

**Estudi citogenètic del primer corpuscle polar
d'oòcits d'hàmsster i d'humans:
diagnòstic genètic preimplantacional
mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar**



Tesi doctoral

Mercè Durban Llenas

**Dra. Joaquina Navarro Ferreté - Dr. Jordi Benet Català
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona**

2008

*Memòria presentada per **Mercè Durban Llenas**, llicenciada en Ciències Biològiques per la Universitat de Barcelona, per aspirar al grau de doctora en Biologia Cel·lular per la Universitat Autònoma de Barcelona.*

Bellaterra, gener de dos mil vuit

Mercè Durban Llenas

- pàg. en blanc -

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,

CERTIFIQUEN:

*Que **Mercè Durban Llenas** ha realitzat sota la nostra direcció, a la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica de la Facultat de Medicina, el treball de recerca que, per optar al grau de doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona en el Programa de Biologia Cel·lular, presenta amb el títol següent:*

***Estudi citogenètic del primer corpuscle polar
d'òocits d'hàmmster i d'humans:
diagnòstic genètic preimplantacional
mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar***

Bellaterra, gener de dos mil vuit

Dra. Joaquina Navarro i Ferreté

Dr. Jordi Benet i Català

La realització del present treball ha estat possible gràcies a l'aportació econòmica de la Fundació Catalana Síndrome de Down - Fundació Marató TV3 (1994-1998), així com del Fons d'Investigació Sanitària (FIS 98/0031-02, 1998-2000) i de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (Grup de Recerca de Citogenètica Bàsica i Clínica: 1995 SGR-00478, 1997-SGR-0030, 1999 SGR-00104 i 2001 SGR-00201).

Des d'octubre de 1994 fins a octubre de 1998 la Mercè Durban Llenas ha estat beneficiària d'una beca assignada al sub-projecte titulat:

Diagnòstic pre-concepcional de la síndrome de Down en oòcits humans mitjançant l'anàlisi citogenètica molecular del primer corpuscle polar

Investigador responsable: *Dra. Joaquima Navarro i Ferreté*

Professora titular: *Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, UAB*

Investigador col·laborador *Dr. Jordi Benet i Català*

Professor titular: *Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, UAB*

Investigador postgraduat: *Mercè Durban i Llenas*

Estudiant 3º cicle: *Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, UAB*

Sub-projecte 4 del projecte:

Origen, mecanismes i detecció pre-concepcional de la no-disjunció de la Síndrome de Down

Investigador principal: *Dr. Josep Egozcue i Cuixart*

Professor catedràtic: *Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, UAB*

Fundació Catalana Síndrome de Down – Fundació Marató TV3–

Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, UAB

La redacció de la memòria de la tesi doctoral ha estat corregida pel Gabinet de Llengua Catalana de la UAB.

- pàg. en blanc -

Agraïments

El maig de 1993 vaig assistir a un curs teòric sobre “El Laboratori de Reproducció Assistida” organitzat per el Col·legi Oficial de Biòlegs de Catalunya, l’Institut Dexeus i la Universitat Autònoma de Barcelona, va ser el meu primer contacte amb el món de la citogenètica i la FIV i vaig sentir parlar per primera vegada a persones que després he tingut molt a prop. En concret vaig demanar una entrevista al Dr. Josep Egozcue i Cuixart. Em va rebre amb les portes obertes al seu despatx de la Unitat de Biologia de Ciències i em va oferir assistir d’oient a les seves classes de Citogenètica. També arran de l’entrevista amb el Dr. Egozcue vaig assistir al meu primer congrés de reproducció, el Fertilidad’93 (ens van regalar un clauer que encara utilitzo per portar les claus del Laboratori...). En un dinar d’aquell congrés vaig seure a taula amb el Dr. Egozcue i la Montse Boada i recordo que parlaven del inicis de l’ICSI... També a través del Dr. Egozcue, vaig conèixer a la Dra. Joaquina Navarro (Quima) i al Dr. Jordi Benet, que després serien els meus directors de tesi. Així doncs, el desembre de 1993 vaig posar els peus per primera vegada a la Unitat de Biologia de Medicina... la Quima estava “tancada” a la cambra fosca positivament cromosomes de primer corpuscle polar d’hàmsster...!

El 1993 vaig fer la meua primera assistència a una lectura de tesi doctoral del Departament va ser a la de la Lídia Cusidó, després he assistit a moltes!!! l’última la de la Imma Ponsa el 4 de febrer. Ara em toca a mi!!! I després a la Piedad, Jorge...

El Març de 1994 vaig començar la meua estada a la Unitat. El primer que vaig fer va ser ajudar als meus futurs “jefes” en el redactat del projecte de la marató de TV3 sobre la Síndrome de Down.

El 1995 vaig anar a presentar el nostre primer pòster al meu primer congrés de la tesi... a San Lorenzo del Escorial, recordo que hi vam anar amb la Quima, Jordi, Pi, Rosa, Olga, Pere....

Són molts anys i records compartits amb els primers companys de tesi (Rosa M., Ivan, M^a Àngels, Maria, Ricard, Laura T., Carmen, Piedad, Olga, Pere, Imma, Maria.O, Cristina, Jorge, Aïda, Ignasi ...) i també amb l’Àngels, Ana i els diferents “jefes de doctorants” (Montse, Quima, Jordi, Cristina, Carme, Rosa, Anna), moments bons i dolents que té la recerca, amics invisibles, sopars de tesi, calçotades i demés!

El 1998 ens van publicar el nostre primer article, quina alegria!

El 1995 vaig assistir a curs sobre micromanipulació on vaig tenir l’oportunitat de conèixer en Joan Sarquella. Uns dies més tard va venir a la unitat a demanar a la Quima si podia practicar l’ICSI en el nostre micromanipulador i tot i que l’entrada va ser dolenta, a partir d’aquí vam establir una molt bona relació d’amistat. En Joan em va ensenyar els passos de la FIV...

El 1996 vaig començar a treballar en el món de la FIV humana amb en Joan Sarquella... a la CRAS (amb el Dr. Pous-Ivern, JM^a Gely i l’Anna Rabanal) i també anant a Pamplona (on vaig conèixer en Toño

Lara, Tito, Toño Laiz, Mertxe, Yolanda, Edurne...! El 1998 vaig començar sola a Lleida (el meu primer laboratori de FIV) i des del 25 d'abril del 2000 estic treballant a EUGIN com a responsable de laboratori. A EUGIN vam començar pocs però ara som molts: "jefes" (Dr.Coll i Dr.Reverter), gines (Ricard, Dani's, Marta's, Anna's, Juanjo, Carolina...), biòlegs (Sara, Aïda, M^a José, Gerard, Ariadna, Anna, M^a Angeles, Cristina), tècnics (Montse, Rebeca, Patricia, Laura, Raquel, Maria), Coralie, Bàrbara, Gabriela, Andrés, Laia, Griselda, Lidia, "tècnics de superfície", coordinadores, traductors, atenció al client, infermeres, recepcionistes, anestesistes.... i molt més)

Gràcies a totes les persones que han col·laborat en algun moment en aquesta tesi!!

- Metges, biòlegs i col·laboradors que han participat amb l'aportació del material amb el qual hem pogut fer aquesta tesi: Joan Sarquella, Anna Veiga, Montse Boada, Itziar Belil, Fernando Marina, Esther Fernández, Dolors Company, Marta Carrera, Lluís Cabero, Marta Lafont, J.M^a Lailla, J M^a Calafell, JJ. Espinós, Fundació Catalana Síndrome de Down, Vicenç Català i la Marga Nadal per permetrem veure per primera vegada una extensió de "polar body" en el seus, aleshores, flamants MetaSystems y CytoVision, respectivament. Gràcies a la Carmen de Izasa pel seu incondicional suport durant els casos de PGD...

- Companys de tesi i de feina!!!!

- Últim tram de la tesi: a la Maria Oliver pel 14 de desembre, dia clau per l'últim esprint, a la Imma per compartir i patir el final de les nostres tesis, a la Dra. Laura Marques (per fer d'informador extern de la tesi, tant ràpid!), a les persones de Escola de Postgrau (Marta Vila, Mateu i Raquel), secretaris i director del Departament (Ernesto, Maica: corregint a últim moment un informe per poder dipositar la tesi el 21/01/08, Lluís Tort), conserges de la Facultat de Medicina, Servei de Llengües (Francesc Galera i Josep Maria Nin), Centre de Visió per Computador (Raquel amb els últims retocs en el disseny de la portada...), i com no, a la Quima i el Jordi amb les ultimes decisions i correccions!!

- Impressió tesi: al Xevi per la primera impressió a doble cara de la tesi (quina bogeria), a la M^a Àngels i al meu pare per les diverses impressions i enquadernacions de la tesi aquest últim mes i també la impressió final!!!

- Membres del tribunal i suplents: Montse Garcia, Fanny Vidal, Laura Marquès, Olga Martinez-Passarell, Ricard Vidal, Mark Grossmann i Fernando Marina.

- Als meus amics que també han sentit parlar un munt de vegades de la tesi, alguns fins i tot es pensen que la tinc "com que fa tant..": Mire, Núria, Jordi, Joan, Sílvia, Rafa, Elena...

- Al David: un any abans d'iniciar els meus passos per la UAB vaig conèixer el David, el qual no vaig retrobar fins l'any 2001. Aleshores va sentir a parlar per primera vegada de la meva tesi! Sempre l'havia

de llegir abans de...: *anar a viure junts* (2002), *casar-nos* (2003), *quedar-me embarassada* (2004), *néixer el BERNAT* (2005) i *ara per fi l'acabo* (2008)!

- Gràcies "xini" per aquest anys de "patir" tu també la tesi i hores que no hem compartit, sobre tots aquests últims mesos!

- Gràcies a la meva family *mama, papa i xevi!!!!* Gràcies per estar sempre amb mi, us estimo moltíssim!

- Gràcies també Bernat, per tenir-te i per les hores que no t'he pogut dedicar fent la tesi! Perdona'm, algun dia ho entendràs!

- Gràcies Mario i gràcies Oriol per la vostra paciència aquests últims mesos.

- Gràcies Josep Egozcue

- Gràcies Quima i Jordi!!! Han estat un munt de "estira i arronses" però al final entre tots ho hem ACONSEGUIT!!

Bob el Manetes (Ens en sortirem? Sí, i tant)

Mercè

A la meva família: pares, germà, David i Bernat!

***Dedico especialment aquesta tesi a
l'estimat Dr. Josep Egozcue i Cuixart
que ens va haver de deixar el
set de febrer de dos mil sis***

- pàg. en blanc -

Índex



Índex de figures	pàg. xxiii
Índex de taules	pàg. xxxi
Abreviatures	pàg. xxxv
Capítol 1: introducció	pàg. 1
1.1 Bases biològiques de la reproducció humana	pàg. 3
1.2 Citogenètica de la reproducció humana	pàg. 10
1.2.1 Espermatogènesi	pàg. 12
1.2.2 Oogènesi	pàg. 18
1.3 Reproducció humana assistida (RHA)	pàg. 21
1.4 Anomalies cromosòmiques estructurals	pàg. 28
1.4.1 Translocacions robertsonianes	pàg. 29
1.4.2 Translocacions recíproques	pàg. 32
1.5 Anomalies cromosòmiques numèriques	pàg. 35
1.5.1 Alteració del nombre de complements cromosòmics (poliploïdia)	pàg. 35
1.5.2 Alteració del nombre de cromosomes de la dotació cromosòmica (aneuploïdia)	pàg. 36
1.5.3 Mecanismes i etiologia d'aneuploïdia en òcits humans	pàg. 36
1.6 Incidència d'anomalies cromosòmiques a la població humana, risc a la descendència i diagnòstic genètic	pàg. 37
1.6.1 Tècniques de fixació	pàg. 37
1.6.2 Freqüència d'anomalies cromosòmiques en gàmetes humans	pàg. 37
1.6.3 Freqüència d'anomalies cromosòmiques en embarassos	pàg. 38
1.6.4 Indicacions de població de risc de tenir descendència amb anomalies cromosòmiques	pàg. 39
1.7 Diagnòstic prenatal	pàg. 40
1.8 Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) mitjançant blastòmer	pàg. 40
1.9 Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP)	pàg. 42
1.10 DGP-1CP en dones portadores de reorganitzacions cromosòmiques	pàg. 44
Capítol 2: hipòtesi de treball i objectius	pàg. 51
2.1 Hipòtesi de treball	pàg. 53
2.2 Objectius	pàg. 53
2.2.1 Posar a punt el mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP humà per a la seva anàlisi citogenètica amb hibridació in situ fluorescent (FISH)	pàg. 53
2.2.1.1 Posar a punt el mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP en un model animal (hàmsster)	pàg. 53
2.2.1.2 Adequar el mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP a òcits madurs humans control descartats de programes de fecundació in vitro (FIV)	pàg. 53
2.2.1.3 Posar a punt la tècnica de la FISH en 1CP d'òcits madurs humans	pàg. 53
2.2.2 Elaborar una sèrie control d'òcits humans i els corresponents 1CP per veure la complementarietat en parelles 1CP-metafase II mitjançant FISH	pàg. 53
2.2.3 Analitzar citogenèticament òcits immadurs i zigots humans anòmals que són rutinàriament descartats de cicles de FIV amb inseminació convencional	pàg. 53
2.2.4 Aplicar clínicament el DGP-1CP en dones portadores de translocacions equilibrades	pàg. 53

Capítol 3: material i mètodes	pàg. 55
3.1 Material biològic	pàg. 57
3.1.1 Òcits madurs d'hàmsster	pàg. 57
3.1.2 Òcits i zigots humans anòmals descartats de programes de fecundació in vitro (FIV)	pàg. 57
3.1.3 Aplicació del diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP) a casos clínics: dones portadores de translocacions estructurals	pàg. 59
3.2 Medis, enzims, reactius i solucions utilitzats en el material biològic d'hàmsster	pàg. 60
3.2.1 Medis i oli de parafina	pàg. 60
3.2.2 Enzims	pàg. 60
3.2.3 Reactius	pàg. 60
3.2.4 Solucions	pàg. 60
3.3 Medis, enzims, reactius i solucions utilitzats en el material biològic d'humà	pàg. 61
3.3.1 Medis i oli de parafina	pàg. 61
3.3.2 Enzims	pàg. 61
3.3.3 Reactius	pàg. 61
3.3.4 Solucions	pàg. 61
3.4 Mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques de l'1CP i de la metafase II (MII) de l'òcit madur d'hàmsster	pàg. 63
3.4.1 Obtenció d'òcits madurs d'hàmsster: estimulació ovàrica	pàg. 63
3.4.2 Recuperació d'òcits madurs d'hàmsster	pàg. 63
3.4.3 Aïllament de l'1CP d'òcits madurs d'hàmsster	pàg. 64
3.4.4 Obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP d'hàmsster	pàg. 66
3.4.4.1 Tractament previ dels portaobjectes	pàg. 66
3.4.4.2 Tractament hipotònic i fixació	pàg. 66
3.4.5 Extensions cromosòmiques de l'MII dels òcits d'hàmsster	pàg. 67
3.4.6 Observació i anàlisi citogenètica d'extensions cromosòmiques: tinció uniforme amb colorant Leishman	pàg. 67
3.5 Mètode d'obtenció d'òcits i zigots humans	pàg. 69
3.5.1 Cicles de FIV humana	pàg. 69
3.5.2 Recuperació d'òcits humans en cicles de FIV	pàg. 69
3.5.3 Inseminació d'òcits humans en cicles de FIV	pàg. 70
3.5.3.1 Processat de la mostra de semen	pàg. 70
3.5.3.2 FIV per inseminació convencional	pàg. 71
3.5.3.3 Observació morfològica de la fecundació en cicles de FIV	pàg. 71
3.5.3.4 FIV amb microinjecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide (FIV-ICSI)	pàg. 73
3.5.4 Aïllament de l'1CP d'òcits madurs humans descartats de programes de FIV	pàg. 76
3.5.4.1 Digestió enzimàtica de la zona pel·lúcida	pàg. 76
3.5.4.2 Biòpsia d'1CP per micromanipulació	pàg. 76
3.5.4.2.1 Mètode físic	pàg. 77
3.5.4.2.2 Mètode mecànic	pàg. 78
3.5.4.2.3 Mètode químic	pàg. 79
3.5.4.2.4 Aspiració	pàg. 79
3.5.4.2.5 Extrusió	pàg. 79
3.5.4.2.6 Desplaçament mitjançant flux de medi	pàg. 80
3.5.5 Obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP, òcits i zigots humans	pàg. 80
3.5.5.1 Extensions cromosòmiques d'1CP humà	pàg. 80
3.5.5.2 Extensions d'òcits i zigots humans	pàg. 80
3.5.5.3 Observació i captura d'extensions cromosòmiques humanes	pàg. 80
3.5.6 Anàlisi citogenètica d'hibridació in situ fluorescent (FISH) i observació microscòpica	pàg. 81

3.6	Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP) aplicat a casos clínics: dones portadores de translocacions robertsonianes i recíproques	pàg. 83
3.6.1	Protocol d'actuació	pàg. 83
3.6.1.1	Etapa A: parelles candidates	pàg. 83
3.6.1.2	Etapa B: estudi d'informativitat	pàg. 84
3.6.1.3	Etapa C: obtenció d'oòcits	pàg. 84
3.6.1.4	Etapa D: biòpsia i anàlisi de cèl·lules	pàg. 85
3.6.1.5	Etapa E: inseminació d'oòcits	pàg. 85
3.6.1.6	Etapa F: transferència embrionària	pàg. 85
3.6.1.7	Etapa G: anàlisi de cèl·lules descartades del cicle de DGP-1CP	pàg. 85
3.6.2	Translocacions equilibrades estudiades	pàg. 86
3.6.3	Estratègia de diagnòstic aplicada a cada cas clínic estudiat	pàg. 86
3.6.3.1	Dona amb cariotip 45,XX,der(14;21)(q10;q10)	pàg. 87
3.6.3.2	Dona amb cariotip 45,XX,der(13;14)(q10;q10)	pàg. 88
3.6.3.3	Dona amb cariotip 46,XX,t(4;12)(q22;q23)	pàg. 89
3.6.3.4	Dona amb cariotip 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	pàg. 90
3.6.3.5	Dona amb cariotip 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)	pàg. 91
3.6.3.6	Dona amb cariotip 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)	pàg. 92
3.6.4	Biòpsia de blastòmer per micromanipulació	pàg. 93
3.6.5	Anàlisi estadístic de la segregació preferent segons la freqüència de recombinació	pàg. 94

Capítol 4: resultats pàg. 95

4.1	Resultats metodològics	pàg. 99
4.1.1	Obtenció d'extensions cromosòmiques de primer corpuscle polar (1CP) d'oòcits madurs d'hàmmster: caracterització morfològica	pàg. 99
4.1.2	Obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP d'oòcits madurs humans descartats de programes de fecundació in vitro (FIV): caracterització morfològica	pàg. 102
4.2	Anàlisi de la complementarietat cromosòmica de l'1CP i la corresponent MII en oòcits madurs humans descartats de programes de FIV	pàg. 105
4.3	Obtenció d'extensions d'oòcits immadurs i zigots humans anòmals descartats de programes de FIV	pàg. 107
4.4	Anàlisi d'anomalies cromosòmiques numèriques en oòcits i zigots humans anòmals descartats de programes de FIV	pàg. 107
4.4.1	Oòcits humans aparentment immadurs descartats de programes de FIV (grup i)	pàg. 108
4.4.1.1	Oòcits humans no inseminats, aparentment immadurs, no posats a madurar in vitro (MIV)	pàg. 109
4.4.1.2	Oòcits humans no inseminats, aparentment immadurs i posats a MIV però que no havien assolit espontàniament l'estadi d'MII	pàg. 109
4.4.1.3	Oòcits humans aparentment no fecundats i immadurs, no posats a MIV	pàg. 111
4.4.1.4	Oòcits humans aparentment no fecundats i immadurs, posats a MIV però que no havien assolit espontàniament l'estadi d'MII	pàg. 112
4.4.2	Zigots humans anòmals descartats de programes de FIV (grup ii)	pàg. 113
4.4.2.1	Zigots humans > 2PN	pàg. 114
4.4.2.1.1	Zigots humans 3PN	pàg. 115
4.4.2.1.2	Zigots humans 4PN	pàg. 115
4.4.2.1.3	Zigots humans 5PN	pàg. 115
4.4.2.2	Zigots humans 1PN	pàg. 115
4.4.2.3	Zigots humans 2PN aturats	pàg. 116

4.5	Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP) en dones portadores de translocacions recíproques o robertsonianes	pàg. 117
4.5.1	DGP-1CP a dones portadores de translocacions robertsonianes	pàg. 117
4.5.1.1	Cas Dx-1(m): dona amb cariotip 45,XX, der(14;21)(q10;q10)	pàg. 121
4.5.1.1.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 121
4.5.1.1.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 121
4.5.1.1.3	Resultat de la fecundació	pàg. 121
4.5.1.1.4	Transferència embrionària	pàg. 122
4.5.1.2	Cas Dx-3(n): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)	pàg. 122
4.5.1.2.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 122
4.5.1.2.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 122
4.5.1.2.3	Resultat de la fecundació	pàg. 122
4.5.1.2.4	Transferència embrionària	pàg. 122
4.5.1.3	Cas Dx-4(p): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)	pàg. 123
4.5.1.3.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 123
4.5.1.3.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 123
4.5.1.3.3	Resultat de la fecundació	pàg. 124
4.5.1.3.4	Transferència embrionària	pàg. 124
4.5.1.4	Cas FJD-1(q): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)	pàg. 124
4.5.1.4.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 124
4.5.1.4.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 124
4.5.1.4.3	Resultat de la fecundació	pàg. 124
4.5.1.4.4	Transferència embrionària	pàg. 125
4.5.1.5	Cas Dx-5 (r): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)	pàg. 125
4.5.1.5.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 125
4.5.1.5.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 125
4.5.1.5.3	Resultat de la fecundació	pàg. 126
4.5.1.5.4	Transferència embrionària	pàg. 126
4.5.2	Cicles de DGP-1CP a dones portadores de translocacions recíproques	pàg. 126
4.5.2.1	Cas Dx-2(H): dona amb cariotip 46,XX,t(4;12)(q22;q23)	pàg. 129
4.5.2.1.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 129
4.5.2.1.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 129
4.5.2.1.3	Resultat de la fecundació	pàg. 129
4.5.2.1.4	Transferència embrionària	pàg. 130
4.5.2.2	Cas HCP-1(l): dona amb cariotip 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	pàg. 130
4.5.2.2.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 130
4.5.2.2.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 130
4.5.2.2.3	Resultat de la fecundació	pàg. 130
4.5.2.2.4	Transferència embrionària	pàg. 131
4.5.2.3	Cas HPC-2(J): dona amb cariotip 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)	pàg. 131
4.5.2.3.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 131
4.5.2.3.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 131
4.5.2.3.3	Resultat de la fecundació	pàg. 132
4.5.2.3.4	Transferència embrionària	pàg. 132
4.5.2.4	Cas HPC-3(K): dona amb cariotip 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)	pàg. 132
4.5.2.4.1	Resultat de l'obtenció d'òocits	pàg. 132
4.5.2.4.2	Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades	pàg. 132
4.5.2.4.3	Resultat de la fecundació	pàg. 133

4.5.2.4.4	Transferència embrionària	pàg. 133
4.5.3	Anàlisi de correlació: no-disjunció entre cromosomes i incidència de recombinació empírica de segregació	pàg. 133
4.6	Article 1	pàg. 137
4.7	Article 2	pàg. 145

Capítol 5: discussió pàg. 161

5.1	Caracterització dels complements cromosòmics de primer corpuscle polar (1CP)	pàg. 163
5.1.1	Oòcit d'hàmsster: procediment metodològic d'obtenció de cromosomes d'1CP	pàg. 163
5.1.2	Oòcit humà: adequació del procediment metodològic d'obtenció de cromosomes d'1CP	pàg. 164
5.1.2.1	Aïllament de l'1CP humà	pàg. 164
5.1.2.2	Tractament hipotònic per a l'1CP humà	pàg. 164
5.1.2.3	Procediment de fixació per a l'1CP humà	pàg. 164
5.1.2.4	Tractament previ del portaobjectes amb trimetoxisilà	pàg. 165
5.1.2.5	Tècnica d'anàlisi citogenètica per a l'1CP humà	pàg. 165
5.1.2.6	Aplicació clínica del mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP humà	pàg. 166
5.2	Aspecte del complement cromosòmic de l'MII i del corresponent 1CP	pàg. 167
5.2.1	Complement cromosòmic de l'MII	pàg. 167
5.2.2	Complement cromosòmic de l'1CP	pàg. 168
5.3	Estudi de la complementarietat cromosòmica de l'1CP i la corresponent MII d'oòcits madurs humans	pàg. 168
5.3.2	Complements cromosòmics i morfologia	pàg. 168
5.3.3	Estudis de complementarietat 1CP-MII: concordança, taxa d'aneuploidia global, taxa i tipus d'aneuploidia per al cromosoma 21 i per al cromosoma X	pàg. 169
5.4	Citogenètica d'oòcits aparentment immadurs i de zigots anòmals descartats de programes de FIV	pàg. 174
5.4.1	Oòcits humans aparentment immadurs (grup i)	pàg. 174
5.4.2	Zigots humans anòmals (grup ii)	pàg. 177
5.4.2.1	Zigots humans > 2PN	pàg. 178
5.4.2.1.1	Zigots humans 3PN	pàg. 179
5.4.2.1.2	Zigots humans 4PN	pàg. 181
5.4.2.1.3	Zigots humans 5PN	pàg. 181
5.4.2.2	Zigots humans 1PN	pàg. 181
5.4.2.3	Zigots 2PN humans aturats	pàg. 183
5.4.3	Cromosomes d'espermatozoide condensats prematurament (SPCC)	pàg. 183
5.5	Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP)	pàg. 184
5.5.2	Protocol d'aplicació del DGP-1CP a casos clínics	pàg. 184
5.5.1.1	Denudació dels oòcits	pàg. 184
5.5.1.2	Moment de fer la biòpsia de l'1CP i l'ICSI	pàg. 184
5.5.1.3	Mètode de biòpsia de l'1CP	pàg. 185
5.5.1.4	Biòpsia de l'1CP seguida de biòpsia de blastòmer	pàg. 186
5.5.1.5	Obtenció del complement cromosòmic de l'1CP	pàg. 187
5.5.2	DGP-1CP en dones portadores de reorganitzacions cromosòmiques: revisió de resultats	pàg. 187
5.5.3	Correlació entre la segregació cromosòmica preferent i la freqüència de recombinació meiótica	pàg. 197
5.5.4	Avantatges i desavantatges del DGP-1CP	pàg. 197
5.5.5	Consideracions sobre la regulació de les tècniques de reproducció assistida	pàg. 199

Capítol 6: conclusions pàg. 201

Capítol 7: bibliografia pàg. 205

Índex de figures

Portada: oòcit madur d'hàmsster després del tractament amb tripsina per eliminar la zona pel·lúcida, de manera que queden lliures el 1CP i la corresponent MII [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

Contraportada i entrada de l'índex i dels capítols: diversos 1CP d'hàmsster. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

En el capítol 2 no hi ha figures.

Capítol 1: introducció

Figura I-1. Espermatozoides d'humà, mostra d'ejaculat en fresc. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]	pàg. 3
Figura I-2. Oòcit immadur amb vesícula germinal (dictiotè de profase I) i oòcit madur (metafase II). [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]	pàg. 4
Figura I-3. Complex cúmul oòfor (CCO) humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]	pàg. 4
Figura I-4. Esquema de l'aparell reproductor femení [adaptat de Nilsson 1990 i www.educa.aragob.com]	pàg. 5
Figura I-5 - (a): CCO i espermatozoides humans. El resultat de la fecundació és el zigot. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x] (b): Espermatozoide humà unit la zona pel·lúcida de l'oòcit [Nilsson 1990] [microscopi electrònic]	pàg. 6
Figura I-6. Embrió preimplantacional humà amb dues cèl·lules o blastòmers. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]	pàg. 7
Figura I-7. Esquema de les quatre fases del cicle cel·lular: M, G1, S i G2. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 8
Figura I-8. Esquema comparatiu de les fases i durada d'aquestes en cicles cel·lulars normal i embrionari. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 8
Figura I-9. (a) blastocist expandit humà (aproximadament al 6è dia de cultiu in vitro). (b): blastocist humà sortint de La zona pel·lúcida (aproximadament al 7è dia de cultiu in vitro). [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]	pàg. 9
Figura I-10. Alternança de cicles haploides i diploides en la reproducció sexual. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 10
Figura I-11. (a): escrot de l'aparell reproductor masculí [adaptat de http://biologia.fciencias.unam.mx]. (b): esquema de la secció transversal d'un túbul seminífer de testicle de mamífer. (c): ampliació del revestiment epitelial intern d'un túbul seminífer [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 12
Figura I-12. Esquema de les diverses etapes de l'espermatogènesi. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 13
Figura I-13. Esquema de les diverses etapes de la divisió meiótica. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 14
Figura I-14. Esquema del curs temporal de la sinapsi i desinapsi cromosòmica durant la profase meiótica I. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 15
Figura I-15. Esquema d'un complex sinaptinomal que mostra els elements laterals i central del complex, i un nòdul de recombinació. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 16
Figura I-16. Esquema de l'aparellament de cromosomes homòlegs matern i patern durant el pas cap a la metafase de la divisió meiótica I. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 17
Figura I-17. Canvis en el nombre de cèl·lules germinals femenines (cèl·lules primordials, oogònies i oòcits primaris) [adaptat de Hassold i col·l. 1996]	pàg. 18
Figura I-18. Esquema de les diverses etapes de l'oogènesi. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]	pàg. 19
Figura I-19. Oòcit madur humà subjectat per la pipeta sostenidora i espermatozoide dins la pipeta de microinjecció moments previs a procedir a l'ICSI. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 24
Figura I-20. D + 1: oòcit madur fecundat o zigot 2PN humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 25
Figura I-21. Evolució del cultiu in vitro humà des del dia de la inseminació (D + 0) fins a l'estadi de blastocist expandit en fase d'eclosió de la zona pel·lúcida (ZP). [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 26
Figura I-22. Esquema del resultat del trencament de dos cromosomes diferents en fase G1 del cicle cel·lular. (a): cromosoma dicèntric. (b): fragment acèntric.	pàg. 28

Figura I-23. Esquema del resultat del trencament de dos cromosomes acrocèntrics per un braç diferent cadascun. (a): cromosoma derivatiu llarg. (b): cromosoma derivatiu curt.	pàg. 29
Figura I-24. Esquema del resultat del trencament de dos cromosomes acrocèntrics pel mateix braç. (a): cromosoma dicèntric. (b): fragment acèntric.	pàg. 30
Figura I-25. Esquema del resultat de les diferents segregacions del trivalent d'una translocació robertsoniana: 2:1 alternant, 2:1 adjacent i 3:0.	pàg. 31
Figura I-26. Esquema de les parts del cromosoma derivatiu: segment no translocat, segment intersticial i segment translocat.	pàg. 32
Figura I-27. Esquema de la figura del tetravalent en forma de creu i de les orientacions resultants de la configuració en anell (a-b) i en cadena (c-d), dependent del nombre de quiasmes.	pàg. 33
Figura I-28. Esquema de les diferents segregacions 2:2 del tetravalent d'una translocació recíproca: 2:2 alternant, 2:2 adjacent-1 i 2:2 adjacent-2.	pàg. 34
Figura I-29. Esquema de les possibles segregacions dels cromosomes implicats en una translocació robertsoniana en la gametogènesi d'una dona portadora. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 45
Figura I-30. Esquema de les possibles segregacions dels cromosomes implicats en una translocació recíproca en la gametogènesi d'una dona portadora. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 46
Figura I-31. Esquema de les fases des de la biòpsia i inseminació dels oòcits d'una dona portadora d'una translocació robertsoniana a la transferència dels embrions resultants de la inseminació d'oòcits normals i equilibrats. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 47
Figura I-32. Esquema de les fases des de la biòpsia i inseminació dels oòcits d'una dona portadora d'una translocació recíproca a la transferència dels embrions resultants de la inseminació d'oòcits normals i equilibrats. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 48

Capítol 3: material i mètodes

Figura M-1. (a): ovari d'hàster estimulat. (b): introducció de medi en un extrem de la l'ampul·la de l'oviducte mitjançant una xeringa amb agulla. (c): cúmul fora de l'ampul·la [estereomicroscopi]	pàg. 64
Figura M-2. (a): oòcit madur d'hàster dins del cúmul. (b): després del tractament amb hialuronidasa. [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 200x]	pàg. 64
Figura M-3. (a): oòcits madurs d'hàster sota l'efecte de la tripsina dissolent la ZP. (b): un oòcit després del tractament amb tripsina, en què queden lliures l'1CP i l'MII de l'oòcit [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 200x]	pàg. 65
Figura M-4. Biòpsia d'1CP d'oòcit madur d'hàster per dissolució parcial de la ZP mitjançant l'aplicació de solució d'àcid Tyrode. [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 200x]	pàg. 65
Figura M-5. Esquema del mètode d'aplicació de la solució fixadora sobre l'1CP envoltat de solució hipotònica.	pàg. 67
Figura M-6. Extensió cromosòmica d'una MII d'1CP d'oòcit d'hàster tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x]	pàg. 68
Figura M-7. Extensió cromosòmica d'una MII d'1CP d'hàster en paper fotogràfic, podem identificar per mida el cromosoma X (el més gran) i el cromosoma 21 (el més petit). [fotografia microscopi de camp clar 1000x]	pàg. 68
Figura M-8. Imatge ecogràfica d'un ovari humà sota l'efecte de l'hormona gonadotrofina fol·liculostimulant (FSH).	pàg. 69
Figura M-9. (a): localització dels CCO humans en els líquids fol·liculars sota control del estereomicroscopi. (b): CCO humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]	pàg. 70
Figura M-10. (a): preparació del gradient de densitat. (b): mostra de semen en fresc. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 70
Figura M-11. (a): incubador de cultiu. (b): CCO humà. (c): espermatozoides d'humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]	pàg. 71

