beneficien del marcatge, la detecció fluorescent i l'anàlisi automatitzada en seqüenciadors de DNA.

## **1.5.2. Dificultats associades al DGP de malalties monogèniques**

### **1.5.2.1. Fallades totals d'amplificació**

En funció del protocol utilitzat i el tipus cel·lular que s'analitza, el percentatge de cèl·lules en el qual no és possible detectar cap producte d'amplificació pot superar el 20% (Piyamongkol *et al.* 2003). La fallada total d'amplificació d'una cèl·lula aïllada es pot deure a diverses causes:

- Pèrdua de la cèl·lula durant la transferència al tub.
- Anàlisi d'una cèl·lula anucleada.
- Lisi incompleta de la cèl·lula.
- DNA de la cèl·lula parcialment degradat en embrions degenerats, bloquejats o de baixa qualitat.

### **1.5.2.2. Allele drop-out (ADO)**

El fenomen d'*allele drop-out* (ADO) consisteix en la fallada d'amplificació d'un dels dos al·lels presents en una cèl·lula heterozigota aïllada: és a dir, només es detecta un dels al·lels. Va ser postulat inicialment per Navidi i Arheim el 1991 i després demostrat empíricament (Findlay *et al.* 1995a).

S'hipotetitzava que les causes d'ADO poden ser unes condicions no òptimes de PCR o una lisi cel·lular incompleta, però s'ha demostrat que els factors que l'afecten són: la grandària de l'amplicó (producte de PCR), la degradació del DNA, cicles de congelació i descongelació i el programa de PCR utilitzat (Piyamongkol *et al.* 2003).

En la majoria dels casos aquesta fallada d'amplificació pot produir-se amb igual probabilitat en qualsevol dels dos al·lels (normal o mutant) i, encara que és possible estimar la freqüència d'ADO, avui en dia no és possible predir quin al·lel es veurà afectat en una reacció donada, tot i que hi ha treballs que demostren que en els casos on hi ha certa diferència de grandària entre els al·lels, l'al·lel que amb més freqüència no es detecta és el d'una mida més gran (Piyamongkol *et al.* 2003).

Quan una cèl·lula heterozigota (blastòmer d'un embrió) pateix ADO es classifica erròniament com a homozigota, ja que no se'n detecta un dels al·lels. Si la malaltia és recessiva i detectem només l'al·lel normal en principi l'error no és greu (fals negatiu) ja que els portadors no pateixen la malaltia. Per la mateixa raó, si detectem només l'al·lel mutant, el fals positiu suposaria l'exclusió d'un embrió que seria transferible. Tanmateix, el fenomen de l'ADO pren més rellevància en l'anàlisi de malalties dominants o en el DGP d'heterozigots compostos en malalties autosòmiques recessives, ja que en aquests casos pot donar lloc a errors diagnòstics greus (fals negatius). Per exemple, en cas de malalties dominants, si únicament es detecta l'al·lel normal, s'està cometent un error de diagnòstic greu ja que l'embrió heterozigot patirà la malaltia. De la mateixa manera, en el cas de l'anàlisi de dues mutacions diferents d'una malaltia recessiva, un embrió heterozigot compost (afectat) podria ser diagnosticat com a portador no afectat si hi hagués ADO d'una de les mutacions.

En la literatura es poden trobar diversos exemples d'errors diagnòstics deguts a ADO (Grifo *et al.* 1994, Harper i Handyside 1994; Verlinsky *et al.* 1994; Verlinsky 1996; Harper i Delhanty 2000). En aquests casos l'ADO ha estat el responsable de l'error de diagnòstic de dues mutacions diferents en el gen *CFTR*, en les quals no es va detectar un dels dos al·lels mutants. En un treball més recent es detallen els diferents errors de diagnòstic tant de malalties monogèniques com de cribatge d'aneuploïdies informats a l'organització *ESHRE PGD Consortium* (Wilton *et al.* 2009).

S'han aplicat diverses estratègies per minimitzar la incidència d'ADO, com ara la utilització de la PCR fluorescent, que al ser altament sensible facilita la detecció de petites quantitats de producte (Findlay *et al.* 1995a) (Figura 21). Ray i col·laboradors van aconseguir l'any 1996 que la taxa d'ADO baixés del 18 al 5% fent servir la PCR fluorescent en lloc de la PCR convencional i la visualització amb bromur d'etidi per a la detecció de mutacions al gen *CFTR* (Ray *et al.* 1996). Sermon i els seus col·laboradors van aconseguir una millora del 24 al 6,5% en distròfia miotònica aplicant el mateix canvi (Sermon *et al.* 1998a).

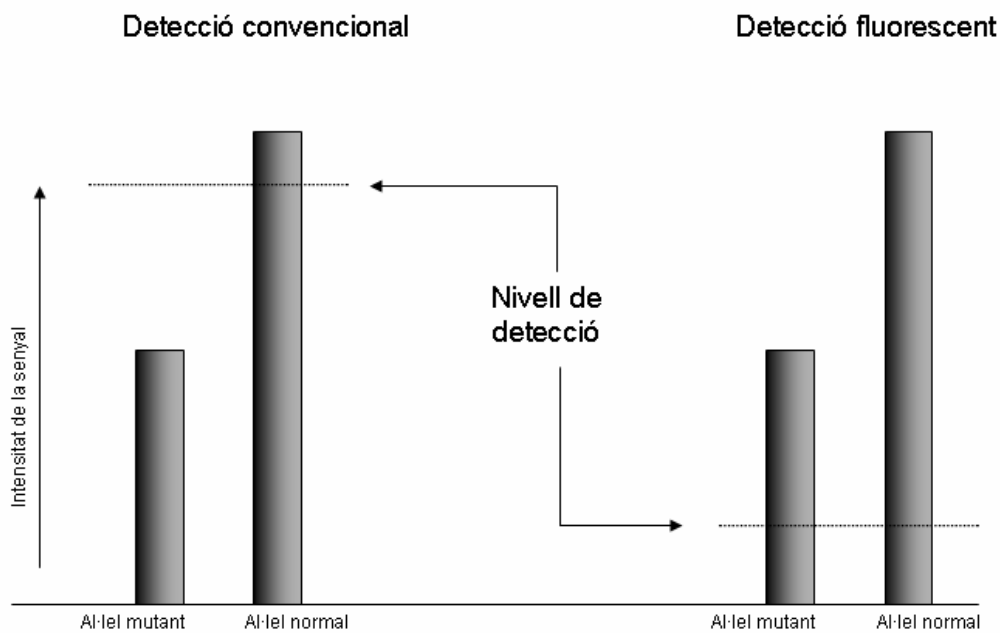


Figura 21. Comparació del nivell de detecció d'una electroforesi convencional amb bromur d'etidi i l'electroforesi capil·lar amb detecció fluorescent. Adaptat de Findlay *et al.* 1996.

Una altra modificació introduïda per tal de disminuir la incidència d'ADO ha estat incrementar el temps i la temperatura de desnaturalització durant la PCR, a fi d'assegurar la completa dissociació de les cadenes de DNA i millorar l'accés dels encebadors al DNA (Thornhill i Snow 2002; Piyamongkol *et al.* 2003).

Les millores en els protocols de lisi, ja sigui utilitzant la lisi enzimàtica amb proteïnasa K i SDS (El-Hashemite i Delhanty 1997) o la lisi alcalina amb KOH i DTT (Thornhill *et al.* 2005) també han permès reduir la taxa d'ADO, ja que s'aconsegueix alliberar completament el DNA sense fer-lo malbé (El-Hashemite i Delhanty 1997).

Els laboratoris de DGP més experimentats poden mantenir la taxa d'ADO dels seus protocols entre un 5-15% però en alguns casos l'ADO pot afectar fins a més del 40% de les amplificacions de cèl·lules aïllades (Sermon 2002; Piyamongkol *et al.* 2003).

Malgrat totes les millores per a reduir-ne la incidència, és inevitable un cert percentatge d'ADO degut a trencaments en les cadenes de DNA. Així doncs, les millores en els protocols de DGP han de permetre una baixa incidència de l'ADO així com la seva detecció per tal d'evitar errors diagnòstics greus.

Una de les estratègies actuals per a la detecció d'ADO és l'amplificació simultània de la mutació i d'un STR o d'un SNP lligat (Wells i Sherlock 1998; Thornhill i Snow 2002) (Figura 22). Per a cada parella en qüestió que s'estudia s'ha de disposar de polimorfismes informatius (que tinguin al·lels diferents). Quan s'utilitzen marcadors de lligament informatius, es pot detectar un ADO en el *locus* de la mutació comparant-lo amb el resultat del marcador lligat. D'aquesta manera es pot diferenciar un individu homocigot normal "real" d'un heterocigot amb ADO en un dels dos al·lels. Això permet disminuir enormement el risc de cometre un error de diagnòstic, ja que la probabilitat que es produeixi a la vegada un ADO de la mutació i una recombinació entre el gen i el marcador lligat és molt més baixa.

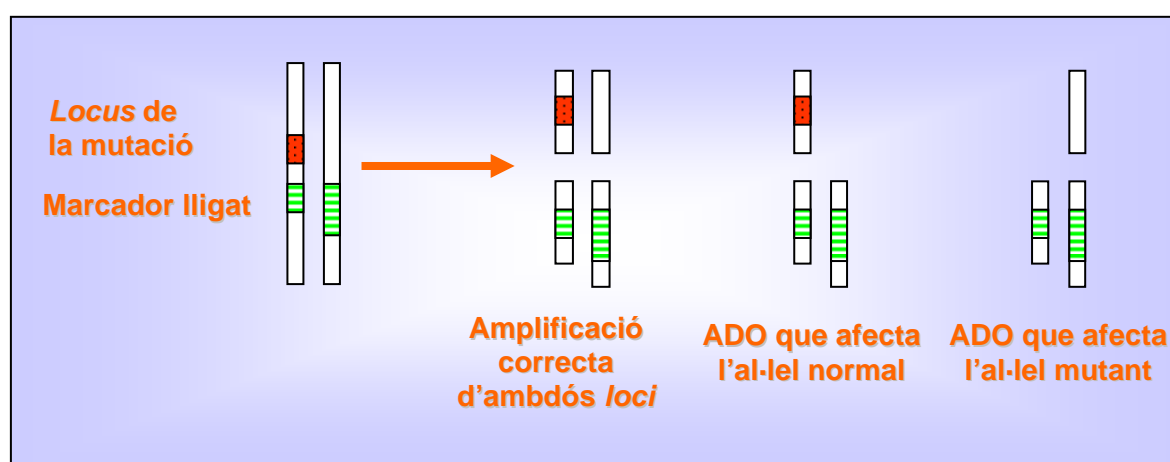


Figura 22. Esquema de l'anàlisi simultània de mutació i marcador lligat per a la detecció d'ADO.

### 1.5.2.3. Contaminació

L'anàlisi de cèl·lules aïllades basada en la PCR requereix fer molts cicles d'amplificació, ja que es parteix d'una única cèl·lula, amb un contingut aproximat de tan sols 6 picograms ( $6 \times 10^{-12}$  g) de DNA. De manera que qualsevol DNA extern present en el tub de PCR pot ser amplificat tant com el de la cèl·lula mateixa, o fins i tot més. Tot això fa que calgui extremar les mesures per evitar qualsevol tipus de contaminació, i molt especialment en les etapes d'aïllament cel·lular, lisi i en les diferents rondes d'amplificació (Wells i Sherlock 1998; Thornhill i Snow 2002).

L'aplicació de la PCR fluorescent ha permès lluitar contra la contaminació al requerir molts menys cicles per detectar els productes d'amplificació. A més la PCR fluorescent ha fet possible la minimització dels canvis de tub i la creació d'aerosols.

Els contaminants potencials poden ser d'origen parental, per la contaminació de cèl·lules del cúmulus que envolten l'oòcit (origen matern) o d'espermatozoides en excés que hi pugui haver adherits a la zona pel·lúcida després de la fertilització (origen patern). Les possibles fonts externes de contaminació són diverses: DNA bacterià i fúngic, DNA de cèl·lules epitelials de descamació de les persones involucrades en el DGP (embriòlegs o tècnics de DGP) o DNA corresponent a productes d'amplificació de PCRs anteriors que persisteixen en l'ambient en forma d'aerosols.

Per tal d'evitar la incidència de contaminació d'origen matern és essencial retirar exhaustivament totes les cèl·lules del cúmulus un cop s'han recuperat els oòcits. La contaminació paterna es pot evitar aplicant com a mètode de fertilització l'ICSI (*intra cytoplasmic sperm injection* - injecció intracitoplàsmica d'espermatozoide), a fi que un únic espermatozoide entri en contacte amb l'oòcit (Palermo *et al.* 1992). Un cop que s'ha realitzat la biòpsia de la cèl·lula s'ha de sotmetre a diversos rentats per retirar qualsevol resta de DNA que pugui quedar en el medi.

Malgrat les precaucions, en el cas que la contaminació tingui lloc, és molt convenient que en la reacció d'amplificació s'hagin inclòs marcadors de tipus microsatèl·lit per tal de poder detectar DNA d'origen no embrionari.

Dues societats internacionals, la PGDIS (*Preimplantation Genetic Diagnosis International Society*) i l'ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) han publicat les seves corresponents normatives de "bones pràctiques" de DGP (PGDIS 2004; Thornhill *et al.* 2005) en les quals es detallen, entre d'altres, tot un seguit de precaucions tant per evitar la contaminació com per detectar-la.

### **1.5.3. Amplificació total del genoma (WGA) a partir de cèl·lules aïllades**

La mínima quantitat de DNA present en una cèl·lula aïllada limita el nombre d'anàlisis que hi poden ser aplicades. El DGP de malalties monogèniques està esdevenint una tècnica molt complexa (Wells i Delhanty 2001), en la que sovint, a part de la detecció directa de la mutació, s'han d'afegir marcadors lligats del tipus STRs, per a una anàlisi indirecta addicional, així com també per a la detecció de contaminació (Piyamongkol *et al.* 2001). Aquest procés, conegut com a *multiplex* PCR, es realitza afegint parelles addicionals d'encebadors, de manera que s'aconsegueix un petit nombre de productes d'amplificació



diferents de PCR a partir d'una sola amplificació. Aquesta tècnica presenta certes limitacions, com ara la dificultat de distingir fragments de mida semblant. Aquest problema pot ser superat mitjançant la PCR fluorescent i l'electroforesi capil·lar en un seqüenciador que permeti el marcatge amb diferents colors i una resolució de fins a 1 pb de diferència (Findlay *et al.* 1995b).

La PCR *multiplex* pot presentar dificultats en l'optimització per tal d'obtenir una amplificació eficient dels diversos productes. Una altra limitació és que després de l'amplificació no és possible retornar a la mostra original per realitzar futures anàlisis o per confirmar el diagnòstic. Una alternativa que permet aconseguir una quantitat important de DNA a partir d'una sola cèl·lula, suficient per evitar molts dels problemes associats a la *multiplex* PCR és l'amplificació total del genoma o *Whole Genome Amplification* (WGA) (Zhang *et al.* 1992). Un cop que s'amplifica tot el contingut genètic de la cèl·lula, es poden agafar al·lotes d'aquest producte amplificat per realitzar PCRs de *loci* específics en reaccions separades que requeriran una optimització menor.

La majoria d'estratègies de WGA descrites es basen en la utilització d'encebadors amb una seqüència totalment o parcial degenerada en combinació amb temperatures d'hibridació molt baixes per tal d'aconseguir una amplificació inespecífica de tot el DNA de la cèl·lula. Aquest pas requereix prendre grans precaucions per tal d'evitar la contaminació. A continuació s'exposen algunes de les tècniques de WGA que han tingut més repercussió en el DGP.

#### **1.5.3.1. Primer extension preamplification (PEP-PCR)**

Va ser descrita al 1992 per Zhang i col. (Zhang *et al.* 1992). Es basa en la utilització d'encebadors de 15 nucleòtids completament degenerats (en cada posició pot haver-hi qualsevol dels quatre nucleòtids). Es tracta d'una PCR amb una barreja de  $4^{15}$  encebadors ( $\sim 10^9$  seqüències diferents). La temperatura d'hibridació és molt baixa, a 37°C, per permetre la unió dels encebadors en qualsevol lloc del genoma. El cobriment obtingut del genoma és força bo (fins al 90%) (Wells *et al.* 1999).

La PEP-PCR ha estat utilitzada en l'anàlisi de diverses malalties monogèniques en cèl·lules aïllades (com per exemple la FQ, l'HA i la síndrome de Tay-Sachs (Snabes *et al.* 1994)) per a la posterior detecció d'una sola mutació amb PCR. La PEP-PCR també s'ha aplicat en el DGP de la poliposi adenomatosa familiar per a la detecció directa de la mutació i d'un marcador polimòrfic lligat en reaccions separades i en el DGP de  $\beta$ -

talasèmia per a la detecció posterior amb PCR específica i seqüenciació (Ao *et al.* 1998; Hussey *et al.* 2002).

### 1.5.3.2 Degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR)

És una tècnica de WGA descrita el 1992 per Telenius (Telenius *et al.* 1992) que ha estat aplicada en nombrosos estudis citogenètics en cèl·lules aïllades (Voullaire *et al.* 1999; Wells *et al.* 1999; Gutierrez-Mateo *et al.* 2004) i també en estudis moleculars (Wells *et al.* 1999; Bermudez *et al.* 2003).

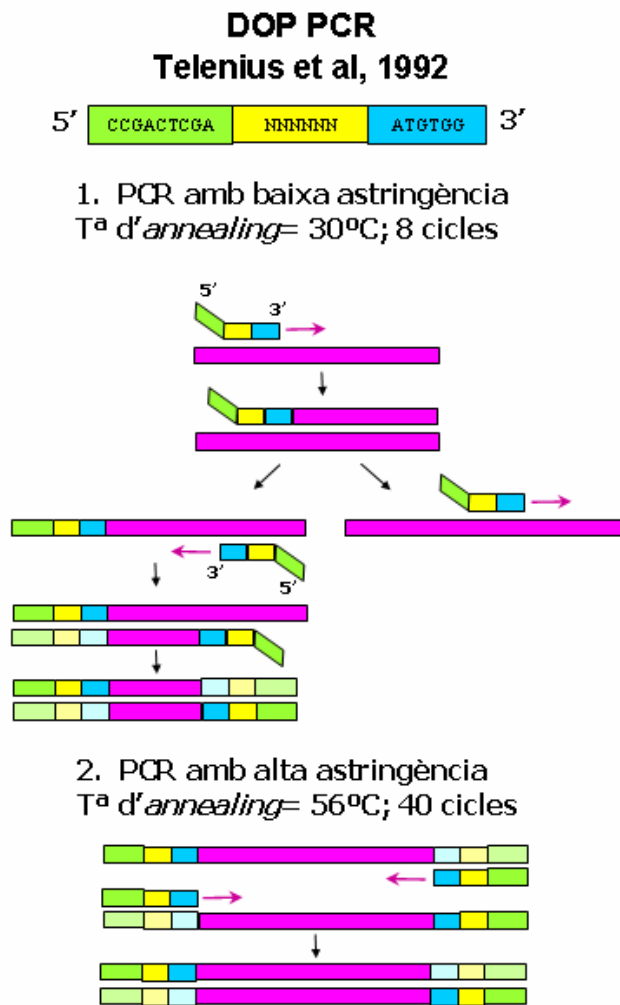


Figura 23. Esquema de la DOP-PCR. ( $T^a$  d'Annealing=  $T^a$  d'hibridació)

Cedit per la Dra. Cristina Gutiérrez-Mateo, UAB-2005.

L'encebador de DOP també és un conjunt heterogeni d'oligonucleòtids de seqüència 5'-GACTCGAGNNNNNNATGTGG-3', amb una seqüència degenerada de sis nucleòtids al mig (Figura 23). La seqüència de l'extrem 5' correspon a un lloc de restricció de l'enzim *Xho*I, ja que en un principi la tècnica es va plantejar per experiments de clonatge. Durant

els primers vuit cicles de la PCR la temperatura d'hibridació és molt baixa (30°C) i els encebadors podran unir-se a l'atzar a diferents punts del genoma (quedant la cua 5' específica no unida). Les cadenes noves hauran incorporat en el seu extrem 5' la seqüència específica d'aquell encebador en concret. En els següents cicles, es copiaran les seqüències complementàries dels encebadors de DOP. Durant la segona etapa d'amplificació es realitzen 40 cicles amb una temperatura d'hibridació més elevada (56°C) i, com que les cadenes sintetitzades en l'etapa anterior estan flanquejades a l'extrem 3' per seqüències complementàries als oligonucleòtids de DOP, s'augmenta l'especificitat de la reacció i s'aconsegueix una amplificació exponencial. Utilitzant aquesta tècnica s'aconsegueix, a partir de cèl·lules aïllades, obtenir una quantitat suficient de DNA (fins a 20 µg) per aplicar una hibridació genòmica comparada (CGH) i a més realitzar múltiples amplificacions per tal de detectar malalties monogèniques (Voullaire *et al.* 1999; Wells *et al.* 1999).

### 1.5.3.3 Multiple displacement amplification (MDA)

Aquesta tècnica de WGA és la descrita més recentment (Dean *et al.* 2002) i s'ha aplicat també en l'anàlisi de cèl·lules aïllades (Handyside *et al.* 2004; Hellani *et al.* 2004; Lledó *et al.* 2006; Renwick *et al.* 2006). Es basa en la utilització d'hexanucleòtids degenerats com a encebadors i la reacció isotèrmica es dona a 30°C (*isothermal amplification*) emprant cert tipus de polimerases com ara la del virus bacteriòfag *Phi29*. Durant la polimerització, quan un fragment elongat es troba amb l'encebador següent, la cadena es desplaça continuant la síntesi i la cadena desplaçada alhora pot ser també copiada (Figura 24).

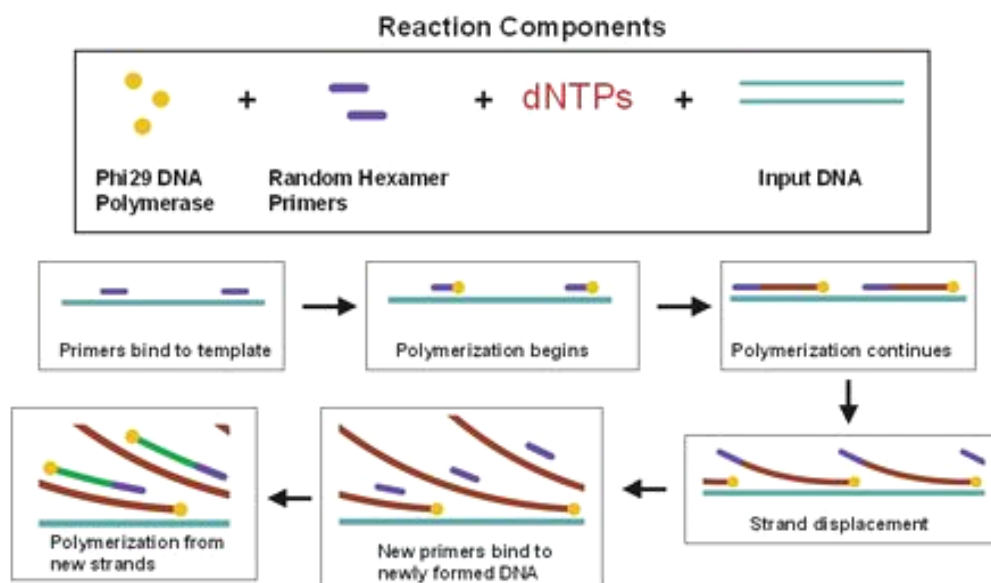


Figura 24: Esquema del funcionament de la tècnica d' MDA.

Imatge obtinguda de GenomiPhi, GE Healthcare ([www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)).

S'han aconseguit amplificacions de l'ordre de  $10^6$  vegades la seqüència original, és a dir, es poden obtenir fins a 35  $\mu\text{g}$  de DNA a partir d'una única cèl·lula. Aquesta tècnica de WGA permet l'anàlisi en cèl·lules aïllades de malalties monogèniques, anàlisi d'STRs i fins i tot anàlisi mitjançant *microarrays* (Hu *et al.* 2004). Tot i ser una tècnica molt prometedora, els resultats no acaben de ser concloents ja que estan en una etapa molt primerenca de desenvolupament (Spits *et al.* 2006).

### **1.5.4. Estratègies actuals**

Atesos els riscos i les limitacions de les tècniques presentades, les estratègies actualment més esteses entre els centres que ofereixen DGP són les que permeten combinar la detecció directa de les mutacions junt amb STRs (lligats o no) (Rechitsky *et al.* 2001), tot i que hi ha treballs que es basen únicament en l'anàlisi indirecta (Eftedal *et al.* 2001). Com ja s'ha dit anteriorment, l'ús de marcadors lligats situats en les proximitats del gen en qüestió, serveix com a suport al diagnòstic quan falla l'amplificació del lloc de la mutació o quan aquesta ha estat afectada per l'ADO (Renwick i Ogilvie 2007). La naturalesa polimòrfica mateixa dels STRs permet també revelar la presència de DNA estrany, amb la qual cosa es pot detectar la contaminació. Per tal de poder oferir un diagnòstic molt acurat i precís, les tècniques que permeten avui en dia la detecció simultània de diversos productes a partir d'una sola cèl·lula són la PCR *multiplex* i les tècniques de WGA.



## **HIPÒTESI I OBJECTIUS**



## 2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

La hipòtesi d'aquest treball és que és possible desenvolupar protocols genèrics de DGP per a la detecció de diverses mutacions en malalties monogèniques tant autosòmiques com lligades al cromosoma X.

A fi de demostrar la viabilitat d'aquesta hipòtesi ens hem proposat els següents objectius parcials:

- 1) Desenvolupar i optimitzar la metodologia d'amplificació total del genoma en cèl·lules aïllades basant-se en la tècnica de PEP-PCR.
- 2) Adequar un sistema de detecció de múltiples mutacions del gen *CFTR* mitjançant l'anàlisi fluorescent en productes de DNA preamplificat de cèl·lules aïllades.
- 3) Adequar un sistema de detecció de múltiples mutacions dels gens *F8* i *F9* mitjançant seqüenciació en productes de DNA preamplificat de cèl·lules aïllades.
- 4) Dissenyar i optimitzar un procediment que combini l'anàlisi directa i indirecta (STRs) de mutacions de la fibrosi quística per aplicar-lo al DGP.
- 5) Dissenyar i optimitzar un procediment que combini l'anàlisi directa i indirecta (STRs) de mutacions de l'hemofília per aplicar-lo al DGP.
- 6) Assajar l'aplicabilitat del sistema desenvolupat al DGP en famílies de risc candidates.







# **MATERIALS I MÈTODES**



# 3. MATERIALS I MÈTODES

## 3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

Es van obtenir mostres de DNA de famílies candidates a sotmetre's a un cicle de DGP i d'individus portadors o afectats de FQ (donats per la secció de Genètica de l'Hospital de Sant Joan de Deu, Barcelona) o de HA i HB (obtinguts de la Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Banc de Sang i Teixits, Barcelona).

Per la posada a punt i la validació de les tècniques en cèl·lules aïllades es van utilitzar diverses mostres cel·lulars:

- Cèl·lules bucals obtingudes glopejant aigua tridestil·lada. Per la posada a punt del protocol de FQ es van obtenir cèl·lules d'individus control no afectats, de cinc individus portadors de FQ heterozigots per a les mutacions  $\Delta F508$ , N1303K, G542X, R347P i 2183AA>G, i de tres malalts afectats de FQ (un homozigot per a la mutació  $\Delta F508$  i dos heterozigots compostos amb les mutacions  $\Delta F508/1078delT$  i  $\Delta F508/3849+10kbC>T$ ). Per a la posada a punt del protocol de HA es van obtenir mostres de cèl·lules bucals d'una família portadora d'una duplicació en tàndem de 41 pb a l'exó 14 del gen *F8*.

- Oòcits descartats de donants o pacients sotmeses a un tractament de infertilitat als centres de reproducció assistida col·laboradors en aquest projecte (Institut Dexeus, clínica IMER, Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital de la Vall d'Hebron, Unitat de Reproducció Assistida del centre mèdic Teknon i Hospital Clínic i Provincial de Barcelona). Els oòcits donats van ser descartats dels cicles de FIV per dos motius: i) oòcits immadurs en el moment de la punció que es van deixar madurar *in vitro* en el medi un màxim de 24 hores fins a assolir l'estadi de MII o ii) oòcits en MII que no es van fertilitzar després de ser inseminats, ja sigui amb fecundació *in vitro* convencional (FIV) o amb injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI). Aquests oòcits no havien assolit l'estadi de dos pronuclis 24 hores després de la inseminació i encara presentaven només un sol corpuscle polar.

Els oòcits es van obtenir per hiperestimulació ovàrica i punció fol·licular seguint la normativa establerta per cadascun dels centres. Es va obtenir consentiment informat escrit dels pacients per a cadascun dels cassos.

- Embrions descartats. La disponibilitat d'aquests ha estat molt reduïda i la majoria d'embrions obtinguts van ser de molt baixa qualitat. Tot i així els protocols desenvolupats també s'han testat en blastòmers, material àmpliament utilitzat en l'aplicació habitual del DGP.

Tots els procediments desenvolupats inclosos en el present estudi han estat aprovats pels comitès ètics dels centres participants.

## 3.2. REACTIUS I SOLUCIONS

### 3.2.1. Reactius utilitzats en l'aïllament cel·lular

#### **Tripsina**

La tripsina (Sigma) es dilueix a 30 mg/ml amb PBS (pH 7,2). S'utilitza per digerir la zona pel·lúcida dels oòcits per separar-los del seu 1CP mitjançant la incubació a 37°C en una placa calefactora durant uns 2-3 minuts.

#### **Àcid Tyrode**

L'àcid Tyrode (pH 2,5), de la mateixa manera que la tripsina, serveix per digerir la zona pel·lúcida d'oòcits però amb els avantatges que actua molt més ràpidament que la tripsina (triga uns 20-30 segons) i que la incubació es dona a temperatura ambient, cosa que en facilita la manipulació. S'ha utilitzat àcid Tyrode subministrat per la casa comercial Sigma, estèril i filtrat.

#### **Solució d'aïllament: tampó fosfat salí (PBS) amb 0,1% d'alcohol polivinílic (PVA)**

El PBS sense  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  el subministra Gibco (Invitrogen) en ampolles de 100 ml a les quals s'afegeixen 0,10 g de PVA en condicions estèrils. Es filtra i es reparteix en parts iguals en tubs de 1,5 ml. El PBS sense  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  desestabilitza les unions intercel·lulars i fa que les cèl·lules se separin més fàcilment. El PVA evita que els oòcits, els corpuscles i els blastòmers d'embrions sense zona pel·lúcida i les cèl·lules bucals s'enganxin a la superfície de plàstic de la placa de Petri.

### 3.2.2. Reactius utilitzats en la lisi cel·lular

#### Solució de lisi: proteïnasa K amb SDS

La proteïnasa K (*proteinase K PCR grade*, Roche) es comercialitza a uns 20 mg/ml de concentració (varia en funció del lot). Aquesta proteïnasa K es reparteix en parts iguals en condicions d'esterilitat i es conserva a 4°C. Just abans d'utilitzar-la, es dilueix a 125 µg/ml barrejant 1 µl amb 159 µl d'aigua miliQ estèril i filtrada. És molt important que la seva qualitat sigui apta per a PCR, ja que es garanteix que estigui lliure de DNA, de DNAses i de RNAses. La proteïnasa K té l'avantatge de degradar possibles DNAses presents durant l'aïllament que podrien tallar el DNA de la cèl·lula.

L'SDS (dodecil sulfat sòdic) es comercialitza al 10% (Gibco, Invitrogen). Es reparteix en parts iguals en condicions estèrils i es guarda a temperatura ambient. Per aconseguir una concentració final de 17 µM es fa una dilució 1:100 i a continuació una dilució 1:200. Aquest detergent desestructura els lípids de membrana i augmenta fins a set vegades l'activitat de la proteïnasa K.

Es prepara suficient barreja de proteïnasa K amb SDS seguint la proporció 2 µl de proteïnasa K 125 µg/ml : 1µl SDS 17 µM i es manté en gel fins a la seva utilització.

### 3.2.3. Reactius utilitzats en electroforesi en gel d'agarosa

#### 50xTAE

Es preparen 100 ml d'EDTA 0,5 M pesant 18,61 g d'EDTA (Sigma) i afegint 95 ml d'aigua miliQ. S'ajusta contínuament el pH a 8 perquè es vagi dissolent i s'enrasa el volum a 100 ml. Als 100 ml d'EDTA se li afegixen 242 g de Trizma base (Sigma) i 57,1 ml d'àcid acètic (Merck). S'enrasa a 1.000 ml amb aigua miliQ.

#### Gel d'agarosa al 2%

Rutinàriament s'han fet gels d'11x14 cm (80 ml de volum final). Es pesen 1,6 g d'agarosa (Bio-Rad o Gibco) i s'afegeixen 80 ml d'1xTAE (20 ml de 50xTAE + 980 ml d'aigua miliQ). S'escalfa la solució 2-3 minuts a 450 W de potència amb el microones (aturant-lo i remenant-lo de tant en tant) i quan l'agarosa s'ha dissolt es deixa refredar una mica i s'afegeixen 4 µl de bromur d'etidi de concentració 10 mg/ml (Gibco), llavors s'aboca dins la cubeta d'electroforesi amb una pinta de pouets adequada al volum de mostra que es vulgui carregar i es deixa solidificar.

### 3.2.4. Reactius utilitzats en l'electroforesi capil·lar

#### Formamida Hi-Di

S'utilitza Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) altament pura i desionitzada apta per a l'electroforesi capil·lar amb un analitzador genètic ABI Prism 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems) per tal de mantenir els productes de PCR marcats fluorescentment i de reacció de seqüenciació desnaturalitzats. Als productes de PCR fluorescent se'ls ha d'afegir a més un marcador de pes molecular ROX 500 per a l'anàlisi dels fragments.