- Figura M-12. Observació morfològica de la fecundació (a) fecundació normal (zigot 2PN); (b-d) no fecundació i (e-f) fecundació anòmala. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman i de Nomarski 400x] pàg. 72
- Figura M-13. (a): CCO humà. (b): el mateix oòcit després del seu tractament amb hialuronidasa. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x] pàg. 73
- Figura M-14. Preparació de la placa d'ICSI amb PVP. pàg. 74
- Figura M-15. Microscopi invertit amb micromanipuladors i imatge que visualitza la inseminació per ICSI d'un oòcit madur humà a 400x. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x] pàg. 74
- Figura M-16. Fases de l'ICSI. (a): recuperació d'un espermatozoide amb la micropipeta d'ICSI. (b): subjecció de l'oòcit amb la micropipeta sostenidora. (c): penetració en el citoplasma. (d): descarrega de l'espermatozoide en el citoplasma. (e): retirada de la micropipeta d'ICSI. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x] pàg. 75
- Figura M-17. (a): esquema del mètode físic de biòpsia d'1CP mitjançant l'ús de làser. (b): aspecte de la ZP després del tractament. [microscopi invertit amb òptica de contrast de fases 400x] pàg. 77
- Figura M-18. (a): esquema del mètode mecànic de biòpsia d'1CP mitjançant fricció. (b): imatges del mètode de biòpsia [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 400x] pàg. 78
- Figura M-19. Esquema del mètode químic de biòpsia d'1CP mitjançant la dissolució parcial de la ZP amb solució d'àcid Tyrode a 400x. pàg. 79
- Figura M-20. Extensió d'MII d'1CP humà. [microscopi de contrast de fases 400x, imatge digital] pàg. 80
- Figura M-21. Complementos cromosòmics complementaris d'1CP (a) i d'oòcit MII (b) humans, hibridats amb una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd) i una sonda de locus específica per al cromosoma 21 (vermell) [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 83
- Figura M-22. Representació gràfica de la translocació robertsoniana 45,XX,der(14;21)(q10;q10). (a): sonda per a cromosoma sencer (WCP) per als cromosomes 14 i 21. (b): hibridació amb les sondes aplicades sobre una extensió cromosòmica de limfòcit de la pacient. [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 87
- Figura M-23. Representació gràfica de la translocació robertsoniana 46,XX,der(13;14)(q10;q10). (a): sonda de locus específica (LSI) per al cromosoma 13 i sonda de telòmer q (TelVysion q) per al cromosoma 14. (b): sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 13 i per al cromosoma 14. (c): hibridació amb les sondes de cromosoma sencer aplicades sobre una extensió cromosòmica de limfòcit d'una pacient portadora d'aquesta translocació robertsoniana. [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 88
- Figura M-24. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(4;12)(q22;q23). (a): sonda centromèrica (CEP) per al cromosoma 4 i per al cromosoma 12. (b): sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 4 i per al cromosoma 12. (c): hibridació amb les sondes de cromosoma sencer sobre una extensió cromosòmic de limfòcit de la pacient. [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 89
- Figura M-25. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3). (a): sonda de telòmer q per al cromosoma q (TelVysion q) per al cromosoma 18 i la sonda centromèrica (CEP) per al mateix cromosoma. (b): sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 1 i per al cromosoma 18. (c): composició amb totes les sondes aplicades. pàg. 90
- Figura M-26. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23) i extensions de limfòcits. (a): sonda centromèrica (CEP) per al cromosoma 4 i sonda telomèrica q (TelVysion q) per al mateix cromosoma. (b): sonda CEP per al cromosoma 11 i sonda de cromosoma sencer (WCP) per al mateix cromosoma (c): composició amb totes les sondes aplicades. pàg. 91
- Figura M-27. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22). (a): sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 8 i sonda locus específica (LSI) per al cromosoma 13. (b): sonda telomèrica q (TelVysion q) per al cromosoma 8 i sonda WCP per al cromosoma 13. (c): composició amb totes les sondes aplicades. pàg. 92
- Figura M-28. (a): imatge de l'entrada de la pipeta de biòpsia dins de l'embrió. (b-c): aspiració del blastòmer dins de a pipeta de biòpsia. (d): el blastòmer biopsiat s'expulsa a la mateixa gota on es troba l'embrió. El nucli del blastòmer es veu clarament. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x] pàg. 93

Capítol 4: resultats

- Figura R-1. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP d'hàster tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x] pàg. 99
- Figura R-2. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'òcit II d'hàster tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x] pàg. 100
- Figura R-3. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP d'hàster tenyida amb colorant Leishman i microfotografiada amb pel·lícula blanc i negre. [microscopi de camp clar 1000x] pàg. 101
- Figura R-4. Extensió d'1CP d'hàster amb morfologia cromosòmica no preservada tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x] pàg. 101
- Figura R-5. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà [microscopi de contrast de fases 400x]. (b): la mateixa extensió hibridada amb una sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 11 (vermell) [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 102
- Figura R-6. Extensió d'un complement d'1CP humà amb aparença de nucli interfàsic hibridada amb una sonda de cromosoma locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 103
- Figura R-7. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb la sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i la sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 103
- Figura R-8. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'òcit II humà hibridada amb una sonda dual locus específica per al cromosoma 22 (verd-vermell) i amb sondes de cromosoma sencer per als cromosomes 13 (verd) i 14 (vermell). (b): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb les mateixes sondes. [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 104
- Figura R-9. Extensió d'un complement aneuploide (+crt X) d'1CP humà que presenta una falsa aparença de nucli i interfàsic i hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 105
- Figura R-10. (a): extensió del complement cromosòmic euploide de l'MII de l'òcit hibridada amb les mateixes sondes [microscopi de fluorescència 1000x] (b): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). pàg. 106
- Figura R-11. (a): extensió del complement cromosòmic -ct 21 de l'MII de l'òcit hibridada amb les mateixes sondes. (b): extensió d'un complement cromosòmic +ct 21 d'1CP humà hibridada amb una sonda de locus específic per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 106
- Figura R-12. (a): extensió cromosòmica d'un complement diploide de metafase II humana [microscopi de contrast de fases 400x]. La morfologia cromosòmica d'ambdós complements és encara molt similar. (b): la mateixa extensió cromosòmica hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd) [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 110
- Figura R-13. (a): extensió cromosòmica de dos complements cromosòmics humans de metafase II procedents d'una cèl·lula amb citocinesi anòmala [microscopi de contrast de fases 400x]. La morfologia cromosòmica d'ambdós complements ja és molt diferent. (b): la mateixa extensió cromosòmica hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 111
- Figura R-14. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide humà de metafase I [microscopi contrast de fases 400x]. (b): la mateixa extensió hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell), una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd) i una sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 4 (vermell) [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 112

Figura R-15. Tetravalent o figura d'aparellament meiótic de cromosomes implicats en translocació recíproca que es produeix a la Profase I. Es visualitzen freqüències de recombinació en les regions telomèriques d'aparellament i en la regió intersticial. pàg. 134

Capítol 5: discussió

Figura D-1. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'òocit II humà hibridada amb una sonda dual locus específica per al cromosoma 22 (verd-vermell) i amb una sonda de centròmer per al cromosoma X (verd). (b): extensió cromosòmica d'un complement de limfòcit humà procedent de sang perifèrica d'una dona 46,XX,t(13;14). Extensió hibridada amb les sondes de cromosoma sencer per als cromosomes 13 (verd) i 14 (vermell). [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 167

Figura D-2. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb una sonda dual locus específica per al cromosoma 22 (verd-vermell) i amb una sonda de centròmer per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x] pàg. 168

Figura D-3. Representació gràfica de la interpretació (a): d'un zigot 3PN: X18 ; Y18 ; Y18. (b): d'un zigot 3PN: XY18 ; XY18 ; XY18. pàg.180

Índex de taules

En els capítols 1 i 2 no hi ha taules.

Capítol 3: material i mètodes

Taula M-1. Material biològic d'hàmsster.	pàg. 57
Taula M-2. Material biològic humà analitzat descartat de programes de FIV.	pàg. 58
Taula M-3. Oòcits procedents de casos clínics (DGP-1CP).	pàg. 59
Taula M-4. Classificació segons morfologia externa post valoració de la fecundació.	pàg. 72
Taula M-5. Cariotip d'ambdós membres de la parella i sondes aplicades.	pàg. 87
Taula M-6. Cariotips femenins analitzats per comparar la segregació observada i la freqüència de quiasmes.	pàg. 94

Capítol 4: resultats

Taula R-1. Característiques dels complements cromosòmics d'1CP d'oòcits madurs d'hàmsster.	pàg. 100
Taula R-2. Característiques dels complements cromosòmics d'1CP d'oòcits madurs humans no inseminats descartats de programes de FIV.	pàg. 104
Taula R-3. Sèrie control per determinar l'eficiència del mètode de la FISH en oòcits humans madurs descartats de programes de FIV: resultats citogenètics.	pàg. 105
Taula R-4. Oòcits immadurs (MI i VG) i zigots humans descartats de programes de FIV.	pàg. 107
Taula R-5. Classificació de les cèl·lules anòmales fixades descartades de programes de FIV.	pàg. 108
Taula R-6. Resultats citogenètics dels oòcits humans aparentment immadurs (grup i) descartats de programes de FIV.	pàg. 109
Taula R-7. Classificació dels zigots fixats (grup ii) descartats de programes de FIV.	pàg. 113
Taula R-8. Ploïdia dels zigots fixats descartats de programes de FIV.	pàg. 113
Taula R-9. Resultats citogenètics dels zigots humans diagnosticats (grup ii) descartats de programes de FIV.	pàg. 114
Taula R-10. Resultats de DGP-1CP obtinguts en parelles amb la dona portadora d'una translocació robertsoniana i l'home amb cariotip normal.	pàg. 118
Taula R-11a. Detall dels resultats obtinguts dels casos clínics de translocacions robertsonianes realitzats.	pàg. 119
Taula R-11b. Detall dels resultats obtinguts dels casos clínics de translocacions robertsonianes realitzats.	pàg. 120
Taula R-12. Resultats de DGP-1CP obtinguts en parelles amb la dona portadora d'una translocació recíproca i l'home amb cariotip normal.	pàg. 127
Taula R-13. Detall dels resultats obtinguts dels casos clínics de translocacions recíproques realitzats.	pàg. 128
Taula R-14. Comparació entre la segregació cromosòmica observada en oòcits o embrions de dones portadores de translocacions recíproques i la freqüència d'un o més quiasmes intersticials a cada braç implicat en la reorganització.	pàg. 135

Capítol 5: discussió

Taula D-1. Estudis de concordança citogenètica i d'aneuploïdia realitzats en parelles 1CP-MII: tipus de pacient i tècnica d'anàlisi aplicada.	pàg. 170
Taula D-2. Estudis de concordança citogenètica i d'aneuploïdia realitzats en parelles 1CP-MII: resultats citogenètics.	pàg. 170
Taula D-3. Possible origen dels pronuclis dels zigots humans diagnosticats (grup ii) descartats de programes de FIV.	pàg. 179
Taula D-4. Translocacions robertsonianes: dades pacients i biòpsia d'1CP.	pàg. 189
Taula D-5. Translocacions recíproques: dades pacients i biòpsia d'1CP.	pàg. 189
Taula D-6. Translocacions robertsonianes: resultats de l'anàlisi d'1CP.	pàg. 191
Taula D-7. Translocacions recíproques: resultats de l'anàlisi d'1CP.	pàg. 191

Taula D-8. Translocacions robertsonianes: DGP-1CP.	pàg. 194
Taula D-9. Translocacions recíproques: DGP-1CP.	pàg. 194
Taula D-10. Cicles de DGP realitzats en parelles amb la dona portadora d'una translocació cromosòmica.	pàg. 196

Abreviatures

A i B

ADN o DNA: àcid desoxiribonucleic

ADO: al·lel dropout

ARN: àcid ribonucleic

BL: blastòmer

C

CCO: complex cúmul oòfor

CEP: sonda per a centròmer

CGH: hibridació genòmica comparada

CGP: cèl·lula germinal primordial

CO₂: diòxid de carboni

1CP: primer corpuscle polar

2CP: segon corpuscle polar

cr: cromosoma

ct: cromàtide

D

der: cromosoma derivatiu

D + 0: dia de la punció fol·licular

DGP: diagnòstic Genètic Preimplantacional

DGP-1CP: DGP mitjançant l'anàlisi d'1CP

DGPC: diagnòstic preconcepcional

D + 1: un dia després de dia punció fol·licular

D + 2: dos dies després de la punció fol·licular

D + 3: tres dies després de la punció fol·licular

D + 6: sis dies després de la punció fol·licular

E i FESHRE: European Society of Human Reproduction and
Embriology

FISH: hibridació in situ fluorescent

FIV: fecundació in vitro

FSH: hormona fol·liculostimulant

GG1: període comprès entre el final de la última divisió
cel·lular i l'inici de la replicació de l'ADNG2: període comprès entre el final de la replicació de l'ADN i
la següent divisió**H i I**

hCG: hormona gonadotrofina coriònica humana

HLA: tipatge d'antigens leucocitaris

IAC: inseminació artificial conjugal o homòloga

ICSI: injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide

L i M

LSI: sonda de seqüència única

M: mitosi (profase, metafase, anafase, telofase i citocinesi)

MI: metafase I

MII: metafase II

MIV: cultiu in vitro per madurar espontàniament

N

n: nombre de cromosomes

N: nombre de cromàtides

O i P

OMS: Organització Mundial de la Salut

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PEP: primer extension preamplification

PGDIS: Preimplantation Genetic Diagnosis International
Society

PN: pronucli

PZD: mètode de biòpsia mecànic

PVP: poli vinil pirrolidona

R

RHA: reproducció humana assistida

rob: translocació robertsoniana

S

S: fase de replicació de l'ADN

SEF: Sociedad Española de Fertilidad

SKY: spectral karyotip analysis

SUZI: inseminació a l'espai perivitell·lí o subzonal
inseminationSPCC: cromosomes d'espermatozoide condensats
prematuament**T**

t: translocació

Tel q: sonda per a telòmer del braç q

TRA: tècniques de reproducció assistida

V, W i Z

VG: vesícula germinal o profase I

WCP: sonda de pintat cromosòmic o cromosoma sencer

WHO: World Health Organization

ZP: zona pel·lúcida

Capítol 1: introducció



1.1 Bases biològiques de la reproducció humana

Des del punt de vista cel·lular, la reproducció humana té lloc mitjançant la unió dels gàmetes o cèl·lules sexuals. El gàmeta masculina és l'*espermatozoide* i el gàmeta femení, habitualment anomenat òvul, és l'*òocit madur* (Nilsson 1990).

L'*organisme masculí*, des de l'inici de la seva maduresa sexual, produeix constantment espermatozoides amb capacitat fecundant [figura I-1]. En situacions normals (WHO 1999) en cada ejaculació hi ha dos mil·lilitres o més de líquid seminal que conté 20 milions o més d'espermatozoides per mil·lilitre.



Figura I-1. Espermatozoides d'humà, mostra d'ejaculat en fresc. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

En canvi, l'*organisme femení* sexualment madur, produeix mensualment només un òocit amb capacitat fecundant. A partir de la pubertat i durant tota l'etapa fèrtil de la dona (entre els 11 i 50 anys aproximadament), l'ovulació es repeteix fins a unes 400 vegades. De forma general, cada mes, un dels dos ovaris produeix l'òocit madur. La maduració d'aquest és el resultat de la continuació de la meiosi d'un o més òocits immadurs aturats en estadi de dictiotè de la profase I, des d'abans del naixement. El nucli present a l'òocit immadur s'anomena *vesícula germinal* (VG). L'òocit madur, en estadi de *metafase II* (MII), s'identifica morfològicament perquè ha desaparegut la VG i s'ha extrusionat el *primer corpuscle polar* (1CP) [figura I-2].

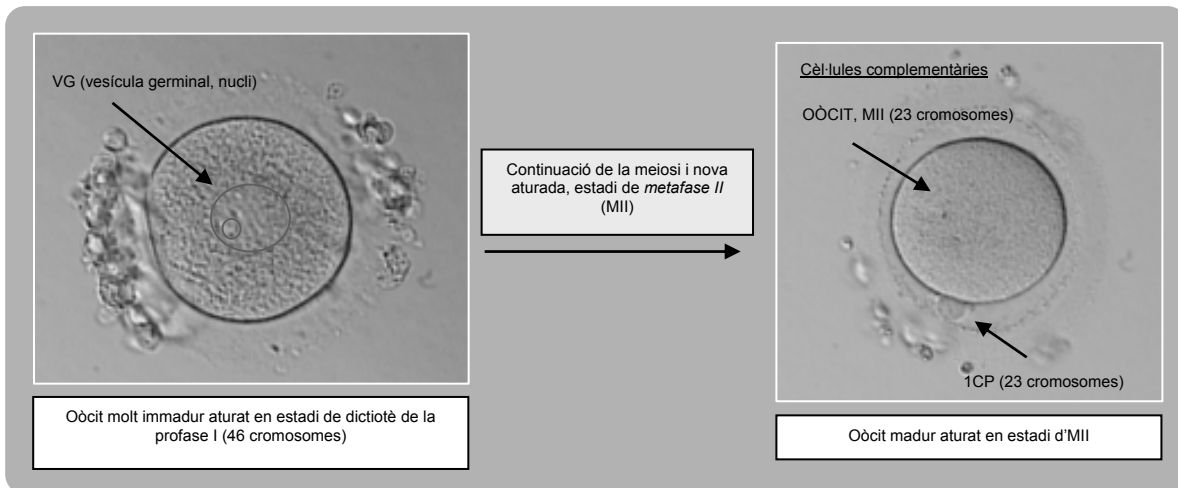


Figura I-2. Oòcit immadur amb vesícula germinal (dictiote de profase I) i oòcit madur (metafase II). [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

Els oòcits es troben dins dels *fol·licles dels ovaris*. En el moment de l'ovulació, quan es trenca la paret del fol·licle, surt amb força el líquid fol·licular, juntament amb l'oòcit madur envoltat per una gran quantitat de cèl·lules que el protegeixen i el nodreixen, anomenades *cèl·lules del cúmul*. Les cèl·lules del cúmul i l'oòcit madur formen el *complex cúmul oòfor* (CCO) [figura I-3].

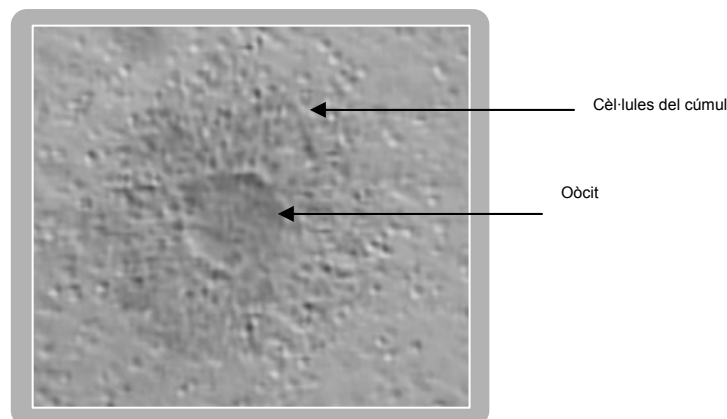


Figura I-3. Complex cúmul oòfor (CCO) humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

Prop dels ovaris es troben les *trompes de Fal·lopi* quan el CCO és expulsat del fol·licle va a parar a l'embut de la trompa en la qual resta en repòs a la porció exterior i més ampla. La fecundació de l'oòcit madur per un espermatozoide té lloc a la trompa de Fal·lopi. Pot ser que en el moment de l'expulsió ja hi hagi espermatozoides, o bé que hi puguin arribar més tard. L'oòcit madur ja expulsat perd la seva fecunditat al cap d'unes vint-i-quatre hores [figura I-4].

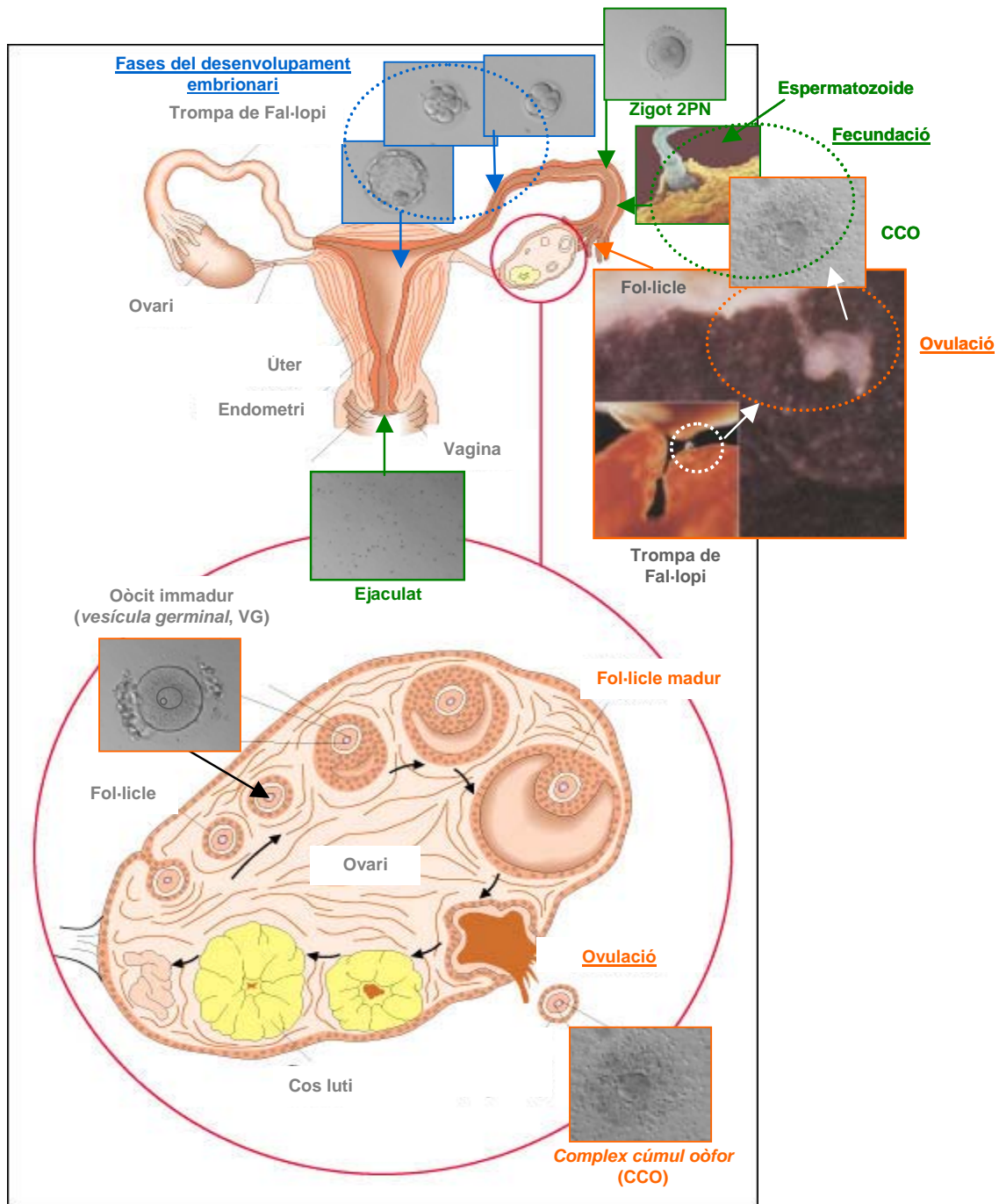


Figura I-4. Esquema de l'aparell reproductor femení [adaptat de Nilsson 1990 i www.educa.aragob.com]

Durant el coït, els espermatozoides són ejaculats contra l'obertura de la cèrvix uterina fins al fons de la vagina. La probabilitat de concebre és major si el coït coincideix amb l'ovulació perquè, a més de tenir la presència imprescindible de l'òvul, el moc cervical i l'úter estan especialment preparats per facilitar el moviment de l'espermatozoide cap a l'oòcit. Es calcula que aproximadament 100 espermatozoides aconseguen arribar a l'oòcit després dels múltiples obstacles que es van trobant pel camí. Els espermatozoides, un cop arriben a l'oòcit, amb l'ajut dels enzims de l'acrosoma van disgregant les capes

cel·lulars que envolten l'òcit fins que queda pràcticament nu. Quan un espermatozoide penetra dins l'òcit, la composició química de la seva paret canvia i es forma la coberta de fecundació. Així s'evita l'entrada d'altres espermatozoides malgrat que encara segueixin adherits a la paret intentant penetrar-lo. El cap de l'espermatozoide conté el material genètic masculí molt condensat empaquetat per les *protamines*.

La *fecundació* té lloc quan un espermatozoide ha aconseguit penetrar dins l'òcit. Com a resultat, es produeix la descondensació del material genètic de l'espermatozoide i la formació del *pronucli masculí*. A la vegada, l'òcit, aturat en MII surt del bloqueig i continua la *meiosi*. Acaba així la segona divisió meiótica, que morfològicament es visualitza amb la extrusió del *segon corpuscle polar* (2CP). També té lloc la formació del *pronucli femení* constituït pel material genètic del propi òcit, el qual es forma un cop extrusionat el segon corpuscle polar. Un òcit fecundat, aproximadament al cap de vint hores de la penetració, presenta els dos pronuclis, un de corresponent a la dotació haploide de l'espermatozoide i l'altre que correspon a la dotació haploide de l'òcit. Aquest estadi rep el nom de *zigot* [figures I-4 i I-5].

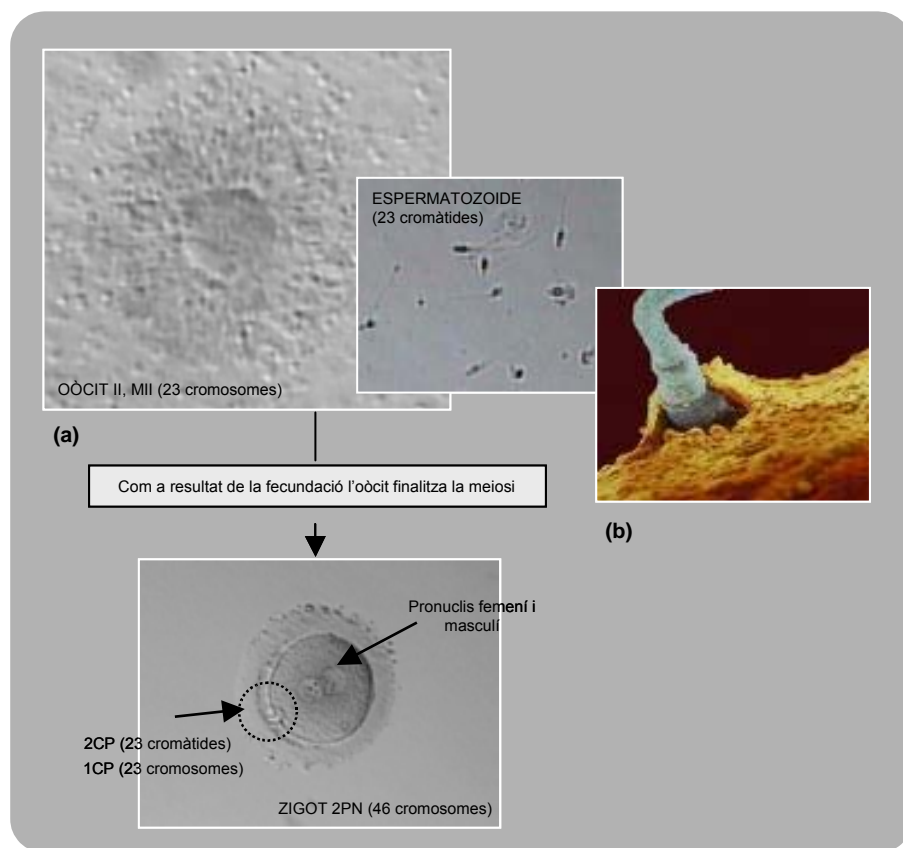


Figura I-5. (a): CCO i espermatozoides humans. El resultat de la fecundació és el zigot. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x] (b): espermatozoide humà unit a la zona pel·lúcida de l'òcit. [Nilsson 1990] [microscopi electrònic]

Si l'oòcit no és fecundat, degenera gradualment i es dirigeix a la vagina a través de la trompa i de l'úter. Aproximadament catorze dies després de l'ovulació es produeix la menstruació, que correspon al desprendiment de l'*endometri* uterí engruixit, preparat per rebre l'embrió en cas que s'hagués produït la fecundació.

Els *chromosomes* del pronucli masculí i els cromosomes del pronucli femení s'uneixen en un únic nucli, després de la *primera metafase mitòtica* del zigot. Com a resultat de la primera divisió mitòtica, al cap d'unes vint-i-quatre hores de la fecundació, el zigot haurà donat lloc a un embrió de dues cèl·lules anomenades *blastòmers*, cada una conté informació gènica que prové del pare i de la mare [figura I-6].



Figura I-6. Embrió preimplantacional humà amb dues cèl·lules o blastòmers. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

L'embrió humà en els successius estadis abans que tingui lloc la implantació s'anomena *embrió preimplantacional* o *preembrió*.

El cicle cel·lular alterna la divisió cel·lular, *mitosi* o *fase M* (profase, metafase, anafase, telofase i citocinesi) i el període entre dues divisions cel·lulars, la *interfase*. Aquesta a la vegada consta de tres fases: *G1* (període comprès entre el final de l'última divisió cel·lular i l'inici de la replicació de l'ADN), *S* (replicació de l'ADN) i *G2* (període comprès entre el final de la replicació de l'ADN i la divisió següent) [figura I-7].



Figura I-7. Esquema de les quatre fases del cicle cel·lular: M, G1, S i G2. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

Els cicles cel·lulars dels embrions primerencs són molt breus, la mitosi (fase M) ve seguida immediatament de la fase de replicació de l'ADN (fase S). Les fases G1 i G2 són imperceptibles [figura I-8].

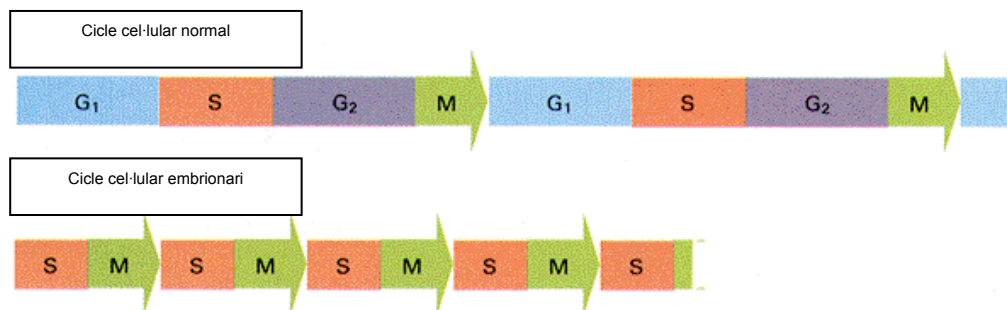


Figura I-8. Esquema comparatiu de les fases i durada d'aquestes en cicles cel·lulars normal i embrionari. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

Del segon al sisè dia aproximadament, l'embrió passa de l'estadi de dues o quatre cèl·lules a l'estadi de *blastocist* de 120–150 cèl·lules ja diferenciades. El blastocist és la blàstula embrionària dels mamífers formada per una *massa cel·lular interna*, que donarà lloc a l'*embrió postimplantacional*, i per una capa externa de cèl·lules del *trofectoderma*, que donarà lloc a la placenta [figures I-4 i I-9].

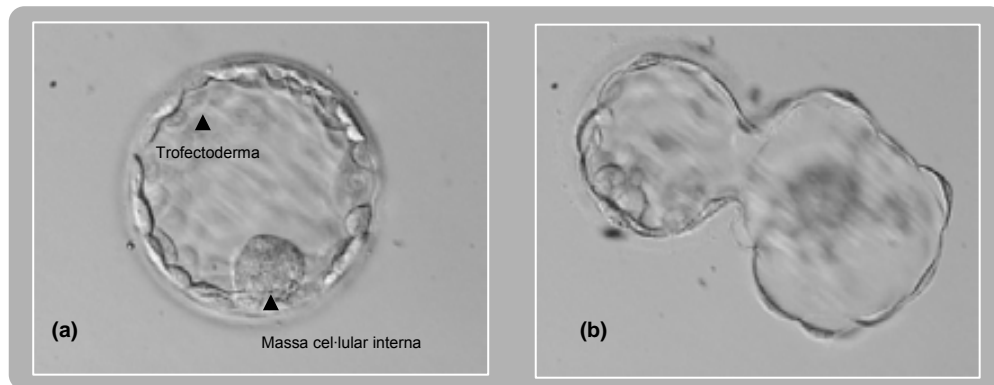


Figura 1-9. (a): blastocist expandit humà (aproximadament al sisè dia de cultiu in vitro). (b): blastocist humà sortint de la zona pel·lúcida (aproximadament al setè dia de cultiu in vitro). [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

Les successives divisions cel·lulars continuen al mateix temps que l'embrió es va desplaçant per la trompa de Fal·lopi en direcció a l'úter, desplaçament facilitat pels cilis de la trompa i les seves contraccions musculars periòdiques [figura 1-4]. Quan arriba a l'úter es troba en fase de blastocist i aproximadament el setè dia després de la fecundació es produeix la implantació quan el blastocist, ja expandit, es lliura de la paret que l'envolta, pren contacte amb l'endometri i queda habitualment implantat en el fons de la cavitat uterina.

Uns quants dies després, el blastocist es troba fermament adherit a l'endometri. Aleshores comença un intens intercanvi químic entre aquest i el cos de la mare. El blastocist és capaç de debilitar el sistema immune de la mare a l'úter, perquè si no l'embrió, com que porta antigens nous i propis, seria detectat com un intrús i rebutjat.

Les cèl·lules del trofoblasta produeixen l'*hormona gonadotrofina coriònica humana* (human chorionic gonadotrophin, hCG) la qual aturarà les ovulacions de l'ovari durant l'embaràs i evitarà que l'endometri engruixit es desprengui amb la menstruació i expulsi l'embrió. Aquesta hormona es pot detectar en la sang materna al cap de pocs dies. L'embrió postimplantacional anirà desenvolupant-se fins a tenir forma de fetus humà. Finalment, aproximadament al cap de quaranta setmanes arribarà el moment del *part* (Nilsson 1990).

1.2 Citogenètica de la reproducció humana

L'ésser humà és un organisme *diploide* que presenta 46 cromosomes organitzats en 23 parelles. La reproducció sexual humana implica una alternança cíclica d'estats diploides ($2n$) i *haploides* (n) [figura I-10].

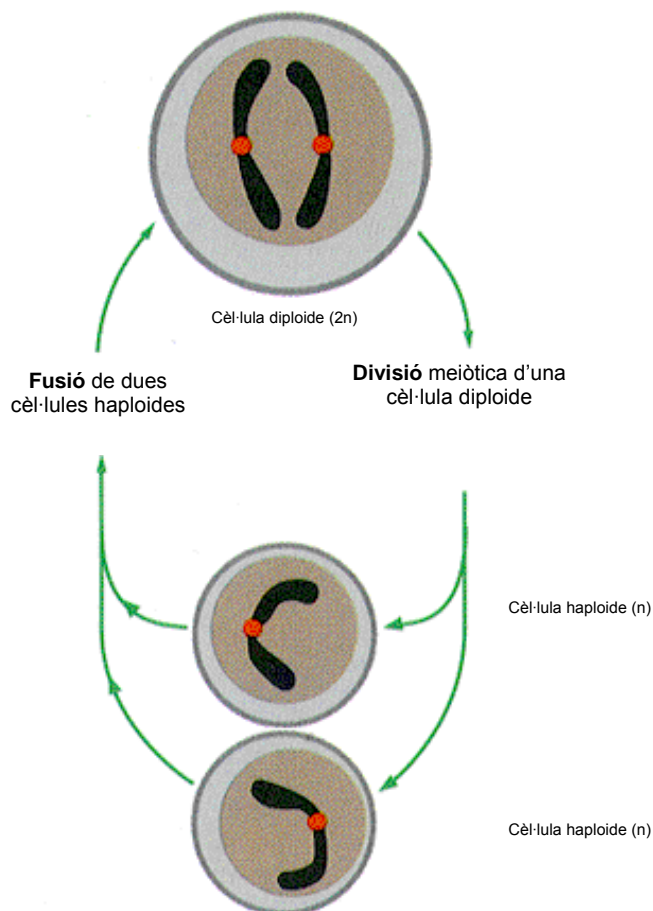


Figura I-10. Alternança de cicles haploides i diploides en la reproducció sexual. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

A la línia germinal, ubicada a les gònades, té lloc la *gametogènesi* o *formació dels gàmetes* a partir de les *cèl·lules germinals primordials* (CPG).

En humans, al voltant dels vint dies de desenvolupament embrionari es comencen a formar les CPG en el sac vitel·lí. A la sisena setmana aquestes migren cap a les crestes genitals i seguidament envaeixen els plecs genitals de les gònades primordials, indiferenciades. La diferenciació sexual té lloc entre la setena i la desena setmana de gestació, implica la diferenciació de les gònades (testicles en el mascle i ovaris en la femella) i de les CGP (*espermatogònies* en el mascle i *oogònies* en la femella) (Alberts i col·l. 1987).

La *gametogènesi masculina* o *espermatogènesi* dóna lloc a la formació dels gàmetes masculins (espermatozoides) i la *gametogènesi femenina* o *oogènesi* dóna lloc a la formació dels gàmetes femenins (òcits madurs). La gametogènesi presenta diferències ben marcades entre l'organisme masculí i el femení, i inclou processos de divisió mitòtica i de divisió meiótica que tenen lloc a les gònades: els *testicles* en els homes i els *ovaris* en les dones.

Les *CPG* són cèl·lules *diploides* ($2n$) i donaran lloc a *gàmetes haploides* (amb 23 cromosomes). L'espermatozoide i l'òcit en fusionar-se en el moment de la fecundació formen el zigot, una cèl·lula diploide (amb 46 cromosomes). Aquest, en dividir-se per mitosi, formarà un embrió de dues cèl·lules o blastòmers amb dotació cromosòmica també diploide. I per divisions mitòtiques successives es formarà finalment l'individu ($2n$).

1.2.1 Espermatogènesi

Tota l'espermatogènesi té lloc en el revestiment epitelial intern dels *túbuls seminífers* que constitueixen els testicles [figura I-11].

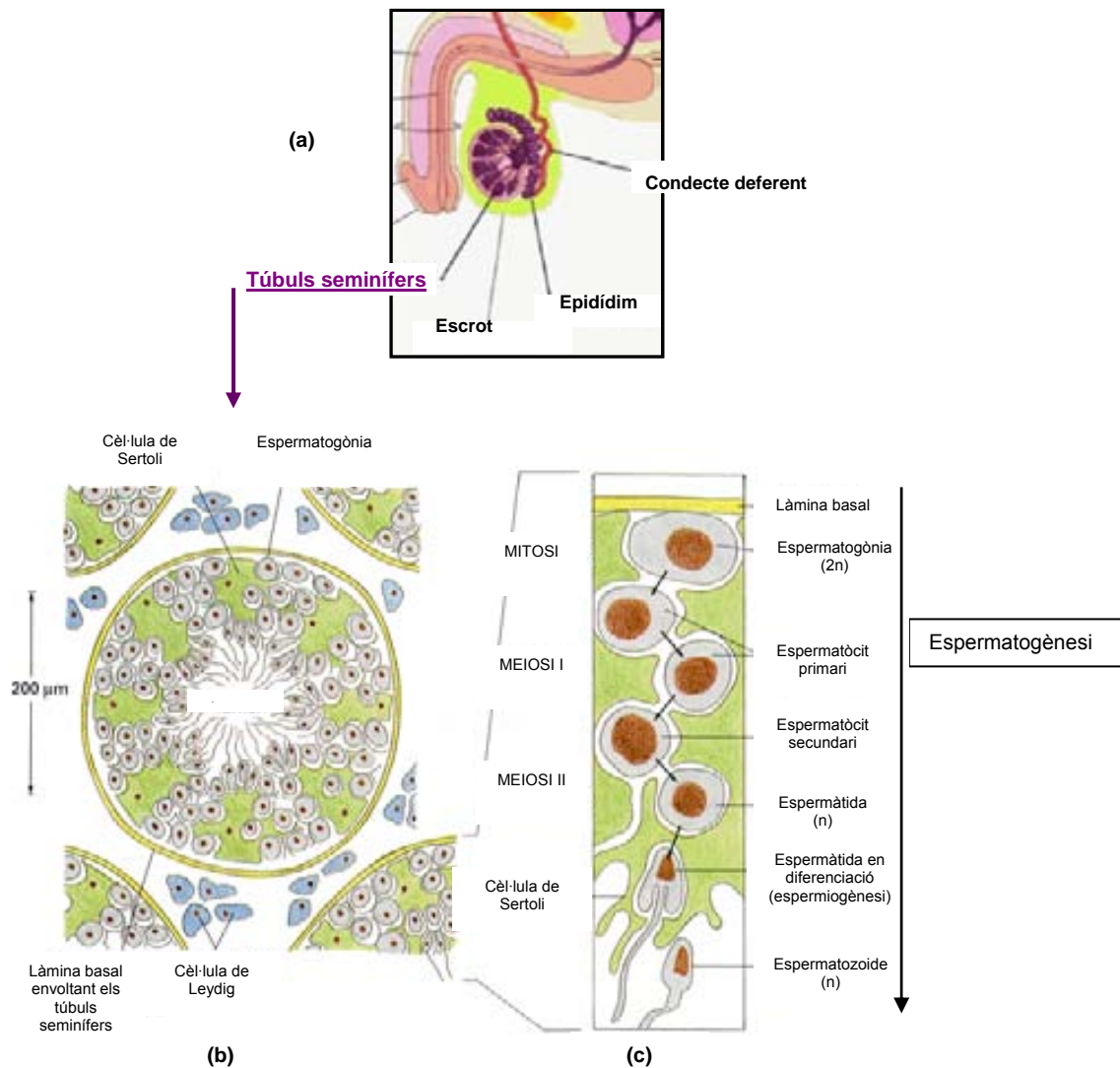


Figura I-11. (a): escrot de l'aparell reproductor masculí [adaptat de <http://biologia.fcienias.unam.mx>]. (b): esquema de la secció transversal d'un túbul seminífer de testicle de mamífer. (c): ampliació del revestiment epitelial intern d'un túbul seminífer [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

Durant els primers estadis del desenvolupament embrionari, les CGPs es diferencien en *espermatogònies* ($2n$; 46 cromosomes) i proliferen per *divisions mitòtiques*. Es produeix un *bloqueig mitòtic* a la setmana setze–divuit de gestació. En arribar a la maduresa sexual, les espermatogònies es segueixen multiplicant activament i durant aquesta fase algunes espermatogònies augmenten de mida i es transformen en els *espermatòcits primaris* o *espermatòcits I* ($2n$, 46 cromosomes duplicats, 92 cromàtides). Cada espermatòcit I mitjançant una *primera divisió meiótica* dóna lloc a dos *espermatòcits secundaris* o *espermatòcits II* amb 23 cromosomes duplicats (46 cromàtides). Cada *espermatòcit II*,

mitjançant una *segona divisió meiótica*, origina dues *espermàtides* haploides amb 23 cromosomes (N 23). Posteriorment, en l'etapa anomenada *espermiogènesi*, les espermàtides es transformen en *espermatozoides* mitjançant un procés de diferenciació cel·lular. La divisió meiótica masculina és una divisió reductiva en la qual es produeixen quatre espermàtides haploides a partir d'un espermatòcit I diploide [figura I-12].

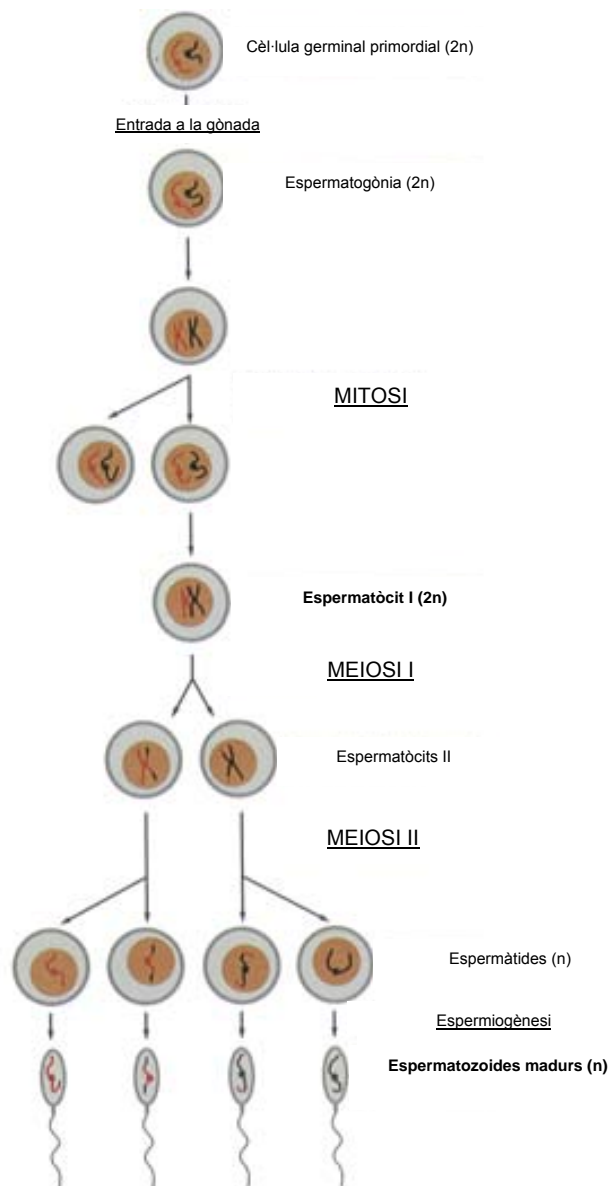


Figura I-12. Esquema de les diverses etapes de l'espermatogènesi. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

Durant la interfase anterior a l'espermatòcit I s'ha produït la *duplicació de la cromatina* (fase S del cicle cel·lular) i, per tant, cada cromosoma presenta *dues cromàtides germanes unides pel centròmer* (46

cromosomes duplicats, 92 cromàtides). Aleshores, s'inicia la *primera divisió meiótica*, que consisteix en una successió de les fases següents: profase I, metafase I, anafase I i telofase I, seguides d'una *citocinesi* que dóna lloc a dos espermatòcits II (23 cromosomes duplicats, 46 cromàtides). A continuació, sense que hi hagi replicació de cromatina, es produeix la *segona divisió meiótica*, que consta de profase II, metafase II, anafase II i telofase II, seguida també d'una citocinesi [figura I-13].

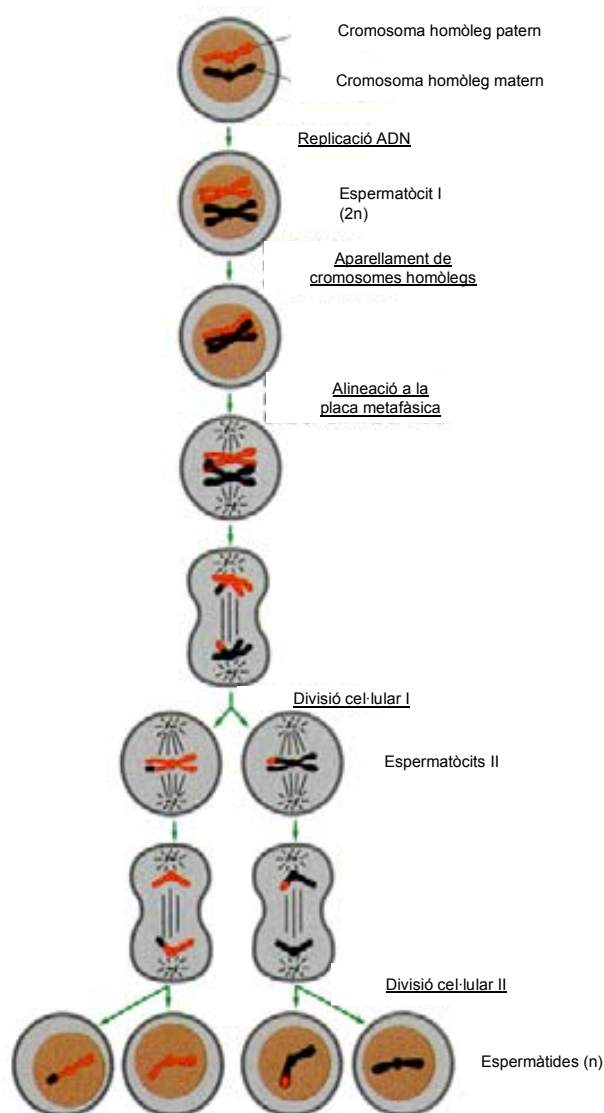


Figura I-13. Esquema de les diverses etapes de la divisió meiótica. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

La *profase I* està dividida en cinc etapes seqüencials: leptotè, zigotè, paquitè, diplotè i diacinesi, definides per canvis morfològics visibles en els cromosomes [figura I-14].

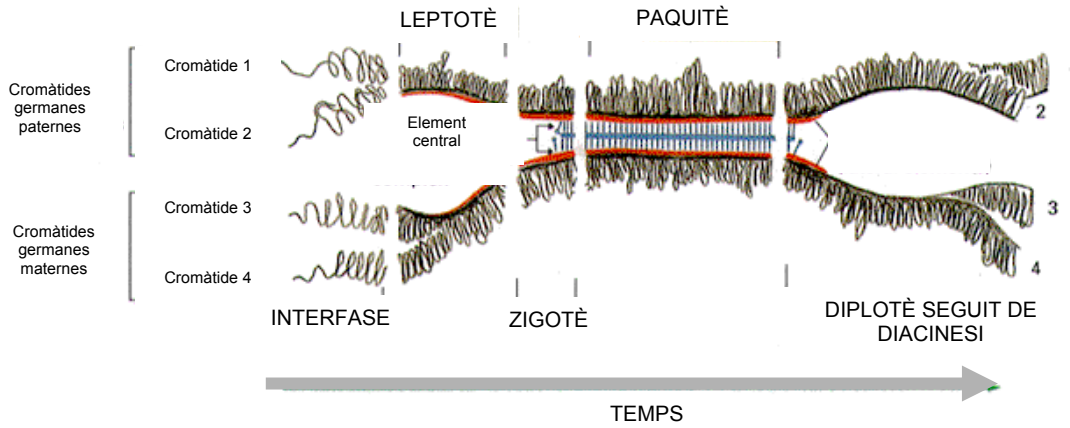


Figura I-14. Esquema del curs temporal de la sinapsi i desinapsi cromosòmica durant la profase meiótica I. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

Durant l'etapa de *leptotè*, cada cromosoma homòleg replicat, format per dues cromàtides germanes íntimament unides, es condensa formant una llarga i fina fibra amb un eix central proteic. Cada *cromosoma* està unit pels seus extrems a l'*embolcall nuclear* mitjançant una estructura proteica especialitzada anomenada *placa d'unió*. Es considera que l'etapa de *zigotè* comença amb l'inici de la *sinapsi* o *aparellament entre cromosomes homòlegs*. La sinapsi pot començar quan ambdós extrems homòlegs dels dos cromosomes s'ajunten al nivell de l'embolcall nuclear, i avança, com si fos una cremallera, encara que també pot començar en regions internes dels cromosomes i avançar cap als seus extrems. Es creu que amb aquesta alineació, cada gen queda juxtaposat al mateix gen del cromosoma homòleg. Quan els cromosomes homòlegs s'aparellen, els eixos proteics respectius, s'ajunten per constituir els *elements laterals del complex sinapteinemal*. Cada parell cromosòmic així format rep el nom de *bivalent*. Quan la sinapsi s'ha completat per a tots els cromosomes, la cèl·lula es troba a l'etapa de *paquitè*. En aquesta etapa apareixen grans *nòduls de recombinació* distribuïts a intervals en els *complexos sinapteinemals*; es creu que aquests intervenen en la *recombinació meiótica* que consisteix, bàsicament, en intercanvis cromosòmics [figura I-15].

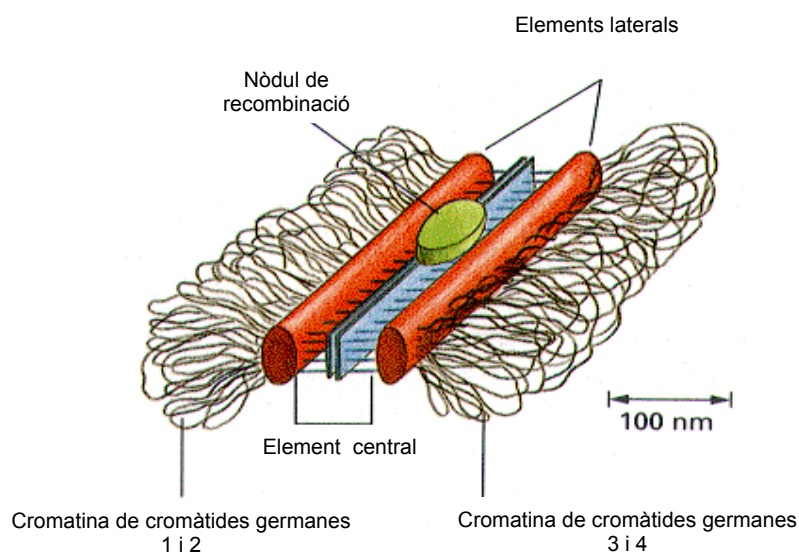


Figura I-15. Esquema d'un complex sinapinemat que mostra els elements laterals i central del complex, i un nòdul de recombinació. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

Els intercanvis cromosòmics donen lloc a creuaments entre dues cromàtides homòlogues que més tard es visualitzen en formacions anomenades *quiasmes*. Quan es produeix la *desinapsi* o *repulsió de cromosomes homòlegs*, comença l'etapa de *diplotè* [figura I-14]. El complex sinapinemat es disgrega, cada bivalent queda unit a través d'un o més quiasmes, que com s'ha dit representen els punts en què s'ha produït l'entrecruament cromosòmic. Durant aquesta fase els cromosomes es descondensen i es produeix activitat de síntesi d'ARN. De l'etapa de diplotè es passa a l'etapa de *diacinesi*, que és una etapa de transició cap a la *metafase I*, en la qual els cromosomes es condensen, s'engruixeixen i queden lliures de l'embolcall nuclear quan aquest desapareix. En aquest punt s'observa clarament que cada bivalent està format per quatre cromàtides separades, germanes dues a dues i unides pel centròmer, mentre que les cromàtides homòlogues, que estan entrecruades estan unides pels quiasmes [figura I-16].

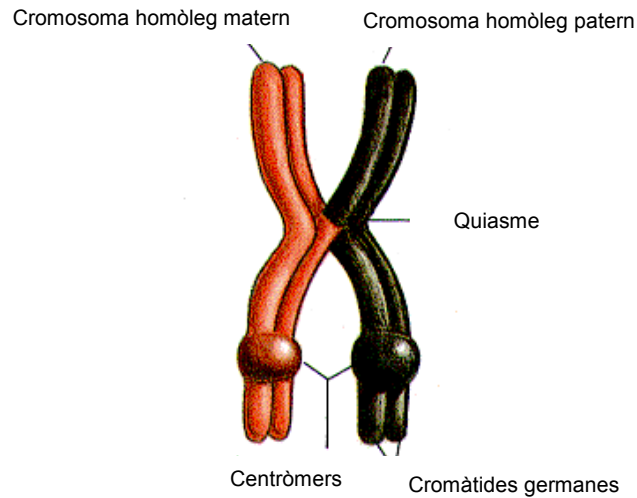


Figura I-16. Esquema de l'aparellament de cromosomes homòlegs matern i patern durant el pas cap a la metafase de la divisió meiótica I. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

A l'*anafase I* els cromosomes homòlegs es separen i es distribueixen cadascun cap a pols oposats. Quan els homòlegs arriben als pols té lloc la *citocinesi*. A continuació es produeix ràpidament la segona divisió meiótica sense síntesi d'ADN. A la *metafase II* els cromosomes presenten una morfologia típica d'aquesta fase en la qual s'intueix la cromatina d'ambdues cromàtides desplegada en "ziga zaga" seguint una simetria especular. A l'*anafase II* les cromàtides germanes se separen i van cap als pols oposats.

Com a resultat de la primera divisió meiótica, de cada espermatòcit I (diploide, n 46, N 92) es formen dos espermatòcits II haploides però amb 23 cromosomes cadascun amb dues cromàtides germanes. Després de la segona divisió meiótica de cada espermatòcit II es formen dues espermatòcides, haploides amb 23 cromosomes amb una cromàtide cadascun. Un cop els espermatozoides estan formats, passen a la llum dels túbuls seminífers [figura I-11a i b] i es dirigeixen a l'epidídim [figura I-11a], on són emmagatzemats mentre es produeix la seva maduració final o espermiogènesi. Cada espermatòcide donarà lloc a un espermatozoide.

Si la divisió reductiva no es produís i els gàmetes tinguessin una dotació diploide, el nou individu rebria les 23 parelles de cromosomes (n 46, N 92) del pare i les 23 parelles de cromosomes (n 46, N 92) de la mare, és a dir, el doble de cromosomes que els seus progenitors, i seria cromosòmicament anòmal (tetraploide: n 92), i generació darrere generació, augmentaria indefinidament el nombre de cromosomes de l'espècie. Així doncs, la divisió reductiva és bàsica per mantenir el nombre de cromosomes de l'espècie ja que en la fecundació es fusionen dos gàmetes que tenen una dotació haploide (n 23) i es formarà un zigot amb una dotació diploide (n 46) idèntica a la dels seus progenitors.

1.2.2 Oogènesi

En les dones, cap a la novena setmana de gestació les CGP es diferencien en *oogònies*. A la desena setmana s'inicia la proliferació o multiplicació mitòtica de les CGP que ja s'han diferenciat en oogònies. A la dotzena setmana algunes oogònies es converteixen en *òcits primaris* o *òcits I* (diploides, n 46, N 92) i comencen la meiosi (Garcia i col·l. 1987). A partir d'aquest punt i de manera asincrònica, les oogònies es van diferenciant en òcits que entren en meiosi. La primera divisió meiotica queda aturada a la profase I (estadi de *dictiotè*) fins que s'assoleix la *pubertat* (Hassold i Hunt 2001).

El nombre i tipus de cèl·lules germinals va variant i és màxim al voltant del cinquè i sisè mes de gestació. En les gònades primordials només hi ha CGP, en la dona aquestes es van diferenciant en oogònies que proliferen per mitosi. Les oogònies perden la capacitat proliferativa en el període fetal i es van diferenciant en òcits primaris. En el cinquè o sisè mes del desenvolupament embrionari, totes les oogònies s'han transformat en òcits primaris i aquests hauran començat la meiosi (aproximadament set milions). A diferència de l'espermatogènesi, a l'oogènesi es genera un nombre limitat d'òcits.

Al final del període fetal s'observa una gran quantitat de fol·licles en degeneració que contenen òcits atrèsics. En el moment del naixement a l'ovari es troben presents només uns dos milions d'òcits primaris i a la pubertat en els ovaris hi ha només uns 400.000 milions d'òcits. Cal remarcar que la majoria d'òcits no assolixen la maduresa, sinó que degeneren de forma gradual en un procés anomenat *atrèsia* [figura I-17].

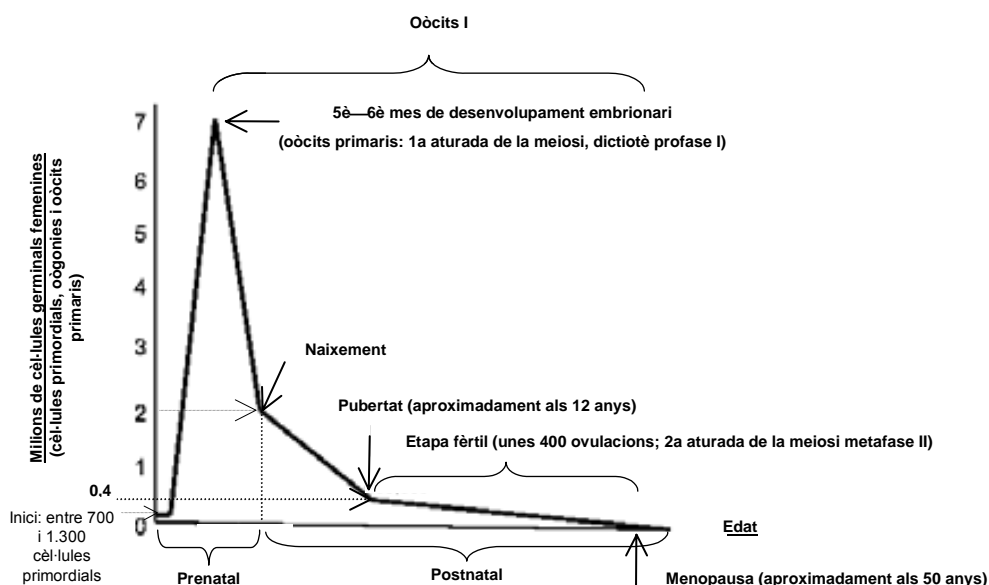


Figura I-17. Canvis en el nombre de cèl·lules germinals femenines (cèl·lules primordials, oogònies i òcits primaris). [adaptat de Hassold i col·l. 1996]

Al final de l'etapa fèrtil de la dona (menopausa), després d'haver tingut unes 400 ovulacions, en els seus ovaris ja no queden oòcits viables.

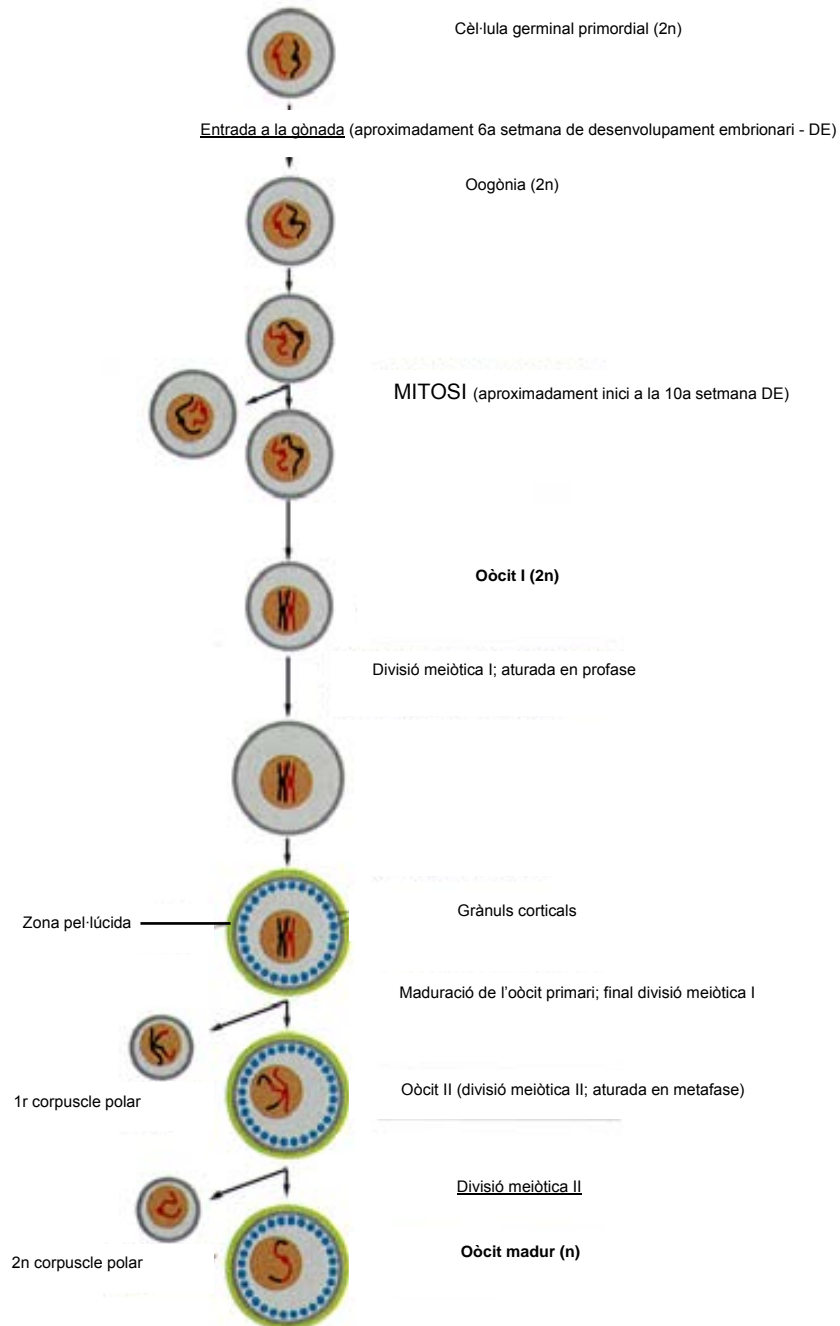


Figura I-18. Esquema de les diverses etapes de l'oogènesi. [adaptat d'Alberts i col·l. 2002]

La primera divisió meiótica femenina quedarà aturada en l'etapa de *dictiotè de la profase I*, equivalent a l'etapa de *diploè masculina*, i es manté en aquesta etapa fins que la dona adquireix la maduresa sexual. En aquesta etapa de dictiotè els cromosomes estan descondensats i realitzen activitat de síntesi d'ARN

per proporcionar materials de reserva requerits per l'òcit. La majoria de les oogònies no aconseguiran madurar, sinó que degeneraran. De fet, molts òcits degeneren de manera que en el moment de néixer en queden en els ovaris uns dos milions [figura I-17]. L'atrèsia continua durant tota l'etapa prèvia a la maduresa sexual i durant tota la vida reproductiva de la dona. Arribada la maduresa sexual, en els cicles d'ovulació, i com a conseqüència de l'actuació de l'hormona *fol·liculostimulant* (follicle stimulating hormone, FSH) i la hCG, diversos òcits I reprenen la meiosi i només un sol arribar a la segona metafase meiòtica (MII), però un cop ja en aquesta fase, de nou queda aturada la meiosi. De cada òcit primari s'originen dues cèl·lules asimètriques, l'una, l'*òcit secundari*, *òcit II* o *òcit madur* (haploide, gran i ric en vitel) i l'altra, el *primer corpuscle polar* o *1CP* (haploide, petit i adossat a l'òcit II). Com que l'òcit està envoltat per la *zona pel·lúcida* (ZP), l'1CP es manté atrapat a l'*espai perivitel·lí*, entre l'òcit i aquesta.