## 3.3. MÈTODES

### 3.3.1. Obtenció i aïllament de cèl·lules

S'han aïllat cèl·lules bucals, oòcits (MII) i 1CPs. El protocol d'aïllament cel·lular s'ha basat en el descrit per Wells (Wells i Delhanty 2000)

#### 3.3.1.1. Cèl·lules bucals

Glopejant aigua destil·lada durant 15-20 segons i recuperant-la en un flascó estèril s'obté una suspensió cel·lular amb una concentració força elevada de cèl·lules bucals. S'afegeix una gota d'aquesta suspensió a una de les gotes de rentat de PBS-PVA que prèviament s'han preparat en una placa de petri, per a l'aïllament de les cèl·lules (Figura 25).

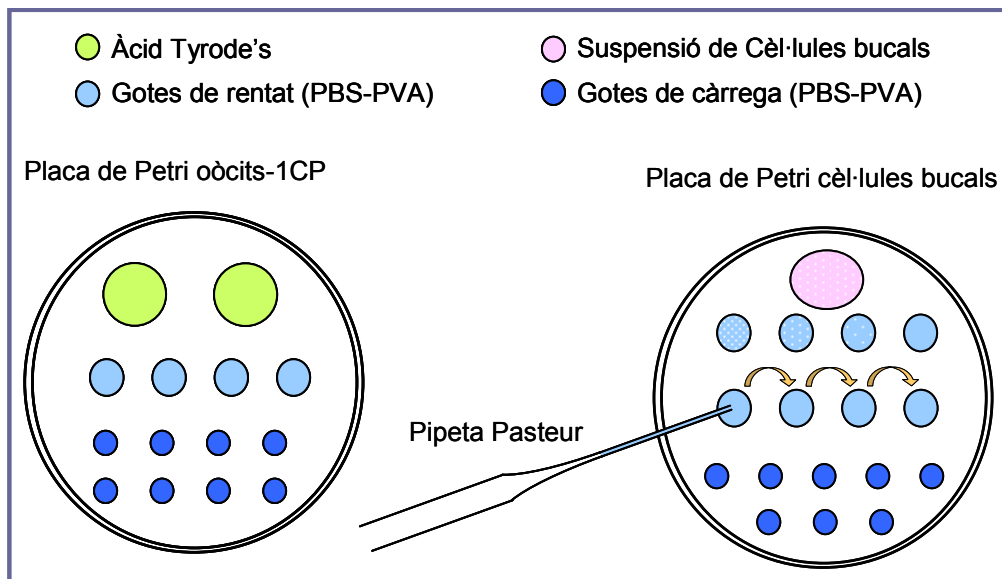
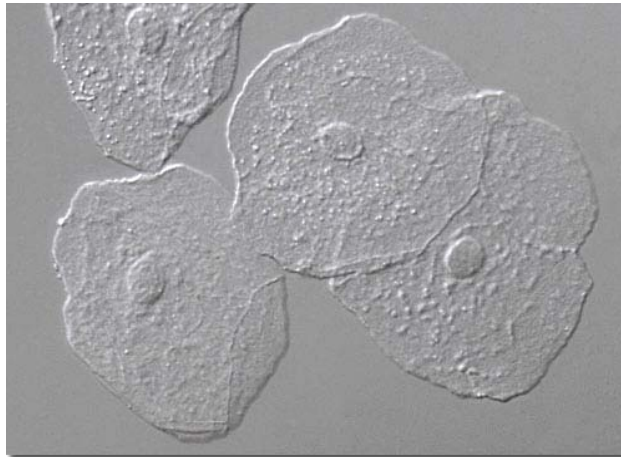


Figura 25. Esquema de les plaques de petri utilitzades per a l'aïllament d'oòcits i embrions o de cèl·lules bucals.

La manipulació de les cèl·lules es realitza sota control estereomicroscòpic (lupa binocular amb un mínim de 50 augments) amb l'ús de pipetes Pasteur estirades a la flama, connectades amb un tub de goma dotat d'un filtre Millex (*Millipore*) de 0,2  $\mu\text{m}$ . El control del moviment de les cèl·lules s'efectua bucalment mitjançant succió suau. S'ha de transferir el menor nombre possible de cèl·lules bucals de la gota inicial a la primera gota d'aïllament. Fent dilucions seriades en les següents gotes s'aïlla una sola cèl·lula amb un nucli visible (Figura 26).



*Figura 26. Cèl·lules d'epiteli bucal. Aprox. X100.*

*Imatge Obtinguda de Molecular Expressions, Florida State University, USA.*

Un cop que es té la cèl·lula individualitzada es canvia la pipeta Pasteur i a continuació es renta la cèl·lula en tres gotes de rentat noves. És important renovar la solució de PBS-PVA de la pipeta en les gotes de càrrega cada cop que es passa la cèl·lula (o les cèl·lules) d'una "gota d'aïllament" a una altra per tal d'eliminar possibles cèl·lules adherides i restes de DNA. Finalment es transfereix una única cèl·lula a un tub de PCR de 0,2 ml. En aquest pas, és essencial mantenir la cèl·lula a prop de la punta de la pipeta i controlar el volum que es buida per evitar fer bombolles. La cèl·lula es deixa preferentment a la paret del tub en un volum petit de solució d'aïllament. A continuació es buida el volum restant de la pipeta en una gota de solució d'aïllament i es comprova que no en surt cap cèl·lula, cosa que permet suposar que molt probablement aquesta s'ha introduït dins del tub.

Una precaució addicional que es pot tenir és mirar amb l'estereomicroscopi (a 50 augments) per confirmar si la cèl·lula és dins del tub. Tanmateix, això no sempre és conclouent en cas de no visualitzar cèl·lules bucals i 1CPs.

La gradeta amb els tubs de PCR que contenen les cèl·lules s'ha de mantenir freda, en gel, fins al moment d'afegir la solució de lisi.

### 3.3.1.2. Oòcits i 1CPs

En el cas dels oòcits, el primer que cal fer és digerir la zona pel·lúcida per tal de separar l'oòcit del seu 1CP. El mateix ocorre quan es volen desagregar els diferents blastòmers d'un embrió. Per digerir la zona pel·lúcida s'han utilitzat dos protocols diferents:

- Tripsina: La digestió té lloc incubant a 37°C durant uns 3 minuts.
- Àcid Tyrode: incubació 25-30 segons a temperatura ambient.

Un cop digerida la zona pel·lúcida, s'agafen les cèl·lules amb una pipeta carregada amb solució d'aïllament i es transfereixen a una gota de solució d'aïllament nova per tal de neutralitzar les restes d'enzim o d'àcid que podrien malmetre la integritat de les cèl·lules. Normalment, un cop que la zona està digerida, les cèl·lules (1CP i oòcit o blastòmers) se separen fàcilment a causa de l'absència de  $\text{Ca}^{2+}$  i de  $\text{Mg}^{2+}$  en el medi. Tot i així, hi ha vegades, sobretot quan els oòcits han madurat *in vitro* i tot just s'ha acabat d'extrusionar l'1CP, que hi ha un pont citoplasmàtic entre l'1CP i l'oòcit. En aquestes ocasions, la separació de les cèl·lules s'aconsegueix de forma mecànica. El pipeteig suau i repetit de l'oòcit junt amb l'1CP, amb una pipeta normal o de menor diàmetre per què hi hagi més fregament, fa que les dues cèl·lules s'acabin separant.

Un cop que l'oòcit i l'1CP estan separats, cada cèl·lula es renta i es transfereix per separat a un tub de PCR seguint el mateix procediment indicat anteriorment per a cèl·lules bucals.

Per a la preparació dels controls negatius (controls de contaminació) s'utilitza un petit volum de la darrera gota de rentat (aprox. 2  $\mu\text{l}$ ) i es transfereix també a un tub de PCR. En un cas clínic, cada cèl·lula aïllada ha d'estar acompanyada d'un d'aquests blancs de solució d'aïllament. Aquest procés es repeteix tantes vegades com cèl·lules es volen aïllar.

### 3.3.2. Mètodes per evitar la contaminació

Com ja s'ha mencionat, s'han de mantenir extremades precaucions contra la contaminació durant tot el procés d'aïllament, lisi i amplificació (Thornhill i Snow 2002). Les mesures que es poden prendre per evitar la contaminació d'origen extern són:



preparar els reactius de PCR dins d'una campana de flux laminar per tal de dificultar-hi l'entrada de contaminants, preferiblement en un laboratori amb pressió positiva, amb accés restringit i en el que no es treballi mai amb DNA genòmic ni amb productes de PCR. Aquesta campana ha de ser netejada exhaustivament mitjançant solucions sabonoses i amb lleixiu i exposada a la llum ultraviolada (UV) abans i després de cada ús. S'ha de utilitzar roba protectora (bata exclusiva per a aquell laboratori, polaines, mascareta i protecció del cabell), guants (s'han de canviar sovint) i efectuar una manipulació amb cura dels tubs evitant-ne tocar les parets interiors dels tubs o l'interior dels taps. L'ús d'un obridor de tubs de microcentrífuga de 1,5 ml (tipus *Eppendorf*) pot ser molt útil. S'ha de reduir al mínim el nombre de vegades que s'obrin els tubs. Als tubs de PCR on s'aïllen les cèl·lules se'ls afegeix una gota d'oli mineral per tal de crear una capa que faci de barrera per evitar l'entrada de contaminants així com la formació d'aerosols després de l'amplificació. Per evitar l'emissió d'aerosols també cal emprar puntes de pipeta estèrils amb filtre (Thornhill i Snow 2002).

És imprescindible dividir tots els reactius en volums petits d'un sol ús així com filtrar, autoclavar i exposar a la llum UV tots els reactius que ho permetin. La manipulació de cèl·lules buccals, oòcits i 1CPs s'ha de dur a terme amb pipetes Pasteur de vidre estirades a la flama prèviament esterilitzades amb radiació UV durant aproximadament una hora.

S'ha de tenir en compte que l'oli mineral no pot ser irradiat amb llum UV ja que inhibeix la PCR com a conseqüència de l'oxidació produïda pels radicals generats (Dohner *et al.* 1995).

Per evitar la contaminació per part de productes de PCR de reaccions anteriors, s'han de tenir en compte tot un seguit de requeriments en el sistema d'organització del laboratori: cal que hi hagi una separació física entre cadascuna de les activitats del DGP, especialment entre les de pre-PCR i post-PCR. Cada zona ha de disposar del seu equipament exclusiu (tubs, pipetes, gradetes i especialment reactius i solucions) i s'ha d'intentar que el trànsit de les mostres entre les diferents àrees sigui només en una direcció.

S'hi inclouen controls de contaminació de les solucions d'aïllament i dels reactius en totes les sèries d'experiments. Addicionalment, abans de la realització d'un cas clínic, tots els reactius s'han de testar per descartar que estiguin contaminats i per confirmar que funcionen correctament.

### 3.3.3. Lisi cel·lular

S'han descrit diverses estratègies per lisar una cèl·lula: introduir les cèl·lules en aigua i incubar-les a elevada temperatura (Gitlin *et al.* 1996), trencar la membrana cel·lular mitjançant diversos cicles de congelació i descongelació (Handyside *et al.* 1990; Strom *et al.* 1990), per incubació de la cèl·lula en hidròxid potàssic i ditiotreitol (KOH/DTT, també anomenada lisi alcalina) (Cui *et al.* 1989) i, finalment, dur a terme la lisi cel·lular mitjançant proteïnasa K i SDS (El-Hashemite i Delhanty 1997). Els dos darrers sistemes són els més acceptats i utilitzats en l'actualitat (PGDIS 2008). En aquest treball, el protocol triat ha estat la lisi amb proteïnasa K/SDS. La proteïnasa K és una endopeptidasa que digereix les proteïnes de membrana però sense interferir amb el DNA de la cèl·lula (El-Hashemite i Delhanty 1997). Es comercialitza lliure de DNAses i RNAses i a més, té l'avantatge que també degrada les possibles DNAses presents que ens introduirien talls en el DNA. A més el detergent SDS desestructura els lípids de membrana i incrementa fins a set vegades l'activitat de la proteïnasa K.

A cada tub s'afegeixen 3 µl de solució de lisi i es cobreix la mostra amb oli mineral (Sigma). La lisi cel·lular es realitza incubant 1 hora a 37°C seguit de 10 minuts a 95°C per tal d'inactivar la proteïnasa K.

### 3.3.4. WGA mitjançant I-PEP-PCR

El DNA de les cèl·lules aïllades és sotmès a l'amplificació total del genoma mitjançant el mètode descrit com a I-PEP-PCR (Dietmaier *et al.* 1999) amb diverses modificacions:

i) La reacció es realitza en un volum de 40 µl amb 5 unitats de Taq DNA polimerasa, 4 µl de tampó de Taq 10X, 3,3 µl d'una solució d'encebadors de 15 bases completament degenerats a una concentració de 400 µM (Zhang *et al.* 1992) i 2 µl d'una barreja del 4 dNTPs (2 mM cadascun). S'han testat dues polimerases diferents: la *SuperTaq polymerase* (HT Biotechnology) (Taq A), especialment recomanada per a PCR de cèl·lules aïllades; i la *SuperTaq Plus polymerase* (Ambion) (Taq B) que és una barreja de la Taq polimerasa i una altra DNA polimerasa termostable amb activitat correctora, i que permet la síntesi de productes de fins a 20 kb. La PCR s'ha dut a terme en un termociclador Tgradient (Biometra).

ii) S'hi aplica un *hotstart* mantenint els tubs en gel i posant-los al bloc del termociclador quan la temperatura arriba a un mínim de 80°C.

iii) La desnaturalització inicial consisteix en una incubació a 94°C durant 7 minuts.

iv) El programa d' I-PEP-PCR modificat consisteix en 50 cicles d'1 minut a 94°C, 2 minuts a 31,5°C, una rampa programada de 0,1°C per segon, 55°C durant 4 minuts i 30 segons a 68°C. Finalment els tubs es refreden fins a 4°C. Si és necessari els tubs es mantenen congelats a -80°C fins que es processin posteriorment.

L'apartat dels termocicladors requereix una menció especial en aquest cas. En aquest treball s'han fet servir dos tipus de termocicladors diferents:

- *Tgradient* (Biometra). La I-PEP-PCR s'ha dut a terme exclusivament en aquest termociclador, per la sèrie d'avantatges que presenta: i) es pot programar una rampa estable i constant de 0,1°C/s, especialment útil en el cas de la I-PEP-PCR; ii) permet optimitzar la temperatura d'hibridació òptima de la PCR en una sola reacció mitjançant una funció de gradient.

- *GeneAmp* 2400 i 9700, (Applied Biosystems). Aquests dos models de termocicladors són molt fiables i el seu ús està àmpliament estès en molts laboratoris de diagnòstic clínic. Aquests aparells s'han emprat en totes les amplificacions específiques que s'han realitzat en aquest treball ja que el control de la rampa d'escalfament no és un aspecte de gran rellevància per a aquests protocols d'amplificació específics.

### **3.3.5. Mètodes de detecció de mutacions i de microsatèl·lits.**

Partint del producte d'amplificació de PEP-PCR, es poden aplicar protocols per a la detecció de mutacions concretes mitjançant PCR així com protocols d'amplificació de microsatèl·lits lligats.

#### **3.3.5.1. *Cystic fibrosis* assay en cèl·lules aïllades**

El *Cystic fibrosis* assay (Applied Biosystems-Abbott) és un *kit* comercial àmpliament utilitzat per al cribatge de les 31 mutacions del gen *CFTR* més comunes al sud d'Europa (incloent-hi les 24 més freqüents al món). La Taula 5 mostra les mutacions incloses.

<u>FAM</u>	<u>TET</u>	<u>HEX</u>
1717-1G>A	1078delT	1898+1G>A
ΔF508	3659delC	2183AA>G
ΔI507	3849+10kbC>T	2789+5G>A
G542X	3849+4A>G	621+1G>T
G551D	3905insT	711+1G>T
Q493X	N1303K	A455E
R553X	R1162X	G85E
R560T	R334W	R117H
S549N	R347H	Y122X
S549R	R347P	
V520F	W1282X	

Taula 5. Llistat de les mutacions detectades en la versió 2 del kit cystic fibrosis assay agrupades segons el color de marcatge.

Els controls positius de la reacció s'han realitzat amb 200 ng de DNA genòmic no preamplificat, mentre que en el cas de les cèl·lules aïllades s'han utilitzat 6 µl dels productes d' I-PEP-PCR. El primer pas del protocol consisteix en una incubació del DNA en un tampó de purificació. A continuació, es realitza una PCR en la qual mitjançant la utilització de quinze parelles d'encebadors, s'amplifiquen les regions específiques del gen *CFTR* que poden contenir les mutacions.

El següent pas del *kit* és un assaig de lligació d'oligonucleòtids (OLA) *multiplex* i fluorescent. Aquest sistema utilitza una sonda comuna marcada fluorescentment per a cada locus assajat. Aquesta sonda és lligada amb una sonda complementària a la seqüència diana (normal o mutant o ambdues en el cas d'heterozigots). Els oligonucleòtids normal i mutant tenen una cua de òxid de pentaetilè de diferent llargada, la qual cosa permet separar ambdós fragments en una electroforesi capil·lar (Figura 27).

Per a la separació electroforètica, es precipiten amb etanol i es resuspenen en 1 µl d'aigua lliure de nucleases 1 o 10 µl de producte de la reacció d'OLA (depenent de si es parteix d'un control positiu o de DNA d'una sola cèl·lula).

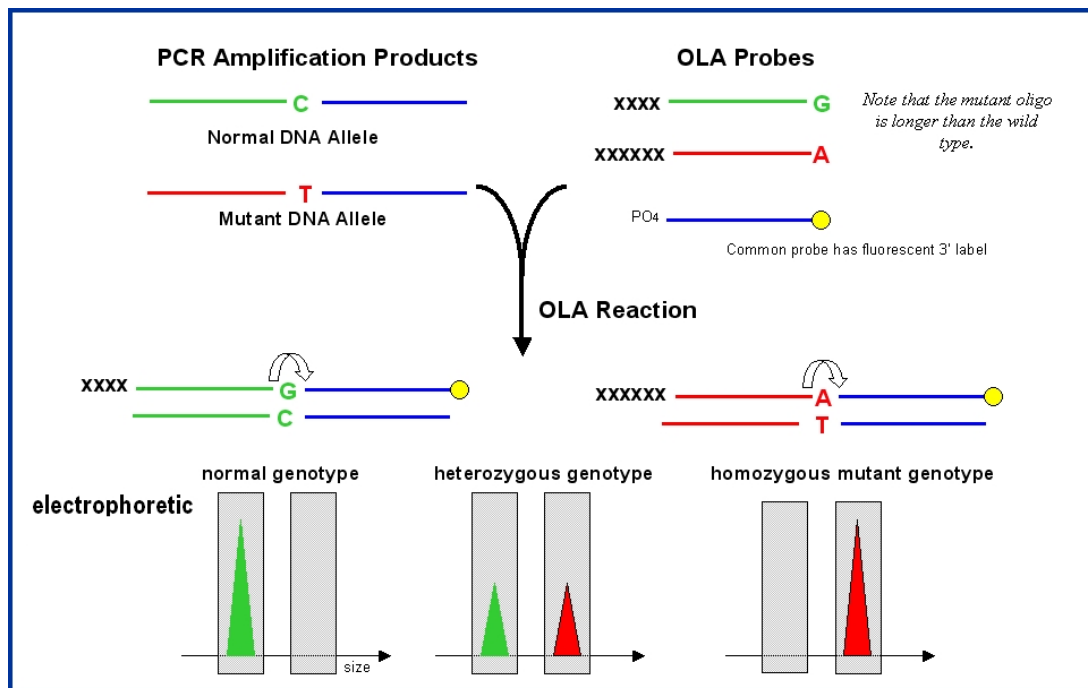


Figura 27. Esquema de la reacció d'OLA i la seva anàlisi. Imatge obtinguda de Abbott Molecular ([http://international.abbottmolecular.com/Description\\_2637.aspx](http://international.abbottmolecular.com/Description_2637.aspx)).

A continuació s'afegeix un marcador de pes molecular fluorescent (TAMRA, vermell) a cadascuna de les mostres i es procedeix a l'electroforesi capil·lar amb un seqüenciador ABI Prism 377 (Applied Biosystems). L'anàlisi de les dades es realitza amb els programes GeneScan i Genotyper (Applied Biosystems), que originen un electroferograma (Figura 28). Aquest tipus de gràfic mostra un pic per a cada al·lel detectat, separats pel seu color de marcatge. Cadascun dels al·lels està assenyalat amb el seu nom, la grandària del fragment en parells de bases i la intensitat del senyal en unitats de fluorescència relativa (RFU).

Per a la interpretació dels resultats, quan un únic pic presenta una alçada igual o superior als 50 RFU s'ha considerat adequada per a la detecció de l'al·lel corresponent. Per tal d'avaluar l'eficiència i la sensibilitat dels protocols s'ha establert una classificació rigorosa de tres categories basades en l'alçada dels pics: no s'han considerat pics amb una alçada per sota de 50 RFU; pics entre 50 i 250 RFU han estat considerats de baixa detecció; finalment, pics per sobre de 250 RFU han estat considerats d'alta detecció.

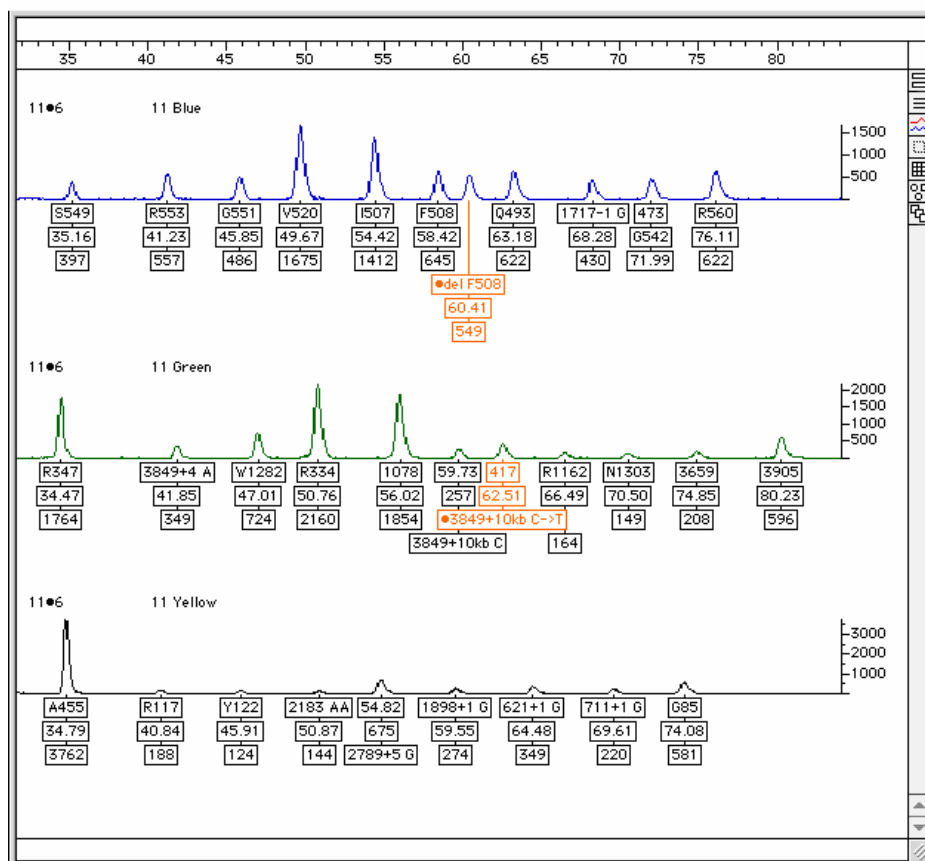


Figura 28. Electroferograma resultant de l'anàlisi amb el cystic fibrosis assay d'una cèl·lula portadora de les mutacions  $\Delta F508$  i  $3849+10kb C>T$ . En cadascun dels al·lels detectats se n'indica el seu nom, la grandària (en pb) i l'alçada en unitats de fluorescència relativa (RFU).

### 3.3.5.2. Amplificació i seqüenciació dels gens *F8* i *F9*

La metodologia emprada és la descrita per Vidal i col., (Vidal *et al.* 2000; Vidal *et al.* 2001) amb certes modificacions. El protocol es basa en l'amplificació del promotor, els 26 exons del gen *F8* i les seves regions flanquejants mitjançant 30 PCRs. De la mateixa manera, l'amplificació dels 8 exons del gen *F9* i les seves regions flanquejants es realitza mitjançant 9 PCRs.

Els encebadors emprats es mostren a les Taules 6 i 7. Els 25  $\mu$ l de reacció contenen 75 mM KCl, 30 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de barreja dels quatre dNTP's, 250 ng de cada encebador, 1 U de *Platinum Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) i 2  $\mu$ l del producte de la reacció d'I-PEP-PCR. El programa d'amplificació consisteix en una desnaturalització inicial de 3 minuts a 94°C seguida per 40 cicles de 20 segons a 94°C, 30 segons a 54°C i 72°C durant 1 minut, seguits per una extensió final d'una hora a 72°C.

<i>Primer directe (forward) (5'-3')</i>		<i>Primer revers (reverse) (5'-3')</i>		Regió amplificada	Grandària del producte (pb)
NOM	SEQÜÈNCIA	NOM	SEQÜÈNCIA		
F8P-1	CAT GGC TAC ATT CTG ATG TAA	F8P-2	GAG CTC TAT TTG CAT GAC TTA	Promotor	1181
F8E1-1	AAT CCT ATC GGT TAC TGC TTA	F8E1-2	AGC ATC ACA ACC ATC CTA AC	exó 1	429
F8E2-1B	GCC TCC TTG CTA ATA GTA GA	F8E2-2B	GTA ACG CCA CCA TTA CAA AG	exó 2	293
F8E3-1B	CTG TGA CCT TGA CTC TAA CT	F8E3-2B	GTA ACG CCA CCA TTA CAA AG	exó 3	290
F8E4-1	GTA CAG TGG ATA TAG AAA GGA C	F8E4-2B	GAT TCA GTT GTT TGT ACT TCT C	exó 4	319
F8E5-1B	TAA CTG ATG AAG AAC TGT CTC	F8E5-2B	CAT CTC CTT CAT TCC TGA AC	exó 5	273
F8E6-1	TCC CAC TTA TTG TCA TGG AC	F8E6-2	TAC AGA ACT CTG GTG CTG AA	exó 6	424
F8E7-1	GGC AAG AGC TGT TGG TTT G	F8E7-2	TGT CCA GTA AAT TTT ATT AAA AGT	exó 7	459
F8E8-1	CCA TAT AGC CTG CAG AAC AT	F8E8-2	CTG ATG CTC AGC TAT GTT AG	exó 8	547
F8E9-1	CTA ACA TAG CTG AGC ATC AG	F8E9-2	AGA TAT GTC CAT TGG AGA CAA	exó 9	416
F8E10-1	CTA GCC TCA AAT TAC TAT AAT G	F8E10-2	ACT TTA GAC TGG AGC TTG AG	exó 10	347
F8E11-1	TGC GAC TTT AGC TTC CAC TT	F8E11-2	ACT GAC CTA TAT TGC AAA CCA	exó 11	445
F8E12-1	TGC CAT CGC TTT CAT CAT AG	F8E12-2	CAT CAT TAT CTG GAC ATC AC	exó 12	320
F8E13-1C	TTC CTG GGA ATA AGA TAA TGG	F8E13-2C	AGC ATA CGA ATG GCT AGT GA	exó 13	392
F8E14-1	ACA GGC ATA GTA CAA CAG CA	F8E14-2	CTT GGC TAT TCA TTA AAC CTG	exó 14 a	1008
F8E14-3	TCC ATC AGA CAA TTT GGC AG	F8E14-4	CTA CAT TTT GCC TAG TGC TC	exó 14 b	1043
F8E14-5	AGT AGG AAA GGG TGA ATT TAC	F8E14-6	AGG TCC TTC TGA TAA ATG TGA	exó 14 c	1062
F8E14-7	AGC AGT CAT TTC TTA CAA GGA	F8E14-8	GTT GAT AGG TGA GGT TGA CT	exó 14 d	1089
F8E15-1	AGA TGA AGT GGT TAA CTA TGC	F8E15-2	GTG GGA ATA CAT TAT AGT CAG	exó 15	349
F8E16-1	AGC ATC CAT CTT CTG TAC CA	F8E16-2	TCA GTA GAT TCC AGA ATG ACA	exó 16	525
F8E17-1	TGT CAT TCT GGA ATC TAC TGA	F8E17-2	CAC TCC CAC AGA TAT ACT CT	exó 17	491
F8E18-1	AGA GTA TAT CTG TGG GAG TG	F8E18-2	CTT AAG AGC ATG GAG CTT GT	exó 18	412
F8E19-1	GCA AGC ACT TTG CAT TTG AG	F8E19-2	AGC AAC CAT TCC AGA AAG GA	exó 19	341
F8E20-1	ACG TTG AGT ACA GTT CTT GG	F8E20-2	ACT AAT AGA AGC ATG GAG ATG	exó 20	314
F8E21-1B	CAG CTT AGA TTA ACC TTT CTC	F8E21-2	GAG TGA ATG TGA TAC ATT TCC	exó 21	217
F8E22-1B	TCA GGA GGT AGC ACA TAC AT	F8E22-2B	GTC CAA TAT CTG AAA TCT GC	exó 22	286
F8E23-1	GTC TTA TGT AGA TGT TGG ATG	F8E23-2	AGT CTC AGG ATA ACT AGA ACA	exó 23	349
F8E24-1	GCT CAG TAT AAC TGA GGC TG	F8E24-2	CTC TGA GTC AGT TAA ACA GT	exó 24	248
F8E25-1	AGT GCT GTG GTA TGG TTA AG	F8E25-2	TTG CTC TGA AAA TTT GGT CAT A	exó 25	371
F8E26-1	GGT TTA ATC CTG GAC TAC TG	F8E26-2	GTG TCT GCT AGG ATT TAG CA	exó 26	354

Taula 6. Seqüències dels encebadors per a l'amplificació del gen F8.

<i>Primer directe (forward) (5'-3')</i>		<i>Primer revers (reverse) (5'-3')</i>		Regió amplificada	Grandària del producte (pb)
NOM	SEQÜÈNCIA	NOM	SEQÜÈNCIA		
F9E1-1b	AAA TCA GCC ACA GTG GCA G	F9E1-2	CAG CAT CAG ATA TTT CTA TAT C	exó 1	368
F9E2-1	CAA AGA CTT TCT TAA GAG ATG T	F9E2-2	CTA TCT TTT ATA ACA TTT AAC ATA C	exó 2	373
F9E3-1	ATG TTA AAT GTT ATA AAA GAT AGG	F9E3-2	GAC AAA GTT TAA TAT ATT ATC TAT T	exó 3	206
F9E4-1	ATC CCA ATG AGT ATC TAC AGG	F9E4-2	CAC CAA TAT TGC ATT TTC CAG	exó 4	275
F9E5-1	ATA CAT GAG TCA GTA GTT CCA	F9E5-2	AGG AAG CAG ATT CAA GTA GG	exó 5	309
F9E6-1B	TCT CAG AAG TGA CAA GGA TG	F9E6-2B	ACA TCC CAA TAG GTC TGT CT	exó 6	407
F9E7-1	CTA TTC CTG TAA CCA GCA CA	F9E7-2	CTT CTG CCT TTA GCC CAA TT	exó 7	318
F9E8-1	AAT TAG GCA GTG GT CCC AA	F9E8-1-R	ACA GAA CAT GTT GTT ATA GAT G	exó 8-a	439
F9E8-1-F	CAA AGG GAG ATC AGC TTT AG	F9E8-2b	TCA TAG AAT GTA TAT ATT CAA ATC	exó 8-b	414

Taula 7. Seqüències dels encebadors per a l'amplificació del gen F9.

Les diferents PCRs s'han dissenyat especialment amb el propòsit de funcionar de manera òptima tant amb les mateixes concentracions de clorur de magnesi i d'encebadors com amb el mateix programa de termociclador, independentment de la grandària del producte de la PCR i de la seva ubicació.

Per comprovar l'eficiència i l'especificitat de l'amplificació, s'han barrejat 6 µl dels productes de la reacció amb 1 µl de tampó de càrrega i s'han visualitzat en un gel d'agarosa a l'1% tenyit amb bromur d'etidi. Els productes de l'amplificació han de tenir la intensitat i la grandària esperades.

A continuació es procedeix a la purificació dels productes de PCR. A 8 µl de cada PCR s'afegeixen 2 µl d'ExoSAP-IT (USB). La barreja s'incuba durant 30 minuts a 37°C. L'ExoSAP-IT consisteix en una barreja dels enzims exonucleasa I (que degrada els encebadors sobrants de la reacció de PCR, així com productes incomplets de cadena senzilla) i la fosfatasa alcalina de gamba (que hidrolitza els nucleòtids no incorporats). Per a la inactivació dels enzims, la barreja s'incuba 15 minuts a 80°C.

Els productes d'amplificació purificats (2,8 µl) s'han seqüenciat mitjançant el mètode de dideoxinucleòtids fluorescents amb 1 µl del kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) i 25 ng d'encebador. La reacció de seqüenciació, a diferència de la PCR, utilitza només un encebador, a partir del qual en van afegint els nucleòtids. Els nucleòtids consisteixen en una barreja de dNTPs i ddNTPs. Els ddNTPs tenen una molècula fluorescent de diferent color per a cada base, (ddATP-verd, ddTTP-vermell, ddGTP-groc (negre) i ddCTP-blau). Sempre que s'incorpori un dNTP a la cadena, la síntesi de DNA continuarà. Tanmateix, els ddNTPs també s'incorporen a l'atzar en diferents posicions, però la seva incorporació impossibilita la incorporació d'altres dNTPs i, per tant, l'elongació de la cadena s'atura. Com que la seqüenciació és cíclica, després de diversos cicles s'obtenen fragments de totes les mides possibles tots acabats amb un terminador fluorescent diferent. Les reaccions de seqüència s'han analitzat mitjançant electroforesi capil·lar en un ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Les seqüències obtingudes amb el *Sequence Analysis Software* (Applied Biosystems) han estat alineades amb les seqüències salvatges dels gens *F8* i *F9* (GenBank) amb el programa *SeqScape* (Applied Biosystems). La manca d'aparellament amb la seqüència salvatge determina la presència de la mutació.