Únicament quan l'òcit II és fecundat i activat per l'espermatozoide, s'acaba la segona divisió meiòtica, i l'òcit extrusiona el segon corpuscle polar el qual també queda atrapat entre el zigot recentment format i la ZP.

Cap al final de la vida reproductiva de la dona, els òcits madurs alliberats de l'ovari durant l'ovulació hauran estat detinguts en la profase I al voltant de 50 anys.

Com hem dit anteriorment, en la dona la meiosi queda aturada en dues fases: a la profase I (etapa de dictiotè) i a la metafase II. El dictiotè és el període de latència de la meiosi de l'òcit I en la profase I, que s'inicia en el fetus i no acaba fins que no arriba la fase de maduresa sexual, si no degenera abans.

En la dona, s'obté un nombre limitat d'oogònies. Aquestes oogònies, a la vegada generen un nombre limitat d'òcits I. A l'etapa de maduresa sexual i a cada cicle, només una oogònia arribarà a l'estadi d'òcit II o òcit madur. En l'home, en canvi, la espermatogènesi no comença fins la pubertat i des d'aleshores es produeixen espermatozoides de manera continua sense aturades de la meiosi.

Això no obstant, hi ha estudis que han descrit l'existència d'oogònies actives en ovaris adults (Johnson i col·l. 2004; Heng i col·l. 2005), i d'altres n'estan en contra (Byskov i col·l. 2005)

1.3 Reproducció humana assistida (RHA)

Per a l'*Organització Mundial de la Salut* (OMS), l'*esterilitat* (incapacitat de concebre) i la *infertilitat* (incapacitat d'aconseguir un nascut viu) són problemes de salut. Les parelles estèrils o no fèrtils tenen el dret d'ésser tractades per tots els mitjans disponibles actualment en medicina de la reproducció.

La medicina de la reproducció és l'especialitat de la ginecologia que té com objectiu a solucionar els problemes d'esterilitat i d'infertilitat. Tots els tractaments i/o tècniques associades reben el nom de tractaments i/o *tècniques de reproducció humana assistida* (RHA o TRA) (SEF 1999). Gairebé un milió de nens han nascut arreu del món com a resultat de les TRA (Soini i col·l. 2006).

La llei actual sobre tècniques de reproducció assistida, *Llei 14/2006*, regula l'aplicació de les tècniques de RHA acreditades científicament i clínicament indicades, regula l'aplicació d'aquestes tècniques en la prevenció i tractament de malalties d'origen genètic, i regula els supòsits i requisits d'utilització de gàmetes i preembrions humans criopreservats (congelats).

Es parla d'*esterilitat primària* quan una parella, després d'un any de relacions sense control anticonceptiu no ha aconseguit l'embaràs, i l'*esterilitat secundària* es defineix com l'esterilitat que presenta una parella que després de tenir un primer fill no aconsegueix una nova gestació l'any següent de coïts sense protecció.

D'altra banda, parlem d'*infertilitat primària* quan una parella aconsegueix gestació però aquesta no arriba a terme i d'*infertilitat secundària* quan una parella després d'un embaràs i un part normals, no aconsegueix una nova gestació a terme.

Tenint en compte que la vida de l'espermatozoide dins de les trompes de Fal·lopi és d'uns quatre dies i que la vida de l'òcit un cop és expulsat de l'ovari, és d'un dia aproximadament; una parella en edat fèrtil té uns cinc dies per cycle amb possibilitat de quedar gestant mantenint relacions sexuals regulars (dues o tres per setmana). Una altra forma de dir-ho és que el 25 % de les parelles aconsegueixen l'embaràs en el primer mes de tenir relacions sexuals regulars. Aproximadament un 20 % (una de cada sis) de les parelles en *edat reproductiva* és estèril. Segons la Societat Espanyola de Fertilidad (SEF), la freqüència de les *causes d'esterilitat* és un 30 % femenina, un 30 % masculina, un 30 % mixta i un 10 % d'origen desconegut (SEF 2005).

Des de l'any 2004 la Generalitat de Catalunya elabora un informe sobre RHA que inclou les dades de cicles d'obtenció d'òcits, cicles de transferència d'embrions i embarassos. Les primeres dades recollides són les corresponents a l'any 2001 i van ser publicades l'any 2004 (FIVCAT.NET 2001, Generalitat de Catalunya, 2004). L'últim informe sobre l'estadística de RHA a Catalunya publicat l'any 2007, inclou les dades de l'any 2004 (FIVCAT.NET 2004, Generalitat de Catalunya, 2007) i la causa d'esterilitat fou: 26,6 % femenina, 30,7 % masculina, 21,0 % mixta, 7,7 % sense diagnòstic i la resta d'origen immunològic o bé no hi constava l'origen.

L'últim registre de la SEF de l'any 2007 (SEF 2007), que analitza les dades de l'any 2004, inclou 21.696 cicles d'obtenció iniciats i la causa d'esterilitats fou: 30,1 % femenina, 30,7 % masculina, 20,6 % mixta i 6,2 % sense diagnòstic.

Una de les causes d'esterilitat femenina més freqüents ve donada per l'obstrucció o falta d'una o les dues trompes de Fal·lopi [figura I-5], anomenada *patologia tubària*. Com a conseqüència d'aquesta patologia és difícil o impossible la fecundació de l'òocit atès que els espermatozoides no es poden posar en contacte físic amb aquest. També hi pot haver un factor ovàric com per exemple una mancança d'ovulació o menopausa precoç. L'OMS en l'última edició del seu manual de laboratori (WHO 1999) estableix uns valors de normalitat (*normozoospermia*) per a la concentració, mobilitat i morfologia espermàtica a l'ejaculat: vint milions o més d'espermatozoides per mil·lilitre o bé quaranta milions o més d'espermatozoides totals a l'ejaculat, un 25 % o més de mobilitat de tipus "a" (progressiva ràpida) o 50 % o més de mobilitat de tipus "a" + mobilitat de tipus "b" (lineal o no lineal, lenta) i en cas que el percentatge de formes normals sigui inferior al 14 % aleshores la taxa de fecundació in vitro es pot veure reduïda (en estudi).

En l'home habitualment l'esterilitat ve donada per la producció d'un nombre d'espermatozoides baix (*oligozoospermia*) i/o la reducció de la mobilitat (*oligoastenozoospermia/astenozoospermia*) o també per l'absència d'espermatozoides en l'ejaculat (*azoospermia*).

En les TRA es produeix una estimulació artificial de l'ovulació, més o menys intensa segons la tècnica aplicada. Les TRA aplicades actualment són la inseminació artificial i la fecundació in vitro (per inseminació convencional o per microinjecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide). Habitualment aquestes tècniques es fan amb el semen de la parella (inseminació homòloga) però també es poden fer amb el semen d'un donant (inseminació heteròloga). La fecundació in vitro també es pot fer amb òcits d'una donant, si cal.

La *inseminació artificial conjugal (IAC)* o *inseminació artificial homòloga* és la TRA més senzilla. Després d'una *estimulació* suau de l'ovulació, es processa el semen de la parella mitjançant una tècnica de centrifugació en gradient de densitat discontinua i es concentren els espermatozoides mòbils en un volum petit de medi de cultiu. Aquest medi amb espermatozoides en suspensió és introduït als fons de l'úter mitjançant una fina cànula, el mateix dia de l'ovulació. Aquesta tècnica està indicada tant en casos

en què se sospita de factors masculins lleugers com a responsables d'esterilitat, com de factor mixtes i factors desconeguts (Bánk 1965).

Segons la SEF, la taxa de gestació per cicle d'IAC és de 13,6 % en dones de menys de 40 anys (SEF 2007). Actualment no existeix un registre de IAC realitzats només a Catalunya.

La *fecundació in vitro* (FIV) consisteix en una estimulació de l'ovulació una mica més intensa per tal d'aconseguir un major nombre de fol·licles. Es recuperen els oòcits el dia de l'ovulació, mitjançant punció dels fol·licles estimulats, sota control per ecografia. Els oòcits madurs i els espermatozoides es posen en contacte en condicions adequades, imitant les condicions fisiològiques de l'aparell reproductor femení. La inseminació es pot fer de diverses maneres:

— Convencional: afegint uns 50.000–100.000 espermatozoides per cada oòcit, esperant que un espermatozoide penetri l'oòcit (Harris 1978).

“1978: primer naixement Regne Unit (Louise Brown)” ; “1984: primer naixement Espanya (Victoria-Anna)”

— SUZI: introduint de forma mecànica un o diversos espermatozoides a l'espai perivitel·lí de l'oòcit (Fishel 1991).

— ICSI: introduint de forma mecànica un espermatozoide en el citoplasma de l'oòcit (Palermo i col·l. 1992).

En la *FIV amb inseminació convencional* la penetració de l'oòcit per un espermatozoide té lloc de forma natural des de fora de la zona pel·lúcida. En la *FIV amb SUZI* es travessa la zona pel·lúcida mitjançant una pipeta molt fina de vidre i es deixa un espermatozoide, o diversos, a l'espai perivitel·lí, l'entrada al citoplasma té lloc de forma natural. En canvi, en la *FIV amb ICSI*, es travessen amb una pipeta la zona pel·lúcida i la membrana i es deixa un espermatozoide ja dins del citoplasma, és a dir, la penetració és artificial [figura I-19].

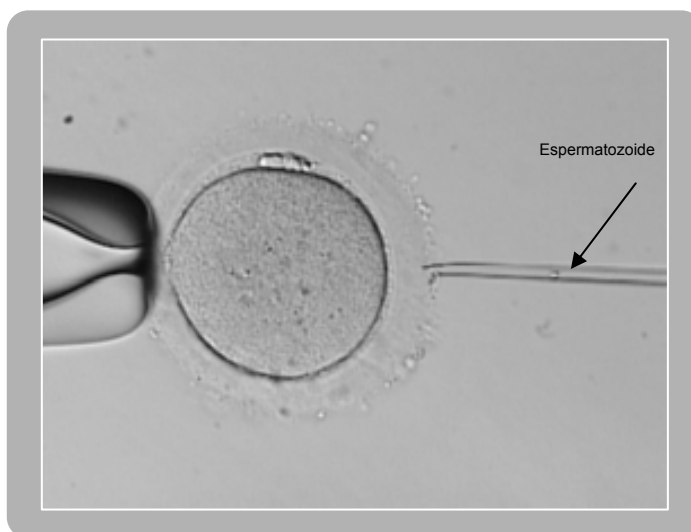


Figura I-19. Oòcit madur humà subjectat per la pipeta sostenidora i espermatozoide dins la pipeta de microinjecció moments previs a procedir a l'ICSI. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

L'espermatozoide pot provenir d'una mostra d'ejaculat o bé d'una *recuperació quirúrgica d'espermatozoides* (REQ) per biòpsia testicular, aspiració de líquid de l'epidídim o aspiració de líquid del conducte deferent [figura I-12]. La inseminació es fa sempre el mateix dia de la punció fol·licular, considerat com a D + 0.

La FIV amb inseminació convencional està indicada bàsicament en casos d'esterilitat tubària bilateral (obstrucció o manca d'ambdues trompes de Fal·lopi), en casos d'esterilitat deguda a factors masculins, com ara un recompte insuficient d'espermatozoides mòbils per realitzar una IAC o també per factors d'esterilitat desconeguts després de diverses IAC en les quals no s'ha aconseguit l'embaràs.

Tant la FIV amb SUZI com la FIV amb ICSI estan indicades en esterilitat causada per un factor masculí greu, bàsicament amb un recompte d'espermatozoides molt baix. Això no obstant, la FIV amb SUZI està actualment en desús, i en aquests casos s'aplica l'ICSI atès que aquesta tècnica és extremadament més eficient. La ICSI està especialment indicada en casos amb azoospermia a l'ejaculat, i els espermatozoides s'obtenen per REQ.

Al cap de *setze-divuit hores postinseminació*, es pot veure si l'oòcit ha estat fecundat i dona lloc al zigot, el qual s'identifica morfològicament per l'extrusió del segon corpuscle polar i la presència dels pronuclis masculí i femení [figura I-20]. El dia següent al de la punció fol·licular i la inseminació (D + 0), és el D + 1, en el qual s'observa el resultat de la fecundació.

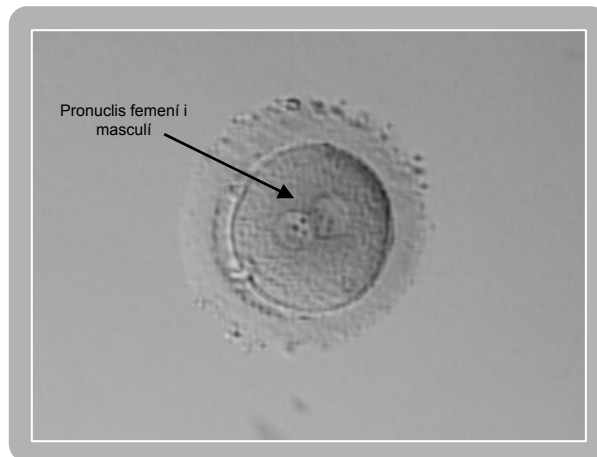


Figura I-20. Oòcit fecundat o zigot 2PN humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

Si s'ha produït la fecundació, a partir del segon dia després de la punció fol·licular i la inseminació, s'observa la divisió del zigot que donarà lloc a l'embrió de dues cèl·lules o *blastòmers*. Els embrions es transfereixen a l'úter matern, habitualment, el segon o tercer dia després de la inseminació (D + 2 o D + 3), quan estan es estadi de quatre o vuit cèl·lules respectivament. Amb els medis de cultiu actuals els embrions es poden cultivar com a màxim fins a l'estadi de estadi de *blastocist* expandit (aproximadament en D + 6) que és l'estadi previ en el qual té lloc la implantació de l'embrió a l'úter matern [figura I-21].

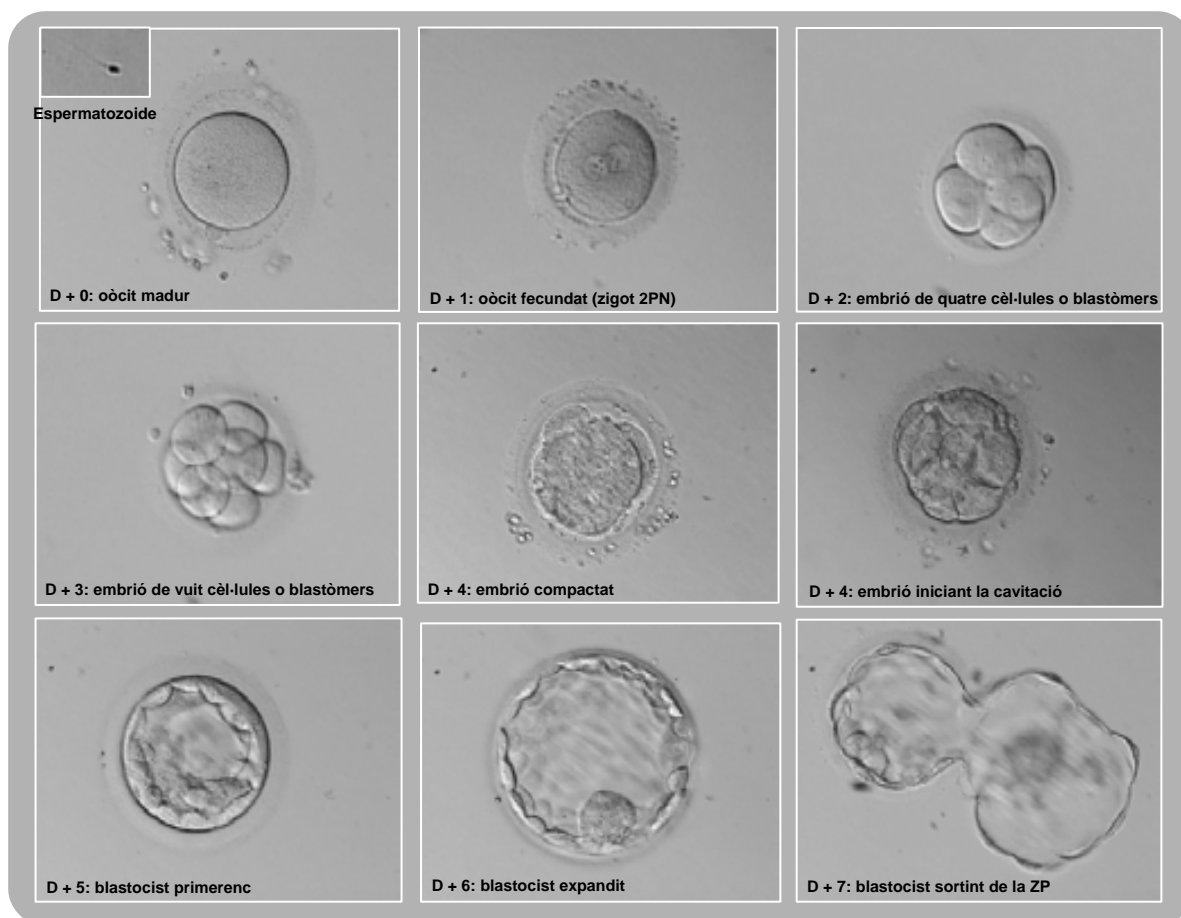


Figura I-21. Evolució del cultiu in vitro humà des del dia de la inseminació (D + 0) fins a l'estadi de blastocist expandit en fase d'eclosió de la zona pel·lúcida (ZP). [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

Per fer la *transferència embrionària* embrions es dipositen habitualment dos embrions, mitjançant un catèter, al fons de l'úter, a la zona on habitualment en una fecundació *in vivo* té lloc la implantació de l'embrió. Els embrions restants, si és el cas, es guarden congelats per a una transferència posterior. La llei actual de reproducció assistida (*Llei 14/2006*) recull transferir com a màxim tres embrions per cicle (*article 3.2*). La taxa de gestació per cicle de transferència és aproximadament d'un 30 % amb oòcits propis i d'un 50 % amb oòcits de donant (SEF 2007).

L'últim informe sobre l'estadística de RHA a Catalunya publicat l'any 2007 inclou les dades dels cicles realitzats només a Catalunya l'any 2004 (FIVCAT.NET 2004, Generalitat de Catalunya, 2007) i la taxa de gestació per cicle de transferència d'embrions procedents de FIV/ICSI és de 36,6 %. D'altra banda, segons l'últim registre publicat l'any 2007 per la SEF també corresponent a dades de cicles realitzats l'any 2004 (SEF 2007), la taxa de gestació per transferència d'embrions procedents de FIV/ICSI és molt similar (36,7 %).

Com s'ha dit anteriorment, la implantació de l'embrió té lloc en estadi de blastocist, a diferència de la fecundació *in vivo* en què l'embrió arriba a l'úter, ja en aquest estadi embrionari, a la fecundació in vitro

l'embrió transferit a l'úter habitualment a partir de l'estadi de quatre cèl·lules es va dividint en el mateix úter fins a assolir l'estadi de blastocist amb el qual pot tenir lloc la implantació. Després de la transferència embrionària, al cap de catorze dies aproximadament, la implantació es detecta amb la presència, en el torrent sanguini de la mare, de β hCG produïda per les cèl·lules del trofocoderm del blastocist implantat, el qual és responsable de la formació de la placenta.

Com ja s'ha dit, després de la fecundació in vitro, al cap de setze–divuit hores postinseminació es pot veure si l'òcit ha estat fecundat. Qualsevol dotació per excés o defecte de pronuclis, nuclis i/o corpuscles polars correspon a estats de zigots anòmals o a absència de fecundació.

La presència de més de dos pronuclis en un zigot pot tenir diferents orígens; com ara, penetració de més d'un espermatozoide (en casos de FIV per inseminació convencional) o bé a la *no-extrusió d'un corpuscle polar* (Grossmann i col·l. 1997; Rosenbusch i col·l. 1997a). En canvi, la formació d'un sol pronucli pot ser deguda a l'activació per *partenogenèsi* de l'òcit (Staessen i col·l. 1997). Els òcits sense pronuclis però amb un corpuscle polar són aparentment òcits madurs no fecundats; en canvi, si no presenten corpuscle, en principi són considerats òcits immadurs aparentment no fecundats.

També és possible que els òcits aparentment no fecundats, en realitat hagin estat penetrats per un espermatozoide però que s'hagi produït un bloqueig en el procés i de vegades s'observa cromatina en estadi de *condensació cromosòmica prematura* (sperm premature chromosome condensation, SPCC) corresponent a la dotació cromosòmica de l'espermatozoide (Benkhalifa i col·l. 1996).

Segons la llei actual sobre tècniques de reproducció assistida, *Llei 14/2006*, els gàmetes es poden utilitzar amb finalitat d'investigació.

Article 14. "Los gametos podrán utilizarse de manera independiente con fines de investigación." "[...] no podrán utilizarse para su transferencia a la mujer ni para originar preembriones con fines de procreación."

Tanmateix, segons l'anterior llei, *Llei 35/1988*, vigent durant la recerca portada a terme en aquest treball, aquest propòsit també era possible (*article 14.1*), tot i que restringia més les condicions previstes (*article 16.1*).

Article 14.1 "Los gametos podrán utilizarse independientemente con fines de investigación básica o experimental."

Article 16.1 (punts b-d-e-j), en les condicions previstes a l'*article 14* de l'esmentada llei s'autoritza:

b)→“La investigación básica sobre el origen de la vida humana en sus fases iniciales sobre el envejecimiento celular, así como sobre la división celular, la meiosis, la mitosis y la citocinesis”.

d)→“Las investigaciones sobre la infertilidad masculina y femenina, los mecanismos de la ovulación, los fracasos del desarrollo de los ovocitos o de la implantación de los óvulos fecundados en el útero, así como sobre las anomalías de los gametos y de los óvulos fecundados.”

e)→“Las investigaciones sobre la estructura de los genes y los cromosomas, su localización, identificación y funcionalismo, así como los procesos de diferenciación sexual en el ser humano.”

j)→“Las investigaciones sobre el origen de las enfermedades genéticas o hereditarias, tales como las cromosopatías, las metabolopatías, las enfermedades infecciosas y las inducidas por agentes externos (mutágenos, teratógenos, físicos, químicos u otros), en especial las de mayor gravedad.”

1.4 Anomalies cromosòmiques estructurals

Les anomalies cromosòmiques estructurals són el resultat de trencaments que afecten un o més cromosomes i una reparació errònia posterior.

Un cromosoma es pot trencar en qualsevol moment del cicle cel·lular, però si es trenca durant la fase G1 [figura I-7] i no es repara durant la fase S, aquest serà visible a totes dues cromàtides a la metafase següent. En cas que durant la fase G1 es produeixi un trencament a dos cromosomes diferents [figura I-22] i es doni un intercanvi de fragments entre ells, es pot produir un *cromosoma dicèntric* i un *fragment acèntric* (opció a) o bé dos *cromosomes translocats* (derivatius) cadascun amb el centròmer corresponent però amb fragments intercanviats (opció b).

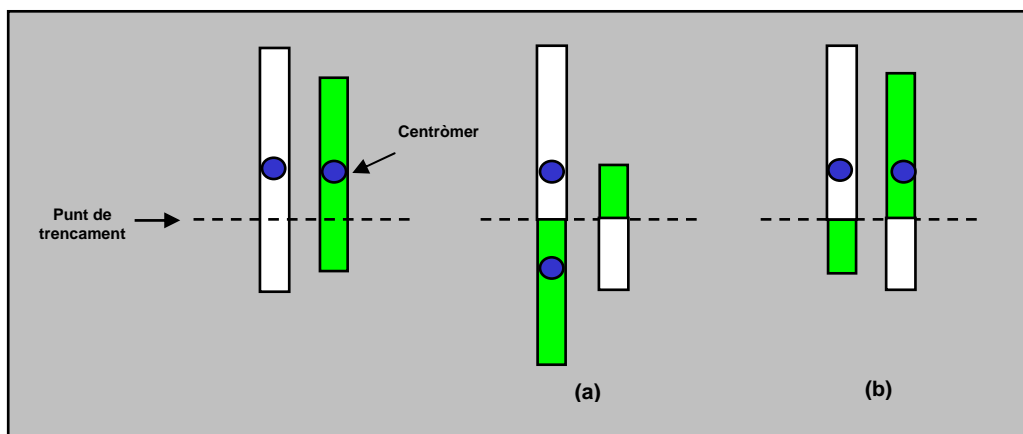


Figura I-22. Esquema del resultat del trencament de dos cromosomes diferents en fase G1 del cicle cel·lular. (a): cromosoma dicèntric. (b): fragment acèntric.

L'opció (a) és la que es dona habitualment en una *translocació robertsoniana*, que implica freqüentment cromosomes acrocèntrics, i l'opció (b) és la que es dona en una *translocació recíproca*. Les alteracions estructurals cromosòmiques poden afectar un cromosoma o més d'un.

Els trencaments cromosòmics a la línia germinal poden provocar anomalies estructurals hereditàries. Per contra, si es donen en cèl·lules somàtiques, òbviament no poden donar lloc a anomalies hereditàries però sí que poden incrementar el risc de càncer.

1.4.1 Translocacions robertsonianes

Les *translocacions robertsonianes* es refereixen a la transferència de braços sencers de cromosomes acrocèntrics. Les translocacions robertsonianes són les anomalies estructurals més freqüents en humans. La transferència de braços sencers entre cromosomes humans que no siguin acrocèntrics és molt rara, ja que s'originarien monosomies d'un braç sencer combinades amb trisomia d'un altre braç sencer, fet que seria letal.

Habitualment, les translocacions robertsonianes no afecten el fenotip de l'individu portador equilibrat, tret d'una fertilitat reduïda i d'esterilitat masculina ocasional. Els individus, que tenen 45 cromosomes, presenten una deleció dels braços curts dels *cromosomes acrocèntrics* que no té efectes greus en el fenotip ja que es tracta de regions d'heterocromatina sense informació gènica.

Si un cromosoma es trenca pel braç curt i l'altre cromosoma es trenca pel braç llarg, prop dels centròmers o bé pel centròmer mateix [figura I-23], en ambdós casos el resultat és la formació d'un cromosoma derivatiu llarg (a) i d'un cromosoma derivatiu curt (b).

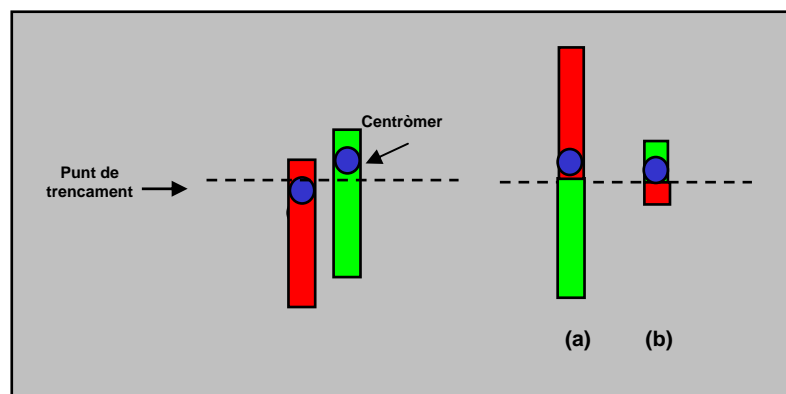


Figura I-23. Esquema del resultat del trencament de dos cromosomes acrocèntrics per un braç diferent cadascun. (a): cromosoma derivatiu llarg. (b): cromosoma derivatiu curt.

Si ambdós cromosomes acrocèntrics es trenquen pel mateix braç el resultat és la formació d'un cromosoma derivatiu dicèntric (a) i d'un *fragment acèntric* (b), que generalment es perd [figura I-24].

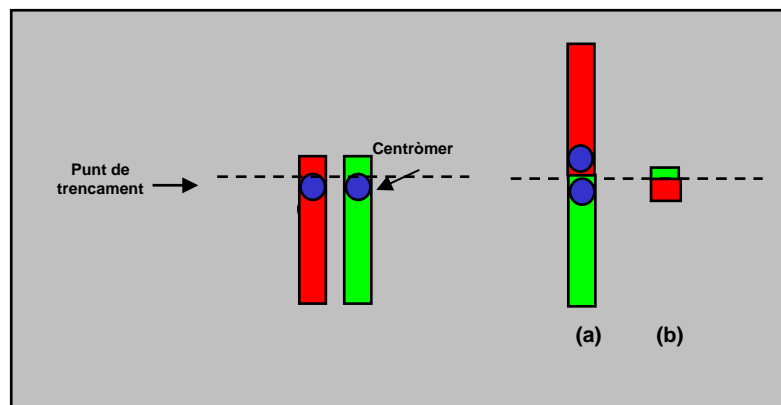


Figura I-24. Esquema del resultat del trencament de dos cromosomes acrocèntrics pel mateix braç. (a): cromosoma dicèntric. (b): fragment acèntric.

Les tècniques de bandes en translocacions robertsonianes evidencien l'existència de cromosomes *monocèntrics* i cromosomes *dicèntrics*.

Les translocacions robertsonianes poden implicar dos homòlegs d'un parell de cromosomes, per exemple, rob(13;13)(q10;q10), o bé un sol homòleg de dos cromosomes acrocèntrics diferents, per exemple, rob(13;14)(q10;q10).

Durant la gametogènesi dels portadors de translocacions robertsonianes, com a conseqüència de la sinapsi dels cromosomes implicats en la translocació, normals i derivatiu, es forma una figura d'aparellament anomenada *trivalent* que es pot veure a la fase de paquíè. Com a resultat de la segregació meiótica dels cromosomes implicats, durant l'anafase I s'observen les segregacions següents: *2:1 alternant*, *2:1 adjacent* i *3:0* [figura I-25].

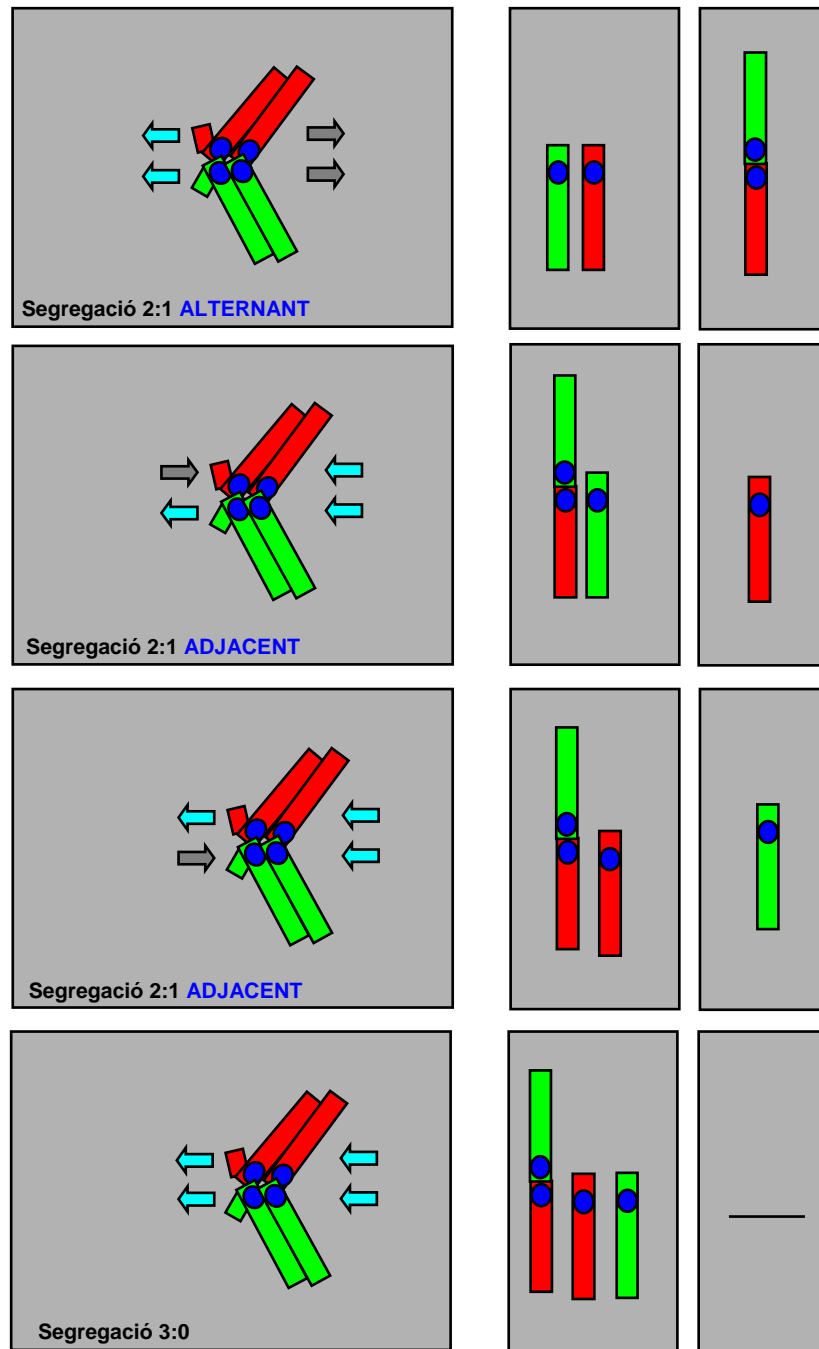


Figura I-25. Esquema del resultat de les diferents segregacions del trivalent d'una translocació robertsoniana: 2:1 alternant, 2:1 adjacent i 3:0.

La segregació 2:1 alternant d'una $t(Dq;Dq)$ i d'una $t(Dq;Gq)$ dona lloc a gàmetes amb dotacions cromosòmiques normals o dotacions cromosòmiques portadores equilibrades. La segregació 2:1 adjacent d'una $t(Dq;Gq)$ comporta dotacions cromosòmiques *trisòmiques* i *monosòmiques* G.

1.4.2 Translocacions recíproques

La majoria d'individus amb *translocacions recíproques* equilibrades són fenotípicament normals. Això no obstant, algunes observacions indiquen que almenys en certes translocacions recíproques el fenotip es pot veure afectat.

El *chromosoma derivatiu* (translocat) està format per tres parts: *segment intercanviat o translocat* (del punt de trencament als telòmers de l'altre cromosoma), *segment intersticial* (del punt de trencament al centròmer), i *segment no translocat* (del centròmer als telòmers del mateix cromosoma) [figura I-26].

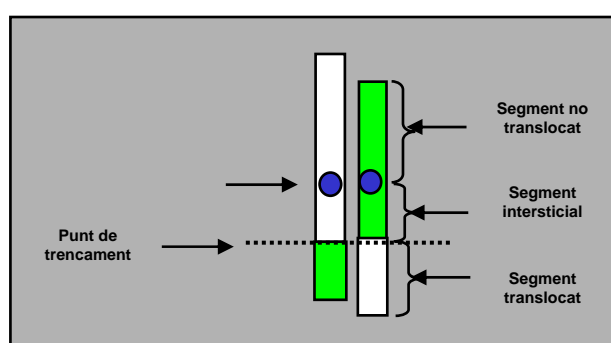


Figura I-26. Esquema de les parts del cromosoma derivatiu: segment no translocat, segment intersticial i segment translocat.

A la gametogènesi d'individus amb cromosomes translocats, ja sigui en homozigosi o heterozigosi, els fragments dels cromosomes homòlegs translocats tendeixen a aparellar-se a la profase de la meiosi I. Els dos cromosomes translocats i els seus homòlegs normals formen una agrupació, en forma de creu, dels cromosomes implicats (normals i derivatius), que constitueix un *tetravalent* que es pot veure a la fase de paquitè.

Els fragments translocats molt petits poden no ser reparats o bé no formar un quiasme. Això resulta en la formació de dos bivalents, o un grup de tres i un univalent.

Ara bé, si es presenta un quiasme terminal a cada braç de la creu [figura I-27] (a), la configuració metafàsica resultant serà un anell de quatre (b). I si en un dels braços no es forma un quiasme (c), aleshores la configuració metafàsica serà una cadena (d).

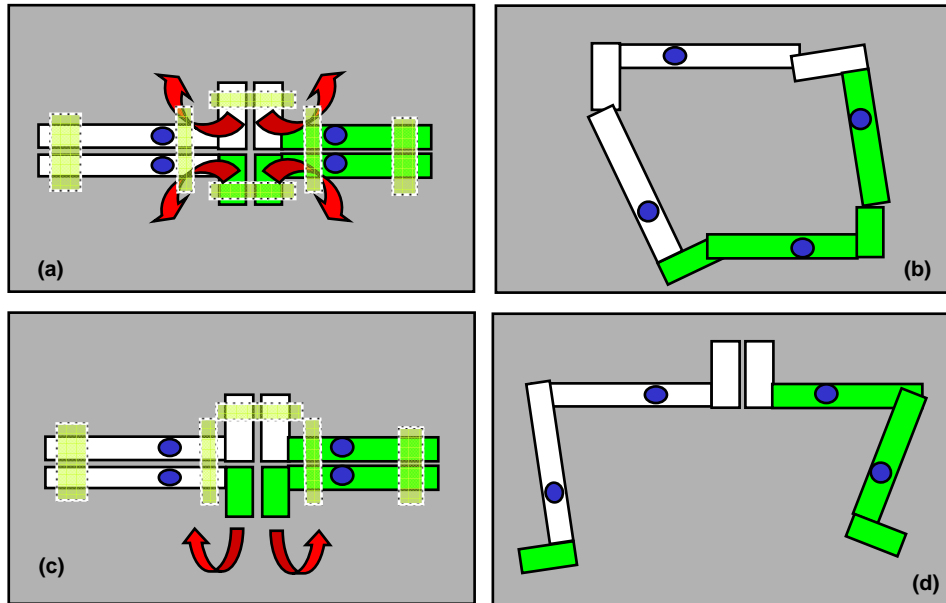


Figura I-27. Esquema de la figura del tetravalent en forma de creu i de les orientacions resultants de la configuració en anell (a-b) i en cadena (c-d), dependent del nombre de quiasmes.

La *segregació 2:2 alternant* produeix una cèl·lula filla amb dos cromosomes normals i l'altre amb dos cromosomes translocats. La *segregació 2:2 adjacent-1* dona lloc a la formació de dues cèl·lules filles desequilibrades, cadascuna amb un cromosoma translocat i un de normal. I en la *segregació 2:2 adjacent-2*, els centròmers homòlegs no segreguen a pols diferents i dona lloc a dues cèl·lules filles que encara són més desequilibrades [figura I-28]. A part de la segregació 2:2, també es poden donar els tipus de *segregació 1:3* i *segregació 4:0*.

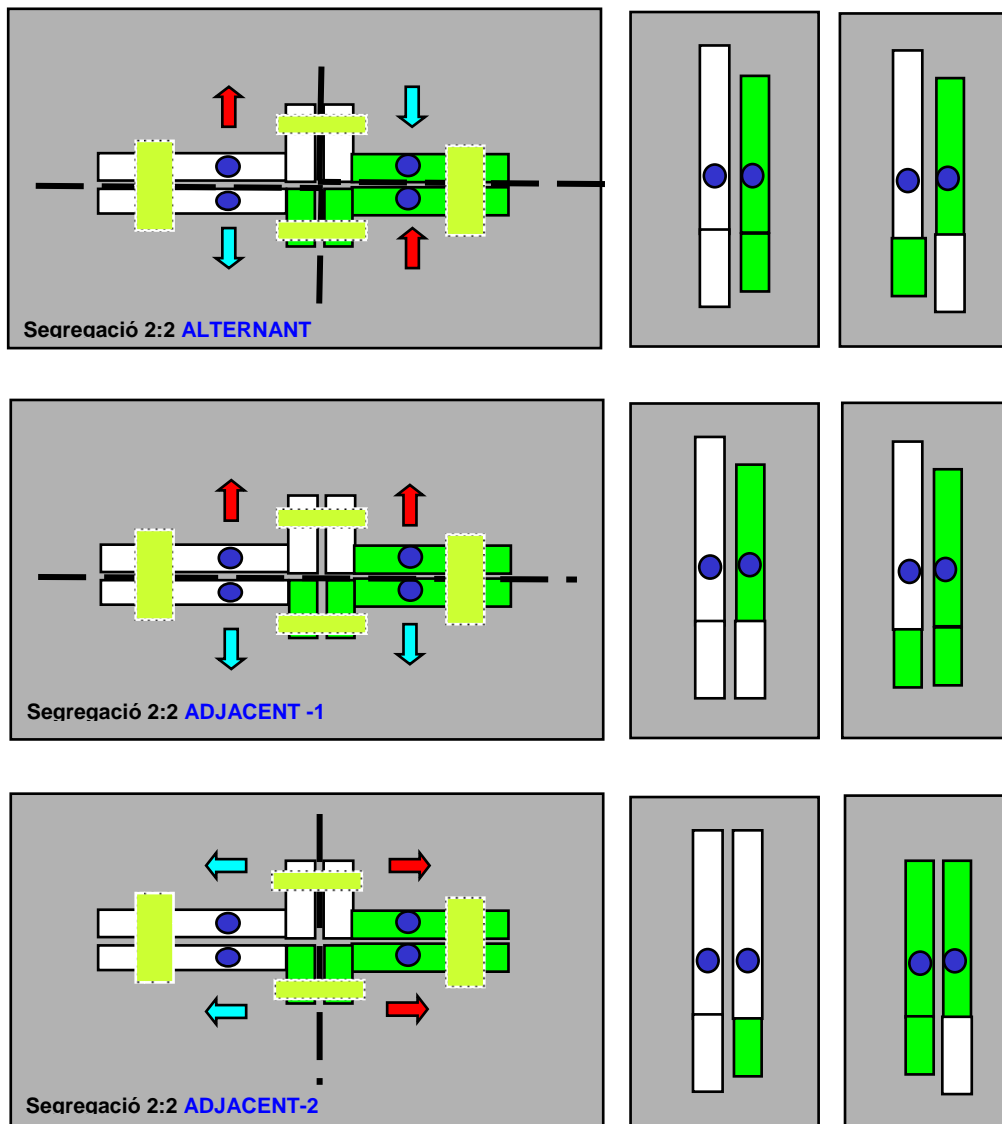


Figura I-28. Esquema de les diferents segregacions 2:2 del tetravalent d'una translocació recíproca: 2:2 alternant, 2:2 adjacent-1 i 2:2 adjacent-2.

El risc de produir diferents tipus de cariotips desequilibrats depèn de la configuració del paquet que formen els quatre cromosomes implicats en la translocació. Aquest fet a la vegada està determinat per la forma dels cromosomes i les distàncies de cada punt de trencament respecte del centròmer (segment intersticial) i els telòmers (segment intercanviat o translocat) [figures I-24 i I-26]. Les dimensions d'aquests segments afecten la probabilitat de recombinació de forma específica en cada tetravalent. El tipus de segregació es pot inferir, en part, de les freqüències de recombinació observades en diferents famílies amb individus portadors de translocacions i es poden inferir alguns comportaments del tetravalent (Miller i Therman 2001):

1. Quan els segments intersticials són tan curts que no formen el quiasme, resulten més segregacions adjacent-1 que adjacent-2.
2. Quan s'espera un quiasme almenys en un segment intersticial, la segregació observada més àmpliament és l'adjacent-1.
3. Quan els fragments translocats són molt curts, els quatre cromosomes formaran una cadena o dos bivalents, aleshores es dona més freqüentment la segregació adjacent.
4. Quan la part no intercanviada és molt curta, és impossible que es formi un quiasme. La cadena resultant s'espera que segueixi tipus adjacent-2.
5. Els factors que sembla que donin lloc més freqüentment a segregacions 1:3 respecte 2:2 són els següents: un dels cromosomes és acrocèntric, almenys un trencament és proper al centròmer i quan participen cromosomes de mida molt diferent; en altres paraules, quan el paquet és molt asimètric.

1.5 Anomalies cromosòmiques numèriques

Les *alteracions cromosòmiques numèriques* són les alteracions en què està alterat el nombre de cromosomes.

1.5.1 Alteració del nombre de complements cromosòmics (poliploidia)

Aquest tipus d'alteracions inclouen les *triploidies* (el total de cromosomes que presenta la cèl·lula és de 69 en comptes de 23) i les *tetraploidies* (el total de cromosomes és de 92). Aquest tipus d'alteracions poden permetre la implantació i l'inici del desenvolupament embrionari però no s'han descrit nounats que la manifestin (Jacobs i Hassold 1995).

La proporció d'òcits amb complement cromosòmic *poliploides* varia del 3,4 % al 31,1 %. (Pellestor i col·l. 2005). La no-extrusió de l'1CP sembla que és el causant principal de la *diploidia*. També s'han descrit òcits II amb dues *plaques metafàsiques* (Rosenbusch i col·l. 2002). La no-extrusió de l'1CP ha estat associada amb la immaduresa citoplasmàtica que pot ser conseqüència de factors fisiològics, hormonals, genètics o ambientals (Pellestor i col·l. 2005).

1.5.2 Alteració del nombre de cromosomes de la dotació cromosòmica (aneuploïdia)

L'aneuploïdia és l'alteració del nombre de cromosomes de la dotació cromosòmica i pot afectar qualsevol cromosoma. La majoria de *monosomies* (pèrdua d'un cromosoma) i *trisomies* (guany d'un cromosoma) autosòmiques no són viables i els embrions que les pateixen aturen el seu desenvolupament; per això és freqüent diagnosticar-les en productes d'avortaments espontanis (Jacobs i Hassold 1995). Això no obstant, hi ha algunes trisomies autosòmiques viables, com per exemple la trisomia 21, la única en que l'individu arriba a l'edat adulta. La síndrome de Turner (45, XO) és un exemple d'aneuploïdia sexual i és la única monosomia viable en l'espècie humana.

Estudis d'avortaments espontanis i en *nascuts vius* han posat de manifest que la majoria de les aneuploïdies en l'embrió són degudes a una no-disjunció en la primera divisió meiótica materna.

1.5.3 Mecanismes i etiologia d'aneuploïdia en oòcits d'humans

El mecanisme de no-disjunció pot venir originat per una *no-disjunció de bivalents* en meiosi I (no-disjunció clàssica) (Zenzes i col·l. 1992a; Kamiguchi i col·l. 1993; Dailey i col·l. 1996) i, per tant, implicaria un guany o una pèrdua d'un *univalent* a les cèl·lules filles (1CP i MII). O bé, per una *separació precoç de cromàtides (predivisió) d'univalents* produint una distribució de cromàtides equilibrada (2 i 2) o desequilibrada (3 i 1) (Angell i col·l. 1993; Dailey i col·l. 1996).

La predivisió de cromàtides desequilibrada implica guany o pèrdua de cromàtides a les cèl·lules filles. L'any 1991 (Angell 1991), analitzant complements cromosòmics d'òcits amb tinció uniforme, van observar per primera vegada una nova alteració que afectava les cromàtides dels cromosomes, predivisió de cromàtides (univalents) originada durant la meiosi I. En canvi, a la predivisió de cromàtides equilibrada no hi ha guany ni pèrdua de material cromosòmic.

El *mosaïcisme gonadal* també és un procés que pot donar lloc a aneuploïdia. És sabut que la recombinació anòmala i l'edat materna avançada són factors etiològics essencials, però els mecanismes causants de l'existència d'una mala segregació meiótica encara no estan del tot clars. L'efecte de l'edat materna és multifactorial (Pellestor i col·l. 2005).

1.6 Incidència d'anomalies cromosòmiques a la població humana, risc per a la descendència i diagnòstic genètic

La presència d'anomalies cromosòmiques en els gàmetes humans, òocits i espermatozoides, varia quant a la incidència i el tipus d'anomalia.

1.6.1 Tècniques de fixació

La tècnica de fixació més àmpliament aplicada és la basada en el *mètode de Tarkowski* (Tarkowski 1966). Tanmateix, aquesta tècnica de fixació pot induir el desplaçament i la pèrdua de cromosomes durant el procés de fixació. Conseqüentment, de forma habitual es fa una estimació conservadora de l'aneuploïdia multiplicant per dos el nombre de hiperploïdies observat. Encara que, de fet, la pèrdua artefactual de cromosomes constitueix la major causa de hipoploïdies, també cal tenir en compte la implicació d'alteracions de mecanismes inherents a l'oogènesi, tal com el retard en l'anafase, l'alteració del citoesquelet o el desplaçament de cromosomes (Pellestor i col·l. 2005). L'any 1983, Mikamo i Kamiguchi van descriure en òocits una *tècnica de fixació suau i gradual*, que evitaria la pèrdua de cromosomes i la separació de cromàtides artefactuals pròpies de la tècnica de Tarkowski.

1.6.2 Freqüència d'anomalies cromosòmiques en gàmetes humans

La freqüència mitjana de poliploïdia, aneuploïdia i d'anomalies estructurals, observades en els estudis de *cariotipatge* d'òocits humans, varien segons la tècnica de fixació aplicada. Utilitzant la tècnica de fixació gradual les incidències són del 9,3 %, 17,0 % i 4,6 % respectivament. I utilitzant la tècnica de Tarkowski són del 10,9 %, 26,4 % i 6,0 %, respectivament (Pellestor i col·l. 2005). Aquests autors extreuen aquestes dades d'una revisió de catorze estudis de cariotipatge d'òocits humans fixats mitjançant la tècnica de fixació gradual, amb un total de 3.808 metafases analitzades; i trenta-cinc estudis de cariotipatge d'òocits humans fixats mitjançant la tècnica de Tarkowski, amb un total de 3.795 metafases analitzades.

Quan s'apliquen altres *tècniques d'anàlisi citogenètica molecular*, la incidència d'anomalies cromosòmiques varia àmpliament segons els estudis. Pellestor i col·l. (2005), revisen diversos estudis de FISH convencional en òocits humans, la poliploïdia oscil·la entre el 6,0 % i el 11,0 % (tres estudis) i l'aneuploïdia oscil·la entre el 3,0 % i el 47,5 % (dotze estudis). Aquests mateixos autors revisen la incidència d'aneuploïdia en quatre estudis de la FISH en 1CP i varia entre el 32,1 % i el 52,1 %. També revisen quatre estudis en què s'aplica el cariotipatge espectral (SKY o M-FISH) i la incidència d'aneuploïdia varia entre el 20,0 % i el 39,0 % (almenys amb quaranta-set metafases analitzades), tres estudis en què s'aplica la tècnica de PRINS o la tècnica de PNA (entre 18,2 % i 23,5 %) i dos estudis on s'aplica la tècnica de CGH (48,0 % i 90,0 %). Cal tenir en compte que aquest valor podrien ser encara

massa baixos ja que no s'estan tenint en compte les anomalies que es poden produir a la segona divisió meiótica un cop ha tingut lloc l'extrusió del segon corpuscle polar.

En qualsevol cas, en òcits humans la incidència d'anomalies cromosòmiques numèriques és superior a la incidència d'anomalies estructurals. Cal tenir en compte que la morfologia i la condensació de les cromàtides en MII dificulten la detecció d'anomalies estructurals. Conseqüentment, la taxa estimada d'anomalies estructurals està probablement subestimada (Pellestor i col·l. 2005). En òcits humans en MII, tenint en compte les dades obtingudes en la revisió d'estudis de cariotipatge i citogenètica molecular, la possible incidència d'anomalies cromosòmiques és aproximadament del 20 % (Pellestor i col·l. 2005).

En espermatozoides humans, en canvi, la incidència d'anomalies cromosòmiques és major en anomalies cromosòmiques estructurals essent d'un 7 %, respecte les anomalies numèriques, d'un 3 % (Martin i col·l. 1991; Guttenbach i col·l. 1997).

En òcits, la més elevada taxa d'anomalies suggereix que hi ha una major contribució materna en la gènesi de concepcions anòmals. Resulta difícil estimar la incidència de la pèrdua de concepcions humanes atès que la majoria es produeixen abans de la implantació o no es detecten abans de la primera falta menstrual i passen desapercebudes. L'any 1987, Santaló i col·l. (1987), analitzant embrions preimplantacionals descartats de cicles de FIV, estimen una freqüència del 65 % de pèrdues preimplantacionals tenint en compte les anomalies cromosòmiques trobades en aquests embrions. Després de la fecundació es produeix una pèrdua progressiva d'embrions anòmals a estats específics del desenvolupament embrionari primerenc, a través d'una aturada d'aquest i la degeneració dels embrions anòmals.

1.6.3 Freqüència d'anomalies cromosòmiques en embarossos

Dels embarossos detectats en la població humana en general, un 85 % corresponen a embarossos que tiren endavant; d'aquests, un 83,3 % sobreviuen (nascuts vius) i un 1,7 % resulten en morts perinatals (nascuts morts o mort primerenca). De forma natural, la incidència d'anomalies cromosòmiques al llarg de l'embaràs decreix de tal manera que en les morts perinatals és un 5–6 % (Machín i Crolla 1974) i en nascuts vius és d'un 0,6 % (Nielsen 1975), sent en ambdós grups més freqüents les anomalies numèriques, 75 i 60 %, respectivament, enfront de les anomalies estructurals, un 25 i 40 % respectivament. Si ens centrem en les reorganitzacions cromosòmiques equilibrades (translocacions robertsonianes, translocacions recíproques i inversions), trobem que un 31 % dels nascuts vius amb anomalies cromosòmiques presenten anomalies cromosòmiques estructurals equilibrades, la qual cosa correspon a un 0,19 % del total de nascuts vius. És a dir, dinou de cada deu mil individus són portadors d'una reorganització cromosòmica, i formen un grup de risc elevat de transmetre anomalies cromosòmiques a la seva descendència.

El 15 % restant dels embarassos detectats a la població humana en general acaben en avortaments espontanis postimplantacionals durant el primer trimestre de gestació i es considera que el 50–70 % són deguts a anomalies cromosòmiques (Rubio i col·l. 2003; Boué i col·l. 1975, Hassold i col·l. 1978; Plachot 1989; Eiben i col·l. 1990; Stephenson i col·l. 2002). Les anomalies cromosòmiques numèriques es donen en el 95 % dels avortaments (Eiben i col·l. 1990; De Vita i col·l. 1993) i les anomalies cromosòmiques estructurals es donen en el 5 % restant dels avortaments espontanis (Eiben i col·l. 1990).

A més, també cal tenir en compte que un 4,7 % de les parelles no fèrtils, amb dos o més avortaments espontanis (*avortaments de repetició*) inclouen un progenitor portador d'una reorganització cromosòmica estructural (De Braekeleer i Dao 1990). Les anomalies estructurals són les més freqüents i representen un 2,1 % dels avortaments espontanis; les anomalies estructurals més freqüents són les translocacions recíproques (1,2 %), seguit de les translocacions robertsonianes (0,6 %) i les inversions (0,2 %). La freqüència d'anomalies estructurals respecte del nombre d'avortaments espontanis per parella: un, dos o més de dos augmenta respecte del nombre d'avortaments, sent un 1,0 %, 2,2 % i 2,4 %, respectivament.

Si tenim en compte el sexe del portador, ens trobem que la distribució de les anomalies cromosòmiques sempre és major en les dones.

Hi ha una taxa elevada de no-evolució embrionària i hi ha una selecció negativa de les anomalies cromosòmiques durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari. La incidència d'anomalies cromosòmiques decreix respecte de les setmanes de gestació: 45,5 % en avortaments espontanis (abans de les vint setmanes de gestació); 5,35 % en morts perinatals i 0,3 % en nascuts vius (Jacobs i Hassold 1995). S'ha estimat que en dones de 35 anys o més, el 50 % dels embrions són cromosòmicament anormals i el factor predominant és l'aneuploïdia (Munné i col·l. 1995a).

1.6.4 Indicacions de població de risc de tenir descendència amb anomalies cromosòmiques

Les indicacions d'una *població de risc* de tenir descendència amb anomalies cromosòmiques són: l'edat materna avançada (> 36 anys), parelles amb dos avortaments o més (avortament de repetició), pares portadors de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades i, finalment famílies amb un fill afecte d'una cromosomopatia precedent, en els quals està indicada la realització d'un diagnòstic genètic prenatal per evitar el naixement de descendència afectada.

En aquest treball ens hem centrat en l'estudi d'alteracions cromosòmiques estructurals com a conseqüència de dones portadores de translocacions.

1.7 Diagnòstic prenatal

L'obtenció de mostra biològica del fetus i la seva anàlisi s'ha de fer en un marge de temps suficient per permetre, si és el cas, practicar una *interrupció voluntària de l'embaràs*, que per llei es pot practicar, com a màxim entre les setmanes dinou i vint de gestació (*Llei 9/1985*). El primer *diagnòstic prenatal* d'anomalies cromosòmiques data de l'any 1967 (Jacobson i Barter 1967) i es va portar a terme mitjançant el cultiu de cèl·lules del líquid amniòtic. I l'any 1983, Brambati i Simoni (1983) utilitzen per primera vegada la biòpsia de vellositats de còrion per al diagnòstic prenatal. L'obtenció de mostra fetal es fa sota control per ecografia, entre les setmanes nou i dotze de gestació es fa una *biòpsia de vellositats de còrion* i entre les setmanes quinze i disset de gestació es fa una *extracció de líquid amniòtic (amniocentesi)*.

Les indicacions del diagnòstic prenatal són les de la població amb risc de transmetre anomalies cromosòmiques a la seva descendència, indicades anteriorment [vegeu l'apartat 1.6.4], i també l'observació prèvia per ecografia de fetus amb anomalies (com ara el creixement retardat i la morfologia fetal alterada).

1.8 Diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) mitjançant blastòmer

Els avenços en les tècniques de reproducció humana assistida han facilitat el desenvolupament de mètodes de diagnòstic de malalties genètiques i anomalies cromosòmiques que són tan precoces que, de fet, es poden diagnosticar abans que tingui lloc la gestació. Per aquesta raó aquesta metodologia es coneix amb el nom de *diagnòstic genètic preimplantacional (DGP)* i és un complement excel·lent al diagnòstic prenatal (Egozcue i col·l. 2006). El DGP, també conegut com a PDG (*preimplantation genetic diagnosis*) va ser inicialment desenvolupat l'any 1990 per Handyside (Handyside, 1990). S'analitza l'embrió de dos o tres dies (preimplantacional) en lloc del fetus de diverses setmanes de gestació. El DGP va ser desenvolupat per evitar la interrupció dels embarassos patològics i la transmissió a la descendència d'anomalies monogèniques i/o cromosòmiques en parelles de risc elevat (1/20 o superior).

Aquest procediment, aplicat en un programa de FIV, permet detectar les alteracions genètiques en blastòmers d'*embrions de sis–vuit cèl·lules* i transferir a l'úter matern embrions genèticament normals. S'analitzen un o dos blastòmers de cada embrió. La tècnica d'anàlisi aplicada inicialment va ser la tècnica de *reacció en cadena de la polimerasa* (polimerase chain reaction, PCR) la qual permet amplificar l'ADN de gens o de parts específiques de gens (Handyside i col·l. 1989). També s'ha aplicat la tècnica d'anàlisi *d'hibridació in situ fluorescent* (fluorescent in situ hybridization, FISH) emprant sondes

d'ADN, marcades fluorescentment, específiques per a regions concretes de cromosomes (Muggleton-Harris i col·l. 1995).

En casos de parelles en les quals la dona és portadora d'una *anomia gènica* recessiva lligada al sexe, majoritàriament lligades al cromosoma X, es fa una determinació del sexe de l'embrió ja que únicament els embrions masculins tenen un risc de patir-la (Handyside i col·l. 1989). Es transfereixen, només, embrions femenins que seran normals o, en el pitjor dels casos, portadors de l'anomia. En cap cas no seran afectes de la patologia ja que el progenitor masculí és normal. Amb el temps es va introduir, alternativament, la *selecció del sexe* mitjançant la aplicació de la FISH amb sondes específiques per als cromosomes sexuals (Staessen i col·l. 1999). També s'ha desenvolupat l'aplicació del DGP per a l'anàlisi citogenètica dels cromosomes implicats en aneuploidies viables mitjançant la FISH (Munné i col·l. 1995a; Munné i col·l. 1996; Gianaroli i col·l. 1999) i en translocacions (Munné i col·l. 2000a,c).

Les indicacions de DGP més freqüents són per a *anomalies cromosòmiques numèriques o estructurals*, i la gran majoria d'indicacions són per a *cribratge d'aneuploidies*. El cribratge d'aneuploidies s'aplica en edat materna avançada (Gianaroli i col·l. 1999), en pacients que han patit almenys tres fallides de FIV, i pacients amb més de dos avortaments amb pares amb cariotip normal (Simón i col·l. 1998).

Els individus portadors d'anomalies cromosòmiques, ja siguin numèriques o estructurals (translocacions, inversions), són els principals beneficiaris del DGP. Aquests individus habitualment presenten infertilitat deguda a diferents graus d'aparellament a la gametogènesi relacionat amb anomalies meiótiques induïdes per l'anomia cromosòmica i a la producció de gàmetes desequilibrats resultants de la segregació meiótica dels cromosomes implicats. Sovint presenten avortaments per raó de la producció d'embrions cromosòmicament anòmals o naixement de nens afectes de desequilibris cromosòmics. La selecció d'embrions donaria més èxit reproductiu (Egozcue i col·l. 2006).

En el DGP per anomalies citogenètiques en embrions implica la *biòpsia* d'un o dos blastòmers d'embrions de sis–vuit cèl·lules. La biòpsia s'ha d'extreure a través d'un forat a la *zona pel·lúcida* (ZP). El procediment per foradar la ZP es pot fer per tres mètodes diferents: químic, mitjançant l'ús d'àcid Tyrode; mecànic, utilitzant una microagulla; o mitjançant un làser. L'elecció d'un o altre mètode dependrà de cada cas individual i s'ha de considerar abans. També cal tenir en compte que la limitació principal del DGP és el nombre d'embrions obtingut. Com més embrions, més possibilitat d'obtenir embrions sans.

La biòpsia es pot extreure també per tres mètodes diferents: aspiració, extrusió o per desplaçament amb un flux de medi (Egozcue i col·l. 2006). Les cèl·lules biopsiades es lisen per a fer PCR o es fixen per a

realitzar la FISH. S'han publicat mètodes alternatius que utilitzen la fusió cel·lular d'un blastòmer amb un zigot de mamífer, amb la qual cosa s'ha pogut condensar la cromatina nuclear dels blastòmers fins a l'estadi de cromosomes metafàsics (Verlinsky i Evsikov 1999; Willadsen i col·l. 1999; Verlinsky i col·l. 2002).

Els primers embarassos, després de l'aplicació clínica del DGP mitjançant embrions, van ser descrits l'any 1990 (Handyside i col·l. 1990), realitzant la selecció de sexe d'embrions per PCR. Avui en dia, milers d'embrions han estat analitzats, i centenars de nens i nenes han nascut utilitzant el DGP mitjançant embrions.

L'any 1997 es va crear un consorci específic per DGP dins la Societat Europea de Reproducció Humana i Embriologia (*European Society of Human Reproduction and Embryology*, ESHRE). La finalitat era fer un estudi a llarg termini de l'eficàcia i els resultats clínics del DGP. Des del mes de gener de l'any 1997 aquest Consorci fa la recollida de dades dels centres europeus que realitzen DGP. S'han publicat quatre recollides de dades dels centres europeus que realitzen DGP. S'han publicat quatre recollides (Geraedts i col·l. 1999 i 2000; Sermon i col·l. 2005). L'any 2006 (Harper i col·l. 2006) s'ha publicat l'última recollida de dades que inclou les dades de gener a desembre del 2002 i les compara amb les dades de les recollides I-IV.

Agrupant les dades de les cinc recollides (I-V) s'han fet 5.891 cicles de DGP per anomalies cromosòmiques estructurals, anomalies lligades al sexe i malalties monogèniques (2.701), per cribratge d'aneuploidies (2.950) i per selecció de sexe per motius socials (240).

1.9 Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP)

L'any 1990 Verlinsky i col·l. (Verlinsky i col·l. 1990) van proposar un mètode alternatiu al DGP en embrions basat en l'anàlisi de *primer corpuscle polar* (1CP); després que Monk i Handyside l'any 1988 (Monk i Handyside 1998) van demostrar que era possible utilitzar la PCR per amplificar gens en ADN aïllat de blastòmers. Aquest mètode alternatiu, inicialment anomenat diagnòstic genètic preconcepcional (DGPC), òbviament, pot ser exclusivament aplicat en parelles en les quals és la dona la portadora de l'anomalia gènica o la que genera el risc d'alteració cromosòmica per a la seva descendència; edat materna avançada o ser portadora de reorganització cromosòmica equilibrada.

El *diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'1CP* (DGP-1CP) es basa en les característiques específiques de la gametogènesi femenina que ja hem explicat anteriorment [vegeu l'apartat 1.2] en la formació del gàmeta femení. L'òcit madur, aturat a la *metafase II*, va acompanyat de l'1CP, resultant de primera divisió meiótica. En ser ambdues cèl·lules cromosòmicament complementàries es pot fer una anàlisi indirecta del contingut cromosòmic de l'òcit a través de l'estudi del contingut cromosòmic de

l'1CP, mentre l'òocit manté la capacitat reproductiva intacta. Així, dins d'un programa de FIV es podria identificar i seleccionar per ser transferits a l'úter matern embrions resultants d'òcits cromosòmicament normals o equilibrats.

Cal tenir present que els errors en l'extrusió del segon corpuscle polar, els errors postzigòtics (mitòtics) i les anomalies lligades al cromosoma Y, no es poden detectar.

El DGP-1CP té un gran interès ja que, almenys el 90 % dels errors cromosòmics s'originen en la meiosi femenina (Hassold i col·l. 1996; Nicolaidis i Petersen 1998). El desenvolupament del DGP-1CP està indicat en la detecció d'anomalies com la síndrome de Down de la qual es coneix que en un 95 % dels casos l'origen és matern (Antonarakis 1991; Antonarakis i col·l. 1992) i que de manera molt majoritària, en un 77,1 % dels casos, l'error s'ha produït en la disjunció dels cromosomes durant la primera divisió meiótica materna.