### 3.3.5.3. Detecció de mutacions específiques

A partir de la mostra preamplificada amb I-PEP-PCR del DNA d'una sola cèl·lula es pot portar a terme la detecció de mutacions específiques. Aquesta aplicació pot ser útil tan per validar les tècniques prèviament explicades com per confirmar el diagnòstic en un cas clínic. Per aquesta raó s'ha dissenyat una PCR fluorescent per a l'anàlisi de fragments específica per a la detecció de la mutació en una parella candidata que es volia sotmetre a un cicle de DGP. L'estudi genètic familiar va evidenciar una duplicació en tàndem de 41 pb en l'exó 14 del gen *F8* responsable de HA greu en el primer fill de la parella: 4113–4153dup CACACAGATAGACTACAATGAGAAGGAGAAAGGGGCCATTA. La dona era portadora de la mutació. L'amplificació té lloc amb les mateixes condicions d'amplificació mencionades anteriorment i utilitzant 250 ng de l'encebador directe (F-TCCCACTAGAAGAAACAGAAC) marcat amb 6-FAM i l'encebador revers (R-GTAATGGAGATCTATTTGCTTG) no marcat per a l'anàlisi mitjançant electroforesi capil·lar.

### 3.3.5.4. Amplificació d'STRs

La mateixa mostra preamplificada amb I-PEP-PCR pot ser utilitzada per amplificar simultàniament microsatèl·lits marcats fluorescentment. L'estudi dels STRs permetrà, en parelles informatives, detectar el fenomen d'ADO i determinats fenòmens de contaminació, així com també proporcionarà un diagnòstic indirecte addicional que corrobore el diagnòstic de la mutació.

S'han dissenyat dues PCRs *multiplex* fluorescents per a l'anàlisi de quatre marcadors polimòrfics lligats a cadascun dels gens *CFTR* i *F8*. En ambdós casos, s'han seleccionat dos marcadors intragènics i dos marcadors extragènics flanquejants un a cada banda del gen.

Els encebadors per aquests vuit marcadors s'han dissenyat a partir de les seqüències de les regions corresponents del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) (veure Taules 8 i 9), seguint els següents criteris:

- La longitud de l'oligonucleòtid, d'aproximadament 20-24 bases.
- El contingut de G+C semblant al d'A+T, i la distribució d'aquestes bases homogènia al llarg de l'encebador.
- L'extrem 3' de l'encebador ha d'acabar en G o C, però idealment no ha d'acabar en CG o GC (per evitar dímers de *primer*).

- La temperatura de fusió o *melting* (calculada segons la regla de Wallace (Wallace *et al.* 1979):  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ ) ha de ser entre 56 i 60°C per a tots els encebadors.
- No-coincidència en la mida dels fragments resultants dels quatre marcadors utilitzats en cadascuna de les *multiplex*, i en el cas de mides similars, marcar els encebadors amb fluorocroms diferents per tal de permetre la diferenciació entre marcadors i l'anàlisi simultània de tots els marcadors en una electroforesi capil·lar.

Els encebadors dissenyats per els marcadors lligats al gen *CFTR* i *F8* es mostren a les Taules 8 i 9 (respectivament).

Locus STR	Seqüència del primer	Marcatge fluorescent	Mida fragment (pb)	GeneBank accession #	Posició
D7S486	F-5'-GGTGATTGATAGTGCACAC-3'	-	124-138	NT_007933.14	41078343 : 41078362
	R-5'-TGGTATATCCCACTGAGAAAG-3'	NED			41078450 : 41078470
IVS8CA	F-5'-CTATCTCATGTTAATGCTGAAG-3'	6-FAM	171-193		42371899 : 42371920
	R-5'-TAAGATATTTGCCATTATCAAG-3'	-			42372051 : 42372073
IVS17bTA	F-5'-GCTGCATTCTATAGGTTATCAA -3'	HEX	200-298		42435500 : 42435521
	R-5'-TGACAATCTGTGTGCATCGG-3'	-			42435728 : 42435747
D7S480	F-5'-ACCATCTTTTAGGTTAGACAAG-3'	NED	210-230		46148661 : 46148681
	R-5'-TTCAGATCTGAATCTCTTACTG-3'	-			46148843 : 46148864

Taula 8. Disseny dels encebadors dels microsatèl·lits lligats al gen *CFTR*.

Locus STR	Seqüència del primer	Marcatge fluorescent	Mida fragment (pb)	GeneBank accession #	Posició
DXS1073	F-5'-ATGCCCTCTCCGAGTTATTAC-3'	NED	120-142	AF277315	81434:81454
	R-5'-GATTGGTGGCCTTTGAAACAC-3'	-			81564:81544
STR13	F-5'-GCATTCAACTGTACATAATGTATC-3'	6-FAM	148-158	AY769950	89743:89766
	R-5'-CCAAATTACAGATTGAATAAGCC-3'	-			89894:89872
DXS1108	F-5'-AGTGAATTCATCATATGTGATTTC-3'	NED	163-177	BX323057	34702:34725
	R-5'-ACTAGGCGACTAATACAGTGG-3'	-			34866:34846
STR22	F-5'-ACACAGTCAGCTGTGAAAGAG-3'	HEX	227-233	AY769950	150199:150179
	R-5'-AACCAGACATGTCAAGGTGTC-3'	-			149970:149991

Taula 9. Disseny dels encebadors dels microsatèl·lits lligats al gen *F8*.

#### 3.3.5.4.1. Multiplex d'STRs lligats al gen *CFTR*

En el cas dels polimorfismes lligats al gen *CFTR* s'han seleccionat els marcadors intragènics *ivs8CA* i *ivs17bTA* i els marcadors extragènics *D7S480* i *D7S486*. Aquests

marcadors han estat seleccionats tant per la seva localització com per la seva elevada informativitat (Taula 10).

<b>D7S480</b>		<b>D7S486</b>		<b>IVS8CA</b>		<b>IVS17bTA</b>	
Al.lel	%	Al.lel	%	Al.lel	%	Al.lel	%
210	1,1	124	8	171	0,9	200	0,5
214	12,5	126	5,7	173	2,8	202	16,1
216	4,5	128	5,7	175	14,6	204	5,5
218	10,2	130	1,1	177	41	228	0,9
220	2,3	132	51,1	179	15,6	230	0,5
222	13,6	134	14,8	181	0,5	232	0,5
224	18,2	136	12,5	185	0,5	242	2,3
226	10,2	138	1,1	187	0,9	244	0,9
228	25			189	10,4	246	7,3
230	2,3			191	10,8	248	10,1
				193	0,9	250	18,8
						252	17
						254	4,1
						256	1,4
						258	3,7
						274	0,5
						276	4,1
						280	2,3
						282	1,8
						284	0,5
						288	0,5
						298	0,9

<b>Heterozigositat combinada: 97,73%</b>			
Heterozigositat extragènics		Heterozigositat intragènics	
<b>D7S480</b> 3,65 Mb tel	<b>D7S486</b> 1,22 Mb cen	<b>IVS8CA</b>	<b>IVS17bTA</b>
<b>68,2%</b>	<b>68,2%</b>	<b>63,2%</b>	<b>79,8%</b>

Taula 10. Al·lels, freqüències i hererozigosi dels quatre marcadors seleccionats per a l'anàlisi de lligament del gen CFTR. La posició respecte del gen indicada per "cen" significa centromèric o proximal i la indicada per "tel", telomèric o distal. La distància està indicada en megabases (Mb). Adaptat de l'article Goossens et al. 2003 als encebadors dissenyats en aquest treball. L'al·lel indica la mida del producte de PCR en pb.

Un cop comprovat que les amplificacions de cada marcador funcionen per separat, s'ha procedit a la posada a punt de la PCR *multiplex* en DNA genòmic (50-100 ng). Després s'han ajustat les condicions per tal de que la PCR funcioni a partir 2 µl de producte d'I-PEP-PCR de cèl·lules aïllades. La reacció final té un volum total de 25 µl i conté els següents reactius:

- Tampó de PCR (75 mM KCl, 30 mM Tris-HCl (pH 8,4))
- 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 200 µM de la barreja dels 4 dNTPs
- 1 U *Platinum Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen)

- 3,1  $\mu$ M dels encebadors IVS17bTA
- 1,6  $\mu$ M dels encebadors D7S480
- 0,9  $\mu$ M dels encebadors D7S486
- 0,4  $\mu$ M dels encebadors IVS8CA

El programa d'amplificació utilitzat ha estat el mateix que per a les PCRs dels gens *F8* i *F9*.

#### 3.3.5.4.2. Multiplex d'STRs lligats al gen *F8*

En el cas dels STRs lligats al gen *F8*, els dos microsatèl·lits intragènics seleccionats han estat el STR13 i el STR22 (Lalloz et al. 1991; Lalloz et al. 1994) i els extragènics DXS1073 i DXS1108 (Gigarel et al. 2004) (Taula 11).

DXS1073		STR13		DXS1108		STR22	
Al.lel	%	Al.lel	%	Al.lel	%	Al.lel	%
8	1,2	19	1,2	11	24,4	24	7,3
9	-	20	51,2	12	-	25	41,5
10	-	21	30,5	13	1,2	26	50
11	7,3	22	8,5	14	-	27	1,2
12	32,9	23	7,3	15	3,7		
13	46,3	24	1,2	16	25,6		
14	1,2			17	35,4		
15	2,4			18	9,8		
16	-						
17	-						
18	6,1						
19	2,4						

Heterozigositat combinada: 90,24%			
Heterozigositat extragènics		Heterozigositat intragènics	
DXS1073 0,23 Mb cen	DXS1108 0,61 Mb tel	STR13	STR22
<b>70,7%</b>	<b>65,9%</b>	<b>46,3%</b>	<b>46,3%</b>

Taula 11. Al·lels, freqüències i hererozigosi dels quatre marcadors seleccionats per a l'anàlisi de lligament del gen *F8*. La posició respecte del gen indicada per "cen" significa centromèric o proximal i la indicada per "tel", telomèric o distal. La distància està indicada en megabases (Mb). L'al·lel indica el nombre de repeticions del dinucleòtid.

Un cop testats per separat i posats a punt en DNA genòmic, les condicions per a l'amplificació *multiplex* dels quatre marcadors en 2  $\mu$ l de producte d'I-PEP-PCR de cèl·lules aïllades consistien en:

- Tampó de PCR (75 mM KCl, 30 mM Tris-HCl (pH 8,4))
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 200 µM de la barreja dels 4 dNTPs
- 1 U *Platinum Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen)
- 3 µM dels encebadors DXS1108
- 1,7 µM dels encebadors STR13
- 0,7 µM dels encebadors STR22
- 0,5 µM dels encebadors DXS1073

La reacció conté en un volum total de 25 µl i de nou el programa d'amplificació utilitzat ha estat el mateix que per a les PCRs dels gens *F8* i *F9*.

### 3.3.6. Anàlisi estadística

En l'estudi de comparació dels resultats obtinguts amb ambdues Taq polimerases, l'anàlisi estadística s'ha aplicat amb el programa SPSS, versió 12.5. Concretament, s'ha aplicat el test de Wilcoxon per a dades no paramètriques.

Per a l'avaluació de paràmetres poblacionals, tals com freqüències al·lèliques i heterozigosi, s'ha utilitzat la plantilla PowerStats per a Microsoft Excel (<http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats/default.htm>).

Per al test d'equilibri de Hardy-Weinberg, els càlculs d'heterozigosi esperada i determinació del desequilibri de lligament s'ha emprat el paquet de software Arlequin 2.0. (Laurent Excoffier, Universitat de Ginebra, Suïssa).

Altres càlculs estadístics més senzills s'han realitzat utilitzant el full de càlcul Microsoft Excel.





## **RESULTATS**





# 4. RESULTATS

## 4.1. ARTICLE 1

### **Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells.**

Sánchez-García JF, Benet J, Gutiérrez-Mateo C, Luís Séculi J, Monrós E, Navarro J.  
*Molecular Human Reproduction*. 2005 Jun;11(6):463-8.

Objectius concrets 1, 2



# Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells

Jorge Fernando Sánchez-García<sup>1,3</sup>, Jordi Benet<sup>1</sup>, Cristina Gutiérrez-Mateo<sup>1</sup>, José Luís Séculi<sup>2</sup>, Eugènia Monrós<sup>2</sup> and Joaquina Navarro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra and <sup>2</sup>Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: jsanchezg@servet.uab.es, joaquina.navarro@uab.es

**PGD is becoming an alternative to prenatal diagnosis. The combination of IVF techniques with the PCR technology allows for the detection of genetic abnormalities in first polar bodies from oocytes and blastomeres from cleavage-stage embryos. Dealing with a genetic disease with a heterogeneous spectrum of mutations like cystic fibrosis, one of the objectives of centres offering PGD is the application of simple and efficient protocols that allow for the detection of a wide range of mutations with a single procedure. In the present work, 29 normal loci and the 31 most frequent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutations in Southern Europe could be detected at the same time in single cells applying a modified and improved primer extension preamplification-PCR. Two different *Taq* polymerases were tested in isolated buccal cells heterozygous for several mutations. The protocol that gave statistically significant better results was also successful in oocytes and their first polar bodies.**

*Key words:* cystic fibrosis/embryo/first polar body/PEP-PCR/PGD

## Introduction

Cystic fibrosis is the most common autosomal-recessive disease which affects one in every 2500 newborns (Cutting, 1997). Its main features are elevation of chloride in sweat, pulmonary disease and pancreatic failure. The gene responsible, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*), was cloned in 1989 (Riordan *et al.*, 1989). The most frequent mutation in approximately 66% of all cases is a 3 bp deletion  $\Delta F508$ , but over 1000 different mutations have been described (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr-cgi-bin/FullTable>). About 1 in 25–30 Caucasians is a carrier of a cystic fibrosis mutation. PGD is an alternative to prenatal diagnosis for the detection of chromosomal abnormalities or single gene defects and can prevent termination of pregnancy in the case of an affected fetus. PGD has been widely applied in cleavage-stage embryos by analysing one or two of their blastomeres (Sermon *et al.*, 2005). PGD can also be performed by first polar body biopsy (PGD-1PB) (Strom *et al.*, 1990). The 1PB is extruded during the first meiotic division and contains the complementary genotype to the oocyte arrested in metaphase II (MII). Its removal has no effect on the subsequent embryo since it is destined to degenerate and does not interfere with fertilization rates or the percentage of embryos entering cleavage (Verlinsky and Kuliev, 1992; Magli *et al.*, 2004). In a female carrying a genetic disease, the absence or presence of the mutation can be detected indirectly in the oocyte by analysis of the 1PB. Only embryos resulting from genetically normal oocytes are transferred back to the mother. To date, PGD-1PB has been applied to several monogenic diseases (Wells and Sherlock, 1998) and its analysis must contemplate recombination events, which

would lead to heterozygous gametes. The phenomenon of allele drop-out (ADO) also has to be considered in single-cell PCR (Findlay *et al.*, 1995). It consists of the amplification of only one allele in a heterozygous single cell which could lead to misdiagnosis. The accuracy of the procedure has been improved by including techniques such as: more efficient lysis (El-Hashemite and Delhanty, 1997), multiplex PCR and fluorescent PCR (Findlay *et al.*, 1995) which allows for more sensitive detection of PCR products. Recent studies in isolated cells and blastomeres are based on the identification of a single *CFTR* mutation (Ray *et al.*, 2002; Vrettou *et al.*, 2002) or on highly polymorphic short tandem repeats (STR) linked to the mutation (Dreesen *et al.*, 2000; Eftedal *et al.*, 2001; Goosens *et al.*, 2003). The most recent alternatives for PGD of cystic fibrosis are sequencing and mini-sequencing methods, with which a wide range of mutations may be detected directly (Bermúdez *et al.*, 2003; Fiorentino *et al.*, 2003).

The aim of the present work was to develop a sensitive and reliable method for the identification of a large number of different mutations in a single procedure. Isolated cells were subjected to a modified and improved primer extension preamplification PCR (I-PEP-PCR) (Dietmaier *et al.*, 1999). The products obtained were used in a multiplex PCR and a fluorescent oligonucleotide ligation assay (OLA) for the identification of normal and mutant loci of the 31 most frequent mutations in Southern Europe (including the 25 most common worldwide). In our hands, the first protocol of PEP-PCR (Zhang *et al.*, 1992) was successful in small clumps of cells (5–30) and in 20 pg of genomic DNA. In order to improve the performance of whole genome amplification in single cells, two different *Taq* polymerases were tested.

## Materials and methods

### Strategy

To develop a unique PGD system to detect diverse mutations, whole genome amplification was applied to isolated cells, enabling the use of a commercial kit which allows for fluorescent detection of 31 cystic fibrosis mutations. Two different *Taq* polymerases were tested to improve the performance of the preamplification step. The validation of both procedures was based on the height of the alleles detected in the electropherogram. Moreover, the method which yielded the best results was tested in oocytes.

### Cell samples

Isolated buccal cells were collected by mouthwashes from three normal individuals, three patients affected by mutations  $\Delta F508$ ,  $\Delta F508/1078\text{delT}$  and  $\Delta F508/3849+10\text{kbC}>\text{T}$  and five heterozygous carriers for *CFTR* mutations  $\Delta F508$ , N1303K, G542X, R347P and 2183AA>G.

Ten matured oocytes remaining unfertilized after IVF, donated by assisted reproductive centres, were available for analysis. Both MII oocytes and 1PBs were studied separately.

All procedures were approved by the Ethics Committees of the participating centres.

### Cell isolation

Stringent precautions were followed to guard against contamination during the entire process of isolation, lysis and amplification (Wells and Sherlock, 1998; Thornhill and Snow, 2002). The work was performed in a restricted area in a flow hood with no DNA or PCR product access. The technician wore a gown, surgical mask and gloves, and dedicated pipettes and filter tips were used in the procedure. The reagents used were subjected to filtration, sterilization and UV exposure.

Manipulation was performed using UV-sterilized pulled-glass micropipettes. Buccal cell suspension was diluted in several droplets of sterile phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% polyvinyl alcohol (PVA) to prevent cell sticking, until a single cell was obtained. Buccal cells were checked under stereomicroscope for the presence of a visible nucleus. MII oocytes and 1PBs were separated by digestion of the zona pellucida with either 30 mg/ml trypsin in PBS, pH 7.2, for 2–3 min at 37°C, or with Tyrode's acid solution (pH 2.5). Cells were washed three times in PBS/0.1% PVA and transferred to a 0.2 ml PCR tube. The presence of the cell inside the tube was confirmed.

### Cell lysis

One microlitre of sodium dodecyl sulphate 17  $\mu\text{M}$  (Sigma, USA) and 2  $\mu\text{l}$  of PCR-grade proteinase K (125 mg/ml) (Roche, Switzerland) were added to each tube and covered with one drop of light mineral oil (Sigma, USA). The lysis was performed by incubation for 1 h at 37°C, followed by 15 min at 95°C to inactivate the enzyme.

### Whole genome amplification in single cells

The lysed cells were subjected to I-PEP-PCR whole genome amplification (Dietmaier *et al.*, 1999) with several modifications: (1) The reaction was performed in 40  $\mu\text{l}$  with five units of *Taq* polymerase, 4  $\mu\text{l}$  of 10 $\times$  *Taq* buffer, 3.3  $\mu\text{l}$  of a 400  $\mu\text{M}$  solution of totally degenerated 15-mer primers (Zhang *et al.*, 1992) and 2  $\mu\text{l}$  of a mixture of the four dNTPs (2 mM each); (2) Two *Taq* polymerases were used: SuperTaq polymerase (*Taq* A) (HT Biotechnology, UK), specially recommended in single-cell PCR and SuperTaq Plus polymerase (*Taq* B) (Ambion, USA), a mixture of thermostable DNA polymerases with proofreading activity, enabling a high yield of PCR products up to 20 kb. Twenty single cells were amplified with *Taq* A and a further 30 isolated buccal cells and 10 1PB-MII pairs were amplified with *Taq* B; (3) Hotstart was performed keeping the tubes in ice and placing them in a Tgradient (Biometra, Germany) thermal cycler when it reached the required temperature of 80°C; (4) The initial denaturation was performed at 94°C for 7 min and (5) Modified I-PEP-PCR consisted of 50 cycles of 1 min at 94°C, 2 min at 31.5°C, a programmed ramp of 0.1°C per second, 55°C for 4 min and a final step at 68°C for 30 s. Tubes were then cooled down to 4°C. Blank

controls of the isolation solutions and PCR reagents were included to check contamination. Tubes were kept at  $-80^\circ\text{C}$  if necessary.

### Cystic fibrosis assay in single cells

Six microlitres of the I-PEP-PCR products were used in an adaptation of the 'Cystic Fibrosis Assay' (Applied Biosystems, USA), a commercially available test for the screening of the most common *CFTR* mutations. It consists of a multiplex PCR in which 15 pairs of primers amplify the regions of the gene which may contain the mutations. Then, a multiplex, fluorescent OLA detects normal and mutant alleles with a complementary probe for each sequence which are ligated with a common probe for every locus labelled with 6-FAM (6-Carboxyfluorescein), TET (tetrachlorofluorescein) or HEX (hexachlorofluorescein). The normal and mutant oligonucleotides have different lengths of pentaethylene oxide tails, with subsequent electrophoretic separation. The mutations assayed are:  $\Delta F508$ ,  $\Delta I507$ , Q493X, V520F, 1717-1G>A, G542X, G551D, R560T, S459R, S459N and R553X labelled with FAM (blue), 3849+10kbC>T, 3849+4A>G, R1162X, 3659delC, W1282X, 3905insT, N1303K, 1078delT, R347P, R347H and R334W labelled with TET (green) and A455E, 1898+1G>A, 2183AA>G, 2789+5G>A, G85E, 621+1G>T, R117H, Y122X and 711+1G>T labelled with HEX (yellow). The 10  $\mu\text{l}$  of the OLA products of a single cell were additionally ethanol-precipitated for 1 h at  $-80^\circ\text{C}$  and resuspended in 1  $\mu\text{l}$  of nuclease-free water and a TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine) size standard was added. Single cells produced a very small amount of PCR products, so it was necessary to ethanol-precipitate the OLA reaction to concentrate the fragments obtained. The samples were run in an ABI Prism 377 (Applied Biosystems, USA) automated gel electrophoresis. Subsequent analysis was performed with GeneScan and Genotyper softwares (Applied Biosystems, USA). Each allele was identified by its name, fragment size in base pairs and fluorescence intensity in relative fluorescence units (RFU).

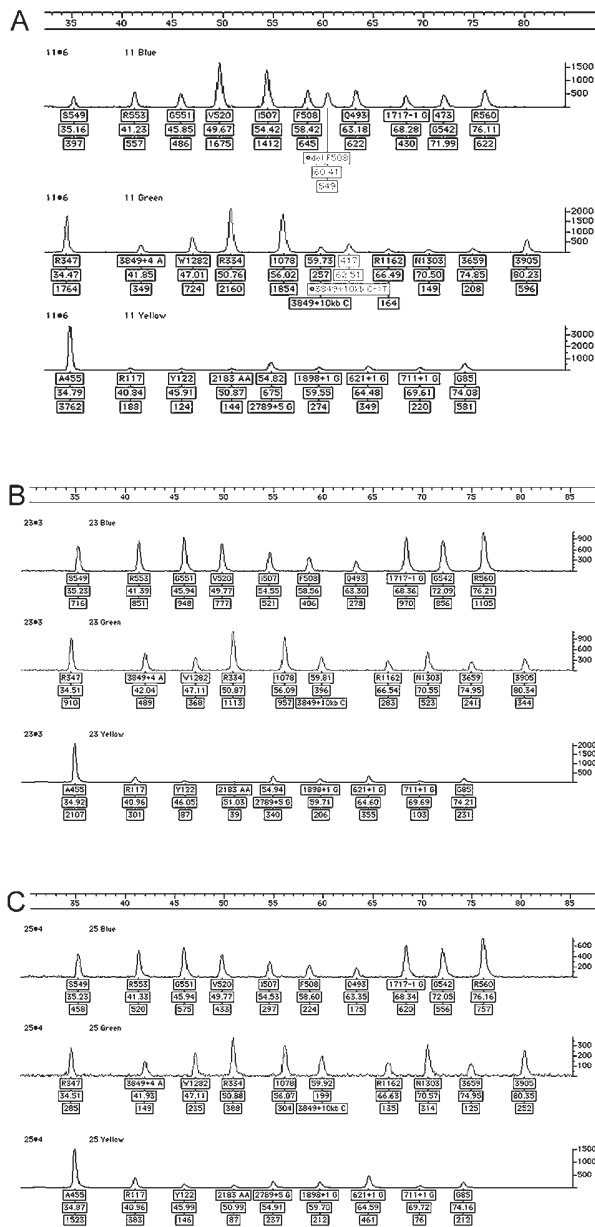
### Scoring criteria

Detection of an allele has been considered when a single peak was equal to or above 50 RFU in height. A rigorous classification of three categories, based on allele height, was established for evaluating the success and quality of both procedures: peaks below 50 RFU were considered not detected, when the peak ranged from 50 to 250 RFU the detection was considered as low and peaks over 250 RFU were classified as high. Statistical analysis was performed with SPSS software, version 12.5, to compare the results obtained with both *Taq* A and B.

## Results

Identification of the normal and mutant alleles of the *CFTR* gene was achieved with both polymerases tested in preamplified DNA of single cells. Since the mutations to be analysed are known, the rest of the peaks of the normal loci can be used as a control of the amplification. No additional unknown mutations were observed after whole genome amplification. Thus the genotype of the cells was determined correctly. Figure 1A shows an electropherogram of a buccal cell carrying mutations  $\Delta F508$  and 3849+10kbC>T.

Twenty single buccal cells were analysed using *Taq* A for amplification with PEP-PCR. Preamplification with *Taq* B was performed in 30 single buccal cells. Table I shows the number of cells analysed for the indicated allele, the percentage of cells in each category of classification and amplification rates for both polymerases. From a total of 30 alleles, a mean of 22.3 alleles was identified per cell using *Taq* A, ranging from 15 to 30. In the case of *Taq* B, an average of 26.4 alleles was identified correctly, ranging from 19 to 31, from a total of 31 alleles. The median values for efficiencies of amplification were 80% with *Taq* A and 90% with *Taq* B, both showing statistically significant differences ( $P < 0.0001$ ) in a Wilcoxon test for non-parametric data. Peaks included in the high category ( $>250$  RFU) were used for identifying which *Taq* achieved better results. *Taq* A revealed a median value of 15% of high peaks, while in the case of *Taq* B it was 40%. The difference between both



**Figure 1.** Electropherograms obtained from the analysis of (A) a compound heterozygote  $\Delta F508/3849+10\text{kbC}>T$  single cell preamplified with the *Taq* with proofreading activity (*Taq B*), (B) a MII and (C) 1PB corresponding to Oocyte 2 in Table III. Each allele detected is labelled with three tags corresponding to its name, size (in bp) and height in RFU.

polymerases was also statistically significant ( $P < 0.0001$ ) with the same test.

In the  $\Delta F508$  locus, a 30% increase in peaks over 250 RFU was found in both normal and mutant alleles by changing *Taq A* for the proofreading *Taq*, while the amplification rate was similar. In most cases, PEP-PCR with *Taq B* achieved better results and amplification rates than *Taq A*. About 10% heterozygous  $\Delta F508$  cells amplified with *Taq B* displayed alleles below 50 RFU, but most of them could be properly identified. A similar result was seen in heterozygous cells for G542X and 3849+10kbC>T. Heterozygous cells for the R347P mutation successfully amplified both alleles with the proofreading *Taq*. Locus A455 showed the highest values in all cells tested. Other loci with high detection were V520, I507, R334

and 1078. On the other hand, amplification in locus 2183AA was extremely low (25% in Protocol A and 33.3% in B), and mutation 2183AA>G was barely detected in only one of seven cases (14.3%). The ADO rate for the assay with *Taq A* was 16.6% because 3 of 18 heterozygous samples generated only one signal. The ADO rate in Protocol B was 13.2% (5/38).

Ten oocytes were also analysed with *Taq B* (Table II), the average of amplification rate of oocytes was 74.5% and in 1PBs 44.5%. The total number of alleles identified in the 10 pairs of 1PBs and MII oocytes is shown in Table III. On average, the alleles detected in 1PBs were 12.9, while in MII oocytes it was 21.7, from a total of 29 normal alleles. Figure 1B and C show electropherograms obtained in the analysis of MII and 1PB pair of Oocyte 2 in Table III, respectively.

The contamination rate was 2.7% (2 of 70 blanks showed amplification).

## Discussion

The present work describes an improved whole genome amplification in isolated cells which allows for performing standard laboratory methods for single gene diagnosis with no extensive modifications. PEP-PCR is a reliable method of preamplification because the expected genotype in isolated cells is found and artefacts after PEP were not observed with either of the polymerases chosen. Considering that an increase in denaturing time has beneficial effects on the ADO rate (Piyamongkol *et al.*, 2003), a long initial denaturation step at 94°C for 7 min was performed for ensuring dissociated strands. This option was preferred, instead of increasing the temperature, for avoiding DNA damage. A step of 30 s at 68°C was added (Dietmaier *et al.*, 1999) because it is the optimal temperature of polymerization for both polymerases (according to manufacturers) and longer genetic fragments are obtained.

Amplification rates were calculated considering only peaks over 50 RFU. The protocol with *Taq B* showed a better amplification rate (90%) over *Taq A* (80%), and *Taq B* yielded more results over 250 RFU than *Taq A* (median values of 40 versus 15%). This may be explained by the fact that proofreading activity repairs mistakes during elongation in PCR, permitting high yield as well as longer DNA fragments. The critical choice of the polymerase has been previously reported (Thornhill *et al.*, 2005). Locus R347P reached a 100% amplification rate, while most of the heterozygous loci displayed efficiencies barely over 90%, suggesting that as PCR primers have to be shared between the two alleles, heterozygous samples seem to have less amplification than homozygotes. The ADO rate was evaluated considering heterozygous samples in which one of the alleles was undetected. *Taq B* showed an acceptable ADO rate of 13.2%, similar to other recent reports (Bermúdez *et al.*, 2003; Handyside *et al.*, 2004). Whole genome amplification does not reduce the ADO rate (Wells and Sherlock, 1998), but PEP-PCR was necessary to have a considerable amount of template because of the variety of mutations detected simultaneously with the reactions of multiplex PCR and OLA. OLA detection works with short fragments, which at first should be less inclined to experience ADO (Piyamongkol *et al.*, 2003).

Only in the case of allele 2183AA and its mutation 2183AA>G, as a result of the failures of amplification accumulated in this locus, would PGD of this mutation not be advisable. The loci with amplification rates below 85% (3849+10kbC>T, N1303K, 2789+5G>A and 711+1G>T) should be studied more in-depth, preferably analysing fresh oocytes. The rest of the loci showed

**Table I.** Percentages of single buccal cells observed in each category

Allele	Taq A					Taq B				
	Number of cells	% Cells	Amplification rate (%)			Number of Cells	% Cells	Amplification rate (%)		
			Low 50-250	High > 250	n.d. < 50			Low 50-250	High > 250	n.d. < 50
S549	20	25	60	15	75	30	13.3	46.7	40	86.7
R553	20	15	65	20	85	30	6.7	46.7	46.7	93.3
G551	20	15	70	15	85	30	10	46.7	43.3	90
V520	20	5	40	55	95	30	0	13.3	86.7	100
I507	20	5	45	50	95	30	0	26.7	73.3	100
F508	20	10	80	10	90	30	10	50	40	90
dF508 (*)	12	25	66.7	8.3	75	19	10.5	52.6	36.8	89.5
Q493	20	10	75	15	90	30	10	56.7	33.3	90
1717-G1	20	25	60	15	75	30	6.7	46.7	46.7	93.3
G542	20	20	65	15	80	30	10	50	40	90
G542X (*)	2	50	50	0	50	7	14.3	85.7	0	85.7
R560	20	20	50	30	80	30	6.7	43.3	50	93.3
R347	20	5	70	25	95	30	0	16.7	83.3	100
R347P (*)	-	-	-	-	-	3	0	33.3	66.7	100
3849+4A	20	15	55	30	85	30	3.3	50	46.7	96.7
W1282	20	20	40	40	80	30	13.3	30	56.7	86.7
R334	20	10	75	15	90	30	0	13.3	86.7	100
1078	20	25	60	15	75	30	0	13.3	86.7	100
1078 del T (*)	2	0	100	0	100	-	-	-	-	-
3849+10kbc	20	20	65	15	80	30	3.3	56.7	40	96.7
3849+10kbc > T (*)	-	-	-	-	-	2	50	0	50	50
R1162	20	30	60	10	70	30	13.3	66.7	20	86.7
N1303	20	65	30	5	35	30	16.7	76.7	6.7	83.3
N1303K (*)	4	50	50	0	50	-	-	-	-	-
3659	20	40	55	5	60	30	10	70	20	90
3905	20	20	60	20	80	30	10	33.3	56.7	90
A455	20	0	0	100	100	30	0	0	100	100
R117	20	20	40	40	80	30	10	36.7	53.3	90
Y122	20	45	35	20	55	30	6.7	70	23.3	93.3
2183AA	20	75	20	5	25	30	66.7	30	3.3	33.3
2183AA > G (*)	-	-	-	-	-	7	85.7	14.3	0	14.3
2789+5G	20	15	45	40	85	30	26.7	33.3	40	73.3
1898+1G	20	45	55	0	55	30	33.3	46.7	20	66.7
621+1G	20	5	50	45	95	30	3.3	26.7	70	96.7
711+1G	20	80	15	5	20	30	16.7	76.7	6.7	83.3
G85	20	30	50	20	70	30	6.7	53.3	40	93.3
Median (**)	20	30	50	15	80	30	6.7	53.3	40	90

n.d. = not detected.

\*Heterozygous loci.

\*\*Statistically significant differences ( $P < 0.000$ ) are shown between results for each polymerase (15 versus 40 and 80 versus 90). Median values were calculated since the distribution was not normal.

**Table II.** Efficiencies of amplification using *Taq* B in MII oocytes and first polar bodies

Allele	Amplification rate (%)	
	MII	1PB
S549	70	60
R553	80	60
G551	80	60
V520	100	50
I507	100	30
F508	100	20
Q493	80	20
1717-1G	70	60
G542	70	60
R560	70	60
R347	80	70
3849 + 4A	80	60
W1282	80	30
R334	80	70
1078	70	70
3849 + 10kb C	80	60
R1162	40	60
N1303	70	30
3659	30	60
3905	80	30
A455	100	80
R117	90	30
Y112	50	10
2183AA	40	20
2789 + 5G	70	20
1898 + 1G	80	40
621 + 1G	90	30
711 + 1G	40	10
G85	90	30
Mean	74.5	44.5

**Table III.** Number of alleles detected in oocytes

Oocyte	MII	1PB
1	28	18
2	28	29
3	25	7
4	26	11
5	24	0
6	12	12
7	20	18
8	12	20
9	27	14
10	15	0
Mean	21.7	12.9

efficiencies of amplification suitable for use in clinical application. The 'Cystic Fibrosis Assay' (Applied Biosystems, USA) commercial kit is used in molecular diagnostic centres for the screening of *CFTR* mutations in cystic fibrosis patients and for carrier identification. Genomic DNA from peripheral blood showed low fluctuations in the height of the alleles due to differences in the efficiencies of amplification for each locus and these variations were increased in preamplified single cells. The possibility of optimization of the kit is rather limited, but the efficiencies of amplification obtained in single cells were very satisfactory in the great majority of alleles.

Controls against contamination are critical when using whole genome amplification, since contaminating cells or amplicons can be over-amplified rather than the assayed cell and thus lead to misdiagnosis. It is a matter that can be dealt with by using severe measures

to prevent it and by the application of techniques which detect it (i.e. STRs). Up to six aliquots of each PEP-PCR product can be analysed simultaneously and this technique allows for additional amplification of STRs of the *CFTR* gene (data not shown) for the detection of contamination and ADO. According to our experience, the phenomenon of slippage, reported in the amplification of preamplified repetitive sequences (Foucault *et al.*, 1996; Wells *et al.*, 1999) did not occur when using the *Taq* with proofreading activity (*Taq* B), as mistakes are corrected when using this polymerase.

The present study has been performed under standard electrophoretic conditions for genomic DNA in an ABI Prism 377 sequencer. The step of precipitation should be avoided as varying results were obtained in different aliquots assayed from the same PEP product. Results could be improved by using more sensitive apparatus, such as an ABI Prism 3100. Variations in injection time or voltage could make detection of certain fragment sizes and weaker fluorescent dyes better. Additionally, electrophoresis is performed simultaneously in 16 capillaries, and all cells tested can be analysed in a single run.

Buccal cells are not completely representative, but they are easier to obtain and can be selected from carriers of mutations in the gene under study. Spare embryos and oocytes from finished IVF cycles are in limited availability and have variable, often suboptimal genetic quality. Oocytes were processed at least one day after retrieval, which could explain the better results of MII compared to 1PB, where degeneration by apoptosis may have started earlier than in the oocyte (Gitlin *et al.*, 2003). Several 1PBs were extensively degraded and completely failed to amplify (1PB numbers 5 and 10 in Table III) and in only one case (1PB number 2) were all normal alleles detected. This oocyte ageing could also explain the difference between the oocytes and the buccal cells. Ageing produces nicks in the DNA with detrimental amplification results.

Handyside *et al.* (2004) have recently described isothermal amplification and its possible application in PGD. Their technique needs overnight incubation (about 16 h), while our method of preamplification lasts 6 h less, in which molecular diagnosis could be performed. Saving time is crucial in the case of PGD in blastomeres, when only 32 h are available for diagnosis before transfer. The entire process (lysis, I-PEP-PCR, multiplex PCR, OLA, electrophoresis and analysis) takes about 30 h, so it would be compatible with 1PB analysis and Day +2 embryo replacement in the case of single gene defects maternally inherited. Blastomere analysis should also be possible since embryo transfer can be carried out the third or fourth day after oocyte retrieval (Durban *et al.*, 2001).

This work represents the first description of the adaptation for PGD of a commercial test for the screening of cystic fibrosis mutations with fluorescent detection. The use of the commercial assay allows for the use of a single procedure for the identification of the 31 most common mutations, avoiding the need for having a different protocol for every mutation tested. Therefore, it could be a very useful strategy for its application in centres offering PGD. The method described here directly detects the mutation as in mini-sequencing strategies (Bermúdez *et al.*, 2003; Fiorentino *et al.*, 2003). However, it is important to note that these procedures are not exempt from primer design for every different mutation tested. This procedure would be applicable to 80% of couples worldwide carrying a *CFTR* mutation. This data is close to the 87% described by Dreesen *et al.* (2000) in the Dutch population with their microsatellite approach. A global strategy including the present technique and STR analysis for additional indirect diagnosis (when informative) and detection of contamination and ADO would be a very powerful approach.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Francisco Vidal for critical reading of the manuscript and Drs Mari Carme Pons and Mark Grossmann (Centro Médico Teknon), Josep Maria Calafell (Hospital Clínic i Provincial) and Carmen Márquez (Hospital Vall d'Hebron) for the provision of oocytes. This work received financial support from the Fundació La Marató de TV3, Project 98/1510, 2001-SGR-00201 and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Project PI-020168.

## References

- Bermúdez MG, Piyamongkol W, Tomaz S, Dudman E, Sherlock JK and Wells D (2003) Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 23,669–677.
- Cutting GR (1997) Cystic fibrosis. *Emery and Rimoin's. Principles and Practice of Medical Genetics*, 3rd edn, Vol 2. Churchill Livingstone, New York.
- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstädter F and Rüschoff J (1999) Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 154,83–95.
- Dreesen JC, Jacobs LJ, Bras M, Herbergs J, Dumoulin JC, Geraedts JP, Evers JL and Smeets HJ (2000) Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod* 6,391–396.
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Laila JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J and Navarro J (2001) PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update* 6,591–602.
- Eftedal I, Schwartz M, Bendtsen H, Andersen AN and Ziebe S (2001) Single intragenic microsatellite preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis provides a positive allele identification of all CFTR genotypes for informative couples. *Mol Hum Reprod* 3,307–312.
- El-Hashemite N and Delhanty JDA (1997) A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* 11,975–978.
- Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A and Lilford R (1995) Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Reprod* 6,1609–1618.
- Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M and Gianaroli L (2003) The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 7,399–410.
- Foucault F, Praz F, Jaulin C and Amor-Gueret M (1996) Experimental limits of PCR analysis of (CA)<sub>n</sub> repeat alterations. *Trends Genet* 11,450–452.
- Gitlin SA, Gibbons WE and Gosden RG (2003) Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online* 2,47–53.
- Goosens V, Sermon K, Lissens W, De Rycke M, Saerens B, De Vos A, Henderix P, Van de Velde H, Platteau P, Van Steirteghem A *et al.* (2003) Improving clinical preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis by duplex PCR using two polymorphic markers or one polymorphic marker in combination with the detection of the  $\Delta F508$  mutation. *Mol Hum Reprod* 9,559–567.
- Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, Omar MB, Shaw MA, Grudzinskas JG and Rutherford A (2004) Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod* 10,767–772.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F and Fasolino MC (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod* 19,1163–1169.
- Piyamongkol W, Bermúdez MG, Harper JC and Wells D (2003) Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 7,411–420.
- Ray PF, Frydman N, Attie T, Hamamah S, Kerbrat V, Tachdjian G, Romana S, Vekemans M, Frydman R and Munnich A (2002) Birth of healthy female twins after preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis combined with gender determination. *Mol Hum Reprod* 7,688–694.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066–1073.
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S and De Die C (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May–December 2001. *Hum Reprod* 20,19–34.
- Strom CM, Verlinsky Y, Milayeva S, Evsikov S, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Ginsberg N and Applebaum M (1990) Preconception genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 336,306–307.
- Thornhill AR and Snow K (2002) Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J Mol Diagn* 1,11–29.
- Thornhill AR, Dedie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN *et al.* (2005) ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 20,35–48.
- Verlinsky Y and Kuliev A (1992) Micromanipulation of gametes and embryos in preimplantation genetic diagnosis and assisted fertilization. *Curr Opin Obstet Gynecol* 4,720–725.
- Vrettou C, Tzetzis M, Traeger-Synodinos J, Palmer G and Kanavakis E (2002) Multiplex sequence variation detection throughout the CFTR gene appropriate for preimplantation genetic diagnosis in populations with heterogeneity of cystic fibrosis mutations. *Mol Hum Reprod* 9,880–886.
- Wells D and Sherlock J (1998) Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn* 18,1389–1401.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH and Delhanty JD (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 4,1214–1218.
- Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W and Arnheim N (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89,5847–5851.

Submitted on March 3, 2005; accepted on April 12, 2005



## **4.2. ARTICLE 2**

### **Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid haemophilia A molecular diagnosis.**

Sánchez-García JF, Gallardo D, Ramírez L, Vidal F.

*Thrombosis and Haemostasis*. 2005 Nov;94(5):1099-103.

Objectiu concret 5



## New Technologies and Diagnostic Tools

# Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid haemophilia A molecular diagnosis

Jorge F. Sánchez-García<sup>1,2</sup>, Dominique Gallardo<sup>1</sup>, Lorena Ramírez<sup>1</sup>, Francisco Vidal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Centre de Transfusió i Banc de Teixits, Passeig Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

### Summary

Indirect molecular diagnosis of hemophilia A (HA) is carried out by analyzing intragenic polymorphic markers described along the coagulation factor VIII (FVIII) gene. Several studies have demonstrated that the two commonly used intronic short tandem repeats (STR13 and STR22) located in the FVIII gene are highly informative for this task. Two extragenic markers closely linked to FVIII (DXS1073 and DXS1108) have also been described as valuable tools for gene tracking. The objective of the present work was to develop a rapid, single-tube automated method to simultaneously analyze these four STRs. Consistent amplification was achieved by quadruplex fluorescent PCR and the products were analyzed by capillary electrophoresis. Validation of the method included DNA analysis of 88 individuals from a

control population, 45 HA patients and 32 individuals from 10 HA-affected families. Statistical study showed that the STR13, STR22 and DXS1108 loci were in significant linkage disequilibrium, whereas DXS1073 was not. Nevertheless, the combination of the four markers offered a high heterozygosity rate (>90%) that improved tracing of FVIII gene inheritance. Optimal results with application to single cells in a HA preimplantation genetic diagnosis (PGD) protocol demonstrated the sensitivity of the technique. In conclusion, the automated fluorescent method described is an extremely rapid, simple and highly informative one that is easy to standardize and allows direct comparison of results among different groups working with genetic counseling, prenatal diagnosis and PGD in HA-affected families.

### Keywords

STR, PGD, haemophilia A, factor VIII, linkage analysis

**Thromb Haemost 2005; 94: 1099–103**

### Introduction

Mutations in the human coagulation factor VIII (FVIII) gene result in the X-linked recessive bleeding disorder haemophilia A (HA). Several methods have been used to detect the gene defect, ranging from a variety of screening techniques (1, 2) to the direct sequencing approaches (3). Although mutation identification possesses an indisputable superiority for genetic analysis of HA, indirect diagnosis is still widely used for genetic counseling and prenatal diagnosis because of the great mutational heterogeneity and the large size and complex genomic organization of the gene (4–7). Moreover, emerging diagnostic fields such as preimplantation genetic diagnosis (PGD) could benefit from tools developed for indirect analysis (8–10).

Two commonly used short tandem repeats (STRs) have been described within the FVIII gene for linkage studies (11, 12):

STR13, consisting in a TG repeat located in intron 13, and STR22, consisting in a GT repeat in intron 22. Two extragenic STRs closely linked to the FVIII gene are DXS1073 (TG repeat) and DXS1108 (CA repeat), which are located ~235 kb centromeric and ~610 kb telomeric to the FVIII gene respectively (distances calculated according to Human Genome Build 35.1). These markers have been used for PGD of HA and other diseases mapped in the Xq28 chromosomal region (9).

The aim of this study was to develop an optimized procedure that technically simplifies FVIII gene tracking and linkage studies. Fluorescent amplification of the four above-mentioned STRs was achieved in a single-tube multiplex PCR and analysis was performed by capillary electrophoresis. Validation of the technique included complete statistical transmission analysis of the four markers as well as calculation of the combined heterozygosity and degree of linkage disequilibrium among them.

Correspondence to:

Francisco Vidal

Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular

Centre de Transfusió i Banc de Teixits

Passeig Vall d'Hebron 119–129

08035-Barcelona, Spain

Tel.: + 34 93 2746726, Fax: + 34 93 2746727

E-mail: fvidal@vhebron.net

Received May 24, 2005

Accepted after resubmission August 22, 2005

Financial support:

This study was supported in part by a grant (FIS, PI020809) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias. Spanish Ministry of Health and Consumption

Republished online October 17, 2005 DOI: 10.1160/TH05–05–0360

## Materials and methods

### DNA samples

Peripheral blood drawn into Vacutainer tubes containing ACD or EDTA was obtained from 47 males and 41 females from a control population (Centre de Transfusió i Banc de Teixits, Barcelona, Spain) and 45 hemophilic males of Spanish origin, all unrelated. Blood samples from 32 individuals belonging to 10 HA-affected families were also obtained. DNA was extracted by the standard salting-out procedure with minor modifications (13) and visualized by electrophoresis in 1% agarose gel.

### Primer design

Four polymorphic STR markers located in the Xq28 region were selected: two intragenic markers, STR13 and STR22, and two closely-linked extragenic markers, DXS1073 and DXS1108. Primer sequences (Table 1) were obtained from GeneBank accession numbers: AY769950 for STR13 and STR22; AF277315 for DXS1073; and BX323057 for DXS1108. Primers were designed having comparable annealing temperatures and taking into consideration appropriate amplicon sizes to avoid overlapping. Moreover, similar fragment lengths were labeled with different fluorescent dyes (Table 1).

### Multiplex STR amplification

All microsatellite markers were amplified in a quadruplex reaction with primers listed in Table 1. The PCR solution contained 75 mM KCl, 30 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP's, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 700 ng of primers (300 ng of DXS1108, 200 ng of STR13, 120 ng of STR22 and 80 ng of DXS1073) and 50–100 ng of genomic DNA in a total volume of 25 μL. After initial denaturation at 94°C for 3 min, 34 cycles at 94°C for 20 sec, 54°C for 30 sec and 72°C for 1 min were performed followed by final extension at 72°C for 1 hour.

### Fragment analysis

A 0.5-μL aliquot of the PCR products was diluted in 24 μL of HiDi formamide containing 0.5 μL of GeneScan 500 ROX size standard (both from Applied Biosystems), denatured at 94°C for 3 minutes, chilled on ice and directly analyzed by capillary electrophoresis in an ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sizing was performed with the electropherogram output from GeneScan 3.7 software (Applied Biosystems). A template for Genotyper software 2.5 (Applied Biosystems)

was specifically developed for this task and used to set up categories (alleles), sort peak data, filter out secondary peaks and set up tables with correlated peak and marker information that could be exported for further analysis. Microsatellite alleles were expressed in number of dinucleotide repeats.

### DNA sequencing

PCR products were purified with Exosap-IT (Amersham) and directly sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequencing reactions were analyzed by capillary electrophoresis in an ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### Population analysis

Allele frequencies, heterozygosity and polymorphism information content (14) were calculated with the PowerStats Microsoft Excel workbook spreadsheet (<http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats/default.htm>) for the evaluation of population parameters. In this way, data generated by the Genotyper software could be directly processed to obtain standard population statistics on the distribution of alleles within specific population subsets. Hardy-Weinberg equilibrium in the female control population was tested with the exact test based on the Monte Carlo method (15), implemented in the Arlequin 2.0 package (16). Expected heterozygosity and haplotype frequencies were also estimated using Arlequin 2.0 software to determine the existence of linkage disequilibrium between loci.

## Results

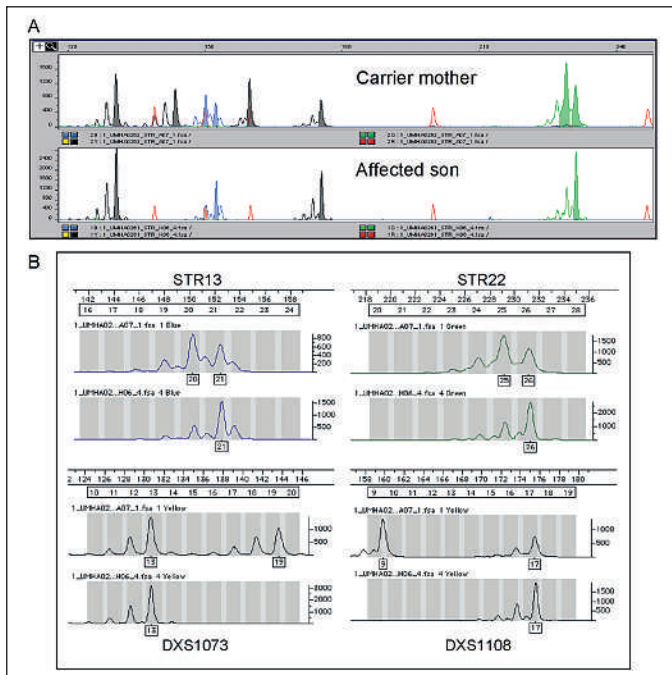
### Design and optimization of the multiplex PCR

Table I shows fragment sizes for each of the amplified STRs. Although amplicons from the different STRs could have proximal range sizes, the combination of 6-FAM, HEX and NED fluorochromes allowed simultaneous analysis of the four loci in a single run. Figure 1A shows an electropherogram obtained after Genescan analysis of a woman carrying a mutation in the FVIII gene and of her affected son. The woman showed informativity for the four STRs and the haplotype associated with the mutation was determined. A template for Genotyper software was developed to assign the different alleles for each locus, thereby simplifying data processing of the resulting haplotypes (Fig. 1B).

To confirm allele identity, five haplotyped male samples were selected and unlabelled PCRs were performed separately

**Table 1: STR primer sequences and amplicon sizes.**

STR Locus	Primer sequence	Fluorescent label	Size range (bp)	GeneBank accession #	Position
DXS1073	F-5'-ATGCCCTCTCCGAGTTATTAC-3'	NED	120–142	AF277315	81434 – 81454
	R-5'-GATTGGTGGCCTTTGAAACAC-3'	-			81564 – 81544
STR13	F-5'-GCATTCAACTGTACATAATGTATC-3'	6-FAM	148–158	AY769950	89743 – 89766
	R-5'-CCAAATTACAGATTGAATAAGCC-3'	-			89894 – 89872
DXS1108	F-5'-AGTGAATTCATCATATGTGATTTTC-3'	NED	163–177	BX323057	34702 – 34725
	R-5'-ACTAGGCGACTAATACAGTGG-3'	-			34866 – 34846
STR22	F-5'-ACACAGTCAGCTGTGAAAGAG-3'	HEX	227–233	AY769950	150199 – 150179
	R-5'-AACCCAGACATGTCAAGGTGTC-3'	-			149970 – 149991



**Figure 1: Capillary electrophoresis analysis.** A) Genescan electropherogram analysis of a woman carrying an FVIII gene mutation and her affected son. B) Results for the same samples after applying a specifically designed Genotyper template for simultaneous analysis of the four STRs showing allele identification for each polymorphism.

for each marker. Sequence analysis of these amplimers revealed that the number of dinucleotide repeats concurred with the alleles assigned with the specific Genotyper template. Moreover, comparison between the allelic frequency distribution found and the distribution reported in other populations reinforced correct allele assignment (11, 17).

**Statistical analysis and linkage studies between loci**

To validate the technique, multiplex STR analysis was applied in a control population of 41 unrelated females (82 chromosomes) and 47 unrelated healthy males plus 45 males with hemophilia. An exact test of sample differentiation based on haplotype frequencies (18) applied to the three groups indicated comparable allele frequency distribution ( $P < .05$ ).

Table 2 shows the allele frequencies and heterozygosity observed in the 41 unrelated females. Male genotypes were not included in the calculations because some of the statistical tests could not be applied to hemizygous data. Eight different alleles were found for DXS1073, six for STR13, six for DXS1108 and four for STR22. The degree of heterozygosity was 0.70 for DXS1073, 0.46 for STR13, 0.65 for DXS1108 and 0.46 for STR22. Genotype frequency distribution showed a good fit to the Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < .05$ ) for all four STRs, indicating Mendelian inheritance.

We determined the pattern of linkage disequilibrium among the STRs, which also determines the haplotype variability of the gene. The statistical analysis revealed significant linkage disequilibrium between STR13, STR22 and DXS1108, but not against the DXS1073 locus. However, the polymorphisms were

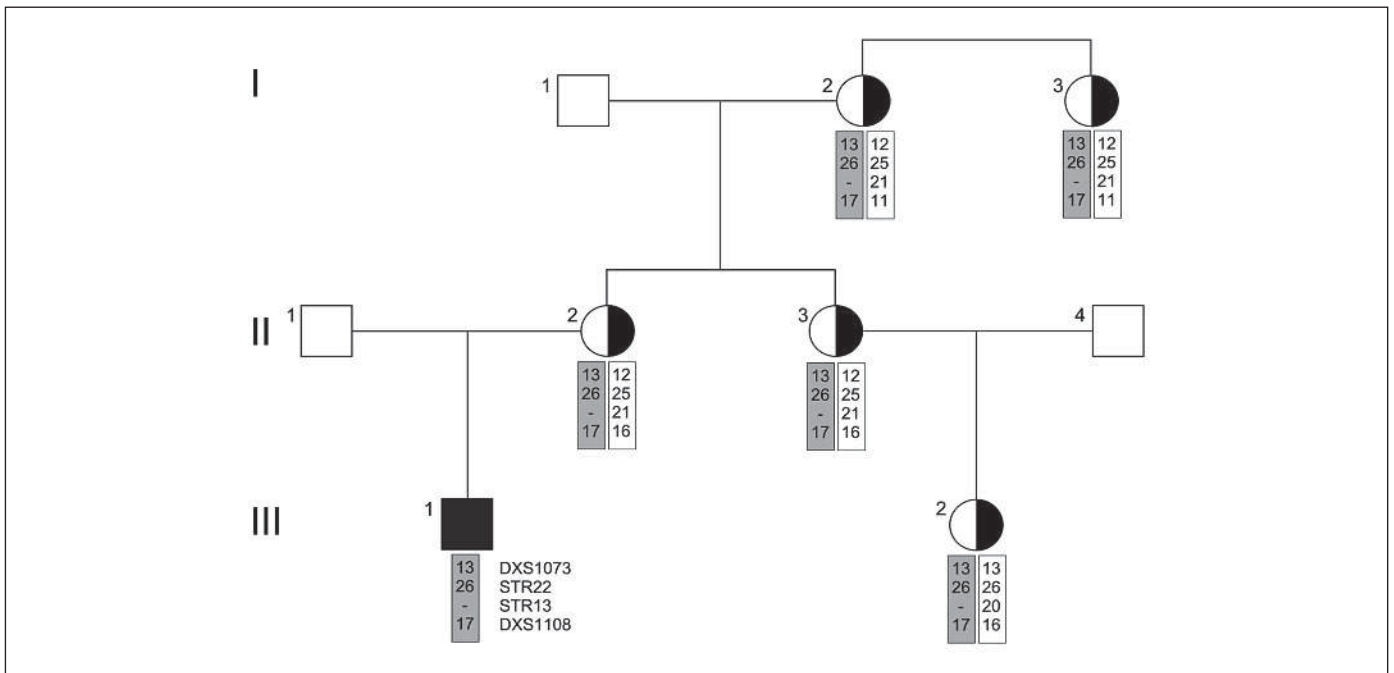
**Table 2: Allele frequencies and statistical data of the four STRs studied.**

Allele	DXS1073	STR13	DXS1108	STR22
8	1.2%			
9	-			
10	-			
11	7.3%		24.4%	
12	32.9%		-	
13	46.3%		1.2%	
14	1.2%		-	
15	2.4%		3.7%	
16	-		25.6%	
17	-		35.4%	
18	6.1%		9.8%	
19	2.4%	1.2%		
20		51.2%		
21		30.5%		
22		8.5%		
23		7.3%		
24		1.2%		7.3%
25				41.5%
26				50.0%
27				1.2%
	DXS1073	STR13	DXS1108	STR22
Power of discrimination	0.842	0.794	0.883	0.738
PIC	0.61	0.57	0.69	0.48
Frequencies				
Homozygotes	29.3%	53.7%	34.1%	53.7%
Heterozygotes	70.7%	46.3%	65.9%	46.3%
Total chromosomes	82	82	82	82
PIC: Polymorphism Information Content				

not in complete linkage disequilibrium; haplotype analysis in the 82 chromosomes from the control population predicted a high degree of informativity when using the three markers with significant linkage disequilibrium. A 63.41% of combined heterozygosity of the two commonly used intragenic markers (STR13 and STR22) was found. When the DXS1108 polymorphism was included, the informativity increased to 78.05%. Finally, the additional STR, DXS1073, revealed the highest heterozygosity rate by improving tracing of FVIII gene inheritance. Only four women were homozygous for all four loci (9.76%), indicating >90% combined heterozygosity.

**Studies of HA patients and relatives**

To confirm that these results were consistent with Mendelian inheritance, a total of 32 individuals from 10 HA-affected families were studied. Concordance was observed in all cases for the four markers from a total of 21 generation steps (four families with 1 transmission, 3 families with 2 transmissions, 1 family with 3 transmissions and 2 families with 4 transmissions). The causative mutation was identified in all cases and co-segregation with the haplotype was also demonstrated in eight informative families.



**Figure 2: Pedigree of a family taken as an example of linkage study.** The morbid allele was tracked and associated with haplotype 13/26-17 of patient III:1. Additional studies indicated that the STR13 polymorphism was not present in this patient; he was affected by a deletion involving all of exon 14 of the FVIII gene and part of intron 13 including STR13. All the females in the tree were identified as carriers of the deletion and showed the shared haplotype clearly linked to the mutation.

There was no amplification of STR13 in only one patient. The DNA was re-assayed, and again amplification was not successful at this locus. Further studies showed that he was affected by a deletion encompassing exon 14 of the FVIII gene and part of intron 13 including STR13. The pedigree of this family is presented in Figure 2.

## Discussion

Molecular diagnosis of HA by linkage analysis is still performed in many laboratories world wide due to the large size and complex genomic organization of the FVIII gene. Usually, two polymorphic STR markers and a number of SNPs detected by PCR-RFLP are used to carry out this task (1). However, each of these markers must be amplified and analyzed individually in agarose or polyacrylamide gels, a tedious and time-consuming task. Fluorescent PCR allows the automation and offers higher sensitivity for STR analysis (19). The goal of the present study was to develop and validate a rapid, sensitive and high-throughput technique for analyzing two intragenic (STR13 and STR22) and two extragenic (DXS1073 and DXS1108) STRs for FVIII gene tracking of the morbid allele in affected families. Although a duplex PCR combining STR13 and STR22 has been described (17), the primer sequences for amplifying STR13, originally described by Lalloz et al. (12) and commonly used to date (5), show differences with respect to the current release of the Human Genome sequence (GeneBank build 35.1). We obtained poor results with the primers described by Lalloz et al. (data not shown). However, the new primers designed according to the GeneBank sequence (accession number AY769950) resulted in strong, sharp signals

both in unlabeled and fluorescently labeled PCRs. In addition, the primers used by Lalloz et al. for STR22 were also modified since they were too close to be correctly analyzed by capillary electrophoresis. Therefore, it may be advisable for laboratories involved in HA linkage analysis to review their primers in order to improve the performance of the technique.

Besides the methodological description of our technique, we have included an in-depth statistical analysis of a control population that determines allele frequencies, individual loci frequencies, intra-locus equilibrium and linkage disequilibrium between loci. The allelic frequencies found in the intragenic markers STR13 and STR22 were similar to those described in previous reports (11, 12). Concerning the extragenic markers DXS1073 and DXS1108, allelic frequencies showed higher heterozygosity (70.7% and 65.9%) than that described for the extragenic marker DXS52, used in many FVIII gene tracking studies (6, 20). We found that the four polymorphisms are not in complete linkage disequilibrium; heterozygosity increases with any additional marker included. Combined heterozygosity in our population was >90%, the highest described to date for HA indirect diagnosis.

Two essential points should be taken into consideration in applying the procedure described in this work: the possibility of recombination between the markers and FVIII gene as well as the potential for STR instability. According to the data on the Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/>, May 2004 assembly) the averaged recombination rate in the region of the FVIII gene is about 0.8 cM/Mb being the expected recombination rates between DXS1073 or DXS1108 and the FVIII gene lower than 1% (on the basis of the known physical dis-

tances). Although there is no information on the stability of the STRs used in this study, intrinsic instability of dinucleotide repeats have been estimated of an average of  $1.94 \times 10^{-4}$  (21). Therefore, the linkage analysis procedure described here offers a high degree of diagnostic confidence and provides a satisfactory alternative or complements direct mutation detection as long as you are aware of the unwanted events discussed above.

In addition to the classical applications of indirect diagnosis, STR analysis can be an invaluable tool for certain promising diagnostic fields, such as PGD (8, 9). This is an excellent example of a novel application requiring a powerful HA linkage analysis tool in terms of speed and sensitivity, since analysis of single cells from oocytes or embryos is performed in a few hours (10). Linkage analysis confirms mutation detection and the origin and purity of the sample can be identified. Moreover, additional indirect diagnosis is highly recommended for detection of contamination and allelic drop-out (ADO), a phenomenon that affects single-cell PCRs in which only one of the two alleles is detected in a heterozygous cell (22). Finally, HA cases involving intron 22 gene inversion cannot as yet be detected from single

cells due to the intrinsic characteristics of the mutation. Thus, PGD can only be performed by identifying the mutant allele using polymorphic markers (9).

In summary, the automated multiplex fluorescent method presented here for FVIII gene tracking is extremely rapid, simple and highly informative. This advanced technique will facilitate genetic counseling and prenatal diagnosis. Sensitivity has been demonstrated, since it was successfully applied to single cells and is being used in our laboratory in combination with direct sequencing mutation detection as a tool for the PGD protocol (10). High-throughput instruments can be used to analyze a large number of samples (e.g., 96 genomic DNA samples can be amplified and analyzed in <4 hours with a 96-capillary instrument). We consider this a suitable strategy since it is easily standardized to obtain comparative results among different groups working in the field of HA molecular diagnosis.

### Acknowledgements

We are grateful to Mrs. Eva Campos for selecting the DNA samples used for the control population studies.

### References

- Goodeve AC. Advances in carrier detection in haemophilia. *Haemophilia* 1998; 4: 358–64.
- Goodeve AC. Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol* 1998; 20: 3–19.
- Vidal F, Farsac E, Altisent C et al. Rapid haemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: Identification of 14 novel mutations. *Thromb Haemost* 2001; 85: 580–3.
- Tagariello G, Belvini D, Salviato R et al. Experience of a single Italian center in genetic counseling for hemophilia: from linkage analysis to molecular diagnosis. *Haematologica* 2000; 85: 525–9.
- Kim JW, Park SY, Kim YM et al. Identification of new dinucleotide-repeat polymorphisms in factor VIII gene using fluorescent PCR. *Haemophilia* 2005; 11: 38–42.
- Chowdhury MR, Tiwari M, Kabra M et al. Prenatal diagnosis in hemophilia A using factor VIII gene polymorphism—Indian experience. *Ann Hematol* 2003; 82: 427–30.
- Ljung R, Tedgard U. Genetic counseling of hemophilia carriers. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 31–6.
- Tomi D, Griesinger G, Schultze-Mosgau A et al. Polar body diagnosis for hemophilia a using multiplex PCR for linked polymorphic markers. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 277–80.
- Gigarel N, Frydman N, Burlet P et al. Single cell co-amplification of polymorphic markers for the indirect preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A, X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked hydrocephalus and incontinentia pigmenti loci on Xq28. *Hum Genet* 2004; 114: 298–305.
- Gallardo D, Sánchez-García JF, Vidal F et al. A new procedure for preimplantation genetic diagnosis of hemophilias A and B based on direct mutation identification. In: *Haemophilia World Congress; 2004 October 01, 2004; Bangkok, Thailand; 2004. p. 1–4.*
- Lalloz MR, McVey JH, Pattinson JK et al. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991; 338: 207–11.
- Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH et al. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1994; 86: 804–9.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225–35.
- Ott J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 283–90.
- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361–72.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. In: 2.000 ed. Geneva: Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; 2000.
- Windsor S, Taylor SA, Lillcrap D. Multiplex analysis of two intragenic microsatellite repeat polymorphisms in the genetic diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 86: 810–5.
- Roussel F, Raymond M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 1995; 140: 1413–9.
- Kochhan L, Lalloz MR, Oldenburg J et al. Haemophilia A diagnosis by automated fluorescent DNA detection of ten factor VIII intron 13 dinucleotide repeat alleles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 497–501.
- Yang YH, Song KS, Kim IK et al. Rapid polymerase chain reaction analysis of St14 (DXS52) VNTR: carrier detection of hemophilia A. *J Obstet Gynaecol Res* 1997; 23: 399–406.
- Huang QY, Xu FH, Shen H et al. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 625–34.
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC 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: 411–20.





### **4.3. ARTICLE 3**

**A versatile strategy for preimplantation genetic diagnosis of haemophilia A based on F8-gene sequencing.**

Sánchez-García JF, Gallardo D, Navarro J, Márquez C, Gris JM, Sánchez MA, Altisent C, Vidal F.

*Thrombosis and Haemostasis*. 2006 Dec;96(6):839-45.