Aquesta anàlisi té l'avantatge que no està afectada per l'existència de *mosaicisme*, el qual resulta molt freqüent durant les primeres divisions mitòtiques postembrionàries, cosa que dificulta el DGP (Munné i col·l. 1994; Munné i col·l. 2002b). Una altra avantatge que presenta aquesta anàlisi és que l'1CP, en trobar-se detingut a la metafase II, no presenta la dificultat d'interpretació dels senyals de la FISH que, en canvi, presenten les cèl·lules proliferants susceptibles de poder-se trobar en qualsevol de les etapes del cicle cel·lular (Pujol i col·l. 2004). Aquest fet sembla que podria induir a errors d'interpretació durant el DGP (Munné i col·l. 2002b).

En l'aplicació del DGP-1CP, com que la biòpsia es realitza en el D + 0, es disposa de fins a tres o quatre dies per poder fer l'anàlisi citogenètica.

No obstant això, el DGP-1CP presenta certes limitacions. No informa de les alteracions produïdes durant la segona divisió meiótica, com a conseqüència d'una segregació anòmala de les cromàtides germanes que, encara que amb menys freqüència, també té lloc (Verlinsky i col·l. 1997a). Al mateix temps, l'anàlisi de l'1CP no informa de la contribució paterna. Això es podria evitar amb la realització, en D + 3, de l'anàlisi d'un o dos blastòmers de l'embrió de sis-vuit cèl·lules el qual ha donat lloc la inseminació de l'òocit. La mala qualitat de les extensions de l'1CP pot dificultar-ne l'anàlisi citogenètica (Verlinsky i col·l. 1996).

L'aplicació del DGP-1CP a dones portadores d'anomalies gèniques ha permès identificar oòcits sense la mutació, mitjançant la tècnica de la PCR (Verlinsky i col·l. 1990), i en dones amb risc d'aneuploidies ha permès identificar oòcits cromosòmicament euploides, mitjançant la FISH amb sondes centromèriques específiques (Munné i col·l. 1995b; Verlinsky i col·l. 1995, 1996). Altres camps d'aplicació de la biòpsia d'1CP són la detecció d'anomalies gèniques lligades al cromosoma X (Verlinsky i col·l. 2001 i 2006) i per

tipatge d'antigens humans leucocitaris (human leucocyte antigen, HLA) per diferents desordres (Verlinsky i col·l. 2001; Rechitsky i col·l. 2004, 2006; Kuliev i col·l. 2005). Recentment s'ha aplicat l'anàlisi d'1CP per el diagnòstic d'anomalies gèniques mitjançant *multiplex fluorescent PCR reaction* (Renbaum i col·l. 2007).

La llei actual sobre tècniques de reproducció assistida (*Llei 14/2006*) defineix els casos en què es podran practicar tècniques de diagnòstic preimplantacional:

Article 12.a "La detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los preembriones no afectos para su transferencia."

L'últim informe sobre l'estadística de reproducció humana assistida a Catalunya publicat l'any 2007, inclou les dades de l'any 2004 (FIVCAT.NET 2007), un 0,6 % de cicles de transferència són per l'aplicació del DGP com a tècnica de RHA. I segons l'últim registre publicat l'any 2006 per la SEF corresponent a les dades de l'any 2003 (SEF 2007), el 3,0 % dels cicles són de DGP.

El DGP a Espanya està regulat per la *Llei 14/2006*, en concret, a l'article 12:

1. "Los centros debidamente autorizados podrán practicar técnicas de diagnóstico preimplantacional para:

a) *La detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los preembriones no afectos para su transferencia.*

b) *La detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión."*

...

2. "La aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para cualquiera otra finalidad no comprendida en el apartado anterior, o cuando pretendan practicar en combinación con la determinación de los antígenos de histocompatibilidad de los preembriones in vitro con fines terapéuticos para terceros, requerirá de la autorización expresa, caso a caso, de la autoridad sanitaria..."

1.10 DGP-1CP en dones portadores de reorganitzacions cromosòmiques

En *translocacions robertsonianes*, un 69,6 % són degudes a mares portadores i un 30,4 %, a pares portadors. En *translocacions recíproques* la distribució és similar, 63,9 % són degudes a mares portadores i un 36,1 %, a pares portadors (De Braekeleer i Dao 1990). El DGP-1CP està especialment indicat en la selecció d'òcits de dones portadores de translocacions, amb èxit reproductiu baix i risc

elevat de descendència desequilibrada, en les quals es podria fer una selecció dels òcits per estudi de segregació dels cromosomes implicats en la translocació en qüestió.

En el cas dels òcits de dones portadores de translocacions robertsonianes com a resultat de la segregació dels cromosomes implicats en la translocació es poden formar vuit gàmetes diferents: normal, equilibrat i sis combinacions de gàmetes desequilibrats (2:2 adjacent-1, 2:2 adjacent-2, 1:3 i 0:4) [figura I-29].

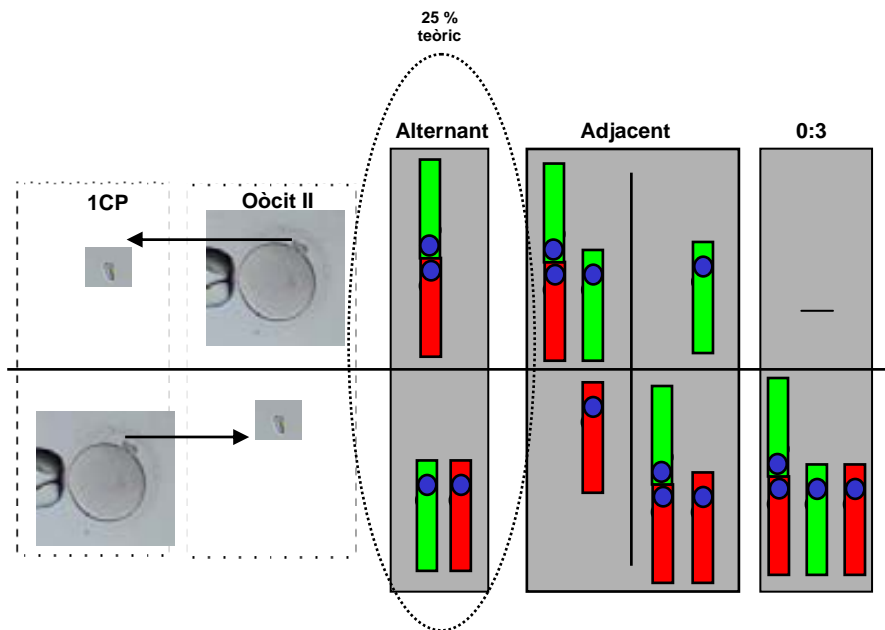


Figura I-29. Esquema de les possibles segregacions dels cromosomes implicats en una translocació robertsoniana en la gametogènesi d'una dona portadora. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

En canvi, com a resultat de l'oogènesi d'una dona portadora d'una translocació recíproca es poden formar teòricament setze gàmetes diferents: normal, equilibrat i catorze combinacions de gàmetes desequilibrats (2:2 adjacent 1, 2:2 adjacent 2, 3:1 i 0:4) [figura I-30].

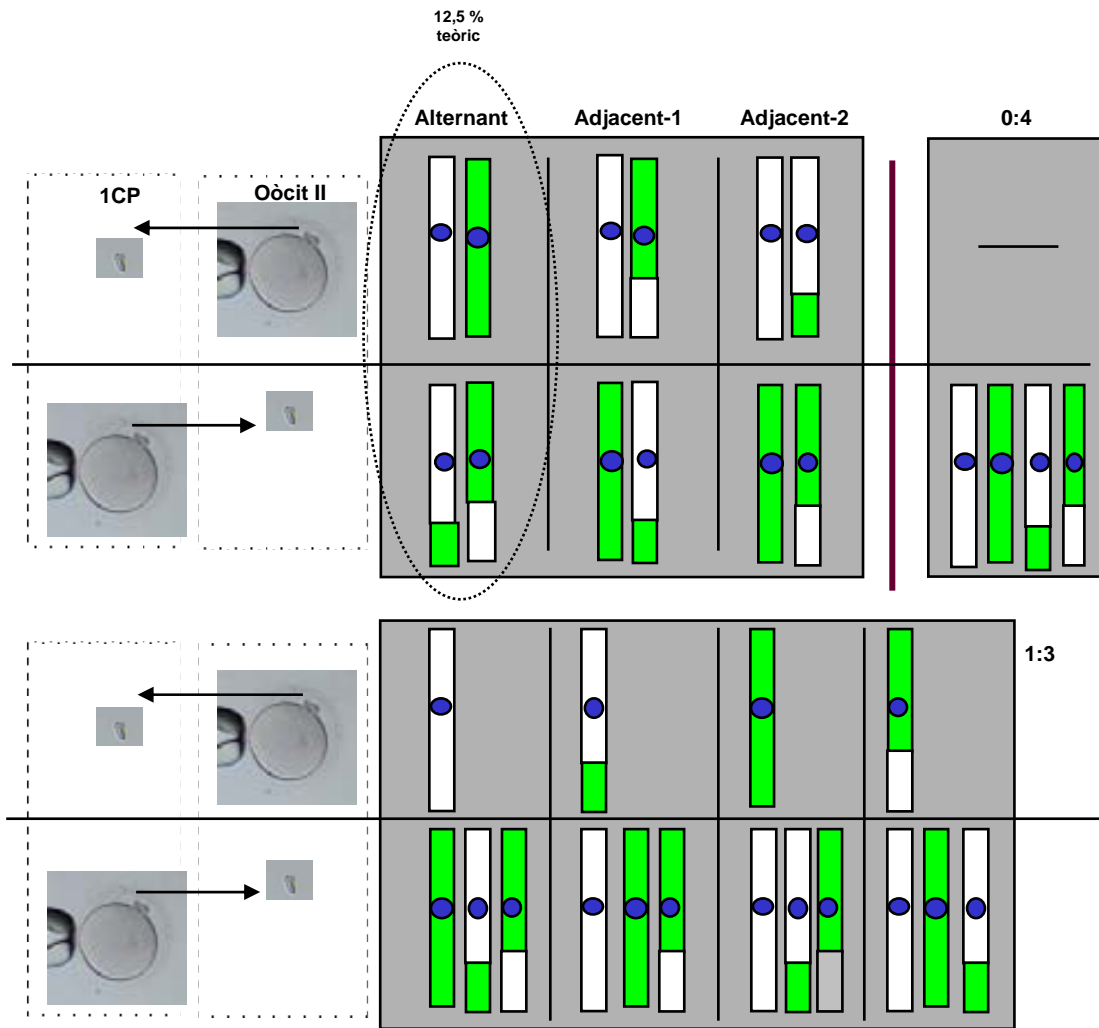


Figura I-30. Esquema de les possibles segregacions dels cromosomes implicats en una translocació recíproca en la gametogènesi d'una dona portadora. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

Si l'home té un cariotip normal es pot fer la selecció dels òcits normals o equilibrats mitjançant un DGP-1CP. La dona portadora de la translocació és sotmesa a estimulació hormonal i el dia de la punció fol·licular els òcits madurs recuperats s'inseminen per ICSI i es biopsien els 1CP. Al cap d'un o dos dies tindrem el resultat de l'anàlisi citogenètica dels 1CP i, indirectament, dels òcits. Els embrions resultants de la inseminació d'òcits diagnosticats normals o equilibrats, des del punt de vista citogenètic, seran els aptes per transferir a l'úter matern, mentre que els embrions resultants d'òcits desequilibrats seran descartats del cicle [figures I-31 i I-32].

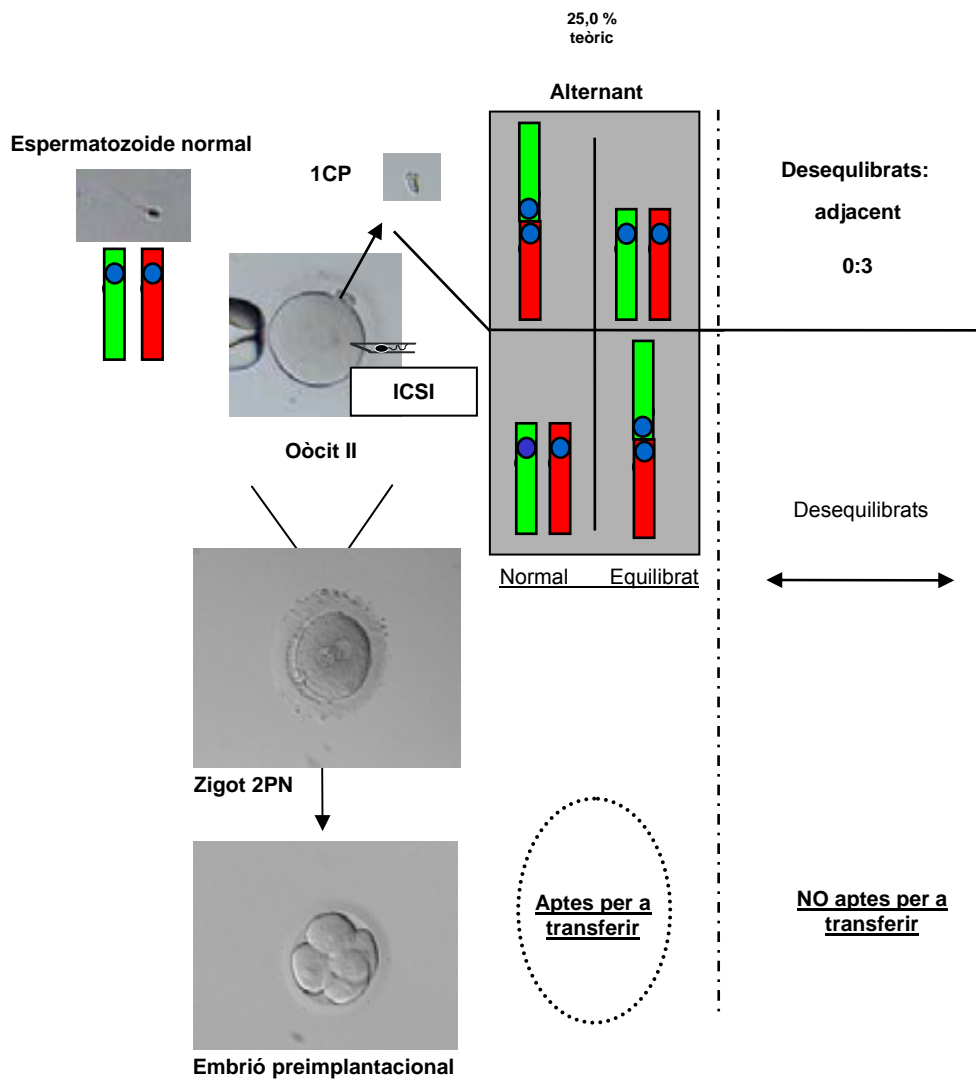


Figura I-31. Esquema de les fases des de la biòpsia i inseminació dels oòcits d'una dona portadora d'una translocació robertsoniana a la transferència dels embrions resultants de la inseminació d'oòcits normals i equilibrats. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

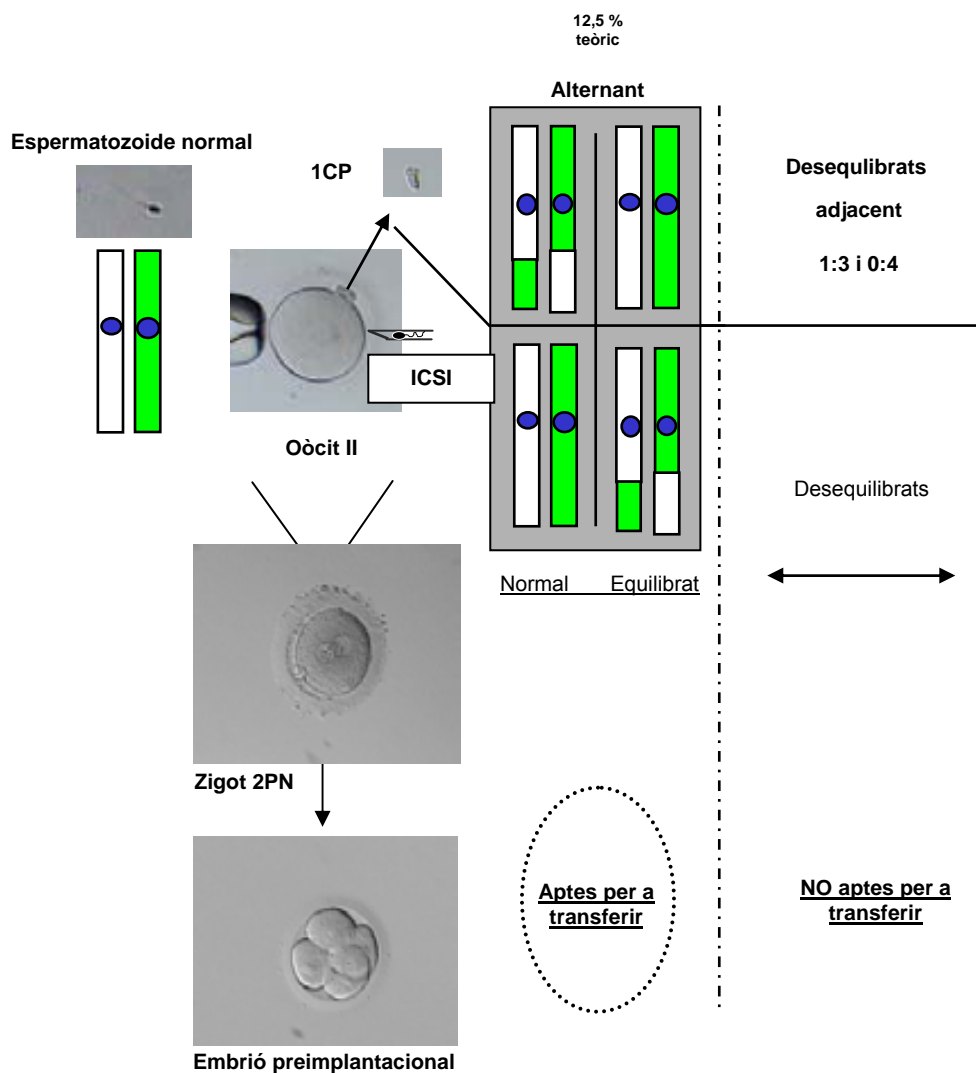


Figura I-32. Esquema de les fases des de la biòpsia i inseminació dels oòcits d'una dona portadora d'una translocació recíproca a la transferència dels embrions resultants de la inseminació d'oòcits normals i equilibrats. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

Les dones portadores de reorganitzacions són un grup d'interès d'aplicació del DGP-1CP i a l'última recollida de dades del consorci per PGD de la ESHRE que inclou les dades de setembre del 1998 fins al desembre del 2002 (Harper i col·l. 2006) es recullen, com hem mencionat anteriorment, un total de 5.891 cicles de DGP. D'aquests, 203 (3,4 %) han estat realitzats amb biòpsia d'1CP: vuit per anomalies cromosòmiques estructurals, disset per malalties monogèniques i 178 per cribratge d'aneuploidies. Per selecció de sexe no hi ha cap cicle realitzat amb biòpsia d'1CP ja que es requereix la contribució paterna. En el cas d'anomalies cromosòmiques estructurals, en concret s'han realitzat 106 cicles de PGD de dones portadores de translocacions robertsonianes i 158 cicles de dones portadores de translocacions recíproques. D'aquests, 158 cicles de DGP per anomalies cromosòmiques d'origen matern, en set cicles (quatre i tres, respectivament) s'ha realitzat el DGP-1CP.

En la present *tesi doctoral*, en l'aplicació dels casos clínics de DGP-1CP, ens hem centrat en dones portadores de translocacions robertsonianes i dones portadores de translocacions recíproques.

Capítol 2: hipòtesi de treball i objectius



2.1 Hipòtesi de treball

El *primer corpuscle polar* (1CP) és una cèl·lula que acompanya l'òcit madur i es produeix com a conseqüència de la primera divisió meiótica. Ambdues cèl·lules tenen per aquest motiu dotacions cromosòmiques haploides complementàries, amb cromosomes amb dues cromàtides. Així doncs, l'1CP pot informar, indirectament, de la dotació cromosòmica del corresponent òcit. Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, en aquest treball s'han seguit els objectius descrits a continuació.

2.2 Objectius

L'objectiu general d'aquest treball és posar a punt un mètode de *diagnòstic preimplantacional mitjançant l'anàlisi citogenètica de l'1CP* (DGP-1CP) i aplicar aquest mètode clínicament. Per assolir aquest objectiu general ens hem plantejat els objectius concrets següents.

2.2.1 Posar a punt el mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP humà per a la seva anàlisi citogenètica amb hibridació in situ fluorescent (FISH) [art.1 vegeu l'apartat 4.6].

2.2.1.1 Posar a punt el mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP en un model animal (hàmmster).

2.2.1.2 Adequar el mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP a òcits madurs humans control descartats de programes de fecundació in vitro (FIV).

2.2.1.3 Posar a punt la tècnica de la FISH en 1CP d'òcits madurs humans.

2.2.2 Elaborar una sèrie control d'òcits humans descartats de programes de FIV per veure la complementarietat en parelles 1CP i la corresponent metafase II mitjançant FISH [art.2 vegeu l'apartat 4.7].

2.2.3 Analitzar citogenèticament òcits immadurs i zigots humans anòmals que són rutinàriament descartats de cicles de FIV amb inseminació convencional.

2.2.4 Aplicar clínicament el DGP-1CP en dones portadores de translocacions equilibrades [art.2 vegeu l'apartat 4.7].

Capítol 3: material i mètodes



3.1 Material biològic

3.1.1 Oòcits madurs d'hàmsster

Els oòcits procedeixen de femelles adultes d'hàmsster daurat o *Siri* establert, espècie *Mesocricetus auratus*. Les femelles tenen de dos a sis mesos d'edat i han nascut en una colònia establerta en el Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona des de l'any 1984 a l'any 2001.

En el present treball s'han inclòs 220 oòcits madurs, en estadi de *metafase II* (MII), procedents de quaranta-quatre femelles. Cada femella d'hàmsster estimulada amb hormones gonadotrofines produeix una trentena d'oòcits, no obstant això només s'han processat cinc oòcits per femella per tal d'escurçar els temps de manipulació.

Taula M-1. Material biològic d'hàmsster.

Oòcits madurs	Cèl·lules processades	1CP fixats
	220	165 [taula R-1]

1CP (primer corpuscle polar).

L'hàmsster ha constituït el material de partida per a la posada a punt del mètode idoni de fixació del *primer corpuscle polar* (1CP).

S'han fixat adequadament un total de 165 dels 220 1CP processats [taules M-1 i R-1].

3.1.2 Oòcits i zigots humans anòmals descartats de programes de fecundació *in vitro* (FIV)

Els oòcits humans descartats de programes de *fecundació in vitro* (FIV) humana, abans o després de la inseminació, així com els zigots humans anòmals també descartats d'aquests programes, han vingut del laboratori de FIV del Instituto Navarro de Ginecología, Pamplona.

El Comitè Ètic de la Universitat Autònoma de Barcelona i el Comitè Ètic del centre de FIV han aprovat el protocol per al present estudi.

En el present treball s'han inclòs un total de 240 cèl·lules entre oòcits madurs en estadi d'MII, oòcits immadurs en estadi de *metafase I* (MI), oòcits molt immadurs en estadi de *vesícula germinal* (VG) i *zigots anòmals* [taula M-2].

Taula M-2. Material biològic humà analitzat descartat de programes de FIV.

Tipus de cèl·lula i origen	Cèl·lules processades	Cèl·lules fixades
Oòcits no inseminats		
Madurs (MII)	39 ^a	35 [taules R2 i R-3]
Immadurs (MI i VG)	18	18 [taula R-4]
	57	53
Oòcits descartats postinseminació (FIV convencional)		
Madurs (MII)	50	41 [taula R-3]
Immadurs (MI i VG)	55	38 [taula R-4]
	105	79
Zigots anòmals descartats postinseminació (FIV convencional)		
	78	49 [taula R-4]
	240	181

FIV (fecundació in vitro), MII (metafase II), MI (metafase I), VG (vesícula germinal).

^a 18 oòcits s'han destinat a la posada a punt del mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP humans (taula R-2) i 21 oòcits s'han destinat a l'elaboració d'una sèrie d'oòcits control fixant separatament la MII de l'oòcit i el corresponent 1CP (taula R-3).

S'han processat cinquanta-set cèl·lules corresponents a oòcits madurs, immadurs i molt immadurs, descartats després de l'eliminació de les cèl·lules del cúmul dels oòcits de cicles de FIV-ICSI i abans de la inseminació; 105 cèl·lules corresponents a oòcits madurs i immadurs descartats postinseminació i observació morfològica de la fecundació de cicles de FIV convencional; i setanta-vuit cèl·lules corresponents a zigots anòmals també descartats postinseminació i observació morfològica de la fecundació de cicles de FIV convencional.

Dels cinquanta-set oòcits no inseminats, s'han destinat divuit oòcits madurs a la posada a punt del mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP humans [taula R-2]; i s'han destinat vint-i-un oòcits madurs a l'elaboració d'una sèrie d'oòcits control fixant separatament l'MII de l'oòcit i el corresponent 1CP [taula R-3]. Els divuit oòcits immadurs s'han processat per a la seva anàlisi citogenètica [taules R-4].

Dels 105 oòcits descartats postinseminació, s'han destinat els cinquanta oòcits madurs a l'elaboració d'una sèrie d'oòcits control fixant separatament l'MII de l'oòcit i el corresponent 1CP [taula R-3]. Els cinquanta-cinc oòcits immadurs s'han processat per a la seva anàlisi citogenètica [taula R-4].

I, finalment, tots els zigots anòmals s'han processat per a la seva anàlisi citogenètica [taula R-4].

3.1.3 Aplicació del diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP) a casos clínics: dones portadores de translocacions estructurals

Els estudis d'òcits procedents de pacients sotmeses a *diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP)* s'han realitzat en col·laboració amb el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus de Barcelona, el Servicio de Medicina de la Reproducción de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid, i el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

En el present treball s'han estudiat nou casos clínics (deu cicles) de dones portadores de translocacions i s'han processat noranta-un òcits madurs per a la seva anàlisi citogenètica mitjançant l'estudi dels corresponents 1CP [taula M-3].

Taula M-3. Òcits procedents de casos clínics (DGP-1CP).

Casos clínics estudiats	Codi d'identificació	Cèl·lules processades	1CP fixats
Translocacions robertsonianes			
45,XX,der(14;21)(q10;q10)	Dx-1 (m)	15	11
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	Dx-3 (n)	4	4
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	Dx-4 (p)	14	8
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	FJD (q)	4 (dos cicles)	3
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	Dx-5 (c)	12	8
		49	34 [taula R-11 a i b]
Translocacions recíproques			
46,XX,t(4;12)(q22;q23)	Dx-2 (H)	16	10
46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	HCP-1 (I)	10	6
46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)	HCP-2 (J)	5	4
46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)	HCP-3 (K)	11	9
		42	29 [taula R-13]
		91	63

1CP (primer corpuscle polar).

DGP-1CP (diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de l'1CP).

3.2 Medis, enzims, reactius i solucions utilitzats en el material biològic d'hàmsster

3.2.1 Medis i oli de parafina

- Medi base: *Biggers-Whitten-Whittingham* (BWW) (Biggers 1971)
- Recuperació oòcits: BWW₃ (BWW suplementat amb 0,3 % de albúmina sèrica humana, Grifols)
- Oli de parafina (Sigma)

3.2.2 Enzims

- Hialuronidasa (Sigma) a l'0,1 % en medi BWW₃
- Tripsina (Sigma) a l'0,1 % en medi BWW₃

3.2.3 Reactius

- Àcid acètic glacial (Panreac)
- Àcid Tyrode (Sigma) a pH 2

3.2.4 Solucions

- Desengreixat i tractament previ del portaobjectes:
 - Èter dietílic anestèsic (Panreac) i etanol 96 % en proporció 1:1.
 - Trimetoxisilà (Fluka) a l'0,1 % en aigua bidestil·lada.
- Hipotònica:
 - Citrat trisòdic dihidratat (Merck) a l'1,0 % en aigua bidestil·lada i filtrat (Millex GS 0,22 µm, Millipore)
- Fixadora: metanol i àcid acètic glacial (3:1)
- Tinció uniforme: colorant i tampó Leishman (1:4) (Merck)

3.3 Medis, enzims, reactius i solucions utilitzats en el material biològic d'humà

3.3.1 Medis i oli de parafina

- Tamponat: Gamete[®] (actualment G-MOPS[®], Vitrolife)
- Cultiu: IVF[®] (actualment G-Fert[®], Vitrolife)
- Oli de parafina G-Ovoil[®] (Vitrolife)
- Rentat per espermatozoides: Sperm Rinse[®]; actualment G-Sperm[®], Vitrolife)

3.3.2 Enzims

- Tripsina (Dyfco) 30 mg / ml en PBS
- Hialuronidasa (Hyase[®], Vitrolife)
- Pepsina (Dyfco) al 10 % en aigua bidestil·lada.

3.3.3 Reactius

- Àcid Tyrode (Sigma) a pH 2
- Àcid clorhídric (HCl) (Merck) 10 mM: 0,5 ml de HCl 1 M (100 ml de 37 % HCl fumant més 900 ml d'aigua bidestil·lada) en 49,5 ml d'aigua bidestil·lada.

3.3.4 Solucions

- Recuperació espermatozoides mòbils per gradient de densitat: Pure Sperm[®], Nidacon (actualment Sperm Grad[®], Vitrolife) al 90 i 45 % en medi de rentat per espermatozoides.
- PVP (polivinilpirrolidina) (ICSI-100[®], Vitrolife)
- Hipotònica: citrat trisòdic dihidratat (Merck) al 0,5 % en aigua bidestil·lada i filtrat (Millex GS 0,22 µm, Millipore)
- Fixadora 1: etanol i àcid acètic glacial en proporció 1:1.
- Fixadora 2: metanol i àcid acètic glacial en proporció 1:1.
- Pepsina (Dyfco) 50 µg / ml en HCl 10 mM.
- Refixació o post fixació:
 - 10 x PBS sense Ca²⁺ ni Mg²⁺: 80 g de NaCl, 25,08 g de Na₂HPO₄ dihidratat, 2 g de KCl, i 1,5 g de KH₂PO₄ dissolt en 1.000 ml d'aigua bidestil·lada. Posar a l'autoclau i ajustar el pH a 7,2.
 - 1 x PBS: dilució 1/10 barrejant 100 ml de 10 x PBS i 900 ml d'aigua bidestil·lada
 - MgCl₂ 50 mM / PBS: 2,5 ml de MgCl₂ 1 M (20,33 g de MgCl₂ i aigua bidestil·lada fins a 100 ml i 47,5 ml de PBS.
 - Formaldehid a l'1 % en 50 mM MgCl₂ / PBS: 2,5 ml de MgCl₂ 1M, 1,5 ml de formaldehid i 46 ml de PBS.
 - Etanol al 70, 80 i 95 % en aigua bidestil·lada.

- Rentat posthibridació:

- 20 x SSC: 88 g de citrat trisòdic dihidratat i 175 g de NaCl en 950 ml d'aigua bidestil·lada. Ajustar a PH 5,5 i enrasar a 1.000 ml amb aigua bidestil·lada.
- 50 % formamida / 2 x SSC (3 banys): 75 ml de formamida, 15 ml de 20 x SSC i 60 ml d'aigua bidestil·lada. Ajustar a pH 7-7,5.
- 2 x SSC: 100 ml de 20xSSC i enrasar fins a 1.000 ml amb aigua bidestil·lada.
- 2 x SSC/0,1 % *Tween* 20: 100 ml de 20 x SSC, 1 ml de *Tween* 20 i 850 ml d'aigua bidestil·lada. Ajustar el pH a 7-7,5 i enrasar a 1.000 ml amb aigua bidestil·lada.

3.4 Mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques de l'1CP i de la metafase II (MII) de l'òocit madur d'hàmsster

3.4.1 Obtenció d'òocits madurs d'hàmsster: estimulació ovàrica

Els òocits s'obtenen després d'una *estimulació hormonal* de femelles d'hàmsster:

- Injecció en el peritoneu de trenta-cinc a quaranta UI/animal d'hormona gonadotrofina d'euga gestant (PMSG, Sigma) el primer dia del cicle. L'acció d'aquesta hormona provoca la maduració sincrònica d'un nombre d'òocits elevat.
- Injecció en el peritoneu de trenta-cinc a quaranta UI/animal d'hormona gonadotrofina coriònica humana (hCG, Lavet), entre cinquanta-vuit i seixanta hores més tard de la injecció de PMSG. L'acció d'aquesta hormona aconsegueix la superovulació dels òocits madurats.

3.4.2 Recuperació d'òocits madurs d'hàmsster

Després de setze–disset hores de la injecció de l'hCG, la femella s'anestesia amb èter etílic i se sacrifica per dislocació cervical. En aquest moment els *òocits madurs superovulats* es troben dins del *cúmul* situat a l'ampul·la de cada oviducte.

Es dissecciona l'ampul·la de cada oviducte i es posen en plaques de cultiu estèrils (Nunc o similar) amb medi BWW₃ [vegeu l'apartat 3.2] gasificat en una *atmosfera de 37°C, 5 % CO₂, i 95 % d'humitat*.