Objectius concrets 3, 5 i 6



## New Technologies, Diagnostic Tools and Drugs

# A versatile strategy for preimplantation genetic diagnosis of haemophilia A based on *F8*-gene sequencing

Jorge F. Sánchez-García<sup>1,2</sup>, Dominique Gallardo<sup>1</sup>, Joaquina Navarro<sup>2</sup>, Carmen Márquez<sup>3</sup>, Josep Maria Gris<sup>3</sup>, Maria Angeles Sánchez<sup>4</sup>, Carme Altisent<sup>5</sup>, Francisco Vidal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Unitat de Reproducció Assistida, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Unitat de Diagnòstic Prenatal, Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Unitat d'Hemofília, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

### Summary

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of hemophilia A (HA) and other X-linked diseases through sex selection implies that male embryos will be systematically discarded, even though 50% are unaffected. The objective of the present work was to develop a PGD protocol for direct mutation identification that could be applied to first polar bodies (IPBs) in several HA clinical cases. Single buccal cells from controls and patients, and IPBs were subjected to primer extension preamplification (PEP) PCR followed by amplification of *F8* gene coding and intronic flanking regions, and direct sequencing. Moreover, multiplex fluorescent amplification of four short tandem repeats was adapted to a single cell preamplification in order to rule out contamination and allele drop-out, and for confirmatory indirect diagnosis. A couple at risk of HA transmission, with a familial mutation characterized as a 41-bp duplication in exon 14 of the *F8* gene, was

selected for the first clinical study. After optimizing the protocol, the complete *F8* gene coding sequence was obtained from single cells to demonstrate the sensitivity of our methodology although in any clinical case only the relevant region, not the whole gene, must be amplified. The woman enrolled in the first clinical case has completed the first in-vitro fertilization cycle, and seven oocytes were analyzed with concordant results by both linkage analysis and direct sequencing method. Only one oocyte, among those diagnosed as mutation free, developed to embryo at day 3. It was transferred but pregnancy was not achieved. This PGD procedure enables non-affected and non-carrier embryo selection in families with any point or small-range mutation in the *F8* gene, without the need for further custom-made modifications.

### Keywords

ADO, STR, haemophilia

Thromb Haemost 2006; 96: 839–45

### Introduction

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is an emerging alternative to prenatal diagnosis for people at risk of transmitting an inherited disease to their offspring. Embryos obtained through in-vitro fertilization (IVF) are tested for the genetic anomaly concerning the couple prior to being placed in the womb of the mother; hence the risk of conceiving an affected child is highly reduced and the need to contemplate pregnancy termination is virtually avoided. Preimplantation genetic diagnosis can be carried out in blastomeres of cleavage stage embryos as well as in the first polar body (1PB) of fertilized oocytes. During meiosis I, homologous chromosomes undergo unequal division and a polar body is

generated, which contains a complete set of chromosomes complementary to the genotype of the oocyte in metaphase II. When the woman is the carrier of the genetic abnormality and analysis of 1PB reveals the mutation, we can infer that the oocyte is healthy and the subsequent embryo will be apt for transfer (1). 1PB biopsy does not affect fertilization rates of the oocytes or the percentage of embryos entering cleavage (2). In addition, it provides an invaluable extended time margin for the analysis before transfer of non-affected embryos classified as normal.

The first reported PGD protocol consisted of amplification of a repeat DNA sequence of the Y chromosome for embryo sexing to circumvent the transmission of X-linked diseases, including hemophilia (3). PGD of these X-linked recessive diseases is

#### Correspondence to:

Dr. Francisco Vidal  
Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Banc de Sang i Teixits  
Passeig Vall d'Hebron 119–129  
08035-Barcelona, Spain  
Tel.: +34 93 2746726, Fax: +34 93 2746727  
E-mail: fvidal@ir.vhebron.net

#### Financial support:

This study was supported in part with a grant (FIS, PI020809) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and in part by the Associació Catalana de l'Hemofília.

Received May 16, 2006

Accepted after resubmission October 2, 2006

Prepublished online November 7, 2006 doi:10.1160/TH06-05-069

now carried out principally by applying fluorescence in-situ hybridization (FISH) for positive selection of female embryos (4–6). According to this general approach, 100% of male embryos are systematically discarded, even though 50% are not affected. In addition, all the carrier female embryos are susceptible to be transferred.

Hemophilia A (HA), which is caused by mutations in the gene of clotting factor VIII, is the most common X-linked recessive bleeding disorder affecting males, and very rarely females. Accurate genetic counseling and prenatal diagnosis are easily performed once the genetic defect has been identified. Although sex selection using FISH or PCR is the usual procedure applied in PGD for HA, precise detection of the mutation would allow the selection of mutation-free embryos regardless of gender (7). In this direction, different strategies have been described in order to circumvent sex selection (8–11). Nevertheless, all these approaches are based on indirect diagnosis or require a specific protocol to be designed for each mutation (each family requires an individualized diagnosis). Moreover, the limitations of indirect diagnosis (12) restrict the use of this strategy as the only approach for PGD.

The aim of the present study was to develop a simple, efficient and universally applicable approach for PGD of HA, by means of a standard procedure for the detection of all point mutations, small range deletions or insertions, and mutations affecting splicing sites in single cells. We adapted to the single-cell detection level a previously described laboratory method for molecular diagnosis of HA mutations (13) based on PCR amplification and direct sequencing of all exons and intronic flanking regions of the *F8* gene. This was achieved with an improved PEP-PCR for whole genome amplification, providing sufficient DNA template for many independent PCR amplifications (14). In addition, application of the protocol was investigated in a clinical case.

## Materials and methods

### Patients and controls

The study was conducted according to written protocols approved by the Ethics Committees of the participating centers.

Blood samples from healthy unrelated individuals were obtained from the blood bank (Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain). Patients and relatives were of Spanish origin.

### DNA extraction from peripheral blood

Peripheral blood was collected into Vacutainer tubes containing ACD (acid citrate dextrose) or EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid). Genomic DNA was extracted by a standard salting-out procedure with minor modifications (15), visualized by electrophoresis in 1% agarose gel, and quantified by spectrophotometry.

### Cell isolation and lysis

Stringent precautions were taken against contamination during the entire process of isolation, lysis and DNA amplification (4, 16). Single buccal cells were obtained by mouthwashes and subsequent dilution in several droplets of sterile PBS with 0.1% polyvinyl alcohol (PVA). Cells were then checked by stereomicroscopy for the presence of a visible nucleus.

Mature oocytes remaining unfertilized after IVF, donated by assisted-reproduction centers, were available for analysis. The zona pellucida was digested with Tyrode's acid solution (pH 2.5) to study both the metaphase II oocyte and 1PB separately. Isolated cells were washed three times in PBS/0.1% PVA, transferred to 0.2-ml PCR tubes and covered with one drop of light mineral oil (Sigma). Proteinase K-SDS lysis was performed by adding 2  $\mu$ l of 125 mg/ml PCR-grade proteinase K (Roche Molecular Biochemicals) and 1  $\mu$ l of 17  $\mu$ M SDS (Sigma) to each tube. Incubation for 1 hour at 37° C was followed by 15 minutes (min) at 95° C for enzyme inactivation.

### Whole-genome amplification of single cells

Lysed cells were subjected to an improved PEP-PCR, as previously described (14). In brief, the reaction was performed in 40  $\mu$ l with 5 units of SuperTaq Plus polymerase (Ambion), 4  $\mu$ l of 10X Taq buffer, 3.3  $\mu$ l of a 400  $\mu$ M solution of totally degenerated 15-mer primers (17) and 1.6  $\mu$ l of 10 mM dNTPs (2.5 mM each). Initial denaturation was performed at 94° C for 7 min in a T gradient thermal cycler (Biometra GmbH) with an amplification program consisting of 50 cycles of 1 min at 94° C, 2 min at 31.5° C with a ramp of 0.1° C per second (sec), and 4 min at 55° C, and a final step at 68° C for 30 sec. Tubes were then cooled to 4° C and kept at –80° C, if required. Blank controls of the isolation and PCR reagents were included to rule out contamination.

### Specific PCRs for F8 gene amplification

All exons and intronic flanking regions of the *F8* gene were amplified by PCR in 29 reactions under identical thermocycling parameters as previously described by our group (13) with some modifications: 2  $\mu$ l of PEP-PCR product was amplified in a final volume of 25  $\mu$ l containing 75 mM KCl, 30 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs and 1 unit of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), and 250 ng of each primer (Table 1). The amplification program consisted of initial denaturation for 3 min at 94° C, followed by 40 cycles of 20 sec at 94° C, 30 sec at 54° C and 1 min at 72° C.

### PCR product purification and sequencing

After visualization on 1% agarose gel, 8  $\mu$ l of PCR product was incubated in the presence of 2  $\mu$ l of ExoSAP-IT (USB) for 30 min at 37° C to remove excess primer and dNTP, followed by 15 min at 80° C for enzyme inactivation.

The purified amplicons were sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Capillary electrophoresis was performed in an ABI PRISM 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and resulting sequences were aligned with the wild-type *F8* gene sequence (GenBank accession: NG\_005114) using SeqScape software (Applied Biosystems) for mismatch detection.

### Microsatellite analysis

A multiplex-multicolor fluorescent PCR recently described by our group (18) comprising two *F8* intragenic dinucleotide repeats (STR13 and STR22) and two closely linked STRs (DXS1073 and DXS1108), was applied with modifications starting with 2  $\mu$ l of PEP-PCR product. Primer concentrations were adjusted (3  $\mu$ M of DXS1108 primers, 1.7  $\mu$ M of STR13

**Table 1: Primers used to amplify the 26 exons and adjacent intronic regions of the F8 gene from single cells.**

Forward primer (5'-3')		Reverse primer (5'-3')		Amplified region	Product size (bp)
name	sequence	name	sequence		
* F8E1-1	AAT CCT ATC GGT TAC TGC TTA	F8E1-2	AGC ATC ACA ACC ATC CTA AC	Exon 1	429
F8E2-1B	GCC TCC TTG CTA ATA GTA GA	* F8E2-2B	GTA ACG CCA CCA TTA CAA AG	Exon 2	293
* F8E3-1B	CTG TGA CCT TGA CTC TAA CT	F8E3-2B	GTA ACG CCA CCA TTA CAA AG	Exon 3	290
F8E4-1	GTA CAG TGG ATA TAG AAA GGA C	F8E4-2B	GAT TCA GTT GTT TGT ACT TCT C	Exon 4	319
F8E5-1B	TAA CTG ATG AAG AACTGT CTC	F8E5-2B	CAT CTC CTT CAT TCCTGAAC	Exon 5	273
F8E6-1	TCC CAC TTA TTG TCA TGG AC	F8E6-2	TAC AGA ACT CTG GTG CTG AA	Exon 6	424
F8E7-1	GGC AAG AGC TGT TGG TTT G	F8E7-2	TGT CCA GTA AAT TTT ATT AAA AGT	Exon 7	459
F8E8-1	CCA TAT AGC CTG CAG AAC AT	* F8E8-2	CTG ATG CTC AGC TAT GTT AG	Exon 8	547
* F8E9-1	CTA ACA TAG CTG AGC ATC AG	F8E9-2	AGA TAT GTC CAT TGG AGA CAA	Exon 9	416
F8E10-1	CTA GCC TCA AAT TAC TAT AAT G	F8E10-2	ACT TTA GAC TGG AGC TTG AG	Exon 10	347
F8E11-1	TGC GAC TTT AGC TTC CAC TT	F8E11-2	ACT GAC CTA TAT TGC AAA CCA	Exon 11	445
F8E12-1	TGC CAT CGC TTT CAT CAT AG	F8E12-2	CAT CAT TAT CTG GAC ATC AC	Exon 12	320
F8E13-1C	TTC CTG GGA ATA AGA TAA TGG	F8E13-2C	AGC ATA CGA ATG GCT AGT GA	Exon 13	392
F8E14-1	ACA GGC ATA GTA CAA CAG CA	F8E14-2	CTT GGC TAT TCA TTA AAC CTG	Exon 14 a	1008
F8E14-3	TCC ATC AGA CAA TTT GGC AG	F8E14-4	CTA CAT TTT GCC TAG TGC TC	Exon 14 b	1043
F8E14-5	AGT AGG AAA GGG TGA ATT TAC	F8E14-6	AGG TCC TTC TGA TAA ATG TGA	Exon 14 c	1062
F8E14-7	AGC AGT CAT TTC TTA CAA GGA	F8E14-8	GTT GAT AGG TGA GGT TGA CT	Exon 14 d	1089
F8E15-1	AGA TGA AGT GGT TAA CTATGC	F8E15-2	GTG GGA ATA CAT TAT AGT CAG	Exon 15	349
F8E16-1	AGC ATC CAT CTT CTG TAC CA	* F8E16-2	TCA GTA GATTCC AGA ATG ACA	Exon 16	525
* F8E17-1	TGT CAT TCT GGA ATC TAC TGA	* F8E17-2	CAC TCC CAC AGA TAT ACT CT	Exon 17	491
* F8E18-1	AGA GTA TAT CTG TGG GAG TG	F8E18-2	CTT AAG AGC ATG GAG CTT GT	Exon 18	412
F8E19-1	GCA AGC ACT TTG CAT TTG AG	* F8E19-2	AGC AAC CATTCC AGA AAG GA	Exon 19	341
* F8E20-1	ACG TTG AGT ACA GTT CTT GG	F8E20-2	ACT AAT AGA AGC ATG GAG ATG	Exon 20	314
F8E21-1B	CAG CTT AGA TTA ACC TTT CTC	F8E21-2	GAG TGA ATG TGA TAC ATT TCC	Exon 21	217
F8E22-1B	TCA GGA GGT AGC ACA TAC AT	F8E22-2B	GTC CAA TAT CTG AAA TCT GC	Exon 22	286
F8E23-1	GTC TTA TGT AGA TGT TGG ATG	F8E23-2	AGT CTC AGG ATA ACT AGA ACA	Exon 23	349
F8E24-1	GCT CAG TAT AAC TGA GGCTG	* F8E24-2	CTC TGA GTC AGT TAA ACA GT	Exon 24	248
* F8E25-1	AGT GCT GTG GTA TGG TTA AG	F8E25-2	TTG CTC TGA AAA TTT GGT CAT A	Exon 25	371
F8E26-1	GGT TTA ATC CTG GAC TACTG	F8E26-2	GTG TCT GCT AGG ATT TAG CA	Exon 26	354

\*Primers not included in the strategy described in reference (13).

primers, 0.7 μM of STR22 primers and 0.5 μM of DXS1073 primers) and the number of PCR cycles was increased to 40. Capillary electrophoresis in the ABI PRISM 3100-*Avant* was followed by GeneScan and Genotyper analysis (Applied Biosystems) for allele identification. Twenty-five single buccal cells for each marker, selected from informative females, were amplified by PEP-PCR and then analyzed by multiplex fluorescent PCR in order to evaluate amplification and allele drop-out rates for each of the microsatellites.

### Mutation identification in the family enrolled in the clinical study

A family with a son who had severe HA was referred to our centre for PGD. Molecular diagnosis was performed on all family members according to our routine protocol (13), and the causative mutation was identified as a 41-bp tandem duplication in exon 14: 4113–4153dup CACACAGATAGACTACAAT-GAGAAGGAGAAAGGGGCCATTA.

This novel mutation was discovered in the couple's first son and was responsible for a de-novo case of severe HA. The mother was confirmed to be a carrier.

**PCR specially designed for the clinical study**

A specific PCR spanning the 41-bp insertion region was developed to detect the mutation and guarantee diagnosis in the family. Amplification was performed with the same thermocycling conditions described above, using a 6-FAM-labelled forward primer (Fdel1DGP: TCCCCTAGAAAGAAACAGAAC) and unlabelled reverse primer (Rdel1DGP: GTAATG-GAGATCTATTGCTTG); capillary electrophoresis was applied for fragment analysis.

**Ovarian stimulation, oocyte retrieval, fertilization and biopsy**

Patients were counseled, and written informed consent was obtained. The female carrier was superovulated using a GnRH (gonadotropin-releasing hormone)-analogue-suppression protocol (19). Vasopressin was given to avoid excess bleeding during the intervention. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval was performed 36 h after hCG administration. Intra-cytoplasmic sperm injection was used to fertilise the oocytes to prevent residual contamination with sperm, and 1PB biopsy was immediately performed. Each 1PB was washed three times in PBS/0.1% PVA and transferred to the 0.2-ml PCR tube. Oocytes were then incubated at 37°C until a diagnosis was obtained.

**Results**

**Protocol for F8 gene amplification from single cells**

An extensive technical optimization process allowed the amplification of the 26 exons and adjacent intronic regions of the F8 gene from single cells under identical thermocycling conditions using the primers described in Table 1. A schematic illustration of the procedure and a representative agarose gel image with the PCR products corresponding to the F8 gene coding regions obtained using a single 1PB as the source of genomic DNA are

shown in Figure 1. None of the blanks gave amplification (data not shown), indicating that contamination was not present.

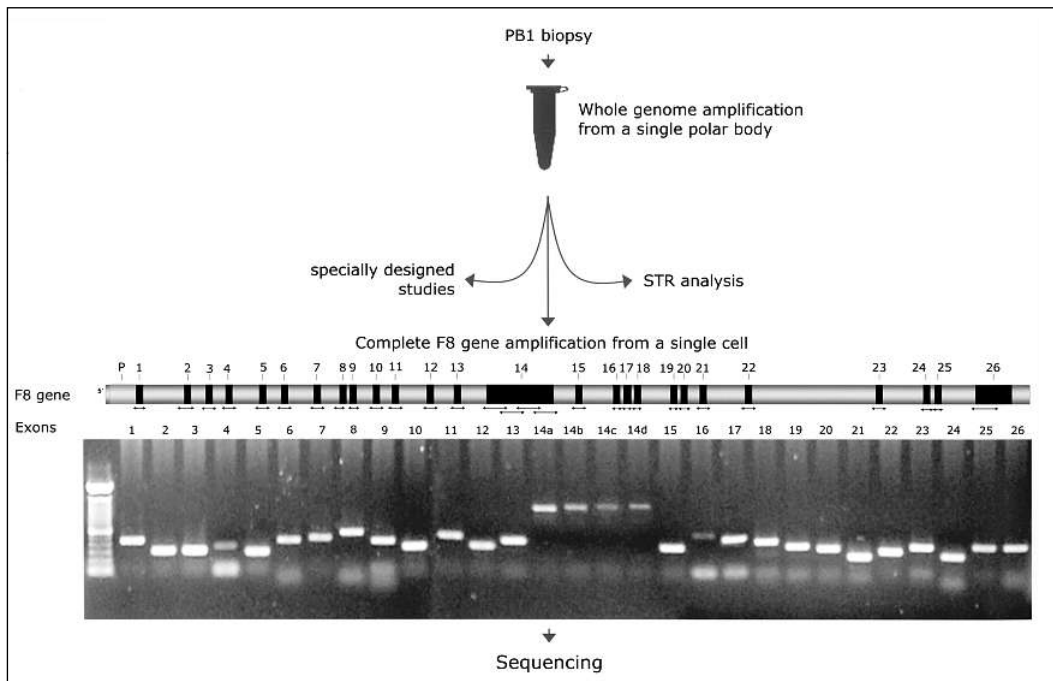
**Direct sequencing of F8 gene from single cells**

Twenty-five single buccal cells and five oocytes (1PB and MII separately) discarded from IVF cycles were used to evaluate the sensitivity of the protocol for DNA sequencing. Likewise, isolated buccal cells from the family members comprising the clinical case were subjected to the same procedure to detect the known mutation in single cells (Fig. 2A). All PCR products obtained were sequenced and aligned with wild-type sequences by the SeqScape software, which revealed complete concordance.

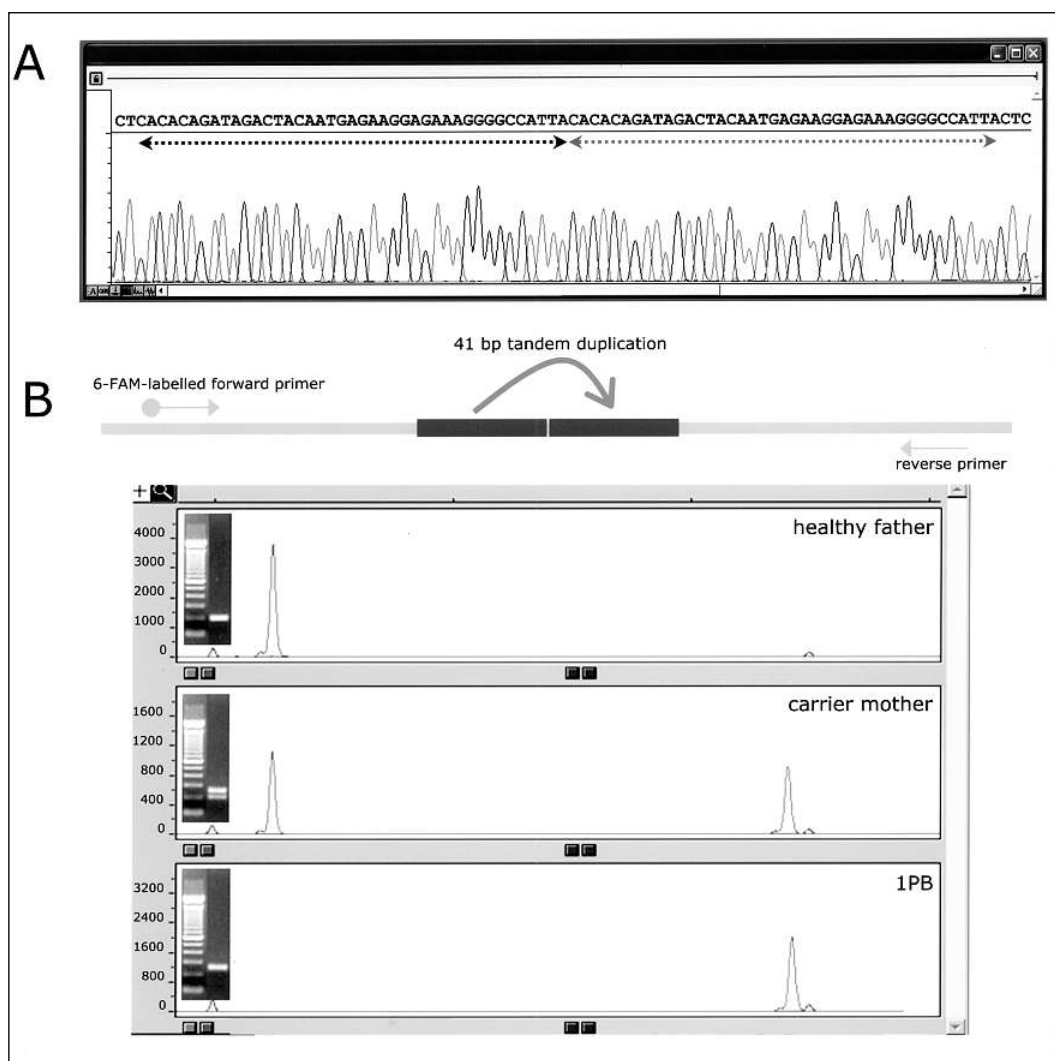
Prior to clinical application, the complete procedure was performed in a series of heterozygous buccal cells to calculate overall allele-drop-out (ADO) rates in our PEP-PCR plus sequencing strategy. The ADO rate was 13.04% (3 out of 23 heterozygous cells showed only one allele).

**Indirect diagnosis of HA from single cells**

We recently described a rapid, sensitive and high-throughput technique for analyzing two intragenic (STR13 and STR22) and two extragenic (DXS1073 and DXS1108) STRs for F8 gene tracking of the morbid allele in affected families (18). In order to apply this technique to single cells, optimization of the originally described protocol required modifications of some of the PCR parameters, such as cycle number and individual primer concentrations. The electropherogram obtained after GeneScan software analysis showed that signals achieved from preamplified DNA of single cells were nearly as high as those detected using genomic DNA from peripheral blood as template and that allele correspondence was complete. The amplification efficiency rates for the markers DXS1073, STR13, DXS1108 and STR22 (n=25 for each) were 76%, 72%, 88% and 92%, respectively, and their ADO rates were 15.8%, 16.7%, 27.3% and 21.7%, respectively.



**Figure 1: Schematic representation of PCR analysis of the complete F8 gene exons starting from a single biopsied IPB subjected to PEP-PCR.** However, in a clinical case only the relevant exon, not the whole gene, must be amplified since the mutation to be looked in a PGD is previously known. In addition, this preamplified product can be used as a template for multiple analyses in separate reactions, such as STR amplification or additional specially designed studies.



**Figure 2: Sequence analysis of the duplication and schematic representation of the specially designed fluorescent PCR, gel electrophoresis and fragment analysis.** A) Sequence analysis of the duplication affecting the clinical case family, showing the 41-bp tandem insertion. B) Schematic representation of the specially designed fluorescent PCR, and gel electrophoresis and fragment analysis of the healthy father, showing the normal 206 bp allele, the carrier mother showing both the 206 and 247 bp alleles, and the 1PB with the mutation showing the 247 bp fragment corresponding to an unaffected oocyte.

### Specific molecular studies for the clinical case

The female carrier was uninformative for all four STRs studied. Consequently, a custom-made fluorescent PCR was designed to validate the technique, to ensure diagnosis and to detect allele drop-out. Amplification of mutant and wild-type alleles produced bands that were easily distinguished by agarose gel electrophoresis (Fig. 2B). However, analysis by fluorescent capillary electrophoresis identified the exact sizes faster and with higher sensitivity: 206 bp and/or 247 bp, depending on whether or not the mutation was present. The PCR results in buccal-cell samples indicated good amplification and ADO rates (96% and 12.5%, respectively) and were concordant with those obtained by sequencing.

### Clinical study results

Nine mature oocytes showing 1PB were recovered from the patient. Two of the oocytes could not be analyzed: one 1PB was lysed during biopsy and another showed no results, possibly due to loss during transfer to the tube, poor lysis or amplification failure. Accurate diagnosis was achieved in the seven remaining 1PBs by direct sequencing of fragment 14c (Table 1), linkage analysis and fluorescent specific PCR with more than 90% successful amplification.

Two oocytes were free of the mutation, but only one developed to an embryo. It was transferred at day 3, but pregnancy was not achieved. Further analysis of the spare eight non-transferred embryos were concordant with the PGD results: three carrier and two non-carrier female embryos; two mutant and one normal male embryos. The three normal embryos were not transferred because of the reasons mentioned above (1PB lysis, no results or embryonic arrest).

### Discussion

Conventional gender determination in PGD by means of PCR or fluorescence in-situ hybridization (20) prevents the birth of affected children in X-linked diseases such as hemophilia. These techniques are not considered ideal by many couples, because half of the transferred female embryos are carriers and have a risk of transmitting the disease in the future. Still worse, male embryos are discarded, including the 50% that are normal, denying the couple the possibility of having male descendants. Direct sequencing and linkage analysis techniques circumvent these important limitations and allow healthy offspring regardless of the sex. However, diagnosis of monogenic diseases by PCR am-

plification from single cells is inherently difficult because of the limited amount of genomic DNA (about three picograms per haploid genome).

Single buccal cells were used for the initial optimization procedure and validation purposes because they are easy to obtain from selected carriers of gene mutations, although they are not totally equivalent to working with 1PBs or blastomeres. On the other hand, discarded embryos and oocytes from IVF cycles are limited in availability and have varying, often suboptimal, DNA quality; moreover, apoptosis can have started in them (21), which leads to poor amplification results. However, we found that the efficiency of amplification was very high for 1PBs and buccal cells for the STRs and DNA sequencing (see *Results*). The entire process of *F8* gene amplification and sequencing starting from a single polar body also demonstrated the sensitivity of the technique (to our knowledge this is the first report of a comparable technical achievement). Obviously, in a clinical case only the relevant region containing the mutation, not the whole gene, should be amplified. The ADO rate obtained (13.04%) is similar to previously reported data (22). Thus, PEP-PCR seems to be a sensitive and reliable technique, and artifacts were not observed. The entire process (lysis, PEP-PCR, PCR, sequencing, electrophoresis and analysis) takes about 30 hours and allows 1PB analysis for day-2 embryo transfer in the case of maternally-inherited single gene defects. Moreover, blastomere analysis should be also possible and embryo transfer could be carried out at the blastocyst stage (23).

We also present the application of our PGD protocol to a clinical study. Unfortunately, the woman was non-informative for any of the four STRs analyzed, invalidating the indirect diagnosis to detect ADO. This problem was circumvented with the design of a specific fluorescent PCR, a means for direct detection of the mutation. Nevertheless, the STR analysis remained valid to detect contamination. Our intention is to design specific studies for all the initial clinical cases (regardless of STR informativity) to provide additional confidence in the clinical application. The use of confirmatory analyses allows the diagnosis to be established when results are inconclusive, increasing the number of embryos suitable for transfer. In addition, a more advanced protocol should circumvent the potential risk of misdiagnosis due to simultaneous occurrence of recombination in the 1PB and preferential amplification by including the analysis of the 2PB or, alternatively, through direct blastomere analysis.

This is the first PGD protocol for HA described to date in which a broad range of *F8* gene mutations can be directly detected without extensive modifications of a standard protocol. The technique provides reliable detection of all point mutations, small-range deletions or insertions, and mutations affecting splicing sites in single cells. Severe HA families bearing the intron 22 inversion could be studied applying only the STRs, in which more than 90% informativity is expected (18). Other recently described PGD protocols based on mini-sequencing strategies (9, 22) require specific designs and optimization for each mutation tested. In contrast, the direct sequencing strategy presented here is applicable to 65% or 75% of couples (expected percentage of carriers of *F8* gene point mutations according to HAMSTeRS database <http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm>) and could be appropriate for other genes. In fact, the same scheme presented here for the *F8* gene was applied to the *F9* gene, responsible for hemophilia B, with successful results (data not shown).

This study represents a synergistic combination of previously developed methodologies that, after a careful optimization work to combine them jointly, become a valuable tool for PGD in a large number of couples carrying HA. One of the main problems that face the molecular diagnostic laboratories enrolled in PGD is the lengthy set-up of the technique necessary prior the clinical application, since it is custom-made for every different mutation in each family requesting PGD. From this point of view, the procedure presented is a versatile approach since this tedious task is not required as long as the characterized mutation is located in any coding or flanking intronic region. In conclusion, this is an extremely convenient and simple strategy with the highest mutation coverage described to date for PGD of HA. Inclusion of pre-designed direct sequencing as well as fluorescent STR analysis for additional indirect diagnosis and detection of contamination and ADO makes it a comprehensive approach for HA-affected families seeking unaffected and non-carrier offspring.

### Acknowledgements

The authors wish to thank Drs. Cristina Gutiérrez, Jordi Benet and Lluís Puig for their valuable contribution to this work.

### References

1. Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation polar body diagnosis. *Biochem Mol Med* 1996; 58: 13–7.
2. Verlinsky Y, Kuliev A. Micromanipulation of gametes and embryos in preimplantation genetic diagnosis and assisted fertilization. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1992; 4: 720–5.
3. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, et al. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; 1: 347–9.
4. Thornhill AR, Snow K. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J Mol Diagn* 2002; 4: 11–29.
5. Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 11–20.
6. Staessen C, Van Assche E, Joris H, et al. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 382–9.
7. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 2005; 20: 35–48.
8. Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, et al. Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6181–5.
9. Fiorentino F, Magli MC, Podini D, et al. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 399–410.
10. Tomi D, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, et al. Polar body diagnosis for hemophilia A using multiplex PCR for linked polymorphic markers. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 277–80.
11. Michaelides K, Tuddenham EG, Turner C, et al. Live birth following the first mutation specific preimplantation genetic diagnosis for haemophilia A. *Thromb Haemost* 2006; 95: 373–9.
12. Kaufman RJ. Advances toward gene therapy for hemophilia at the millennium. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2091–107.
13. Vidal F, Farssac E, Altisent C, et al. Rapid Hemophilia A Molecular Diagnosis by a Simple DNA Se-



quencing Procedure: Identification of 14 Novel Mutations. *Thromb Haemost* 2001; 85: 580–3.

- 14.** Sanchez-Garcia JF, Benet J, Gutierrez-Mateo C, et al. Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 463–8.
- 15.** Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225–35.
- 16.** Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1389–401.
- 17.** Zhang L, Cui X, Schmitt K, et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5847–51.
- 18.** Sanchez-Garcia JF, Gallardo D, Ramirez L, et al. Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid Hemophilia A molecular diagnosis. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1099–103.
- 19.** Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002; 78: 1025–9.
- 20.** Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004; 363: 1633–41.
- 21.** Gitlin SA, Gibbons WE, Gosden RG. Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 403–9.
- 22.** Bermudez MG, Piyamongkol W, Tomaz S, et al. Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2003; 23: 669–77.
- 23.** Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, et al. Moving towards blastocyst biopsy: trophectoderm biopsy for PGD of beta-thalassaemia. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 23.





## **DISCUSSIÓ**



## 5. DISCUSSIÓ

Les parelles portadores d'una malaltia hereditària tenen diverses opcions per tal de disminuir el risc de tenir descendència afectada: el DGP, el diagnòstic prenatal, la utilització de gàmetes o embrions de donants, o abstenir-se de tenir fills i adoptar. En el diagnòstic prenatal, després de detectar un fetus afectat, els progenitors tenen tan sols dues alternatives: continuar amb l'embaràs o fer un avortament terapèutic. En canvi, l'objectiu principal del DGP és detectar malalties genètiques i anomalies cromosòmiques abans de la implantació de l'embrió (Sermon 2002), transferir embrions no afectats i evitar així avortaments, intervencions futures i patiment. Cal tenir en compte la minvada qualitat de vida de les persones afectades per aquestes malalties i les dificultats que es poden trobar en el tractament. Per exemple, en el cas de l'hemofília alguns malalts desenvolupen inhibidors a conseqüència de la resposta immunitària enfront dels factors de coagulació administrats, la qual cosa redueix l'eficàcia del tractament (Bolton-Maggs i Pasi 2003; Goodeve 2003; Chuah i Vandendriessche 2007). En el cas de pacients de FQ, tot i els avenços dels tractaments en les últimes dècades, l'esperança de vida actual només ha augmentat fins a uns 37 anys de mitjana (Foundation 2008). A més a més, el fet que uns pares tinguin uns símptomes moderats de certa malaltia no implica que la seva descendència no pugui estar greument afectada per aquesta malaltia, ja que la severitat del fenotip sovint no es pot predir d'una generació a l'altra.