Tots els passos següents es fan sota control d'un estereomicroscopi. El *cúmul* s'obté introduint, amb xeringa i agulla, un mil·lilitre del mateix medi en un extrem de l'ampul·la. Per pressió positiva el *cúmul* s'expulsarà per l'altre extrem [figura M-1].

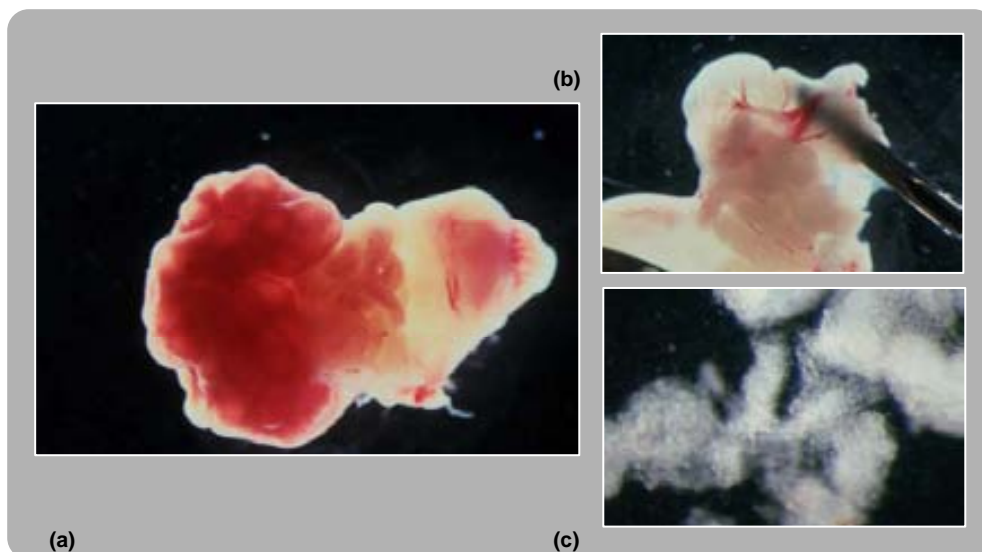


Figura M-1. (a): ovari d'hàmsster estimulat. (b): introducció de medi en un extrem de la l'ampul·la de l'oviducte mitjançant una xeringa amb agulla. (c) cúmulo fora de l'ampul·la [estereomicroscopi]

El cúmulo conté els oòcits madurs i després d'un tractament enzimàtic amb *hialuronidasa* en medi BWW₃ gasificat en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % d'humitat i cobert amb oli de parafina. La durada del tractament és de dos minuts per tal que els oòcits quedin lliures de les cèl·lules que els envolten [figura M-2].

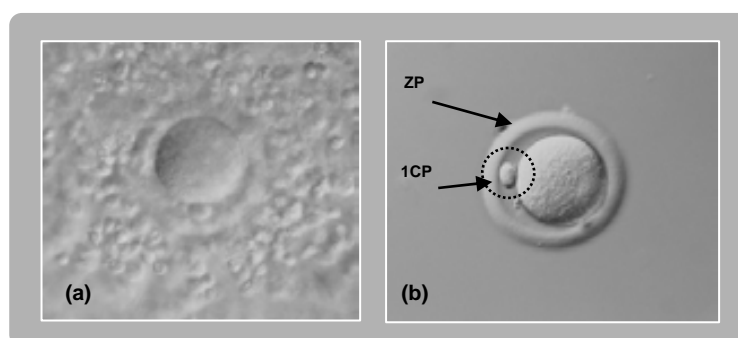


Figura M-2. (a): oòcit madur d'hàmsster dins del cúmulo. (b): després del tractament amb hialuronidasa. [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 200x]

3.4.3 Aïllament de l'1CP d'òcits madurs d'hàmsster

Cada oòcit madur es tracta amb una solució de *tripsina* en medi BWW₃ [vegeu l'apartat 3.2] gasificat en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % d'humitat i cobert amb oli de parafina. La durada del tractament és de dos minuts per tal de dissoldre la *zona pel·lúcida* (ZP) que envolta l'oòcit [figura M-3].

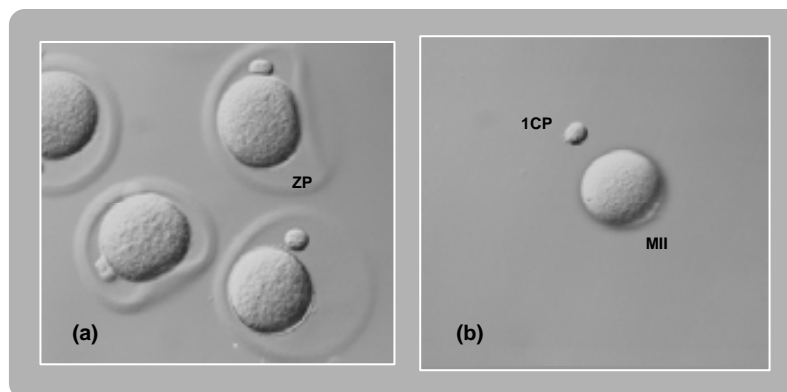


Figura M-3. (a): òcits madurs d'hàmsster sota l'efecte de la tripsina dissolent la ZP. (b): un òcít després del tractament amb tripsina, en què queden lliures l'1CP i l'MII de l'òcít [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 200x]

L'1CP i l'MII de l'òcít, lliures de la ZP, es recuperen amb l'ajut d'una pipeta Pasteur estirada al foc. Ambdues cèl·lules es fixen per separat, cada una en el seu portaobjectes, emprant el mètode desenvolupat per nosaltres, descrit més endavant, per a la fixació de l'1CP i una modificació del mètode de Tarkowski (1966) per a la fixació de l'MII de l'òcít.

Per aïllar l'1CP també s'ha aplicat una tècnica de *micromanipulació* sense eliminar totalment la ZP. L'òcít es posa en un portaobjectes excavat amb medi BWW₃ [vegeu l'apartat 3.2] gasificat en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % d'humitat i cobert amb oli de parafina. L'òcít madur subjectat amb el micromanipulador es col·loca de manera que l'1CP quedi a la posició equivalent a les tres de les agulles del rellotge. El forat es realitza per dissolució local de la ZP amb una solució d'àcid Tyrode a pH 2. L'àcid es lliura per una pipeta molt fina (< 10 µm de diàmetre intern) directament a la ZP que es vol dissoldre [figura M-4].

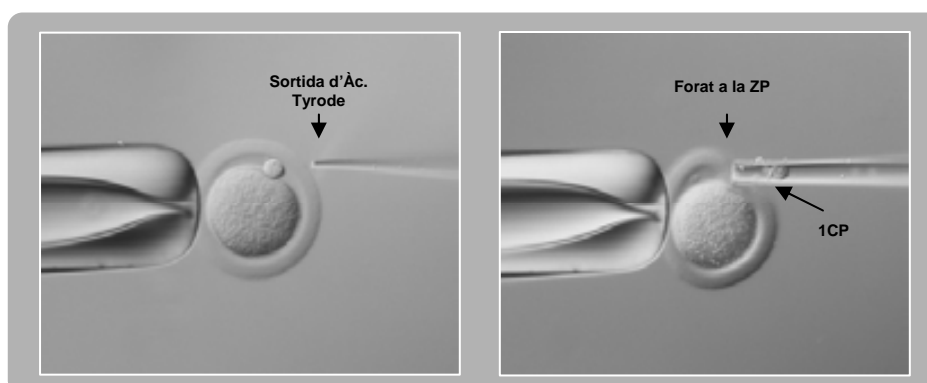


Figura M-4. Biòpsia d'1CP d'òcít madur d'hàmsster per dissolució parcial de la ZP mitjançant l'aplicació de solució d'àcid Tyrode. [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 200x]. Vegeu l'annex 1 de l'apartat 7.

3.4.4 Obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP d'hàmsster

3.4.4.1 Tractament previ dels portaobjectes

Els portaobjectes amb banda mat i vores bisellades (Objektträger, Menzel-Glaser) es desengreixen i, una vegada secs, es banyen en una solució de *trimetoxisilà* [vegeu l'apartat 3.2]. Un cop assecat a l'aire es retira l'excés de producte fregant amb un drap de cotó.

3.4.4.2 Tractament hipotònic i fixació

Per al tractament hipotònic s'empra una *solució hipotònica* consistent en citrat trisòdic dihidratat [vegeu l'apartat 3.2]. Primerament se submergeix la cèl·lula durant tres minuts en una cubeta amb solució hipotònica, després la cèl·lula es passa a un portaobjectes encara envoltada de solució hipotònica i es manté en aquestes condicions durant dos minuts. Tots els passos es fan sempre sota control d'un estereomicroscopi a 50 augments. L'estereomicroscopi disposa de camp fosc i de camp clar (Leica) per facilitar en tot moment la localització de l'1CP.

Per a la fixació s'empra una *solució fixadora* consistent en àcid acètic i etanol [vegeu l'apartat 3.2]. L'àcid actua eliminant proteïnes i fa que la membrana i el citoplasma desapareguin, mentre que l'alcohol fixa la cromatina. L'augment de la proporció d'àcid acètic, respecte de la proporció 1:3 de la clàssica solució fixadora de Carnoy, aconsegueix eliminar la membrana citoplasmàtica de l'1CP més fàcilment.

La solució fixadora s'aplica un cop ha passat el temps de tractament hipotònic, deixant-la lliscar molt suaument sobre el portaobjectes amb l'ajut d'una micropipeta automàtica, i realitzant moviments suaus en direcció a l'1CP, creant un flux continu en una sola direcció. L'1CP va quedant adherit mentre el fixador va desplaçant, de mica en mica, la solució hipotònica que l'envolta. Quan l'1CP queda cobert únicament de solució fixadora, es repeteix la mateixa operació per segona vegada. Posteriorment en observar, en la zona que hi ha l'1CP, un puntejat, es deixa caure una última gota de solució fixadora des d'una alçada de set o vuit centímetres aproximadament, per tal d'augmentar l'extensió dels cromosomes [figura M-5].

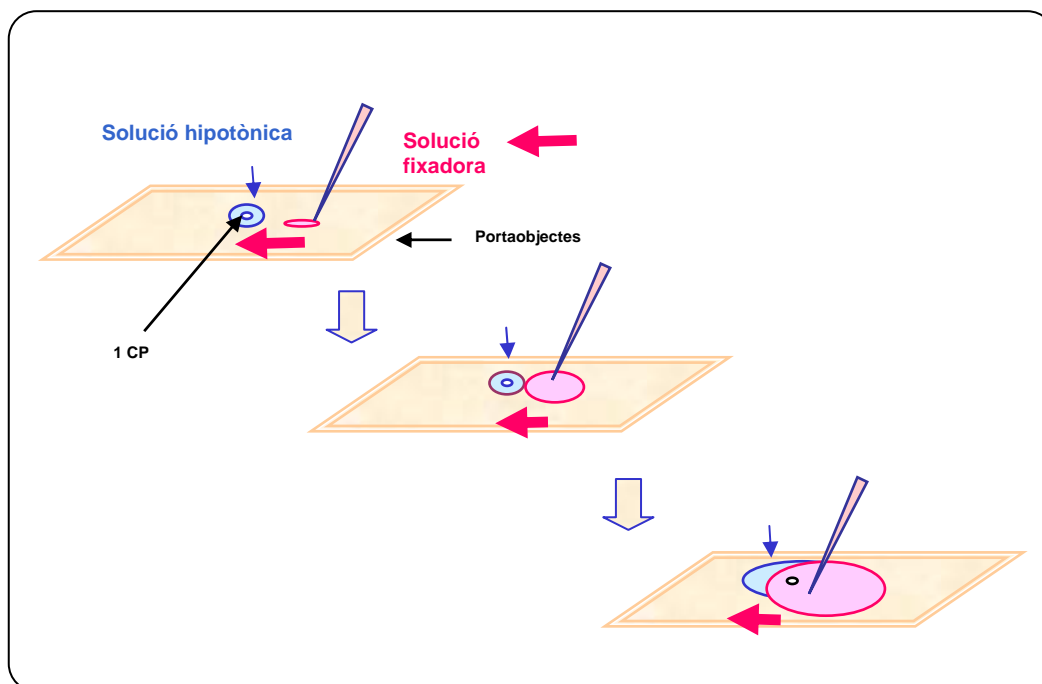


Figura M-5. Esquema del mètode d'aplicació de la solució fixadora sobre l'1CP envoltat de solució hipotònica.

3.4.5 Extensions cromosòmiques de l'MII dels oòcits d'hàmsster

L'MII de l'oòcit es tracta amb una solució hipotònica de citrat trisòdic dihidratat a l'1,0 % [vegeu l'apartat 3.2] durant sis minuts, després es col·loca sobre un portaobjectes amb un volum mínim de solució hipotònica. Llavors, amb l'ajut d'una micropipeta automàtica es tira gota a gota la solució fixadora [vegeu l'apartat 3.2], molt a poc a poc i sota control estereomicroscòpic fins que la cèl·lula desapareix, eliminant-se el citoplasma i quedant els cromosomes fixats sobre els portaobjectes (Tarkowski 1966).

3.4.6 Observació i anàlisi citogenètica d'extensions cromosòmiques: tinció uniforme amb colorant Leishman

Les extensions cromosòmiques obtingudes s'observen a *microscòpia de contrast de fases* (microscopis PROVIS-AX 70 i BX-60, Olympus, Tècniques Mèdiques MAB) a 40 augments. A continuació, les extensions d'1CP d'hàmsster s'analitzen mitjançant la *tinció uniforme* amb colorant Leishman [vegeu l'apartat 3.2] durant sis minuts, després els portaobjectes s'esbandeixen amb aigua corrent i s'assequen a l'aire. Les extensions tenyides s'observen a *microscòpia de camp clar* (Leitz Diaplan) amb l'objectiu de 100 augments [figura M-6].



Figura M-6. Extensió cromosòmica d'una MII d'1CP d'òcit d'hàster tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x]. Vegeu l'annex 1 de l'apartat 7.

Les extensions cromosòmiques es *microfotografiem* amb pel·lícula de blanc i negre (Agfa Copex Rapid AHU 50 ASA), o bé es capturen amb una estació de captura digital i anàlisi d'imatges (Cytovision Ultra, Applied Imaging, Regne Unit; Spectra Vysion, Izasa) acoblades a un microscopi PROVIS-AX 70 i BX-60 respectivament. Es fa una valoració de la qualitat de les extensions dels complements cromosòmics d'1CP i de la morfologia cromosòmica, directament en el monitor o en el paper fotogràfic [figura M-7].



Figura M-7. Extensió cromosòmica d'una MII d'1CP d'hàster en paper fotogràfic, podem identificar per mida el cromosoma X (el més gran) i el cromosoma 21 (el més petit). [fotografia microscopi de camp clar 1000x]

3.5 Mètode d'obtenció d'òocits i zigots humans

3.5.1 Cicles de FIV humana

Els cicles de FIV humana es realitzen en *centres de reproducció assistida*. La superovulació de les pacients es porta a terme amb una supressió de la hipòfisi per un anàleg de gonadotrofines en un protocol llarg en associació amb *hormona gonadotrofina fol·liculostimulant* (FSH) i *hormona gonadotrofina coriònica humana* (hCG) [figura M-8].

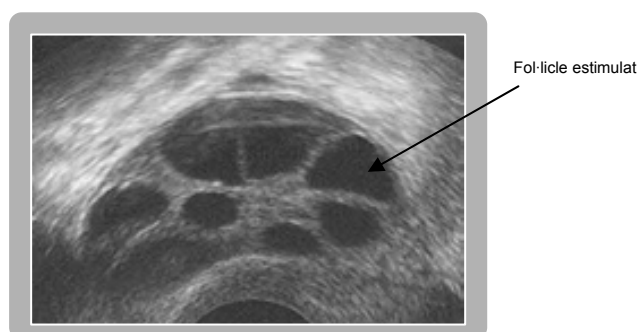


Figura M-8. Imatge ecogràfica d'un ovari humà sota l'efecte de l'hormona gonadotrofina fol·liculostimulant (FSH).

La recuperació dels òocits envoltats de cèl·lules del cúmul (*complex cúmul oòfor*, CCO) es fa per punció dels fol·licles amb una agulla per via transvaginal guiada per ecografia i aspiració del líquid fol·licular trenta-sis hores després de l'administració de l'hormona hCG. La *punció fol·licular* es fa en un quiròfan sota sedació i sota control ecogràfic via vaginal. El *líquid fol·licular* s'aspira per acció d'una bomba de buit i es recull en tubs estèrils (Falcon). Els tubs es porten a una temperatura constant de 37°C cap al laboratori d'embriologia.

3.5.2 Recuperació d'òocits humans en cicles de FIV

Els tubs amb líquid fol·licular s'aboquen en plaques de cultiu estèrils (Falcon o similar) i sota control d'un estereomicroscopi es localitzen els CCO [figura M-9], aquests es passen a plaques amb medi de cultiu tamponat gasificat en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % d'humitat, cobert amb oli de parafina [vegeu l'apartat 3.3].

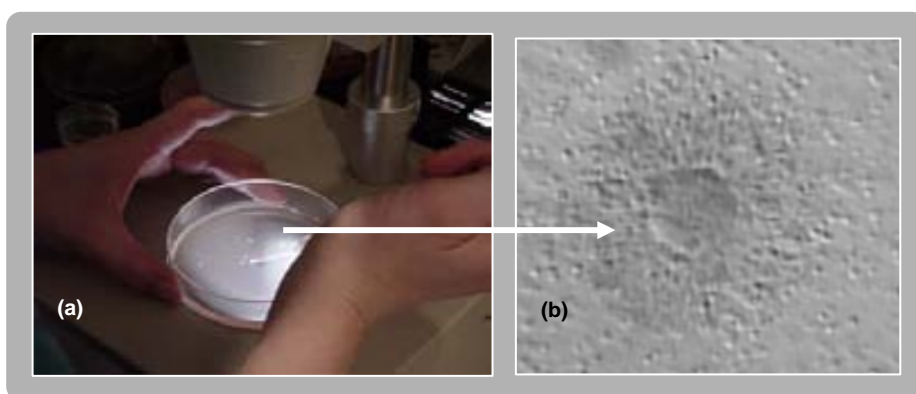


Figura M-9. (a): localització dels CCO humans en els líquids fol·liculars sota control del estereomicroscopi. (b): CCO humà. [microscopi invertit 200x]

3.5.3 Inseminació d'òcits humans en cicles de FIV

3.5.3.1 Processat de la mostra de semen

Els *espermatozoides* habitualment s'obtenen de l'ejaculat obtingut per masturbació el dia de la punció fol·licular. La mostra de semen ejaculat es processa per tal de *seleccionar* els espermatozoides amb mobilitat progressiva ràpida (tipus "a": WHO 1999) mitjançant un *gradient de densitat* [vegeu l'apartat 3.3] seguit d'un rentat del precipitat, on es troben els espermatozoides seleccionats, en medi bàsic equilibrat en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % (actualment 6 % CO₂) [figura M-10].

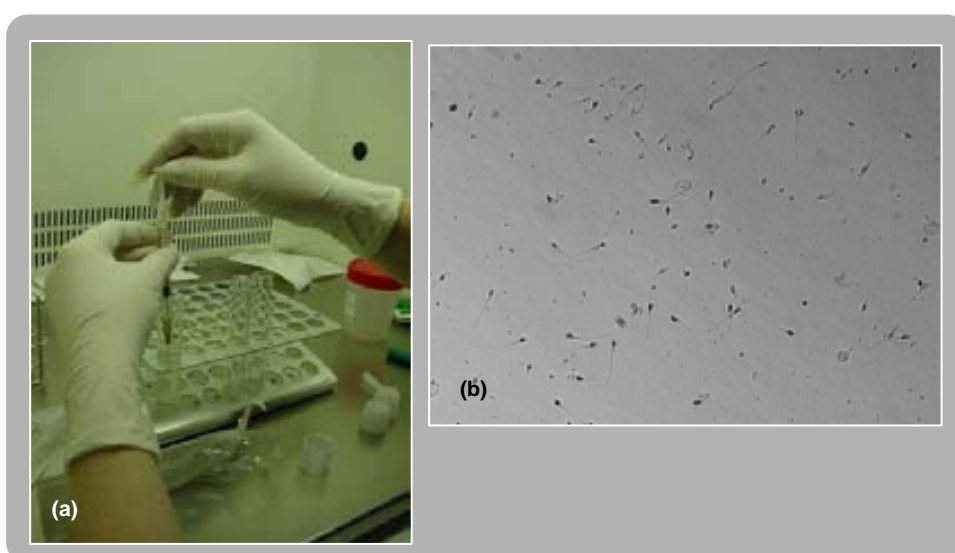


Figura M-10. (a): preparació del gradient de densitat. (b): mostra de semen en fresc. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

3.5.3.2 FIV per inseminació convencional

Per realitzar la *FIV per inseminació convencional* els CCO es col·loquen en plaques de quatre pous (Nunc o similar) amb 0,5 ml de medi de cultiu cobert amb 0,3 ml d'oli de parafina [vegeu l'apartat 3.3]. A cada pou s'hi afegeix una suspensió d'aproximadament 50.000 espermatozoides amb mobilitat progressiva ràpida (tipus "a": WHO 1999). Els CCO inseminats es cultiven en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % (actualment 6 % CO₂) [figura M-11].

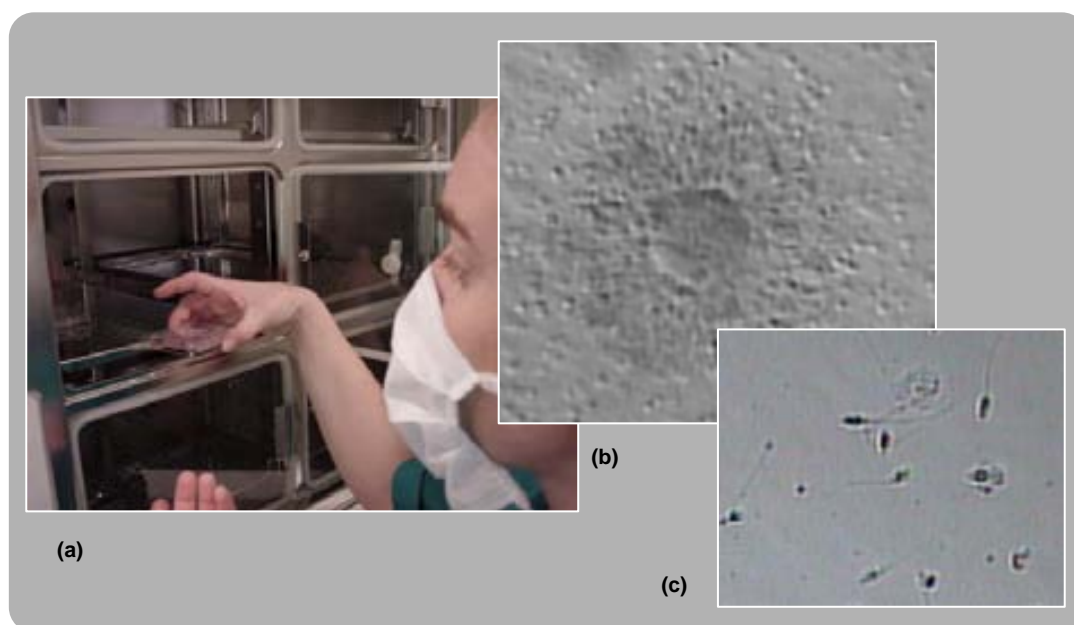


Figura M-11. (a): incubador de cultiu. (b): CCO humà. (c): espermatozoides d'humà. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

Al cap de setze–divuit hores de cultiu els oòcits s'alliberen de les *cèl·lules del cúmul* que els envolten per tractament mecànic amb una pipeta Pasteur estirada a la flama d'un cremador tipus Bunsen.

3.5.3.3 Observació morfològica de la fecundació en cicles de FIV

Els oòcits alliberats de les *cèl·lules del cúmul* s'observen a 200 augments amb un *microscopi invertit* amb la platina a 37°C i òptica de Hoffman, i es classifiquen segons els criteris especificats a la [taula M-4].

Taula M-4. Classificació segons morfologia externa post valoració de la fecundació.

Tipus de cèl·lula	Pronucli	Nucli	Corpuscle Polar
Zigots			
Normal	2	–	2
Anòmals	1	–	2
	3	–	1 o 2
	4	–	1 o 2
Oòcits			
Metafase II	–	–	1
Metafase I	–	–	–
Profase I (vesícula germinal)	–	1	–

Com a resultat d'una fecundació normal s'observa la presència de *dos corpuscles polars* (1CP i 2CP) i *dos pronuclis* (2PN) [figura M-12].

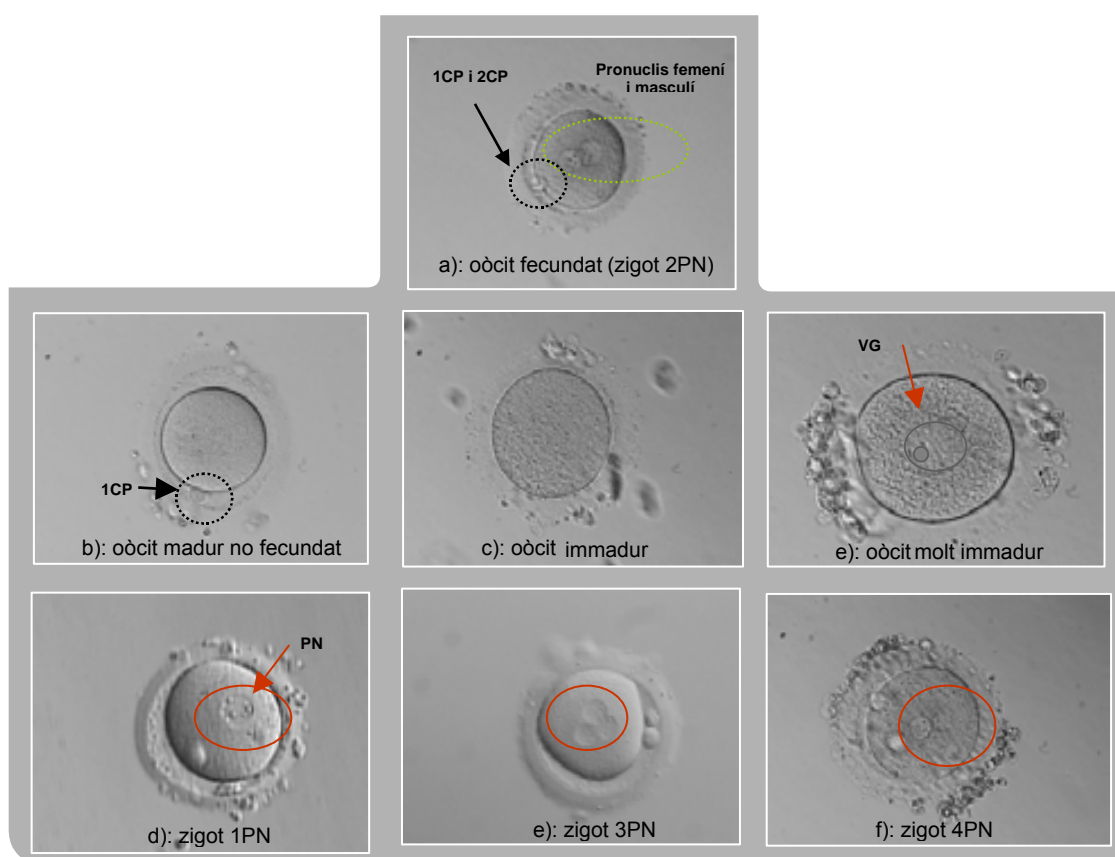


Figura M-12. Observació morfològica de la fecundació. a): fecundació normal (zigot 2PN); b-d): no fecundació i, e-f): fecundació anòmala. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman i de Nomarski 400x]

Les cèl·lules descartades de programes de FIV les hem classificat en:

- òcits madurs aparentment no fecundats: amb un 1CP i sense pronuclis ni nucli en profase I (metafase II, MII) [figura M-12 a]
- òcits aparentment immadurs i no fecundats: sense corpuscles ni pronuclis, i sense nucli en profase I (metafase I, MI) o amb nucli en profase I (vesícula germinal, VG) [figura M-12 b-c]
- zigots anòmals: amb dos CP i un, dos, tres, quatre o fins i tot cinc pronuclis, i sense nucli en profase I [figura M-12 e-f]

Alguns oòcits immadurs (MI i VG) s'han deixat en cultiu dotze hores en el mateix medi de cultiu per poder assolir espontàniament la maduració in vitro (MIV).

3.5.3.4 FIV amb microinjecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide (FIV-ICSI)

Els CCO es tracten amb hialuronidasa [vegeu l'apartat 3.3] per eliminar les cèl·lules del cúmul [figura M-13] i poder fer la *injecció citoplasmàtica de l'espermatozoide* (intra cytoplasmic sperm injection, ICSI) [figura M-15].

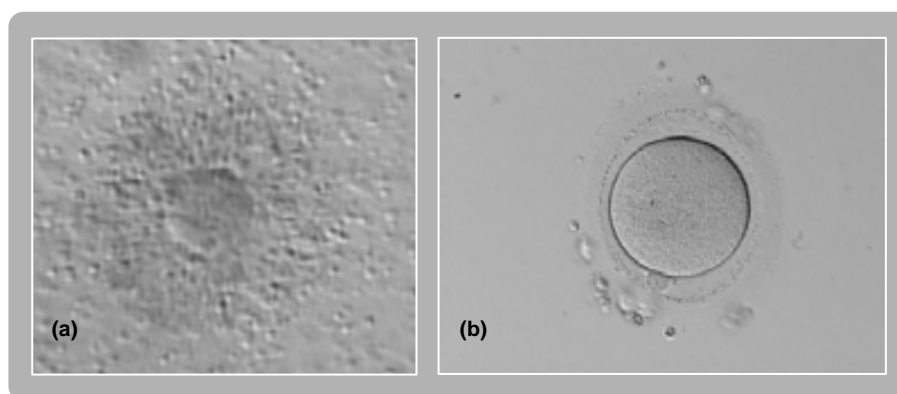


Figura M-13. (a): CCO humà. (b): el mateix oòcit després del seu tractament amb hialuronidasa. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

La mostra de semen ja processada es dilueix a la concentració adequada per procedir amb l'ICSI (aproximadament 500.000 espermatozoides / ml) i s'afegeix a una gota de PVP [vegeu l'apartat 3.3] per tal de reduir la mobilitat dels espermatozoides i poder-los agafar fàcilment amb la pipeta [figura M-14].

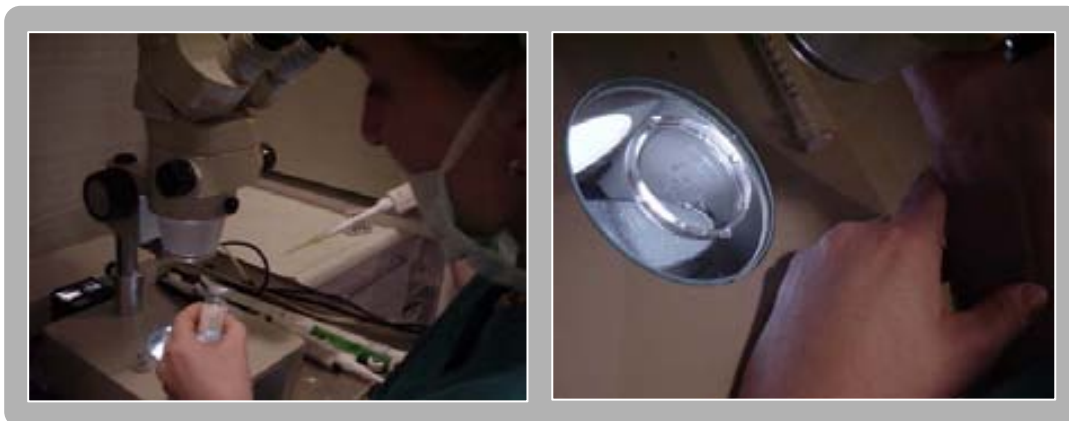


Figura M-14. Preparació de la placa d'ICSI amb PVP.

En els casos clínics, l'ICSI s'ha fet immediatament després de la punció fol·licular i tractament dels CCO amb hialuronidasa. D'aquesta manera es fa la biòpsia d'1CP després de l'ICSI. O bé, l'ICSI s'ha fet després de la biòpsia d'1CP, aproximadament cinc a sis hores després de la punció fol·licular.

En qualsevol dels casos, l'ICSI es porta a terme mitjançant dos micromanipuladors (Narishige o similar) acoblats a un microscopi invertit amb la platina a 37°C i òptica de Hoffman. Els oòcits es col·loquen en gotes de medi tamponat cobertes amb oli de parafina. La ICSI es fa seguint el mètode descrit l'any 1992 (Palermo i col·l. 1992) [figures M-15 i M-16].