El DGP representa la unió dels camps de l'embriologia (tècniques de reproducció assistida) amb el diagnòstic genètic (tècniques moleculars). Les estratègies diagnòstiques utilitzades en DGP tenen una sèrie de característiques específiques: són molt ràpides (en un màxim de 36 hores és necessari donar els resultats), són extremadament sensibles (s'analitza una única cèl·lula) i tenen una elevada fiabilitat (93-99%) (Colls *et al.* 2007; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008). Els laboratoris de fecundació *in vitro* (FIV) i de diagnòstic molecular poden estar físicament separats (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008) i per tant no es requereix d'un equipament dedicat als centres de reproducció assistida ni d'una especialització del personal d'aquests. Això facilita l'accessibilitat de la tècnica de DGP arreu del món.

A diferència del diagnòstic prenatal, per a dur a terme el DGP és necessari sotmetre a la parella a un cicle de FIV mitjançant microinjecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), encara que no presentin problemes reproductius. Molt sovint es comenta l'elevat cost de les tècniques de FIV, al qual a més s'ha de sumar el cost del DGP. El cost real,

però, es molt inferior al preu de les teràpies de moltes malalties genètiques (medicaments, intervencions quirúrgiques, hospitalitzacions, fisioteràpia, etc). Per exemple, el cost anual del tractament profilàctic d'un hemofílic amb factors recombinants és d'uns 100.000 euros i arriba a fins uns 200.000 euros anuals en el cas dels hemofílics greus que desenvolupen inhibidors (dades estimades de l'Hospital de la Vall d'Hebron). Lògicament, s'ha de fomentar la recerca en totes les alternatives possibles, des de les que permeten la curació de les malalties ja sigui mitjançant aproximacions terapèutiques clàssiques o per teràpia gènica, fins a les que permeten la prevenció de la transmissió de malalties genètiques en famílies de risc.

El DGP de malalties monogèniques ha esdevingut una eina molt valuosa per a la consecució de descendència sana en parelles portadores d'una malaltia hereditària. Moltes parelles coneixen el seu estat de portadors abans del primer fill (per antecedents familiars) o després del naixement d'un fill afectat. Un cop coneixen les opcions que tenen, les motivacions d'aquestes parelles per a sotmetre's al DGP són bàsicament dues: algunes parelles rebutgen l'avortament ja sigui per raons religioses o morals, o perquè ja s'hi han hagut de sotmetre anteriorment; d'altres volen disminuir el risc de concebre descendència afectada (Kuliev i Verlinsky 2008). Fins a l'actualitat el DGP de malalties monogèniques s'ha aplicat amb èxit en més de 170 malalties genètiques diferents (PGDIS 2008).

Aquest treball s'ha centrat en el desenvolupament d'estratègies per al DGP de fibrosi quística i hemofília pel fet de ser dues malalties de gran importància clínica i social tant per la seva incidència com per l'interès de diversos grups de suport i per estar entre les malalties monogèniques analitzades amb més freqüència.

## **5.1. ESTRATÈGIES DIAGNÒSTIQUES**

Una de les grans dificultats del DGP de malalties monogèniques és que els protocols utilitzats per diagnòstic rutinari a partir de DNA de sang perifèrica no són prou sensibles per a garantir un diagnòstic a partir d'una sola cèl·lula. A més a més, els protocols necessaris per al DGP de malalties monogèniques acostumen a ser específics de cada pacient (Kuliev i Verlinsky 2008). Dit d'una altra manera, la majoria de protocols utilitzats per al DGP s'han de desenvolupar específicament per a la parella que s'estudia (atès que els progenitors poden tenir mutacions diferents i també són informatius per diferents marcadors polimòrfics) i s'han d'optimitzar exhaustivament per a poder ser utilitzats en

cèl·lules aïllades amb un elevat grau de fiabilitat. Aquests protocols tan sensibles i específics de pacients són molt costosos i llargs de desenvolupar, bàsicament a causa de la seva complexitat (representada a la Taula 12). Tot això fa que el temps d'espera dels pacients sigui de fins a sis o més mesos (Fiorentino *et al.* 2004; Moutou *et al.* 2004a; Moutou *et al.* 2004b).

	Passos en la preparació d'un cas de malaltia monogènica	Problemes que poden sorgir (i endarrerir la preparació)
1-	Rebre les mostres dels pacients i familiars (Sang perifèrica o cèl·lules bucals)	Rebuda de tubs incorrectes (heparina) / No recepció de mostres de tots els familiars sol·licitats.
2-	Extreure'n el DNA	
3-	Localitzar la seqüència i la mutació en les bases de dades	La mutació no està ben descrita i no es pot localitzar
4-	Dissenyar els encebadors específics per a amplificar la mutació	La seqüència de DNA al voltant de la mutació pot dificultar el disseny d'encebadors adequats (per ex. regió rica en GC)
5-	Trobar marcadors lligats propers al gen	Pot ser que no hi hagi marcadors propers al gen // Els marcadors trobats poden no tenir un percentatge elevat d'informativitat en la població
6-	Dissenyar els encebadors per a amplificar els marcadors	La seqüència de DNA de la regió al voltant del STR pot dificultar el disseny d'encebadors adequats (p.e. regió rica en GC, seqüència ALU, etc)
7-	Fer la comanda dels encebadors	
8-	Preparació aturada en espera dels encebadors	El temps d'espera mitjà per a encebadors marcats és de 10-14 dies però de vegades hi poden haver retards i problemes en la síntesi.
9-	Confirmar que els encebadors identifiquen la mutació correctament	Els encebadors no caracteritzen la mutació. Cal tornar als passos 3 i 4
10-	Testar els marcadors lligats en totes les mostres per tal de trobar marcadors informatius (marcador informatiu = la parella presenta al menys 3 al·lels diferents suficientment separats)	No es troben marcadors informatius – cal tornar al pas 5 // Malgrat ser informatius, no es pot determinar la fase – sol·licitar mostres d'altres familiars per determinar la fase: tornar al pas 1
11-	Posada a punt de la PCR <i>multiplex</i> per a amplificar simultàniament en DNA la mutació(ns) i els marcadors informatius	Poden haver-hi interaccions entre encebadors que impedeixen el funcionament de la <i>multiplex</i> . Tornar las pasos 4 o 6 i redissenyar alguns encebadors. Alternativament, replantejar l'estratègia diagnòstica (per ex. eliminar un marcador, substituir-lo per un altre, fer només anàlisi indirecta) // Solapament dels al·lels dels marcadors emprats. Tornar al pas 6 i redissenyar alguns encebadors que evitin el solapament
12-	Testar la PCR <i>multiplex</i> en dil·lució de DNA (quantitat de DNA similar a la d'una cèl·lula aïllada)	Poden haver-hi interaccions entre encebadors que impedeixen el funcionament de la <i>multiplex</i> . Tornar las passos 4 o 6 i redissenyar alguns encebadors. Alternativament, replantejar l'estratègia diagnòstica (per ex. eliminar un marcador, substituir-lo per un altre, fer només anàlisi indirecte).
13-	Testar la PCR <i>multiplex</i> en cèl·lules aïllades d'individus control. Optimitzar el protocol (determinar el nombre de cicles d'amplificació necessaris, provar diferents Taq polimerases, provar diferents quantitats d'encebadors per a obtenir una amplificació equilibrada dels marcadors i la mutació)	La PCR <i>multiplex</i> funciona en DNA i dil·lució però no funciona en cèl·lules aïllades – cal intentar optimitzar el protocol
14-	Sol·licitar cèl·lules bucals dels pacients (portadores de les mutacions) Enviar <i>kits</i> per a recollir cèl·lules bucals.	Els <i>kits</i> es poden perdre // Els pacients triguen a donar l'adreça, o a retornar les mostres de cèl·lules bucals.
15-	Aïllament de cèl·lules bucals dels pacients	Cèl·lules de baixa qualitat : impossibles d'aïllar – tornar al pas 14 i demanar més cèl·lules
16-	Validar el protocol optimitzat testant cèl·lules dels pacients, calcular les eficiències d'amplificació, ADO i taxa d'error del protocol	Les cèl·lules mostren baixa amplificació o elevada taxa d'ADO i mostren resultats inacceptables – cal tornar al pas 14 i demanar més cèl·lules. Alternativament, revisar l'estratègia i tornar al pas 11
17-	Revisar la preparació meticulosament i escriure un informe.	
18-	Enviar l'informe al centre de FIV i als pacients	

Taula 12. Esquema de la complexitat de la posada a punt d'un protocol per al DGP d'una malaltia monogènica.

Vist això, és obvi que un dels objectius principals dels centres que realitzent DGP és l'aplicació de protocols simples i eficients que permetin la detecció de forma segura, d'un ventall ampli de mutacions en malalties genètiques relativament freqüents en la població (Renwick *et al.* 2006; Lledo *et al.* 2007). Per aquest motiu, en aquest treball s'ha plantejat

el disseny de protocols de DGP genèrics per a la detecció de múltiples mutacions de FQ i d'hemofilies. Els procediments metodològics desenvolupats, útils per a un nombre elevat de famílies i que tenen una posada a punt simplificada, han de facilitar l'aplicabilitat clínica dels DGPs corresponents.

Pel desenvolupament d'aquests protocols versàtils s'han utilitzat dues aproximacions diferents. En el cas de la FQ, atès que el gen *CFTR* té una mutació molt freqüent ( $\Delta F508$ ) i també altres mutacions que es presenten amb una elevada incidència, s'ha proposat aplicar una tècnica per a la detecció de les 31 mutacions més freqüents mitjançant la utilització d'un kit comercial. En el cas de HA i HB, hi ha una gran diversitat de mutacions i la majoria d'elles es localitzen disperses al llarg de tots els exons. Per això l'estratègia proposada per al DGP d'hemofilies és la detecció de totes aquestes mutacions mitjançant seqüenciació.

Amb aquest plantejament, s'ha desenvolupat amb èxit un protocol genèric per a la detecció de mutacions de FQ que es pot aplicar a fins a un 60-80% de les parelles portadores a tot el món (Taula 13), resultat proper al 87% descrit per Dreesen i col·laboradors a la població holandesa amb la seva estratègia de microsatèl·lits extragènics (Dreesen *et al.* 2000) però amb els avantatges d'un diagnòstic directe. En el cas de l'hemofília, s'ha desenvolupat un protocol de seqüenciació que permet detectar fins al 75% de les mutacions actualment descrites per a l'HA i gairebé la totalitat de les mutacions per a l'HB (Kemball-Cook *et al.* 1998; Green 2004).

	Total de cromosomes FO analitzats	G85E	R117H	621+1G>T	711+1G>T	1078delT	R334W	R347P	A455E	$\Delta I507$	$\Delta F508$	1717-1G>T	G542X	S549N	G551D	R553X	R560T	1898+1G>A	2184delA	2789+5G>A	R1162X	3659delC	3849 + 10kbC>T	W1282X	N1303K	Proporció de mutacions detectades (%)
Nord d'Europa	21,154	30	62	97	15	53	18	55	35	57	14,87	160	439	18	356	165	40	41	14	27	36	39	23	120	209	80.2
Sud d'Europa	7,281	14	3	37	13	2	21	24	0	5	4,007	65	259	2	37	44	0	10	7	10	68	1	8	43	179	66.7
Nord Amèrica	10,438	16	61	154	21	1	12	26	27	20	6,9	44	234	5	206	96	24	2	8	17	19	14	57	245	130	79.9
Sud i centre Amèrica	758									2	342		38	1	1	5									11	52.8
Australasia	2,095		7	27		1	2	1		9	2,309	12	56	3	117	11	3							6	23	83.7
Àsia (principalment Orient Mitjà)	608	7	0							0	173	3	27	0	0	0	0						16	120	29	61.7
Àfrica	515										351		9	1		1								2	8	72.2
Freqüència relativa (%)		0.2	0.3	0.7	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	66.0	0.6	2.4	0.1	1.6	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.2	1.2	1.3	

Taula 13: Distribució per continent de les mutacions més freqüents de FQ. La informació es basa en la Taula 2 i té una finalitat comparativa. Atès que no tots els centres han analitzat totes 24 mutacions, la freqüència relativa real d'algunes pot ser lleugerament més gran. Pot haver-hi també un petit nombre de mostres superposades, les quals s'han considerat més d'una vegada. Adaptat de <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/resource/old/rptTable2.html>.



A més a més, per als casos en què cal detectar mutacions no cobertes per les aproximacions anteriors, s'ha desenvolupat un protocol per a l'anàlisi simultània de quatre STRs lligats a cada malaltia que permet fer un diagnòstic indirecte. En aquesta aproximació s'ha optat per combinar dos marcadors intragènics, que són els més fiables atès que la probabilitat de recombinació entre aquests i el lloc de la mutació responsable és menor, i dos marcadors extragènics, un a cada banda del gen. Els marcadors seleccionats són altament polimòrfics; gràcies a aquest fet s'aconsegueix un elevat grau de informativitat quan aquests són combinats en una PCR *multiplex* (97,73% i 90,24% per FQ i HA, respectivament). Això es tradueix que com a mínim un 90% dels individus són informatius per almenys un dels quatre marcadors (Sanchez-Garcia et al. 2005b). Aquesta estratègia permet la detecció indirecta de mutacions menys comunes del gen *CFTR* (no incloses en el kit comercial) o la inversió de l'intró 22 del gen *F8* en el cas d'HA.

La combinació de la tècnica de detecció directa de les mutacions junt amb l'anàlisi de quatre marcadors lligats esdevenen una estratègia versàtil pel DGP d'ambdues malalties que dota al procediment de robustesa.

## 5.2. ASPECTES TÈCNICS

### 5.2.1. Consideracions tècniques: WGA

Com ja s'ha dit prèviament, és molt costós i laboriós desenvolupar un protocol específic per cada parella sotmesa a un cicle de DGP, que compregui la detecció simultània, en una sola cèl·lula, de la mutació i de diversos marcadors lligats en format *multiplex*. La dificultat de l'optimització augmenta per cada parella d'encebadors que s'afegeix a la reacció ateses les interaccions que es produeixen entre els diferents oligonucleòtids. La incompatibilitat entre les parelles d'encebadors emprades per a amplificar els diferents marcadors o mutacions pot aparèixer per l'existència de diferents condicions òptimes de reacció o per l'aparició de productes inespecífics artefactuals. A més a més, el rendiment de l'amplificació disminueix si es formen dímers d'encebadors. Desenvolupar una reacció *multiplex* directament en cèl·lules aïllades resulta molt més difícil que fer-ho en DNA genòmic o en productes de WGA. Per exemple, quan la PCR *multiplex* optimitzada pels STRs d'HA s'aplica directament en cèl·lules aïllades (no preamplificades amb I-PEP-PCR) els marcadors de mida més gran (DXS1108 i STR22) pateixen fallades d'amplificació per sobre del 70% (dades no mostrades).

Amb la finalitat d'augmentar la quantitat de DNA amb el qual es pogués fer el diagnòstic i evitar la posada a punt de protocols en format *multiplex*, el disseny de protocols de DGP genèrics s'ha basat en la utilització d'un mètode d'amplificació total del genoma (WGA). Les tècniques de WGA permeten la utilització de tècniques rutinàries de diagnòstic molecular en cèl·lules aïllades sense necessitat de complexes optimitzacions. Per aquesta raó les tècniques de WGA també poden utilitzar-se en casos de DGP per a dues malalties (o dues indicacions diferents) simultàniament (Fiorentino et al. 2004; Rechitsky et al. 2006; Altarescu et al. 2007; Obradors et al. 2008; Obradors et al. 2009).

Les tècniques de WGA tenen altres avantatges respecte dels protocols de PCR *multiplex*, com per ara la possibilitat de confirmar el diagnòstic o l'amplificació a posteriori d'altres *loci* no considerats inicialment. Això és degut al volum de mostra i la concentració de DNA aconseguits a partir d'una única cèl·lula preamplificada. Dit d'una altra manera, el DNA amplificat d'una cèl·lula no pot sotmetre's a cap estudi addicional si no és que s'ha aplicat la WGA (Wells i Sherlock 1998; Thornhill i Snow 2002).

En un primer moment, durant l'etapa de posada a punt de la tècnica, es van provar diverses tècniques de WGA: la tècnica d'MDA (utilitzant el kit GenomiPhi, GE Healthcare), la DOP-PCR i la I-PEP-PCR. Tant amb la MDA com amb la DOP-PCR s'aconsegueixen grans quantitats de DNA a partir d'una sola cèl·lula. Tanmateix, els resultats obtinguts amb totes dues tècniques no han estat satisfactoris, ja que es generen artefactes i productes inespecífics que dificultaven la interpretació dels resultats. L'amplificació obtinguda mitjançant la I-PEP-PCR és més reduïda en comparació amb la MDA o la DOP-PCR ja que segueix una cinètica més o menys lineal. Les seqüències originals només s'amplifiquen de l'ordre d'unes 30 vegades (Wells i Sherlock 1998) i, tot i que es duquin a terme 50 cicles d'amplificació, només s'aconsegueixen unes 1.000 còpies del genoma (Paunio *et al.* 1996). Això no obstant, el mateix estudi també demostra que la I-PEP-PCR presenta un cobriment millor del genoma que la DOP-PCR (Wells i Sherlock 1998), fet determinant per a seleccionar aquest mètode de WGA per a la detecció de malalties monogèniques. A diferència dels treballs que utilitzen MDA com a tècnica de WGA (Hellani *et al.* 2005; Lledo *et al.* 2006; Renwick *et al.* 2006), el mètode d'I-PEP-PCR no és comercialitzat en forma de *kit* i, per tant, a part de ser força més econòmic, permet optimitzacions en el nombre de cicles aplicats, el programa de PCR i el tipus de DNA polimerasa a utilitzar. Tot això amb la finalitat d'aconseguir millores en la quantitat de DNA genòmic obtingut amb un màxim de integritat.

En els treballs presentats en aquesta memòria (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a; Sanchez-Garcia *et al.* 2006) s'ha evidenciat que la I-PEP-PCR permet utilitzar les tècniques rutinàries de biologia molecular directament en cèl·lules aïllades. Per exemple, la quantitat de DNA preamplificat obtinguda d'una sola cèl·lula és adequada per a permetre aplicar tècniques moleculars per a la detecció directa de fins a 31 mutacions diferents en casos de FQ. Pel que fa a la Hemofília, els productes de WGA obtinguts permeten l'amplificació i la seqüenciació de qualsevol exó o regió flanquejant així com del promotor tant del gen *F8* com del gen *F9*. Això permet poder identificar qualsevol substitució o petita inserció o deleció d'aquests gens. A més a més, a partir de la mateixa mostra preamplificada amb I-PEP-PCR es pot fer una PCR *multiplex* fluorescent per a l'anàlisi dels quatre marcadors STR (Sanchez-Garcia *et al.* 2005b) que proporcionen una anàlisi indirecta addicional (per a corroborar el diagnòstic directe de la mutació i detecció d'ADO) o una anàlisi de lligament per a mutacions que no són detectades mitjançant mètodes directes. L'anàlisi de microsatèl·lits, finalment, també permet detectar la possible contaminació de la mostra durant el processament d'aquesta en l'aplicació clínica del DGP.

La I-PEP-PCR és un mètode fiable de pre-amplificació perquè el genotip esperat és determinat correctament en cèl·lules aïllades sense introduir mutacions artefactuals amb cap de les polimerases emprades (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a). El volum de mostra i la concentració de DNA aconseguits a partir d'una cèl·lula única preamplificada permet la confirmació del diagnòstic i la reanàlisi de les mostres, a diferència del procediment mitjançant PCRs convencionals utilitzant DNA de cèl·lules aïllades.

S'ha demostrat que la correcta selecció de la Taq polimerasa té un efecte beneficiós tant en l'eficiència d'amplificació com en una disminució de l'ADO, tal i com indiquen altres autors (Piyamongkol *et al.* 2003). La Taq polimerasa seleccionada per a aquest estudi, a diferència de les utilitzades en PCR convencional, té certes característiques especials, com ara l'activitat correctora que evita introduir mutacions i per tant, també fa còpies fidels dels STRs. A més a més, té la capacitat de produir fragments prou llargs a partir d'una sola cèl·lula, el quals permeten amplifícacions posteriors de fins a 1 kb (per exemple, per a amplificar fragments de l'exó del 14 del gen *F8*) i finalment, manté l'activitat després de 50 cicles amb incubacions molt llargues a elevades temperatures (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a).

Inicialment, el protocol d'amplificació total del genoma s'ha posat a punt amb la polimerasa *SuperTaq polymerase* (HT Biotechnology) però amb aquest enzim els

productes de l'amplificació rarament superen les 2 Kb de longitud. Una gran millora en el protocol s'ha aconseguit emprant l'enzim *SuperTaq Plus*, que té activitat correctora (*proof reading*) i que per tant, permet obtenir productes de PCR molt més llargs, de fins a 20 Kb (segons les especificacions del fabricant). La temperatura òptima de polimerització d'aquest enzim és de 68°C i per tant el pas d'extensió de la I-PEP-PCR s'ha modificat en aquest aspecte respecte la PEP-PCR original (Zhang *et al.* 1992).

El canvi de la Taq polimerasa també ha suposat una millora en altres aspectes: 1) s'ha detectat un 10% més d'al·lels del gen *CFTR* (80% amb la Taq A o *SuperTaq polymerase* i 90% amb la Taq B o *SuperTaq Plus*) i 2) la detecció de pics alts s'ha millorat un 25% (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a). Els pics inclosos en la categoria alta (>250 RFU) han mostrat un valor de mediana del 15% de pics alts amb la Taq A, mentre que en el cas de la Taq B és del 40%. Les diferències en tots dos grups són estadísticament significatives ( $P < 0.0001$ ).

A part de la selecció de la Taq polimerasa, la I-PEP-PCR ha tingut una exhaustiva posada a punt. Atès l'elevat nombre de seqüències diferents per amplificar, és important que el DNA estigui molt preservat i totalment desnaturalitzat per facilitar-ne la còpia. A més a més, s'ha descrit un efecte beneficiós en la taxa d'ADO en augmentar el temps de desnaturalització (Piyamongkol *et al.* 2003). Per aquestes raons, s'ha fet un pas llarg de desnaturalització a 94°C durant 7 minuts per assegurar que les cadenes estiguessin totalment dissociades. S'ha preferit aquesta opció en lloc d'augmentar la temperatura de desnaturalització, ja que aquest fet podria causar un excés de talls (*nicks*) en les cadenes de DNA que farien augmentar tant l'ADO com la fallada total d'amplificació (Piyamongkol *et al.* 2003). Per a seleccionar la temperatura òptima d'aparellament (31,5°C), s'ha fet un experiment de gradient en el qual s'han provat diferents temperatures i s'ha comparat la intensitat dels senyals. S'ha modificat la temperatura d'extensió a 68°C ja que és la temperatura òptima de polimerització d'ambdues polimerases (segons les especificacions dels fabricants). Finalment, d'acord amb Dietmaier i col·laboradors (Dietmaier *et al.* 1999), el pas d'extensió a 68°C s'ha allargat 30 segons per tal d'obtenir productes de PCR com més llargs millor.

## 5.2.2. Consideracions tècniques: detecció de mutacions i STRs

L'adaptació del *kit* de FQ ha requerit l'ajustament de la quantitat de producte d'I-PEP-PCR sotmès a l'amplificació i detecció de mutacions del gen *CFTR*. També ha estat necessari precipitar amb etanol la reacció d'OLA per a concentrar els fragments obtinguts abans de carregar-los en el gel d'acrilamida de l'ABI Prism 377 i permetre'n una detecció millor. Tot i que la PCR en cèl·lules aïllades no és quantitativa, l'amplificació de cèl·lules amb genotip heterozigot, en alguns casos, produeix pics de menor alçada en l'electroferograma que les cèl·lules amb genotip homozigot. Això es deu al fet que els encebadors es reparteixen per a amplificar ambdós al·lels.

En l'optimització de les PCRs específiques de mutació, així com també en les PCRs *multiplex* dels polimorfismes, s'ha doblat la quantitat d'encebador com suggereixen alguns autors (Henegariu *et al.* 1997). De la mateixa manera, la concentració del tampó de PCR s'ha augmentat fins a 1,5 vegades respecte dels valors normals. Això ha permès obtenir l'amplificació de totes les regions codificadores dels gens *F8* i *F9* a partir de la mateixa cèl·lula. Segons el nostre coneixement, en aquest treball es descriu per primera vegada a la literatura l'amplificació completa de tot un gen a partir d'una cèl·lula aïllada (Sanchez-Garcia *et al.* 2006).

La mutació 2183AA>G del gen *CFTR* només s'ha detectat en un 14,3% dels casos (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a). És possible que aquest locus procedeixi d'un producte de PCR del *Cystic Fibrosis Assay* de mida gran, el qual seria propens a patir fallades d'amplificació més freqüentment. Aquest fet limita l'aplicació del *kit* per a pacients amb aquesta mutació a causa de la possibilitat augmentada d'errors de diagnòstic específics per a aquesta mutació i el risc elevat que les cèl·lules no tinguin resultat. Per tant, en el cas de fer un DGP d'aquesta mutació, seria indispensable la utilització, addicionalment, de marcadors lligats per a assegurar el diagnòstic.

Durant la posada a punt de les PCRs *multiplex* dels marcadors lligats, primer s'ha provat individualment cada parella d'encebadors per tal de comprovar que els productes amplifiquessin correctament per separat. Després s'han testat alhora tots junts i les quantitats dels encebadors de cada STR s'han ajustat individualment fins a aconseguir que tots els microsatèl·lits amplifiquen de manera equilibrada, és a dir, que les alçades dels pics dels quatre marcadors siguin semblants i amb una intensitat de senyal prou alta perquè la identificació sigui fàcil. Cal destacar que els productes de PCR marcats amb 6-

FAM es detecten millor ja que aquesta molècula emet més fluorescència que la resta de fluorocroms. Això permet reduir la quantitat d'encebador necessari per a amplificar un STR que estigui marcat amb aquesta molècula. De la mateixa manera, marcadors amb productes d'amplificació grans, solen requerir més quantitat d'encebador en la *multiplex* que els marcadors que generen productes més petits atès que aquests s'amplifiquen més eficientment.

S'han descrit diversos fenòmens que poden interferir en l'anàlisi de STRs en cèl·lules aïllades. L'efecte de "*stutter*" (Walsh *et al.* 1996) consisteix en l'aparició artefactual de productes de PCR que difereixen en mida en quant al nombre de repeticions de la unitat bàsica del STR. Dit d'una altra manera, si el STR amplificat és un dinucleòtid, l'*stutter* consistiria en subproductes de PCR de -2, -4 i -6 parells de bases. Aquest fenomen s'ha observat tant en l'amplificació de DNA genòmic com de productes d'I-PEP-PCR de cèl·lules aïllades, i fa evident que és inherent a l'amplificació de repeticions de dinucleòtids. El fenomen de lliscament (*slippage*) (Foucault *et al.* 1996) consisteix en l'amplificació preferencial d'un dels *stutters* respecte a l'al·lel real. Tot i haver estat descrit en l'anàlisi de STRs preamplificats amb mètodes de WGA (Wells *et al.* 1999), en aquest treball aquest fenomen no s'ha observat quan s'empra la Taq polimerasa amb activitat correctora, ja que cap de les 25 cèl·lules analitzades han mostrat cap al·lel addicional no esperat (Sanchez-Garcia *et al.* 2006). Una possible explicació és que els errors són majoritàriament corregits quan s'utilitza aquesta DNA polimerasa.

### 5.2.3. Consideracions tècniques: amplificació i ADO

Per a la posada a punt de protocols d'amplificació de cèl·lules aïllades, la integritat i la preservació del DNA són dos aspectes especialment rellevants. Les cèl·lules bucals, per exemple, són cèl·lules epitelials de descamació que es troben fora de cicles de proliferació cel·lular (en estadis no replicatius del DNA) les quals poden haver començat processos de degradació del DNA per apoptosi. Aquest fet s'ha demostrat deixant mostres de cèl·lules bucals diversos dies a temperatura ambient abans de fer-ne l'amplificació, i observant que els nivells d'ADO d'aquestes cèl·lules són força superiors als de cèl·lules bucals processades immediatament després de la seva recollida (Piyamongkol *et al.* 2003; Glentis *et al.* 2009). El mateix succeeix en mostres congelades respecte de les que no s'han congelat (Piyamongkol *et al.* 2003). L'anàlisi d'oòcits i blastòmers d'embrions descartats de cicles de FIV també mostren aquest tipus de

comportament, especialment els 1CPs ja que són cèl·lules destinades a degenerar. Aquest material, quan procedeix d'òocits descartats de cicles de FIV, acostuma a estar disponible per a l'anàlisi com a mínim un dia després d'obtenir-lo i molt sovint ja està en condicions subòptimes a causa d'aquests processos de degradació (Gitlin *et al.* 2003; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008). Això explicaria les diferents taxes d'amplificació observades en òocits (74,5%) respecte de les observades en 1CPs (44,5%) (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a).

La taxa d'amplificació de cèl·lules aïllades amb el protocol de detecció de mutacions del gen *CFTR* és del 90%, amb una taxa d'ADO del 13,2% (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a). Ambdós valors són acceptables segons la PGDIS i l'ESHRE que recomanen un màxim del 10% de fallades d'amplificació i una incidència d'ADO preferiblement menor al 10% (PGDIS 2004; Thornhill *et al.* 2005; PGDIS 2008). En quant al protocol de seqüenciació per detecció de mutacions d'hemofília, l'amplificació aconseguida és del 92% amb un ADO del 13,04% (Sanchez-Garcia *et al.* 2006).

Els resultats d'amplificació són comparables a les taxes d'amplificació descrites en altres treballs que detecten mutacions directament mitjançant miniseqüenciació (Bermudez *et al.* 2003; Fiorentino *et al.* 2003): Bermúdez i col·laboradors han desenvolupat un protocol per a la detecció d'un SNP del gen de la poliposi adenomatosa familiar (*APC*) en una sèrie de cèl·lules bucals aïllades preamplificades amb PEP-PCR, amb el qual s'ha aconseguit un 90% d'amplificació i un 11% d'ADO (Bermudez *et al.* 2003); de la mateixa manera, un grup italià ha aconseguit una taxa d'amplificació del 87,5 i 92,7% dels gens *F8* i *CFTR*, respectivament (Fiorentino *et al.* 2003).

Els resultats de la taxa d'ADO del present treball són igualment comparables a les dades publicades anteriorment (d'un 3,3 a un 12,5% en el cas del gen de la *FQ* i del 12 al 12,5% en el cas del gen del *FVIII*) (Fiorentino *et al.* 2003). Els nostres resultats també són semblants als publicats per DGP de  $\beta$ -talassèmia mitjançant seqüenciació (Hussey *et al.* 2002), en que es mostra un 79% d'eficiència d'amplificació en blastòmers amb un 12% d'ADO i que remarca l'existència de dos ADOs simultanis en la mateixa cèl·lula diverses vegades. Això indica la importància d'afegir marcadors lligats com a confirmació del diagnòstic.

S'ha descrit que, en comparació amb amplicons (fragments de PCR) petits, els fragments llargs presenten taxes superiors d'ADO així com de fallades d'amplificació (Piyamongkol *et al.* 2003). Cal esperar doncs, que els talls en les cadenes de DNA es presentin

aleatòriament, de manera que és més probable que es presenti un tall entre la parella d'encebadors més separats. Els nostres resultats confirmen aquesta hipòtesi ja que s'ha observat una certa tendència a patir més ADO en els marcadors que tenen productes d'amplificació són més grans (Sanchez-Garcia *et al.* 2006). Els resultats obtinguts en l'amplificació *multiplex* dels quatre marcadors lligats al gen *F8* (DXS1073, STR13, DXS1108 i STR22) han mostrat unes taxes d'ADO del 15,8%, 16,7%, 27,3% i 21,7%, respectivament. Tot i ser uns valors lleugerament superiors als recomanats per la PGDIS i l'ESHRE, cal recordar dues coses: i) els valors s'han determinat analitzant cèl·lules bucals i s'ha demostrat que aquest tipus cel·lular pot presentar nivells d'ADO superiors que limfòcils aïllats (Glentis *et al.* 2009), ii) els resultats combinant els quatre marcadors alhora, junt amb la localització molt propera d'aquests respecte del gen, fan que la possibilitat d'error diagnòstic sigui menor al 1% (Navidi i Arnheim 1991; Obradors *et al.* 2008).

S'ha suggerit que el lloc d'unió dels encebadors i l'estructura secundària local del DNA podrien influir en el fenomen de l'ADO (Wells i Sherlock 1998; Wells *et al.* 1999; Thornhill i Snow 2002). Si això fos cert, seria esperable detectar una incidència menor d'ADO en treballs en què s'han aplicat mètodes d'amplificació total del genoma, ja que, en cada cicle d'amplificació, els encebadors degenerats que utilitzen aquests mètodes s'uneixen en llocs diferents del DNA. Tanmateix, s'ha descrit una elevada incidència d'ADO amb la utilització de mètodes de WGA com ara l'MDA (Renwick *et al.* 2006). De la mateixa manera, les dades obtingudes en el present treball tampoc suggereixen una disminució del fenomen d'ADO en aplicar WGA ja que les taxes d'ADO trobades són comparables a les d'altres estudis. Tot i que l'ADO no va disminuir, l'aplicació de la I-PEP-PCR ha estat molt útil per a generar prou quantitat de DNA a partir d'una única cèl·lula i analitzar simultàniament múltiples mutacions i STRs per a la detecció de contaminació i d'ADO.

### 5.3. DGP EN CORPUSCLES POLARS I BLASTÒMERS

La gran majoria de centres que ofereixen DGP arreu del món basen el diagnòstic majoritàriament en l'anàlisi de blastòmers i alguns grups també en l'anàlisi dels corpuscles polars (únicament el 1CPs o la combinació de l'anàlisi d'1CP i 2CP) (Harper *et al.* 2008).

Els avantatges principals del DGP en 1CP són atribuïbles al fet que es disposa de molt més temps per a fer l'anàlisi abans de la transferència embrionària (fins a 5 dies) i que la



biòpsia de l'1CP no redueix el potencial d'implantació dels embrions a diferència de la biòpsia de blastòmers, que està considerada, per alguns autors, com potencialment perjudicial (Cohen *et al.* 2007; Goossens *et al.* 2008). D'altra banda, s'ha descrit que la taxa d'ADO en 1CP és entre 2,3 i 5,6 vegades menor que en blastòmers (Rechitsky *et al.* 1996; Rechitsky *et al.* 1998; Rechitsky *et al.* 1999; Altarescu *et al.* 2006), fet sorprenent ja que és esperable que la integritat del DNA sigui superior en un blastòmer (cèl·lula proliferativa), que en una cèl·lula, com l'1CP, destinada a degenerar (Gitlin *et al.* 2003).

Un avantatge, si més no relatiu, del DGP en 1CP és el fet que mostres contaminades (a les quals per algun motiu la contaminació no és detectada mitjançant STRs) no podran donar lloc a errors diagnòstics greus o falsos negatius, sinó a falsos positius. Dit d'una altra manera, com que el diagnòstic de l'1CP és un diagnòstic invers, la contaminació de mostres produïda pel manipulador (embrióleg, especialista de DGP, etc.) no comporta la selecció d'embrions afectats, ja que es detecta un al·lel normal i es dedueix que l'MII és mutant i que l'embrió resultant no és recomanat per a transferència. Tanmateix, la contaminació amb DNA de portadors (per exemple, DNA d'origen matern) sí que pot donar lloc a errors diagnòstics greus (en el cas de detectar un al·lel mutant en l'1CP es dedueix que l'MII i l'embrió són normals, quan poden no ser-ho). Aquest fet emfatitza la importància dels STR per a detectar contaminació de DNA d'origen no embrionari.

Finalment, l'anàlisi d'1CPs no és afectat pel fenomen de mosaïcisme embrionari, que consisteix en l'existència de diverses línies cel·lulars en un mateix embrió, per exemple una línia cel·lular cromosòmicament normal i una línia amb una trisomia d'un cromosoma. Aquest fenomen afecta fins a un 30% dels blastòmers i pot donar lloc a errors diagnòstics greus tant en el DGP de cribatge d'aneuploidies (Munne *et al.* 2002) com en el DGP de malalties monogèniques (Wilton *et al.* 2009).

L'anàlisi de l'1CP, però, també presenta una sèrie d'inconvenients. En primer lloc, la contribució paterna no s'analitza: atès que l'1CP és una cèl·lula d'origen femení únicament serveix per avaluar l'aportació genètica materna. Això fa que aquest tipus de DGP estigui especialment indicat en casos en què la dona és la portadora d'una malaltia d'herència dominant (Renbaum *et al.* 2007; Altarescu *et al.* 2008) o lligada al cromosoma X (per ex. hemofília) (Verlinsky *et al.* 2002a; Tomi *et al.* 2005), o també d'una anomalia cromosòmica (per exemple una translocació equilibrada) (Durban *et al.* 2001; Pujol *et al.* 2003). En els casos de malalties autosòmiques recessives (per exemple la FQ), un 50% dels embrions resultants d'òocits diagnosticats normals seran finalment portadors ja que hauran heretat la mutació paterna.

L'anàlisi de l'1CP està també afectat per l'existència de recombinació entre els cromosomes homòlegs, que en dones portadores de malalties genètiques pot resultar en 1CPs i MII heterozigots. En aquests casos, atès que l'1CP proporciona una informació incompleta, es requereix també de l'anàlisi del 2CP per tal de determinar la segregació en la meiosi II. És per això que s'han publicat treballs en què s'analitza seqüencialment tant l'1CP com el 2CP, del qual es fa la biòpsia el dia següent de la fecundació (Verlinsky *et al.* 1999; Verlinsky *et al.* 2002a; Kuliev *et al.* 2006).

Finalment, atès que no tots els oòcits es fecundaran correctament ni evolucionaran favorablement fins l'estadi d'embrió, en els casos de DGP-1CP s'analitzen 1CPs d'oòcits que no arriben a embrions viables, la qual cosa encara que proporciona informació de tipus bàsic que es pot donar a la família, fa augmentar tant el temps de manipulació com els costos de reactius. Això també passa en l'anàlisi de blastòmers, però en menys mesura, ja que molts centres de FIV no fan biòpsies d'embrions amb desenvolupament endarrerit o aturat (embrions amb menys de sis cèl·lules) o embrions fragmentats o de baixa qualitat.

Un inconvenient de l'ús de la I-PEP-PCR per al DGP és que aquest pas dura unes deu hores aproximadament, fet que fa plantejar l'anàlisi de l'1CP com a estratègia diagnòstica inicial per tal d'obtenir els resultats a temps per a poder fer una transferència embrionària. Tanmateix, s'ha pogut millorar la sensibilitat i la rapidesa en l'obtenció dels resultats mitjançant la utilització d'estratègies de PCR *multiplex* amb detecció fluorescent i mitjançant la utilització de seqüenciadors més moderns i sensibles com ara l'ABI Prism 3100 *Avant*. La PCR fluorescent té una elevada sensibilitat i permet disminuir el nombre de cicles sense comprometre la detecció correcta del producte. D'aquesta manera es minimitza també l'aparició d'artefactes i es redueix el risc de contaminació per la formació d'aerosols a conseqüència de l'excés de cicles d'amplificació. La posada a punt de la tècnica s'ha fet en condicions estàndards per a DNA genòmic en un seqüenciador ABI Prism 377 o en un 3100 *Avant*. Tanmateix, en vista a l'aplicació clínica, el seqüenciador ABI Prism 3100 permet analitzar simultàniament la majoria de cèl·lules testades ja que la electroforesi es fa en 16 capil·lars. A més a més, variacions en el temps d'injecció o en el voltatge poden fer que es detectin millor certes grandàries de fragments o fragments marcats amb fluorocroms més dèbils. Aquesta sensibilitat més gran permet prescindir del pas de precipitació i escurçar encara més el protocol, i permet en la seva aplicació clínica, utilitzar els protocols desenvolupats tant en l'anàlisi d'1CP i 2CPs (Figura 29) com en l'anàlisi de blastòmers a Dia +3 amb una transferència embrionària a Dia +5, i analitzar d'aquesta manera també la contribució paterna.

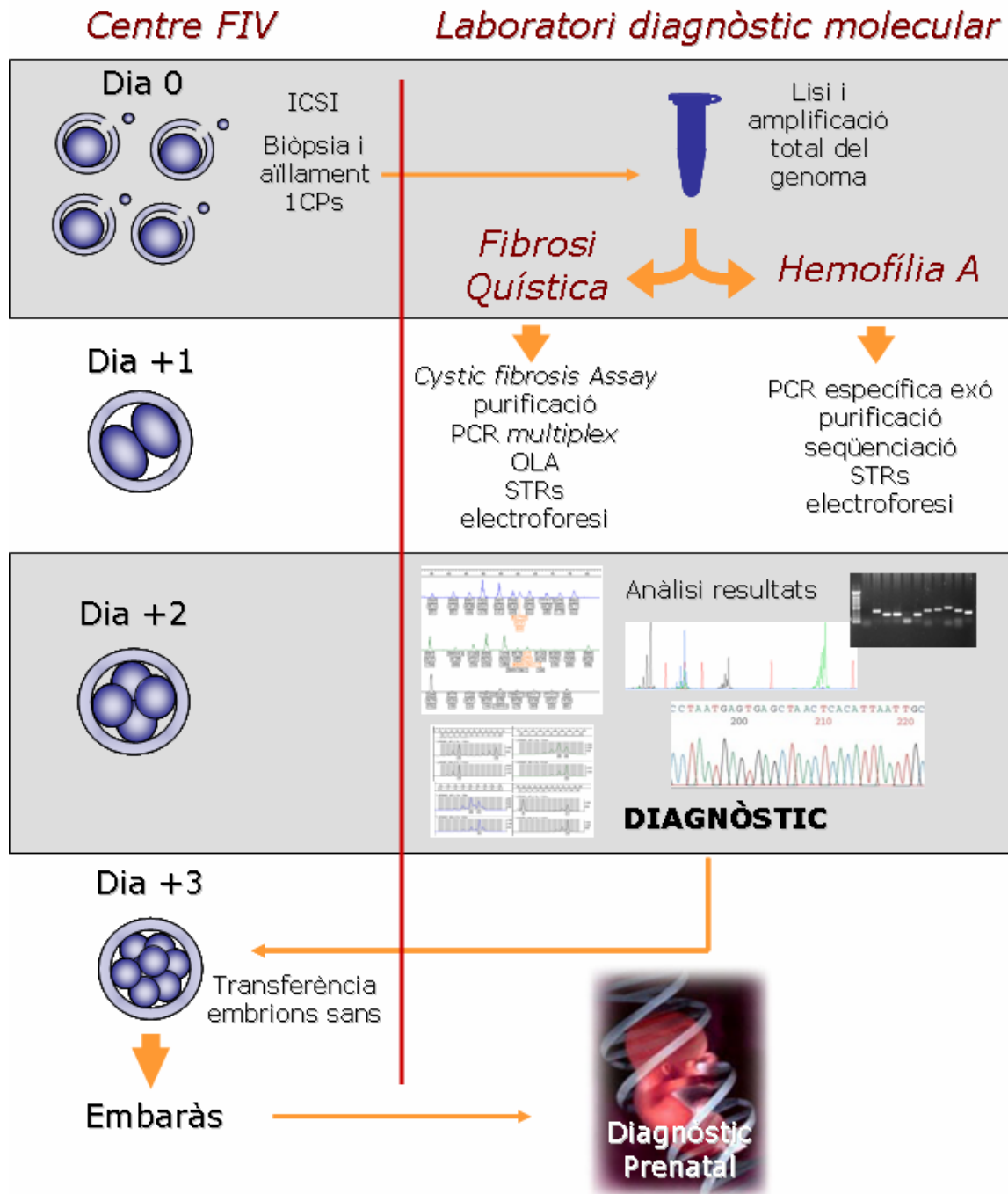


Figura 29. Diagrama dels procediments de DGP desenvolupats

## 5.4. DGP DE MALALTIES MONOGÈNIQUES

El DGP de malalties monogèniques requereix fecundació *in vitro* i aquest fet, per si mateix, pot presentar certs inconvenients com ara riscos associats als embarassos múltiples, la síndrome d'hiperestimulació ovàrica, complicacions perinatales i augment de naixements prematurs (Zadori *et al.* 2003; Allen *et al.* 2006; Papanikolaou *et al.* 2006;

Jarzembovska *et al.* 2007; Shebl *et al.* 2007). Altres inconvenients específics del DGP són: la possible influència d'aquesta tècnica en la viabilitat embrionària (Magli *et al.* 2004; Cieslak-Janzen *et al.* 2006; Cohen *et al.* 2007; Combelles 2008), el poc consens que hi ha sobre la metodologia que cal utilitzar (Munne *et al.* 2007) i les connotacions morals negatives que té per a determinats grups i per alguns pacients (Cameron i Williamson 2003; Munne i Cohen 2004).

Tot i els inconvenients, el DGP de malalties monogèniques ha demostrat ser molt útil per a reduir el risc de tenir descendència afectada i també ha demostrat unes taxes d'implantació i d'embaràs acceptables, del 12,5% i 25,7%, respectivament (Harper *et al.* 2008).

Com s'ha esmentat prèviament hi ha diversos factors que poden afectar l'èxit del DGP de malalties monogèniques. Aquesta secció detalla quins són els problemes que poden afectar l'aplicació clínica de la metodologia descrita i quines són les mesures utilitzades per tal de reduir-ne l'impacte.

### **5.4.1. Fallades d'amplificació i ADO**

Com s'ha descrit anteriorment, la integritat i la preservació del DNA de les cèl·lules que s'analitzen és molt important. Les fallades totals d'amplificació poden arribar a afectar un 20% de les cèl·lules analitzades (Piyamongkol *et al.* 2003). Tanmateix, la incidència d'aquest fenomen pot augmentar en casos amb baixa qualitat embrionària, ja que embrions degenerats, bloquejats o de baixa qualitat són propensos a tenir el DNA parcialment degradat (Goossens *et al.* 2008) i a patir més fallades d'amplificació (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008). Altres factors que poden afectar l'eficiència d'amplificació són la selecció adequada de la cèl·lula de què s'ha de fer la biòpsia, el temps transcorregut des de l'extrusió del 1CP fins a la biòpsia i la correcta manipulació de la cèl·lula durant les etapes de biòpsia, rentat i transferència al tub de PCR.

El fenomen d'ADO té un impacte negatiu en qualsevol protocol de DGP i pot donar lloc a errors diagnòstics greus (Wilton *et al.* 2009). Una estratègia utilitzada per alguns grups per tal de minimitzar les fallades d'amplificació i els errors de diagnòstic impliquen la biòpsia i l'anàlisi de dos blastòmers per tal de trobar concordança entre ambdós resultats (Staessen *et al.* 2004; Fiorentino *et al.* 2006). Una altra opció és també fer la biòpsia de dues cèl·lules però amplificar aquestes conjuntament. S'ha descrit una gran reducció de

l'ADO quan s'amplifiquen dues cèl·lules a la vegada i una reducció encara més gran quan se n'analitzen tres, on la taxa d'ADO és pràcticament zero (Piyamongkol *et al.* 2003). Tanmateix, la biòpsia de dues cèl·lules d'un total de 6-10 que formen l'embrió a Dia +3, sembla ser que compromet la viabilitat i/o el potencial d'implantació dels embrions (Cohen i Munne 2005; Goossens *et al.* 2008). Per aquest motiu, en aquest treball s'ha plantejat una estratègia alternativa que combina l'anàlisi directa de les mutacions juntament amb una anàlisi indirecta mitjançant la utilització de STRs per tal de detectar ADOs de mutacions i augmentar així la fiabilitat dels protocols.

### 5.4.2. Anàlisi indirecta i recombinació

L'aproximació presentada en aquest treball es basa en els estudis fets per Verlinsky i Kuliev, que demostren que en l'anàlisi de blastòmers, els possibles errors diagnòstics relacionats amb l'ADO disminueixen del 27% a prop de 0% en l'afegir quatre marcadors polimòrfics a la detecció directa de la mutació (Verlinsky i Kuliev 2000). Aquests autors també destaquen que els STRs lligats permeten detectar recombinació.

En aquest treball, l'estratègia de diagnòstic indirecte inclou la utilització de dos marcadors intragènics i de dos extragènics molt propers un a cada costat del gen (Sanchez-Garcia *et al.* 2005b). El fenomen de desequilibri de lligament, és a dir, l'associació no aleatòria d'al·lels cromosòmicament propers, s'ha utilitzat com una eina molt útil per el diagnòstic indirecte de nombroses malalties humanes d'herència mendeliana (Varilo *et al.* 2000). S'estima que la distància d'una megabase correspon a 1 centiMorgan (cM) o 1% de recombinació (White *et al.* 1993), encara que dades concretes de freqüències de recombinació es poden consultar a la web de l'USCS (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Així, doncs, a causa de la gran proximitat dels quatre marcadors entre ells i en relació amb el gen, és molt probable que tots els marcadors s'heretin conjuntament. En el cas del DGP de FQ, l'estratègia plantejada en el present treball és més acurada i es veu menys afectada per fenòmens de recombinació que l'aproximació de Dreesen i col·laboradors, en la qual feien servir quatre STRs, però tots ells extragènics distribuïts en una àmplia regió de 6 cM (Dreesen *et al.* 2000). En el present treball, els quatre marcadors seleccionats lligats al gen *CFTR* es distribueixen en una àrea de només 2,2 cM. Això permet reduir la possibilitat de doble recombinació entre els marcadors, que és una possible font d'error de diagnòstic (Dreesen *et al.* 2000).

La fiabilitat de les tècniques de DGP també pot ser afectada per l'elevada incidència d'aneuploidies en oòcits i per la prevalença del mosaïcisme embrionari (Gianaroli *et al.* 2001; Munne 2002; Munne *et al.* 2002; Kuliev *et al.* 2003; Wilton *et al.* 2009). Per exemple, el fet de no trobar un al·lel mutant pot ser causat simplement per la manca del cromosoma en què el gen està localitzat. Per tant, és molt necessari afegir marcadors lligats per tal de detectar la presència dels dos cromosomes (Verlinsky i Kuliev 2005).

Lògicament, es pot plantejar l'aplicació del DGP únicament amb diagnòstic indirecte amb STRs per exemple en els casos de parelles amb mutacions que no estan incloses en el kit de FQ i en casos de dones portadores de la inversió de l'intró 22 del gen del factor VIII de coagulació. Tot i que la informativitat esperada en combinar quatre marcadors polimòrfics lligats ha de superar el 90% (Sanchez-Garcia *et al.* 2005b), a la pràctica aquesta xifra és menor atès que hi ha casos en els quals s'ha d'intentar identificar al·lells de dinucleòtids amb només una repetició de diferència. Aquesta identificació de vegades és difícil ja que, per fenòmens d'amplificació preferencial, l'al·lel més petit sovint és confós amb un *stutter* de l'al·lel de 2 pb més grans. Altres alternatives, en parelles no informatives pels STRs emprats, són buscar altres marcadors lligats (encara que la distància entre aquests i el gen serà més gran) o combinar marcadors lligats semiinformatius (per a complementar l'anàlisi de la mutació) junt amb marcadors no lligats completament informatius (per a la detecció de contaminació).

Tot i l'elevada sensibilitat i precisió dels protocols de DGP descrits en aquest i altres treballs, és important destacar que el diagnòstic efectuat en una sola cèl·lula mai pot assolir el 100% de seguretat. Atès que el diagnòstic prenatal proporciona una fiabilitat diagnòstica marcadament superior, està altament recomanat després del DGP de malalties monogèniques i en cas d'embaràs a fi de confirmar el diagnòstic i descartar falsos negatius (Wilton *et al.* 2009).

### **5.4.3. Contaminació**

La contaminació és un problema que es pot minimitzar mitjançant la utilització de mesures severes de prevenció. Els controls contra la contaminació són crítics quan s'utilitza amplificació total del genoma ja que tant les possibles cèl·lules contaminants com els amplicons (productes de PCR d'amplificacions prèvies) poden ser amplificats fins i tot més que la mateixa cèl·lula estudiada i, per tant, dur-nos a un error de diagnòstic.

La utilització de STRs no només permet l'anàlisi indirecta addicional que corrobora el diagnòstic i la detecció tant de l'ADO com de fenòmens de recombinació. A més a més, les característiques polimòrfiques dels marcadors utilitzats permeten caracteritzar l'origen de la mostra mitjançant *fingerprinting* i detectar en quin cas aquesta no té origen embrionari (Piyamongkol *et al.* 2001).

Cal destacar que no tots els treballs que descriuen un nombre elevat de casos clínics informen sobre les taxes de contaminació detectades (Vandervorst *et al.* 2000; Fiorentino *et al.* 2006; Feyereisen *et al.* 2007). Mentre que la taxa de contaminació detectada en els controls negatius de PCR se situa per sota del 0,5% (Pickering *et al.* 2003; Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008), la incidència de contaminació en les pròpies cèl·lules analitzades i en els seus controls negatius pot arribar a ser de fins a 8,9%. Aquesta elevada incidència també es manifesta en el fet de que una elevada proporció de casos de DGP de malalties monogèniques (49,5%) presenten un mínim d'un embrió contaminat (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008). Atesa la seva elevada incidència, és evident la necessitat de detectar la contaminació i d'evitar així possibles errors de diagnòstic. La taxa de contaminació en aquest treball és del 2%, durant la posada a punt de la tècnica en mutacions de FQ (Sanchez-Garcia *et al.* 2005a). Gràcies a les estrictes precaucions emprades, no s'ha detectat cap tipus de contaminació en el cas clínic de DGP dut a terme per a una família candidata amb risc de HA (Sanchez-Garcia *et al.* 2006).

## 5.5. APLICACIÓ CLÍNICA

En el cas de DGP dut a terme en una família candidata (Sanchez-Garcia *et al.* 2006), la dona portadora de la mutació responsable de HA severa ha resultat que no era informativa per a cap dels quatre marcadors utilitzats, tot i que l'heterozigositat combinada dels quatre marcadors lligats al gen *F8* és del 90,24% (Sanchez-Garcia *et al.* 2005b). En aquest cas, la PCR *multiplex* dels STRs només ha estat útil per a la detecció de contaminació externa, ja que no proporciona una anàlisi indirecta addicional. Això ha fet necessari el disseny i l'optimització d'una PCR fluorescent específica mitjançant anàlisi de fragments, a part de la seqüenciació de l'exó, per tal de poder detectar ADO i confirmar el diagnòstic (Sanchez-Garcia *et al.* 2006). La utilització de diferents tècniques sobre un mateix producte de WGA permet assegurar el diagnòstic d'un màxim nombre d'embrions, i augmentar les possibilitats que els pacients puguin tenir una transferència d'embrions no afectats.

De la mateixa manera, atès el nombre d'1CPs heterozigots detectats en el cas clínic a causa de l'elevada incidència de recombinació en aquesta pacient (3/9, dades no mostrades al treball Sanchez-Garcia *et al.* 2006), seria molt convenient fer també l'anàlisi del 2CP, que permet deduir la segregació durant la segona divisió meiótica dels oòcits recombinants. Alternativament es pot realitzar l'anàlisi de blastòmers, que eludeix els problemes de recombinació. Totes dues estratègies permeten augmentar el nombre d'embrions amb resultats i són viables i compatibles amb una transferència embrionària a Dia +5, ja que el protocol desenvolupat té una durada d'unes 30 hores.

## 5.6. PERSPECTIVES DE FUTUR

Els estàndards actuals per al DGP de malalties monogèniques impliquen, sempre que sigui possible, l'amplificació en format *multiplex* de la mutació junt amb diversos marcadors polimòrfics lligats (Gutiérrez-Mateo *et al.* 2008). Lògicament, les tècniques evolucionen cap a aconseguir més fiabilitat i proporcionar un diagnòstic més complet combinant diverses estratègies diagnòstiques a partir d'una mateixa cèl·lula (Figura 30).

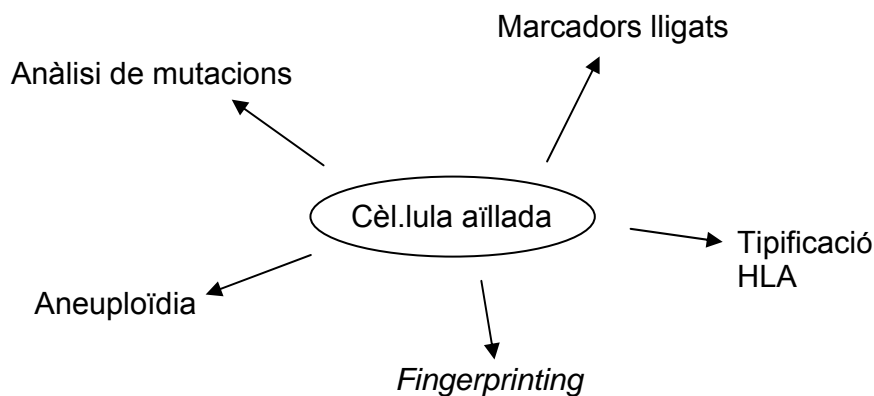


Figura 30. Diagnòstic global a partir d'una cèl·lula aïllada.

Alguns grups han plantejat tècniques innovadores per a la detecció de mutacions prèviament seleccionades, com ara la PCR a temps real (*real-time* PCR) (Rice *et al.* 2002; Vrettou *et al.* 2004) o la cromatografia líquida desnaturalitzant d'alt rendiment (DHPLC) (Girardet *et al.* 2003). Ambdues estratègies, però, no estan exemptes d'optimitzacions i només presenten com a novetat que el mètode de detecció emprat no ha estat utilitzat prèviament en DGP. També s'han fet intents de desenvolupar tests



específics de malaltia genètica en plataforma tipus *array* per a la detecció d'algunes de les mutacions més freqüents del gen *CFTR* (Salvado i Cram 2007).

Atès que moltes parelles decideixen ajornar el moment de tenir descendència, en l'actualitat es presenten bastants casos de DGP de parelles portadores de malalties hereditàries que alhora tenen edat avançada. Així doncs, seria molt recomanable el DGP de cribatge d'aneuploïdies, a causa del risc elevat d'aquestes pacients de tenir descendència amb anomalies cromosòmiques numèriques (Munne *et al.* 1995; Plachot *et al.* 1988). Aquesta problemàtica s'ha intentat adreçar de dues maneres diferents. La primera estratègia és mitjançant la PCR *multiplex* amb STRs informatius situats en alguns dels cromosomes més freqüentment implicats en anomalies cromosòmiques (6, 13, 16, 18, 21, 22, X i Y) a part del diagnòstic de la malaltia genètica en qüestió (Rechitsky *et al.* 2006). Una altra estratègia ha estat la utilització de la tècnica de hibridació genòmica comparada (CGH) en 1CP per a la detecció d'aneuploïdies i l'anàlisi posterior de la mutació mitjançant PCR de blastòmers dels embrions resultants (Obradors *et al.* 2008). Amb aquesta darrera estratègia desenvolupada pel nostre grup s'ha aconseguit el naixement d'un nen sa en una parella portadora de dues mutacions del gen *CFTR* en què la dona, de 38 anys d'edat, ja s'havia sotmès a dos cicles fallits de FIV.

Recentment s'ha descrit la tècnica "*haplotyping*" com a mètode quasi universal per al DGP d'algunes malalties monogèniques comunes (Renwick *et al.* 2006; Renwick *et al.* 2007). Aquesta tècnica es basa en l'amplificació de DNA dels blastòmers amb MDA i la seva anàlisi posterior amb una bateria de fins a 64 STRs que permet l'anàlisi indirecta de diferents malalties monogèniques simultàniament. Aquesta alternativa té diversos avantatges: no caldria posar a punt protocols específics de pacients, el mateix protocol seria útil per diferents malalties genètiques, no calen optimitzacions i finalment permet detectar aneuploïdies dels cromosomes en què els STRs estan localitzats. Malgrat els beneficis que *a priori* té aquesta alternativa, també presenta una sèrie d'inconvenients. En primer lloc, s'ha descrit una elevada incidència d'ADO (a l'entorn del 28%) que es compensa pel gran nombre de polimorfismes analitzats simultàniament. En segon lloc, com que és una estratègia basada únicament en l'anàlisi indirecta, és susceptible de presentar problemes com ara manca de familiars clau per a la determinació del lligament, la disponibilitat d'un mínim nombre de familiars per a descartar la recombinació dins la família, la impossibilitat d'aplicar aquesta tècnica en casos esporàdics, la manca d'informativitat dels marcadors utilitzats en certes famílies i, finalment, depenent de la malaltia, la dificultat de trobar prous marcadors amb un cert grau d'informativitat i suficientment a prop del gen (Goodeve 1998).

Una alternativa a l'*haplotyping* que en podria superar algunes de les seves limitacions és l'anàlisi amb SNP-arrays per al diagnòstic indirecte. Com que els SNPs són més nombrosos que els STRs i estan distribuïts al llarg de tot el genoma, aquesta tècnica permetrà diagnosticar un nombre més gran de malalties monogèniques. A més a més, amb aquesta aproximació es podran detectar aneuploïdies de qualsevol cromosoma (Hellani *et al.* 2008; Wells *et al.* 2008).

Tant per a la tècnica d'*haplotyping* com per als SNP-arrays es necessiten grans quantitats de DNA, per la qual cosa s'han d'aplicar mètodes de WGA fiables, amb una baixa incidència d'ADO i amb una durada compatible amb una transferència embrionària a Dia +5. Alternativament, es poden congelar els embrions en estadi de blastocist i transferir-los en un cicle posterior (Fragouli *et al.* 2008; Schoolcraft *et al.* 2008). Gràcies a les millores en els protocols de congelació i l'increment de la taxa de supervivència embrionària (Stachecki *et al.* 2008), aquesta opció està adquirint més acceptació entre als centres de FIV que realitzen DGPs. Els recents avenços en el cultiu d'embrions fins a l'estadi de blastocist permetrien, també, una biòpsia d'un nombre més gran de cèl·lules (habitualment de 5 a 10) a Dia +5. D'aquesta manera, es pot aconseguir una eficiència d'amplificació del 100% i una taxa d'ADO propera a zero (Kokkali *et al.* 2005; McArthur *et al.* 2008).

Ateses les bones taxes d'èxit aconseguides al llarg dels anys (Geraedts *et al.* 1999; Geraedts *et al.* 2000; Consortium 2002; Sermon *et al.* 2005; Harper *et al.* 2006; Sermon *et al.* 2007; Harper *et al.* 2008; Goossens *et al.* 2009), les tècniques de DGP han evolucionat cap a noves aplicacions com, per exemple, el DGP de malalties d'aparició tardana en l'edat adulta, com ara la malaltia de Huntington (Sermon *et al.* 1998b). En aquests casos fins i tot es poden aplicar criteris d'exclusió en parelles que tenen historial familiar de la malaltia, no volen saber si en són portadors, però volen aconseguir descendència totalment sana (Sermon *et al.* 2002; Stern *et al.* 2002; Jasper *et al.* 2006). Altres aplicacions del DGP inclourien casos de malalties mitocondrials (Steffann *et al.* 2006; Feyereisen *et al.* 2007), i casos de susceptibilitat a diversos tipus de càncer (per exemple, la síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), el retinoblastoma i la neurofibromatosis) (Rechitsky *et al.* 2002; Verlinsky i Kuliev 2002; Obradors *et al.* 2009), predisposició a l'Alzheimer (Verlinsky *et al.* 2002b) o malformacions congènites (Abou-Sleiman *et al.* 2002; Verlinsky *et al.* 2003; He *et al.* 2004; Verlinsky *et al.* 2005a). Una altra aplicació del DGP és l'anàlisi indirecta dels antígens del sistema d'histocompatibilitat (HLA). Aquesta aplicació és indicada per a parelles amb un fill afectat per certes malalties (per exemple, l'anèmia de Fanconi, la  $\beta$ -talassèmia, etc) que requereixin per al tractament

---

un transplantament de moll de l'os. La selecció i la transferència d'embrions immunocompatibles amb el fill afectat permetria obtenir cèl·lules mare de cordó compatibles pel transplantament (Verlinsky *et al.* 2001; Fiorentino *et al.* 2004; Rechitsky *et al.* 2006).

Una aplicació derivada del DGP és la utilització d'embrions descartats (ja sigui pel fet d'estar afectats per malalties monogèniques o de tenir anomalies cromosòmiques) com a font de cèl·lules mare (*stem cells*). Aquestes cèl·lules mare permetrien l'estudi d'aquestes malalties en qüestió, i la recerca de possibles teràpies (Verlinsky *et al.* 2005b; Ben-Yosef *et al.* 2008).

Malgrat haver passat gairebé 20 anys des del primer protocol de DGP, l'anàlisi de cèl·lules aïllades encara és un repte. Hi ha moltes portes obertes per part dels diferents grups que treballen per tal de desenvolupar uns procediments més consensuats. La combinació d'uns millors estàndards de qualitat, tecnologies robustes i la possibilitat de reanalitzar mostres de cèl·lules aïllades milloraran el diagnòstic i oferiran molts més beneficis als pacients.





## **CONCLUSIONS**



## 6. CONCLUSIONS

1. La I-PEP-PCR és un mètode fiable per a l'amplificació de cèl·lules aïllades, ja que no introdueix mutacions en les còpies de DNA, produeix prou quantitat de DNA per a poder aplicar tècniques de diagnòstic directe i indirecte, i permet simplificar la posada a punt de protocols de DGP i en facilita, d'aquesta manera, l'aplicabilitat clínica.

2. La selecció d'una Taq polimerasa apropiada resulta de gran rellevància tant per a augmentar l'eficiència d'amplificació dels locus analitzats i millorar la intensitat dels senyals d'aquests com per a obtenir fragments de mida suficient.

3. El protocol de DGP desenvolupat per a la detecció de les 31 mutacions més freqüents d'FQ pot aplicar-se fins a un 80 % de les parelles portadores a tot el món sense la necessitat de posar a punt protocols específics de pacients.

4. En el cas de l'hemofília, el protocol de DGP basat en seqüenciació permet detectar fins al 75 % de les mutacions descrites per a l'hemofília A i gairebé la totalitat de les mutacions per a l'hemofília B.

5. La combinació de la tècnica de detecció directa de les mutacions juntament amb l'anàlisi de quatre marcadors lligats esdevé una estratègia genèrica pel DGP d'ambdues malalties, ja que permet la detecció indirecta de mutacions menys comunes del gen *CFTR* (no incloses en el *kit* comercial) o de mutacions de l'hemofília A no detectables mitjançant seqüenciació, com per exemple la inversió de l'intró 22 del gen *F8*.

6. L'anàlisi indirecta emprant una bateria d'STR lligats molt propers al gen i amb una elevada heterozigositat permet detectar l'ADO i corroborar el diagnòstic directe de la mutació. L'anàlisi de microsatèl·lits, a més a més, permet detectar la possible contaminació de la mostra durant el processament d'aquesta en l'aplicació clínica del DGP.

7. Les taxes d'amplificació i ADO dels protocols genèrics de detecció de mutacions són comparables als resultats d'altres autors i demostren, per tant, que la tecnologia desenvolupada és eficient i fiable.

8. Els protocols desenvolupats per a l'anàlisi d'1CPs poden ser aplicats també a biòpsies de blastòmers d'embrions a Dia +3 per tal d'analitzar al mateix temps la dotació genètica paterna. Aquesta aplicació és compatible amb una transferència embrionària el Dia +5.

9. L'estratègia diagnòstica utilitzada seria transferible a moltes altres malalties, i facilitaria el desenvolupament de protocols de DGP genèrics d'elevada fiabilitat.





## **BIBLIOGRAFIA**



## 7. BIBLIOGRAFIA

### A

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T, Munne S (2003) Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. *Reprod Biomed Online* 6:226-31
- Abou-Sleiman PM, Apeessos A, Harper JC, Serhal P, Delhanty JD (2002) Pregnancy following preimplantation genetic diagnosis for Crouzon syndrome. *Mol Hum Reprod* 8:304-9
- Allen VM, Wilson RD, Cheung A (2006) Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J Obstet Gynaecol Can* 28:220-50
- Altarescu G, Eldar Geva T, Brooks B, al. e (2006) Polar body versus blastomere biopsy for PGD. PB or not PB? Paper presented at The American Society of Human Genetics 56th Annual Meeting, 28.
- Altarescu G, Brooks B, Margalioth E, Eldar Geva T, Levy-Lahad E, Renbaum P (2007) Simultaneous preimplantation genetic diagnosis for Tay-Sachs and Gaucher disease. *Reprod Biomed Online* 15:83-8
- Altarescu G, Renbaum P, Brooks PB, Margalioth EJ, Ben Chetrit A, Munter G, Levy-Lahad E, Eldar-Geva T (2008) Successful polar body-based preimplantation genetic diagnosis for achondroplasia. *Reprod Biomed Online* 16:276-82
- Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG (1984) The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *Embo J* 3:1053-60
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, Ketterling RP, Kazazian HH, Jr., Negrier C, *et al.* (1995) Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 86:2206-12
- Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD (1998) Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* 15:140-4
- Auerbach HS, Williams M, Kirkpatrick JA, Colten HR (1985) Alternate-day prednisone reduces morbidity and improves pulmonary function in cystic fibrosis. *Lancet* 2:686-8

### B

- Bennett LE, Keck BM, Daily OP, Novick RJ, Hosenpud JD (2000) Worldwide thoracic organ transplantation: a report from the UNOS/ISHLT International Registry for Thoracic Organ Transplantation. *Clin Transpl*:31-44

- Ben-Yosef D, Malcov M, Eiges R (2008) PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders. *Mol Cell Endocrinol* 282:153-8
- Bermudez MG, Piyamongkol W, Tomaz S, Dudman E, Sherlock JK, Wells D (2003) Single-cell sequencing and mini-sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 23:669-77
- Blanco A (1992) Genética y frecuencia de las hemofilias. In: Salamanca, EUd (ed) *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*, Salamanca, pp 291-308
- Bolton-Maggs PH, Pasi KJ (2003) Haemophilias A and B. *Lancet* 361:1801-9
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-7
- Brambati B, Tului L (2005) Chorionic villus sampling and amniocentesis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 17:197-201
- Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM (2002) Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet* 3:941-53

## C

- Cameron C, Williamson R (2003) Is there an ethical difference between preimplantation genetic diagnosis and abortion? *J Med Ethics* 29:90-2
- Casals T, Gimenez J, Ramos MD, Nunes V, Estivill X (1996) Prenatal diagnosis of cystic fibrosis in a highly heterogeneous population. *Prenat Diagn* 16:215-22
- Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Giambona A, Siciliano S, Maggio A, Fichera M, Guglielmino A (2002) Successful application of preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassaemia and sickle cell anaemia in Italy. *Hum Reprod* 17:1158-65
- Chance PF, Dyer KA, Kurachi K, Yoshitake S, Ropers HH, Wieacker P, Gartler SM (1983) Regional localization of the human factor IX gene by molecular hybridization. *Hum Genet* 65:207-8
- Chinnery PF, Schon EA (2003) Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:1188-99
- Choo KH, Gould KG, Rees DJ, Brownlee GG (1982) Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature* 299:178-80
- Chuah M, Vandendriessche T (2007) Gene therapy for hemophilia "A" and "B": efficacy, safety and immune consequences. *Verh K Acad Geneesk Belg* 69:315-34
- Cieslak-Janzen J, Tur-Kaspa I, Ilkevitch Y, Bernal A, Morris R, Verlinsky Y (2006) Multiple micromanipulations for preimplantation genetic diagnosis do not affect embryo development to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 85:1826-9
- Cohen J, Munne S (2005) Comment 2 on Staessen et al. (2004). Two-cell biopsy and PGD pregnancy outcome. *Hum. Reprod.* 20:2363-2364

- Cohen J, Wells D, Munne S (2007) Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 87:496-503
- Collins FS (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256:774-9
- Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munne S (2007) Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril* 88:53-61
- Combelles CM (2008) What are the trade-offs between one-cell and two-cell biopsies of preimplantation embryos? *Hum Reprod* 23:493-8
- Committee AP (2008) Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertil Steril* 90:S136-43
- Committee EPCS (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 17:233-46
- Consortium CFGP (1993) Correlation between genotype and phenotype in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 329:1308-1313
- Consortium PGD (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 17:233-46
- Costa JM, Ernault P, Vidaud D, Vidaud M, Meyer D, Lavergne JM (2000) Fast and efficient mutation detection method using multiplex PCR and cycle sequencing--application to haemophilia B. *Thromb Haemost* 83:244-7
- Coutelle C, Williams C, Handyside A, Hardy K, Winston R, Williamson R (1989) Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *Bmj* 299:22-4
- Cui XF, Li HH, Goradia TM, Lange K, Kazazian HH, Jr., Galas D, Arnheim N (1989) Single-sperm typing: determination of genetic distance between the G gamma-globin and parathyroid hormone loci by using the polymerase chain reaction and allele-specific oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9389-93
- Cutting G (1997) Cystic fibrosis. In: Rimoin's, Ea (ed) *Principles and Practice of Medical Genetics*. Vol 2. Churchill Livingstone, New York
- Cutting G (2002) Cystic Fibrosis. In: Rimoin's, Ea (ed) *Principles and Practice of Medical Genetics*. Vol 2. Churchill Livingstone, pp 1561-1606
- Cystic Fibrosis Foundation B (2001) Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report 2000.

**D**

- Dangerfield BT, Manga P, Field SP, Hartman E, Jenkins T, Krause A (1997) Feasibility of prenatal diagnosis and carrier detection in South African haemophilia A patients. *Br J Haematol* 97:558-60
- De Vos A, Van Steirteghem A (2001) Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 21:767-80
- Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, *et al.* (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5261-6
- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstadter F, Ruschoff J (1999) Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am J Pathol* 154:83-95
- Dixon MJ, Dixon J, Raskova D, Le Beau MM, Williamson R, Klinger K, Landes GM (1992) Genetic and physical mapping of the Treacher Collins syndrome locus: refinement of the localization to chromosome 5q32-33.2. *Hum Mol Genet* 1:249-53
- Dodge JA (1995) Male fertility in cystic fibrosis. *Lancet* 346:587-8
- Dohner DE, Dehner MS, Gelb LD (1995) Inhibition of PCR by mineral oil exposed to UV irradiation for prolonged periods. *Biotechniques* 18:964-7
- Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH (1990) Trophoctoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 5:821-5
- Dreesen JC, Jacobs LJ, Bras M, Herbergs J, Dumoulin JC, Geraedts JP, Evers JL, Smeets HJ (2000) Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod* 6:391-6
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernandez E, Calafell JM, Laila JM, Sanchez-Garcia JF, Pujol A, Egozcue J, *et al.* (2001) PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update* 7:591-602

**E**

- Eftedal I, Schwartz M, Bendtsen H, Andersen AN, Ziebe S (2001) Single intragenic microsatellite preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis provides positive allele identification of all CFTR genotypes for informative couples. *Mol Hum Reprod* 7:307-12
- El-Hashemite N, Delhanty JD (1997) A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* 3:975-8
- el-Hashemite N, Wells D, Delhanty JD (1997) Single cell detection of beta-thalassaemia mutations using silver stained SSCP analysis: an application for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* 3:693-8

Engel E (2006) A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet* 14:1158-69

## F

Feyereisen E, Steffann J, Romana S, Lelorc'h M, Ray P, Kerbrat V, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N (2007) Five years' experience of preimplantation genetic diagnosis in the Parisian Center: outcome of the first 441 started cycles. *Fertil Steril* 87:60-73

Figueiredo MS (1994) Location and rapid analysis of the intragenic BamHI polymorphic site of the factor IX gene. *Braz J Med Biol Res* 27:1117-21

Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A, Lilford R (1995a) Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Reprod* 10:1609-18

Findlay I, Urquhart A, Quirke P, Sullivan K, Rutherford AJ, Lilford RJ (1995b) Simultaneous DNA 'fingerprinting', diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Hum Reprod* 10:1005-13

Findlay I, Quirke P, Hall J, Rutherford A (1996) Fluorescent PCR: a new technique for PGD of sex and single-gene defects. *J Assist Reprod Genet* 13:96-103

Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M, Gianaroli L (2003) The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 9:399-410

Fiorentino F, Biricik A, Karadayi H, Berkil H, Karlikaya G, Sertyel S, Podini D, Baldi M, Magli MC, *et al.* (2004) Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Mol Hum Reprod* 10:445-60

Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, Trengia V, Caserta D, Bonu MA, *et al.* (2006) Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod* 21:670-84

Fischer SG, Lerman LS (1980) Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4420-4

Fischer SG, Lerman LS (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1579-83

Foucault F, Praz F, Jaulin C, Amor-Gueret M (1996) Experimental limits of PCR analysis of (CA)<sub>n</sub> repeat alterations. *Trends Genet* 12:450-2

Foundation CF (2008) [www.cff.org](http://www.cff.org)

Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D (2008) Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 23:2596-608

**G**

- Gelfi C, Orsi A, Righetti PG, Brancolini V, Cremonesi L, Ferrari M (1994) Capillary zone electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified DNA fragments in polymer networks: the case of GATT microsatellites in cystic fibrosis. *Electrophoresis* 15:640-3
- Georges M, Dietz AB, Mishra A, Nielsen D, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Leipold H, *et al.* (1993) Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1058-62
- Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Thornhill A, Vanderfaeillie A, Viville S (1999) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 14:3138-48
- Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Thornhill A, Viville S, Wilton L (2000) ESHRE preimplantation genetic diagnosis (PGD) consortium: data collection II (May 2000). *Hum Reprod* 15:2673-83
- Gianaroli L, Magli MC, Munne S, Fortini D, Ferraretti AP (1999) Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* 16:170-5
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP (2001) The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol Cell Endocrinol* 183 Suppl 1:S13-8
- Gigarel N, Frydman N, Bulet P, Kerbrat V, Steffann J, Frydman R, Munnich A, Ray PF (2004) Single cell co-amplification of polymorphic markers for the indirect preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A, X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked hydrocephalus and incontinentia pigmenti loci on Xq28. *Hum Genet* 114:298-305
- Ginsburg D (2002) Hemophilias and other disorders of hemostasis. In: Rimoins, Ea (ed) *Principles and practice of Medical Genetics*. Vol 2. Churchill Livingstone, pp 1926-1958
- Girardet A, Cathala P, Claustres M (2003) Rapid detection of the deltaF508 mutation in single cells using DHPLC: implications for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 20:153-6
- Gitlin SA, Lanzendorf SE, Gibbons WE (1996) Polymerase chain reaction amplification specificity: incidence of allele dropout using different DNA preparation methods for heterozygous single cells. *J Assist Reprod Genet* 13:107-11
- Gitlin SA, Gibbons WE, Gosden RG (2003) Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online* 6:403-9
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-30



- Glentis S, SenGupta S, Thornhill A, Wang R, Craft I, Harper J (2009) Molecular comparison of single cell MDA products derived from different cell types. *Reprod Biomed Online in press*
- Goodeve A (2003) The incidence of inhibitor development according to specific mutations- and treatment? *Blood Coagul Fibrinolysis* 14 Suppl 1:S17-21
- Goodeve AC (1998) Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol* 20:3-19
- Goossens V, Sermon K, Lissens W, De Rycke M, Saerens B, De Vos A, Henderix P, Van de Velde H, Platteau P, *et al.* (2003) Improving clinical preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis by duplex PCR using two polymorphic markers or one polymorphic marker in combination with the detection of the DeltaF508 mutation. *Mol Hum Reprod* 9:559-67
- Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, Van Steirteghem A, Bertrand C, Liebaers I, *et al.* (2008) Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 23:481-92
- Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij MC, Harper J (2009) ESHRE PGD consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 29
- Green PM, Giannelli, F, Sommer, SS, M-C. Poon, M. Ludwig, R. Schwaab, P.H. Reitsma, M. Goossens, A. Yoshioka, M.S. Figueiredo, G. Tagariello, G.G. Brownlee (2004) The Haemophilia B Mutation Database – version 13.  
<http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>
- Griffin DK, Handyside AH, Harper JC, Wilton LJ, Atkinson G, Soussis I, Wells D, Kontogianni E, Tarin J, *et al.* (1994) Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 11:132-43
- Grifo JA, Tang YX, Cohen J, Gilbert F, Sanyal MK, Rosenwaks Z (1992) Pregnancy after embryo biopsy and coamplification of DNA from X and Y chromosomes. *Jama* 268:727-9
- Grifo JA, Tang YX, Munne S, Alikani M, Cohen J, Rosenwaks Z (1994) Healthy deliveries from biopsied human embryos. *Hum Reprod* 9:912-6
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, Egozcue J, Munne S, Navarro J (2004) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 19:2118-25
- Gutiérrez-Mateo C, Sánchez-García JF, Fischer J, Tormasi S, Cohen J, Munné S, Wells D (2008) Preimplantation genetic diagnosis of single-gene disorders: experience with more than 200 cycles conducted by a reference laboratory in the United States. *Fertil Steril*

**H**

- Handyside A, Delhanty J (1993) Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive diseases. In: Edwards, RG (ed) Preimplantation diagnosis of human genetic disease. Cambridge University Press, Cambridge, pp 239-270
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344:768-70
- Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR (1992) Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 327:905-9
- Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, Omar MB, Shaw MA, Grudzinskas JG, Rutherford A (2004) Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod* 10:767-72
- Harper JC, Handyside A (1994) The current status of preimplantation diagnosis. *Current Obst and Gynecol* 4:143- 149
- Harper JC, Delhanty JD (2000) Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 12:67-72
- Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C, Muntjewerff N, Repping S, SenGupta S, *et al.* (2006) ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* 21:3-21
- Harper JC, de Die-Smulders C, Goossens V, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, *et al.* (2008) ESHRE PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. *Hum Reprod* 23:741-55
- Hattori M, Yoshioka K, Sakaki Y (1992) High-sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutations. *Electrophoresis* 13:560-5
- He J, McDermott DA, Song Y, Gilbert F, Kligman I, Basson CT (2004) Preimplantation genetic diagnosis of human congenital heart malformation and Holt-Oram syndrome. *Am J Med Genet A* 126:93-8
- Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, Ozand P (2004) Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 10:847-52
- Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S (2005) Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 10:376-80
- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S (2008) Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 17:841-7

- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23:504-11
- Herber B, Herold K (1998) DNA typing of human dandruff. *J Forensic Sci* 43:648-56
- Hu DG, Webb G, Hussey N (2004) Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 10:283-9
- Hughes CR, Queller DC (1993) Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol Ecol* 2:131-7
- Hussey ND, Davis T, Hall JR, Barry MF, Draper R, Norman RJ, Rudzki Z (2002) Preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassaemia using sequencing of single cell PCR products to detect mutations and polymorphic loci. *Mol Hum Reprod* 8:1136-43

## J

- Jarzembovska M, Koryntova D, Rezabek K (2007) [Ovarian hypertimulation syndrome: a review]. *Ceska Gynekol* 72:52-7
- Jasper MJ, Hu DG, Liebelt J, Sherrin D, Watson R, Tremellen KP, Hussey ND (2006) Singleton births after routine preimplantation genetic diagnosis using exclusion testing (D4S43 and D4S126) for Huntington's disease. *Fertil Steril* 85:597-602
- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 16:10953-71

## K

- Karimipoor M, Kokabee L, Kamali E, Karizi SZ, Zeinali S (2008) Molecular Analysis of Factor IX Gene in an Iranian Female with Severe Hemophilia B. *Acta Haematol* 119:151-153
- Kelsey G, Monagle P, Barnes C (2006) Delayed diagnosis of congenital factor IX deficiency (Christmas disease) in a girl with Turner's Syndrome. *Clin Lab Haematol* 28:355-6
- Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI (1998) The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 26:216-9
- Kemp DJ, Smith DB, Foote SJ, Samaras N, Peterson MG (1989) Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2423-7
- Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1075-82

- Kochhan L, Lalloz MR, Oldenburg J, McVey JH, Olek K, Brackmann HH, Tuddenham EG, Schwaab R (1994) Haemophilia A diagnosis by automated fluorescent DNA detection of ten factor VIII intron 13 dinucleotide repeat alleles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5:497-501
- Kokkali G, Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Jones GM, Cram D, Stavrou D, Trounson A, Kanavakis E, Pantos K (2005) Moving towards blastocyst biopsy: trophectoderm biopsy of B-thalassemia. Paper presented at Sixth International Symposium on Preimplantation Genetics. London, England, may
- Kopelman H, Durie P, Gaskin K, Weizman Z, Forstner G (1985) Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 312:329-34
- Kopito LE, Kosasky HJ, Shwachman H (1973) Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril* 24:512-6
- Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, Angastiniotis M, Georgiou D, Kukhareno V, *et al.* (1998) Preimplantation diagnosis of thalassemias. *J Assist Reprod Genet* 15:219-25
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y (2003) Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 6:54-9
- Kuliev A, Rechitsky S, Laziuk K, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Verlinsky Y (2006) Pre-embryonic diagnosis for Sandhoff disease. *Reprod Biomed Online* 12:328-33
- Kuliev A, Verlinsky Y (2008) Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications. *Reprod Biomed Online* 16:532-8
- Kurachi K, Davie EW (1982) Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:6461-4

## L

- Lalloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham EG (1991) Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 338:207-11
- Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG (1994) Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 86:804-9
- Levinson G, Fields RA, Harton GL, Palmer FT, Maddalena A, Fugger EF, Schulman JD (1992) Reliable gender screening for human preimplantation embryos, using multiple DNA target-sequences. *Hum Reprod* 7:1304-13
- Li HH, Gyllensten UB, Cui XF, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335:414-7
- Lledó B, Ten J, Galan FM, Bernabeu R (2006) Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using multiple displacement amplification. *Fertil Steril* 86:949-55

Lledó B, Bernabeu R, Ten J, Galan FM, Cioffi L (2007) Preimplantation genetic diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy with gender determination using multiple displacement amplification. *Fertil Steril* 88:1327-33

## M

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F, Fasolino MC (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod* 19:1163-9

Mann KG (1999) Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 82:165-74

McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, Gee AJ, De Boer KA, Jansen RP (2008) Blastocyst trophectoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations. *Prenat Diagn* 28:434-42

Mendel G (1865) Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*:1-47

Migeon BR, Kennedy JF (1975) Evidence for the inactivation of an X chromosome early in the development of the human female. *Am J Hum Genet* 27:233-9

Monk M (1988) Genomic imprinting. *Genes Dev* 2:921-5

Morral N, Estivill X (1992) Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. *Genomics* 13:1362-4

Morral N, Girbau E, Zielenski J, Nunes V, Casals T, Tsui LC, Estivill X (1992) Dinucleotide (CA/GT) repeat polymorphism in intron 17B of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Hum Genet* 88:356

Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M, Jr., *et al.* (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 7:169-75

Moutou C, Gardes N, Viville S (2004a) New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. *Eur J Hum Genet* 12:1007-14

Moutou C, Gardes N, Viville S (2004b) Duplex, triplex and quadruplex PCR for the preimplantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis (CF), an exhaustive approach. *Prenat Diagn* 24:562-9

Mujezinovic F, Alfirevic Z (2007) Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 110:687-94

Munne S, Weier HU, Stein J, Grifo J, Cohen J (1993) A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 10:82-90

Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64:382-91

Munne S, Marquez C, Magli C, Morton P, Morrison L (1998) Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol Hum Reprod* 4:863-70

Munne S (2002) Preimplantation genetic diagnosis of numerical and structural chromosome abnormalities. *Reprod Biomed Online* 4:183-96

Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J (2002) Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* 4:223-32

Munne S, Cohen J (2004) The status of preimplantation genetic diagnosis in Japan: a criticism. *Reprod Biomed Online* 9:258-9

Munne S, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J, Cram D, Kahraman S, Verlinsky Y, *et al.* (2007) Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil Steril* 88:781-4

## N

Navidi W, Arnheim N (1991) Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis. *Hum Reprod* 6:836-49

Nilsson I (1994) Hemophilia. Pharmacia, Malmö, Sweden

## O

Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, Benet J, Navarro J (2008) Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: Case Report. *Hum Reprod*

Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J, Navarro J (2009) Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 91:933 e1-7

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-70

## P

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-8

- Papanikolaou EG, Pozzobon C, Kolibianakis EM, Camus M, Tournaye H, Fatemi HM, Van Steirteghem A, Devroey P (2006) Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 85:112-20
- Paunio T, Reima I, Syvanen AC (1996) Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, PCR amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. *Clin Chem* 42:1382-90
- Paynton C, Sarkar G, Sommer SS (1991) Identification of mutations in two families with sporadic hemophilia A. *Hum Genet* 87:397-400
- Peake I (1993) Detection of carriers and prenatal diagnosis of bleeding disorders. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 24 Suppl 1:37-40
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) (2004) Guidelines for good practice in PGD. *Reprod Biomed Online* 9:430-4
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) (2008) Guidelines for good practice in PGD: programme requirements and laboratory quality assurance. *Reprod Biomed Online* 16:134-47
- Pickering S, Polidoropoulos N, Caller J, Scriven P, Ogilvie CM, Braude P (2003) Strategies and outcomes of the first 100 cycles of preimplantation genetic diagnosis at the Guy's and St. Thomas' Center. *Fertil Steril* 79:81-90
- Pierce KE, Rice JE, Sanchez JA, Brenner C, Wangh LJ (2000) Real-time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomeres. *Mol Hum Reprod* 6:1155-64
- Pierce KE, Rice JE, Sanchez JA, Wangh LJ (2003) Detection of cystic fibrosis alleles from single cells using molecular beacons and a novel method of asymmetric real-time PCR. *Mol Hum Reprod* 9:815-20
- Pillet N, Schorderet DF (1994) Diagnosis using PCR: the indirect approach. *Schweiz Rundsch Med Prax* 83:599-603
- Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, Wells D (2001) A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn* 21:223-32
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D (2003) Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 9:411-20
- Plachot M, de Grouchy J, Junca AM, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, Cohen J (1988) Chromosome analysis of human oocytes and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance? *Hum Reprod* 3:125-7
- Poustka A, Dietrich A, Langenstein G, Toniolo D, Warren ST, Lehrach H (1991) Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8302-6

Pujol A, Durban M, Benet J, Boiso I, Calafell JM, Egozcue J, Navarro J (2003) Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction* 126:701-11

Pujol A, Benet J, Staessen C, Van Assche E, Campillo M, Egozcue J, Navarro J (2006) The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduction* 131:1025-35

Purrello M, Alhadeff B, Esposito D, Szabo P, Rocchi M, Truett M, Masiarz F, Siniscalco M (1985) The human genes for hemophilia A and hemophilia B flank the X chromosome fragile site at Xq27.3. *Embo J* 4:725-9

## R

Ratjen F, Doring G, Nikolaizik WH (2001) Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 358:983-4

Ratjen F, Doring G (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* 361:681-9

Ratjen F (2007) New pulmonary therapies for cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 13:541-6

Ray PF, Winston RM, Handyside AH (1996) Reduced allele dropout in single-cell analysis for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *J Assist Reprod Genet* 13:104-6

Ray PF, Harper JC, Ao A, Taylor DM, Winston RM, Hughes M, Handyside AH (1999) Successful preimplantation genetic diagnosis for sex Link Lesch--Nyhan Syndrome using specific diagnosis. *Prenat Diagn* 19:1237-41

Rechitsky S, Freidine M, Verlinsky Y, Strom CM (1996) Allele dropout in sequential PCR and FISH analysis of single cells (cell recycling). *J Assist Reprod Genet* 13:115-24

Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharenko V, Kuliev A, Verlinsky Y (1998) Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 15:253-7

Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharenko V, Kuliev A, Verlinsky Y (1999) Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 16:192-8

Rechitsky S, Verlinsky O, Amet T, Rechitsky M, Kouliev T, Strom C, Verlinsky Y (2001) Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Mol Cell Endocrinol* 183 Suppl 1:S65-8

Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Ozen S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlinsky Y (2002) Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod Biomed Online* 5:148-55

Rechitsky S, Kuliev A, Sharapova T, Laziuk K, Ozen S, Barsky I, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Verlinsky Y (2006) Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 12:89-100



- Renbaum P, Brooks B, Kaplan Y, Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Levy-Lahad E, Altarescu G (2007) Advantages of multiple markers and polar body analysis in preimplantation genetic diagnosis for Alagille disease. *Prenat Diagn* 27:317-21
- Renwick P, Ogilvie CM (2007) Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diagn* 7:33-43
- Renwick PJ, Trussler J, Ostad-Saffari E, Fassihi H, Black C, Braude P, Ogilvie CM, Abbs S (2006) Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping--a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online* 13:110-9
- Renwick PJ, Lewis CM, Abbs S, Ogilvie CM (2007) Determination of the genetic status of cleavage-stage human embryos by microsatellite marker analysis following multiple displacement amplification. *Prenat Diagn* 27:206-15
- Rice JE, Sanchez JA, Pierce KE, Wangh LJ (2002) Real-time PCR with molecular beacons provides a highly accurate assay for detection of Tay-Sachs alleles in single cells. *Prenat Diagn* 22:1130-4
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-73
- Roberts HR (1993) Molecular biology of hemophilia B. *Thromb Haemost* 70:1-9
- Roberts LJ, Baldwin TM, Speed TP, Handman E, Foote SJ (1999) Chromosomes X, 9, and the H2 locus interact epistatically to control Leishmania major infection. *Eur J Immunol* 29:3047-50
- Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid DJ, *et al.* (1994) Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 3:1035-9
- Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM (2001) STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucl. Acids Res.* 29:320-322

## S

- Sacchetti L, Calcagno G, Coto I, Tinto N, Vuttariello E, Salvatore F (1999) Efficiency of two different nine-loci short tandem repeat systems for DNA typing purposes. *Clin Chem* 45:178-83
- Sadler J, Davie E (1994) Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand disease. In: *The molecular basis of blood diseases*. Saunders Co, pp 680-697
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4

- Salvado C, Cram D (2007) Microarray technology for mutation analysis of low-template DNA samples. *Methods Mol Med* 132:153-73
- Sanchez-Garcia JF, Benet J, Gutierrez-Mateo C, Luis Seculi J, Monros E, Navarro J (2005a) Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol Hum Reprod* 11:463-8
- Sanchez-Garcia JF, Gallardo D, Ramirez L, Vidal F (2005b) Multiplex fluorescent analysis of four short tandem repeats for rapid haemophilia A molecular diagnosis. *Thromb Haemost* 94:1099-103
- Sanchez-Garcia JF, Gallardo D, Navarro J, Marquez C, Gris JM, Sanchez MA, Altisent C, Vidal F (2006) A versatile strategy for preimplantation genetic diagnosis of haemophilia A based on F8-gene sequencing. *Thromb Haemost* 96:839-45
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munne S (2001) Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 16:1954-8
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S (2008) Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril*
- Sermon K, De Vos A, Van de Velde H, Seneca S, Lissens W, Joris H, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I (1998a) Fluorescent PCR and automated fragment analysis for the clinical application of preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy (Steinert's disease). *Mol Hum Reprod* 4:791-6
- Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I (1998b) Preimplantation diagnosis for Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat Diagn* 18:1427-36
- Sermon K (2002) Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 8:11-20
- Sermon K, De Rijcke M, Lissens W, De Vos A, Platteau P, Bonduelle M, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I (2002) Preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease with exclusion testing. *Eur J Hum Genet* 10:591-8
- Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I (2004) Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 363:1633-41
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, *et al.* (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod* 20:19-34
- Sermon KD, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K, *et al.* (2007) ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 22:323-36
- Shebl O, Ebner T, Sommergruber M, Sir A, Urdl W, Tews G (2007) [Multiple pregnancies after ART: problems and possible solutions]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 47:3-8

- Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, DiSepio D, Hughes MR (1994) Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6181-5
- Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, Sermon K (2006) Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. *Hum Mutat* 27:496-503
- Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, Wiemer KE, Cohen J (2008) A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 17:360-7
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2004) Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 19:2849-58
- Steffann J, Frydman N, Gigarel N, Bulet P, Ray PF, Fanchin R, Feyereisen E, Kerbrat V, Tachdjian G, *et al.* (2006) Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet* 43:244-7
- Stern HJ, Harton GL, Sisson ME, Jones SL, Fallon LA, Thorsell LP, Getlinger ME, Black SH, Schulman JD (2002) Non-disclosing preimplantation genetic diagnosis for Huntington disease. *Prenat Diagn* 22:503-7
- Strom CM, Verlinsky Y, Milayeva S, Evsikov S, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Ginsberg N, *et al.* (1990) Preconception genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 336:306-7
- Strom CM, Rechitsky S, Wolf G, Cieslak J, Kuliev A, Verlinsky Y (1998) Preimplantation diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa using two simultaneous single cell assays for a point mutation in the rhodopsin gene. *Mol Hum Reprod* 4:351-5

## T

- Taylor AC, Sherwin WB, Wayne RK (1994) Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Mol Ecol* 3:277-90
- Tedgard U (1998) Carrier testing and prenatal diagnosis of haemophilia--utilisation and psychological consequences. *Haemophilia* 4:365-9
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-25
- Thornhill AR, Snow K (2002) Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J Mol Diagn* 4:11-29

- Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, *et al.* (2005) ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 20:35-48
- Tomi D, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Eckhold J, Schopper B, Al-Hasani S, Diedrich K, Schwinger E (2005) Polar body diagnosis for hemophilia a using multiplex PCR for linked polymorphic markers. *J Histochem Cytochem* 53:277-80
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, *et al.* (1984) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 312:342-7
- Tracey M (2001) Short tandem repeat-based identification of individuals and parents. *Croat Med J* 42:233-8
- Tsui LC, Rommens J, Kerem B, Rozmahel R, Zielenski J, Kennedy D, Markiewicz D, Plavsic N, Chou JL, *et al.* (1991) Molecular genetics of cystic fibrosis. *Adv Exp Med Biol* 290:9-17; discussion 17-8
- Tsuji S (1997) Molecular genetics of triplet repeats: unstable expansion of triplet repeats as a new mechanism for neurodegenerative diseases. *Intern Med* 36:3-8

## V

- van den Berg HM, Fischer K, Mauser-Bunschoten EP, Beek FJ, Roosendaal G, van der Bom JG, Nieuwenhuis HK (2001) Long-term outcome of individualized prophylactic treatment of children with severe haemophilia. *Br J Haematol* 112:561-5
- Vandervorst M, Staessen C, Sermon K, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Bonduelle M, Vanderfaellie A, Lissens W, *et al.* (2000) The Brussels' experience of more than 5 years of clinical preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update* 6:364-73
- Varilo T, Laan M, Hovatta I, Wiebe V, Terwilliger JD, Peltonen L (2000) Linkage disequilibrium in isolated populations: Finland and a young sub-population of Kuusamo. *Eur J Hum Genet* 8:604-12
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM (1992) Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 12:103-10
- Verlinsky Y, Kuliev A (1994) Human preimplantation diagnosis: needs, efficiency and efficacy of genetic and chromosomal analysis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 8:177-96
- Verlinsky Y (1996) Preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 13:87-9
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Ivachnenko V, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Borkowski A, *et al.* (1999) Prepregnancy testing for single-gene disorders by polar body analysis. *Genet Test* 3:185-90

- Verlinsky Y, Kuliev A (2000) Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. Parthenon, NY, London
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A (2001) Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *Jama* 285:3130-3
- Verlinsky Y, Kuliev A (2002) Preimplantation diagnosis for diseases with genetic predisposition and nondisease testing. *Expert Rev Mol Diagn* 2:509-13
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Kenigsberg D, Moshella J, Ivakhnenko V, Masciangelo C, Strom C, Kuliev A (2002a) Polar body-based preimplantation diagnosis for X-linked disorders. *Reprod Biomed Online* 4:38-42
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Masciangelo C, Lederer K, Kuliev A (2002b) Preimplantation diagnosis for early-onset Alzheimer disease caused by V717L mutation. *Jama* 287:1018-21
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Ozen S, Sharapova T, Masciangelo C, Morris R, Kuliev A (2003) Preimplantation diagnosis for sonic hedgehog mutation causing familial holoprosencephaly. *N Engl J Med* 348:1449-54
- Verlinsky Y, Kuliev A (eds) (2005) Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis. Taylor and Francis, London and New York
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Kuliev A (2005a) Preimplantation diagnosis for homeobox gene HLXB9 mutation causing Currarino syndrome. *Am J Med Genet A* 134:103-4
- Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukharensko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, Kuliev A (2005b) Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 10:105-10
- Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D (2000) Factor IX gene sequencing by a simple and sensitive 15-hour procedure for haemophilia B diagnosis: identification of two novel mutations. *Br J Haematol* 111:549-51
- Vidal F, Farssac E, Altisent C, Puig L, Gallardo D (2001) Rapid hemophilia A molecular diagnosis by a simple DNA sequencing procedure: identification of 14 novel mutations. *Thromb Haemost* 85:580-3
- Viswambharan N, Suganthi R, Simon AM, Manonayaki S (2007) Male infertility: polymerase chain reaction-based deletion mapping of genes on the human chromosome. *Singapore Med J* 48:1140-2
- Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 19:846-51
- Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Palmer G, Sofocleous C, Kanavakis E (2004) Real-time PCR for single-cell genotyping in sickle cell and thalassemia syndromes as a rapid, accurate, reliable, and widely applicable protocol for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Mutat* 23:513-21

**W**

- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* 6:3543-57
- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res* 24:2807-12
- Wells D, Sherlock JK (1998) Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn* 18:1389-401
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 27:1214-8
- Wells D, Delhanty JD (2000) Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 6:1055-62
- Wells D, Delhanty JD (2001) Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 7:23-30
- Wells D, Alfarawati S, Fragouli E (2008) Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 14:703-10
- White A, Tomfohrde J, Stewart E, Barnes R, Le Paslier D, Weissenbach J, Cavalli-Sforza L, Farrer L, Bowcock A (1993) A 4.5-megabase yeast artificial chromosome contig from human chromosome 13q14.3 ordering 9 polymorphic microsatellites (22 sequence-tagged sites) tightly linked to the Wilson disease locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10105-9
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J (2003) Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 80:860-8
- Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC (2009) The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod*
- Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM (1985) Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 317:726-9
- Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, *et al.* (1984) Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312:330-7

**Y**

- Yip B, Chan V, Chan TK (1994) Intragenic dinucleotide repeats in factor VIII gene for the diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 88:889-91

---

Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K (1985) Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 24:3736-50

## Z

Zadori J, Kozinszky Z, Orvos H, Katona M, Pal A, Kovacs L (2003) Dilemma of increased obstetric risk in pregnancies following IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 20:216-21

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5847-51

Zielenski J, Markiewicz D, Rininsland F, Rommens J, Tsui LC (1991a) A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Am J Hum Genet* 49:1256-62

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC (1991b) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10:214-28