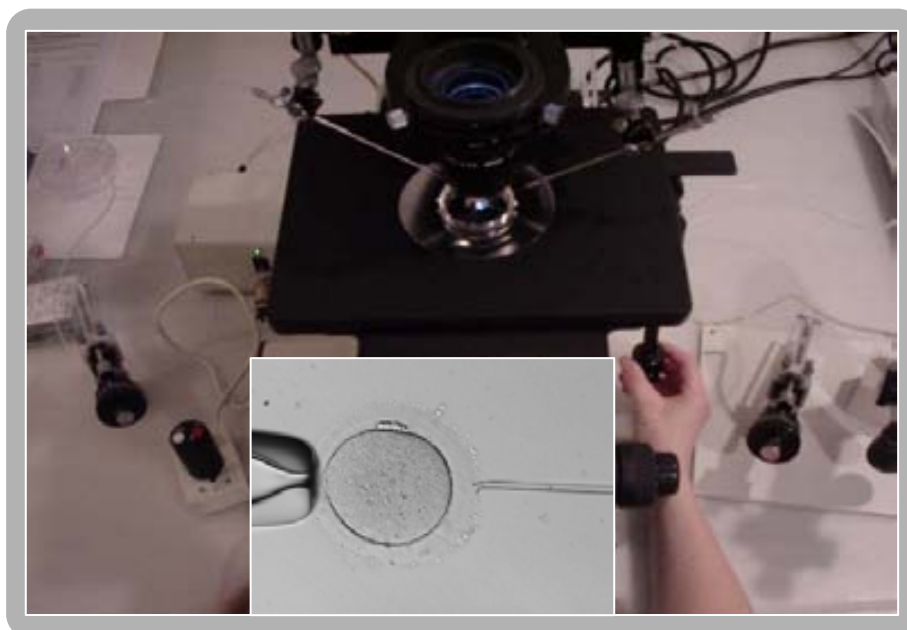


Figura M-15. Microscopi invertit amb micromanipuladors i imatge que visualitza la inseminació per ICSI d'un oòcit madur humà a 400x. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

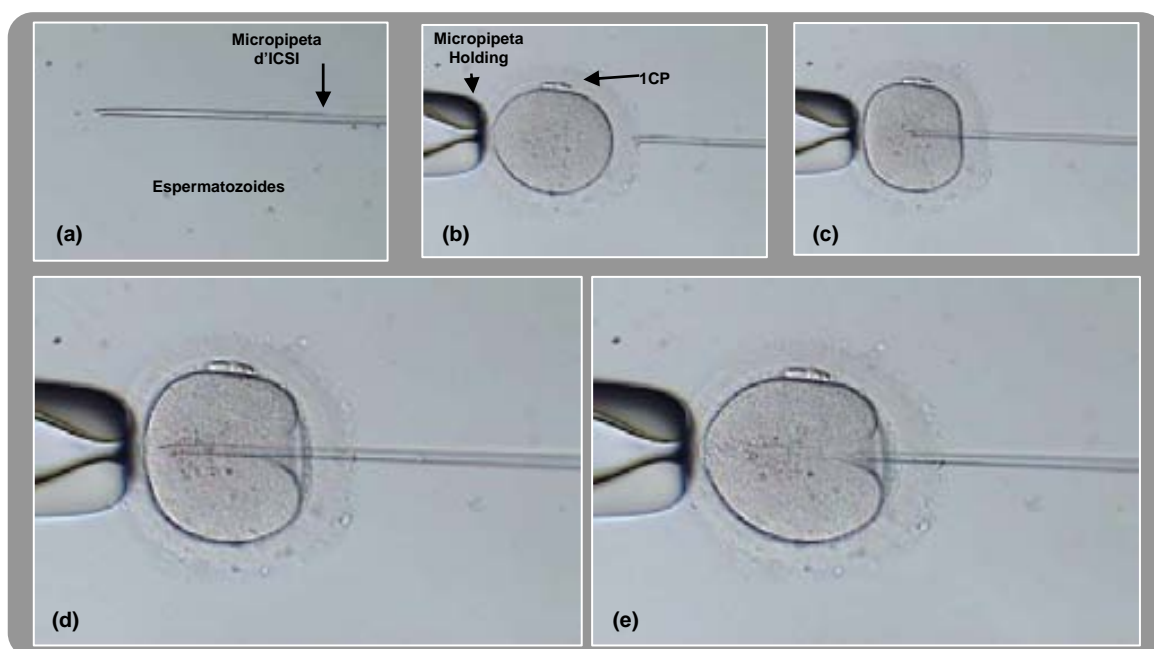


Figura M-16. Fases de l'ICSI: (a): recuperació d'un espermatozoide amb la micropipeta d'ICSI. (b): subjecció de l'òcit amb la micropipeta Holding. (c): penetració en el citoplasma. (d): descàrrega de l'espermatozoide en el citoplasma. (e): retirada de la micropipeta d'ICSI. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 200x]

Els òcits inseminats es col·loquen en plaques de quatre pous (Nunc o similar) amb medi de cultiu cobert amb oli de mineral i es cultiven durant setze–divuit hores en una atmosfera de 37°C, 5 % CO₂ i 95 % (actualment 6 % CO₂). L'*observació morfològica de la fecundació* es visualitza al cap d'aquestes hores després de la inseminació.

En els casos clínics de DGP-1CP el mètode de inseminació aplicat sempre és l'ICSI ja que, en cas de fer les biòpsies prèvies a l'ICSI aquesta és la tècnica de inseminació obligada per evitar la polispèrmia, ja que la ZP de l'òcit després de la biòpsia està foradada, i en cas de fer la inseminació abans de la biòpsia, amb l'ICSI s'aconsegueix una major sincronia en la fecundació atesa la rapidesa de la tècnica.

3.5.4 Aïllament de l'1CP d'òcits madurs humans descartats de programes de FIV

3.5.4.1 Digestió enzimàtica de la zona pel·lúcida

Cada òcit es passa per una solució enzimàtica de *tripsina* [vegeu l'apartat 3.3] durant tres minuts a fi de dissoldre la *zona pel·lúcida* (ZP) que envolta l'òcit, i així poder aïllar l'1CP d'igual manera que per als 1CP d'hàmsster. Ambdues cèl·lules, 1CP i MII de l'òcit es fixen per separat, cada una en el seu portaobjectes.

Aquest sistema s'ha emprat exclusivament en òcits d'hàmsster i en òcits humans descartats de programes de FIV, en els quals l'estudi s'ha dirigit a la recerca bàsica.

3.5.4.2 Biòpsia d'1CP per micromanipulació

Per fer DGP-1CP va caldre emprar un mètode de biòpsia d'1CP per tal que l'òcit no perdés la seva capacitat fecundant.

Per realitzar la *biòpsia* cada òcit madur es posa en una gota de medi tamponat coberta amb oli de parafina [vegeu l'apartat 3.3] en una placa a 37°C col·locada sobre la platina també a 37°C d'un microscopi invertit amb dos micromanipuladors. L'òcit se subjecta amb una pipeta sostenidora de manera que l'1CP quedi a la posició equivalent a les dotze o tres de les agulles del rellotge dependent del mètode de biòpsia que s'apliqui.

Els *mètodes alternatius* es diferencien en la manera de fer el forat a la ZP per on s'extreu l'1CP (mètode físic mecànic o físic) i la manera en què s'extreu l'1CP (aspiració, extrusió o desplaçament mitjançant un flux de medi).

3.5.4.2.1 Mètode físic

S'aplica una adaptació del mètode per 1CP prèviament descrit l'any 1998 (Montag i col·l. 1998, 2004). Es treballa amb un microscopi invertit a 400 augments amb un equip de dos micromanipuladors. L'òcit s'orienta deixant l'1CP a les tres horàries. El forat es fa per acció local d'un làser de monocontacte d'1,48 μm (Fertilase; Medical Technologies, Montreal, Suïssa) acoblat al microscopi invertit. El làser desintegra la ZP de l'òcit [figura M-17]. El gruix de la ZP es mesura per determinar el temps d'exposició al làser segons la mida del forat que es desitja.

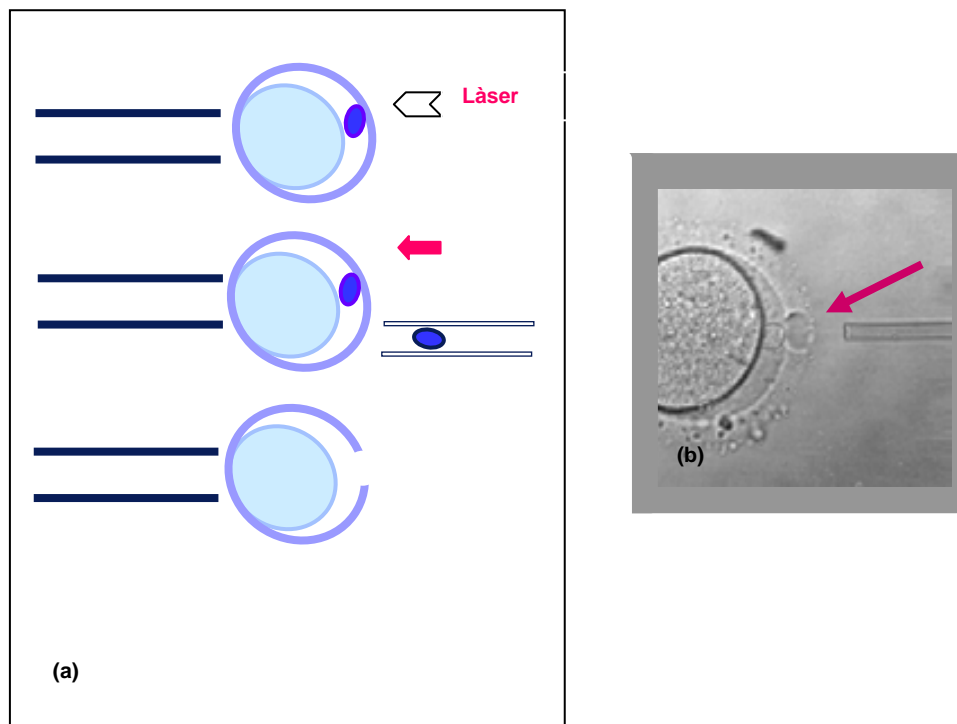


Figura M-17. (a): esquema del mètode físic de biòpsia d'1CP mitjançant l'ús de làser. (b): aspecte de la ZP després del tractament. [microscopi invertit amb òptica de contrast de fases 400x]

3.5.4.2.2 Mètode mecànic

S'aplica una adaptació del mètode prèviament descrit l'any 1999 (Cieslak i col·l. 1999). Es treballa amb un microscopi invertit a 400 augments amb un equip de dos micromanipuladors. L'òcit s'orienta deixant l'1CP que quedi a la posició equivalent a les dotze de les agulles del rellotge. Amb un *agulla* (PZD, Humagen) es punxa la ZP per la dreta de l'1CP, es passa per sobre d'aquest i es fa sortir per l'esquerra de l'1CP, sense malmetre'l. Aleshores es deixa anar l'òcit de la pipeta sostenidora i es col·loca per sota seu, i es frega la ZP enganxada a l'agulla amb la pipeta sostenidora. Es friccionen ambdues pipetes entre elles fins que, per fricció, la ZP s'acaba seccionant i queda un tall pel qual es pot extreure l'1CP [figura M-18]. Es pot fer un segon tall perpendicular a l'anterior per facilitar l'entrada de la pipeta de biòpsia.

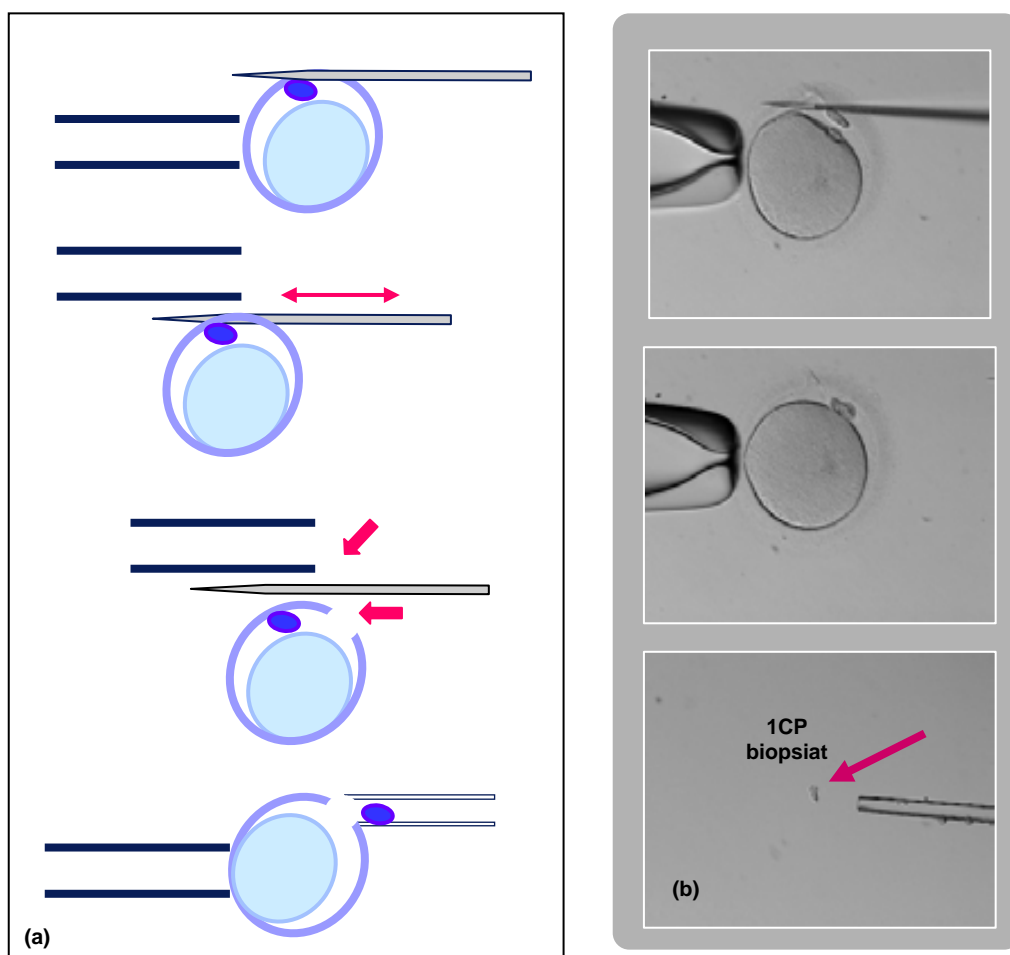


Figura M-18. (a): esquema del mètode mecànic de biòpsia d'1CP mitjançant fricció. (b): imatges del mètode de biòpsia [microscopi invertit amb òptica de Nomarski 400x]

3.5.4.2.3 Mètode químic

S'aplica una adaptació del mètode prèviament descrit l'any 1990 (Cohen i col·l. 1990) però adaptat a oòcits. Es treballa amb un microscopi invertit a 400 augments amb un equip de dos micromanipuladors. L'oòcit s'orienta de manera que l'1CP quedi a la posició equivalent a les tres de les agulles del rellotge. El forat es fa per dissolució local de la ZP amb una solució d'àcid Tyrode a pH 2. L'àcid s'allibera per una pipeta molt fina (< 10 µm de diàmetre intern) directament en el punt de la ZP que es vol dissoldre [figura M-19].

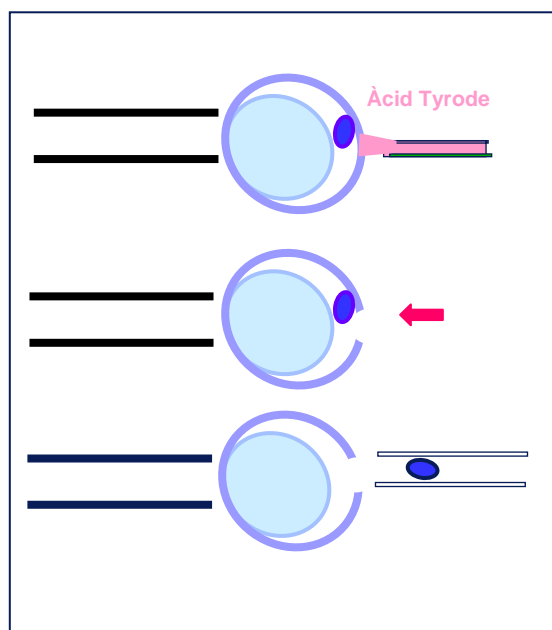


Figura M-19. Esquema del mètode químic de biòpsia d'1CP mitjançant la dissolució parcial de la ZP amb solució d'àcid Tyrode a 400x.

Un cop fet el forat, el procés per extreure la biòpsia fora de la zona pel·lúcida es pot fer per tres mètodes diferents (Egozcue i col·l. 2006):

3.5.4.2.4 Aspiració

De lluny és el mètode més utilitzat. La biòpsia s'aspira dins d'una pipeta de biòpsia amb un diàmetre intern de 20–30 µm, controlada per un micromanipulador.

3.5.4.2.5 Extrusió

Aquest mètode, menys utilitzat que l'aspiració, consisteix a pressionar l'oòcit utilitzant una pipeta controlada per un micromanipulador per tal d'empènyer l'1CP a través del forat de la ZP.

3.5.4.2.6 Desplaçament mitjançant un flux de medi

Aquest mètode, poc utilitzat, consisteix a introduir, a través del forat de la ZP i utilitzant una pipeta controlada amb un micromanipulador, un flux de medi a l'espai perivitel·lí per crear una pressió positiva que empeny l'1CP cap a fora a través del mateix forat.

3.5.5 Obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP, oòcits i zigots humans

3.5.5.1 Extensions cromosòmiques d'1CP humà

L'1CP un cop aïllat és immediatament fixat segons la tècnica detallada anteriorment. Inicialment s'ha fet servir el mateix *hipotònic i fixador* que per a les extensions d'1CP d'hàmsster però més endavant s'ha canviat la proporció de citrat trisòdic dihidratat, de l'1,0 % en aigua bidestil·lada al 0,5 %. També s'ha canviat la solució fixadora d'etanol i àcid acètic en proporció 1:1 s'ha passat a metanol i àcid acètic també en proporció 1:1.

3.5.5.2 Extensions d'oòcits i zigots humans

Els oòcits i zigots humans es fixen de la mateixa manera que els oòcits d'hàmsster [vegeu l'apartat 3.4.5].

3.5.5.3 Observació i captura d'extensions cromosòmiques humanes

Després del procés de fixació d'oòcits i zigots, l'extensió cromosòmica o de nucli obtinguda s'observa a *microscòpia de contrast de fases* (microscopi PROVIS-AX 70, Olympus, Tècniques Mèdiques MAB) a 40 augments, es captura amb una estació de *captura digital i anàlisi de imatges* (Cytovision Ultra, Applied Imaging, Regne Unit; o Spectra Vysion, Vysis, Izasa) [figura M-20], finalment es guarda en un congelador a -20°C fins que es processa per a l'anàlisi citogenètica.



Figura M-20. Extensió d'MII d'1CP humà. [microscopi de contrast de fases 400x, imatge digital]

3.5.6 Anàlisi citogenètica d'hibridació in situ fluorescent (fluorescent in situ hybridization, FISH) i observació microscòpica

La tècnica citogenètica molecular d'*hibridació in situ fluorescent* (FISH) s'ha portat a terme amb sondes marcades directament amb fluorocroms (Vysis). El protocol de FISH utilitzat és el proposat per la casa comercial, lleugerament modificat. Abans d'aplicar les sondes es fa un tractament previ del portaobjectes amb *pepsina* a 37°C de mig minut a cinc minuts, rentat a temperatura ambient amb aigua bidestil·lada i assecat a l'aire. Després s'aplica una gota de *solució fixadora* recent preparada (metanol i àcid acètic en proporció 3:1). Seguidament els portaobjectes s'observen a microscòpia de contrast de fases per veure si queden restes de membrana citoplasmàtica. Una vegada es tenen les extensions ben netes, els portaobjectes es tracten amb $MgCl_2$ durant cinc minuts, es refixen amb *formaldehyd* a l'1,0 % durant deu minuts, es renten amb *PBS* durant cinc minuts i es deshidraten amb *etanol* al 70, 80 i 95 %, cinc minuts cadascun, per tal de preservar millor la morfologia dels cromosomes.

Atès que hi ha una cèl·lula fixada per portaobjectes (excepte en extensions de limfòcits), en comptes d'utilitzar 10 µl de *mescla de FISH* per portaobjectes amb un *cobreobjectes* de 20 x 20 mm, es fa servir, per cada portaobjectes, d'un a dos µl de mescla amb un *cobreobjectes* de 5 x 5 mm. Els *cobreobjectes* se segellen amb cola. La *desnaturalització* de la sonda i el material cromosòmic es fa de forma conjunta col·locant les preparacions en una placa a 72°C durant cinc minuts (Hybraid; OmniGene, Izasa). La hibridació es fa en cambra humida en una estufa a 37°C. Un cop finalitzada la hibridació, s'enretira la cola i les preparacions se sotmeten al *rentat posthibridació* seguint el protocol de la casa comercial amb lleus modificacions. Es fa un rentat llarg en tres banys de *formamida* 50 % a 46°C durant 10 minuts cadascun, un rentat en un bany 2 x SSC a 46°C durant deu minuts, i un últim rentat en un bany de 2 x SSC / 0,1 % *Tween* 20 durant cinc minuts [vegeu l'apartat 3.3]. Després les preparacions es tenyeixen amb un *colorant de fons* (25 % DAPI II Vysis i 75 % Vectashield Vector).

En determinats casos es fa una *segona ronda de FISH*. El DAPI s'elimina submergint la preparació en detergent *Tween* 20 al 0,1 % en 2 x SSC a temperatura ambient i en agitació constant durant cinc minuts, es deshidrata en etanol al 70, 80 i 95 %, cinc minuts cadascun i s'asseca a l'aire. Després es fa una altra vegada la refixació abans de procedir a la hibridació.

Per als òocits no fecundats, majoritàriament s'ha aplicat la sonda per al satèl·lit alfa del cromosoma X (CEP X *Spectrum green*, Vysis) i la sonda de locus específica per al cromosoma 21 (LSI 21 *Spectrum orange*, Vysis) en una FISH doble. També s'ha aplicat la sonda triple específica per al cromosoma 15 (SNRPN/CEP15/PML *Spectrum orange/green/orange*, Vysis) o sondes per a cromosomes sencers (Vysis i Cambio). En canvi, per determinar la ploïdia dels zigots 1PN i > 2PN, s'ha aplicat una sonda

doble per al satèl·lit alfa del cromosoma X (*Spectrum green*, Vysis) i per al satèl·lit III del cromosoma Y (*Spectrum orange*, Vysis), combinada amb la sonda per al satèl·lit alfa del cromosoma 18 (*Spectrum aqua*, Vysis).

En els casos clínics s'han aplicat sondes específiques per a cada cas. S'han aplicat fins a quatre sondes en dues rondes de FISH. L'estratègia de diagnòstic seguida en cada cas es detallarà més endavant [vegeu l'apartat 3.6.3].

L'observació es fa amb un *microscopi d'epifluorescència* Olympus PROVIS-AX70. Per l'excitació dels fluorocroms s'utilitza una bombeta de mercuri de 100 W. Els filtres (Olympus) que permeten excitar i captar la llum emesa per als *fluorocroms* utilitzats són :

- U-MNIBA per captar emissions verdes (*Spectrum green*, longitud d'ona d'excitació 497 nm i longitud d'ona d'emissió 524 nm).
- U-MWIY per captar emissions vermelles (*Spectrum orange*, longitud d'ona d'excitació 592 nm i longitud d'ona d'emissió 612 nm).
- U-MNU per captar emissions blaves (DAPI, longitud d'ona d'excitació 367 i longitud d'ona d'emissió 445 nm).
- Aqua per captar emissió blava específica del fluorocrom Aqua, (longitud d'ona d'excitació 433 nm i longitud d'ona d'emissió 480 nm).

Després de l'*anàlisi directa*, les extensions hibridades es capturen i s'analitzen amb una estació de *captura digital i anàlisi d'imatges* (Cytovision Ultra, Applied Imaging, Regne Unit) acoblada al microscopi [figura M-21].

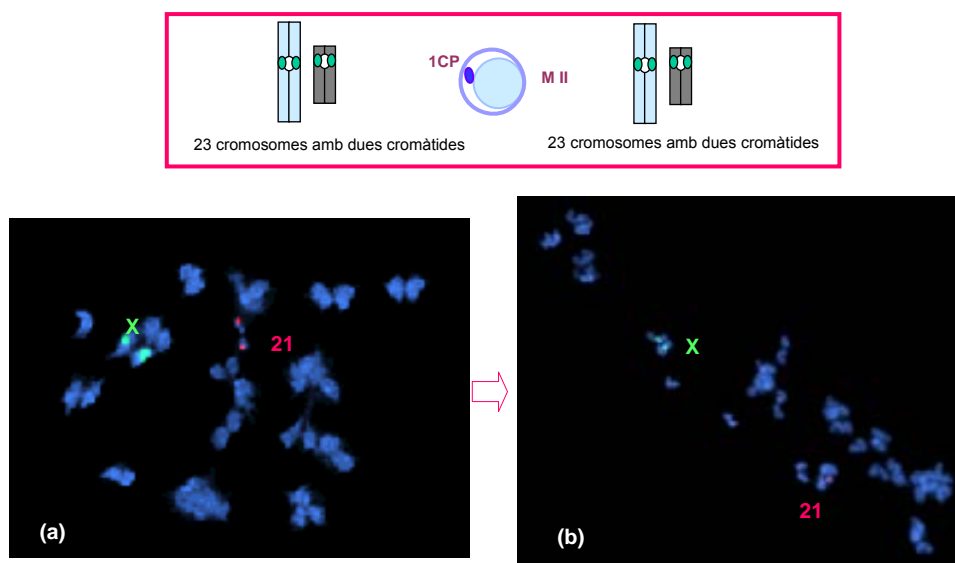


Figura M-21. Complementos cromosòmics complementaris d'1CP (a) i de oòcit MII (b) humans, hibridats amb una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd) i una sonda de locus específica per al cromosoma 21 (vermell). [microscopi de fluorescència 1000x]

3.6 Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi de primer corpuscle polar (DGP-1CP) aplicat a casos clínics: dones portadores de translocacions robertsonianes i recíproques

3.6.1 Protocol d'actuació

El protocol d'actuació per a un possible cas clínic requereix seguir les etapes següents:

3.6.1.1 Etapa A: parelles candidates

Des dels *centres de reproducció* assistida col·laboradors, Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus de Barcelona, Servicio de Medicina de la Reproducción de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid i Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona; s'informa les *parelles candidates*, en les quals la dona és portadora d'una reorganització cromosòmica equilibrada i l'home presenta un cariotip normal de l'existència del mètode DGP-1CP.

3.6.1.2 Etapa B: estudi d'informativitat

Una vegada la parella candidata s'inclou en un programa de DGP-1CP, es confirma el cariotip dels dos membres de la parella i es fa un *estudi previ d'informativitat*. L'estudi d'informativitat es fa sobre un cultiu de *limfòcits* del portador de la translocació (en aquest cas, la dona) i serveix per determinar si la reorganització cromosòmica és caracteritzable amb les sondes a priori escollides. S'estudien les característiques morfològiques de les marques de FISH de les sondes escollides per comprovar que permeten diferenciar els cromosomes normals dels derivatius en limfòcits de la dona portadora i en extensions cromosòmiques d'1CP d'òcits control, obtingudes en el centre col·laborador mateix. Es pot donar el cas que la disponibilitat de sondes actual no permeti diferenciar els cromosomes normals o equilibrats dels desequilibrats, no sent possible la caracterització d'una reorganització en concret.

3.6.1.3 Etapa C: obtenció d'òcits

Es tracta d'obtenir els òcits que seran objecte d'estudi. Cal que es faci l'obtenció dels òcits *in vitro* mitjançant tècniques de reproducció assistida malgrat que la parella no presenti a priori cap tipus d'anomalia que impedeixi procrear de manera natural. Un cop signat el consentiment informat, la dona se sotmet a la estimulació hormonal. El dia de la *punció fol·licular* es procedeix al rentat de la mostra de semen i al tractament enzimàtic dels CCO recuperats. Aquest mateix dia es fa la biòpsia dels 1CP dels òcits madurs seguint el *mètode de biòpsia* seleccionat anteriorment pel centre col·laborador on es realitza el cas: Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus de Barcelona (mètode físic, làser), Servicio de Medicina de la Reproducción de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (mètode mecànic, agulla) i Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (mètode químic, àcid Tyrode).

Prèviament també es decideix el moment de realització de l'ICSI, abans o després de la biòpsia d'1CP: en els primers casos l'ICSI es va fer després de la biòpsia de l'1CP, i posteriorment es va fer l'ICSI abans de la biòpsia. A mesura que es van inseminant i biopsiant els òcits, un a un, aquests són convenientment codificats i seguidament introduïts a l'incubador.

3.6.1.4 Etapa D: biòpsia i anàlisi de les cèl·lules

Immediatament després de la biòpsia es procedeix al *tractament hipotònic*, de *fixació* i *anàlisi* citogenètica de cada 1CP, segons les tècniques detallades anteriorment. El nombre de rondes de la FISH ha estat una o dues, dependent de la reorganització estudiada i segons les sondes escollides.

3.6.1.5 Etapa E: inseminació d'òocits

Els òocits s'inseminen per la tècnica d'*ICSI*, aquesta es pot fer abans o després de la biòpsia d'1CP. L'observació morfològica de la fecundació es fa al cap de setze-divuit hores de la inseminació. Els zigots 2PN es mantenen dins l'incubador fins que són diagnosticats els corresponents 1CP. En el cas que d'algun òocit fecundat (zigot 2PN) no es disposés de diagnòstic de l'1CP, ja sigui per pèrdua en el moment del tractament hipotònic, fixació o manca de resultat de la FISH, en D + 3 es procedeix a la biòpsia d'un o dos blastòmers de l'embrió resultant i s'analitzen citogenèticament per FISH.

3.6.1.6 Etapa F: transferència embrionària

Un cop es té el resultat citogenètic de cada 1CP, s'informa a la parella a través del centre col·laborador. Els embrions resultants d'òocits *normals* o *equilibrats* per als cromosomes estudiats són citogenèticament aptes per ser transferits. No obstant això, també cal una valoració morfològica d'aquests per estimar-ne la viabilitat. Segons la llei de reproducció actual (*Llei 14/2006*) es poden transferir com a màxim tres embrions.

3.6.1.7 Etapa G: anàlisi de cèl·lules descartades del cicle de DGP-1CP

Es procedeix també a l'anàlisi citogenètica per a FISH dels òocits immadurs no inseminats, òocits madurs no fecundats, zigots anòmals (1PN, > 2PN i 2PN aturats) i embrions diagnosticats desequilibrats, per tal de donar un diagnòstic global de tots els òocits recuperats en la punció fol·licular. S'empren les mateixes sondes fluorescents que per a l'anàlisi citogenètica dels 1CP.

3.6.2 Translocacions equilibrades estudiades

En col·laboració amb el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus (Dx) s'ha fet l'aplicació del DGP-1CP a una dona portadora d'una translocació recíproca i quatre dones portadores d'una translocació robertsoniana.

Dx-1 (m):	45,XX,der(14;21)(q10;q10)
Dx-2 (H):	45,XX,t(4;12)(q22;q23)
Dx-3 (n):	45,XX,der(13;14)(q10;q10)
Dx-4 (p):	45,XX,der(13;14)(q10;q10)
Dx-5 (r):	45,XX,der(13;14)(q10;q10)

En col·laboració amb el Servei de Medicina de la Reproducció de la Fundació Jiménez Díaz (FJD) s'ha fet l'aplicació del DGP-1CP a una dona portadora d'una translocació robertsoniana.

FJD-1 (q):	45,XX,der(13;14)(q10;q10) [dos cicles]
------------	--

En col·laboració amb el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (HCP) s'ha aplicat el DGP-1CP a tres dones portadores d'una translocació recíproca.

HCP-1 (I):	46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)
HCP-2 (J):	46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)
HCP-3 (K):	46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)

3.6.3 Estratègia de diagnòstic aplicada a cada cas clínic estudiat

La FISH s'ha aplicat amb diferents rondes segons de les característiques de cada *reorganització cromosòmica*. En la majoria dels casos, la primera, —o única—, ronda s'ha dut a terme utilitzant la combinació adequada de sondes centromèriques, telomèriques i/o locus específiques, i una segona ronda utilitzant sondes de cromosomes sencers [taula M-5]. D'aquesta manera, habitualment es poden diagnosticar tots els 1CP fixats, encara que no presentin una bona morfologia cromosòmica o extensió.

Taula M-5. Cariotip d'ambdós membres de la parella i sondes aplicades.

Cas	Dona	Home	Sonda 1	Cr	Color	Sonda 2	Cr	Color	Sonda 3	Cr	Color	Sonda 4	Cr	Color
Cas Dx-1(m)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	46,XY	Pintat	14	Verd	Pintat	21	Vermell	np	np	np	np	np	np
Cas Dx-3 (n)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	46,XY	Locus	13	Verd	Telòmer q	14	Vermell	Pintat	13	Verd	Pintat	14	Vermell
Cas Dx-4 (p)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	46,XY	Locus	13	Verd	Telòmer q	14	Vermell	Pintat	13	Verd	Pintat	14	Vermell
Cas FJD-1 (q)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	46,XY	Locus	13	Verd	Telòmer q	14	Vermell	Pintat	13	Verd	Pintat	14	Vermell
Cas Dx-5 (r)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	46,XY	Locus	13	Verd	Telòmer q	14	Vermell	Pintat	13	Verd	Pintat	14	Vermell
Cas Dx-2 (H)	46,XX,t(4;12)(q22;q23)	46,XY	Pintat	4	Vermell	Pintat	12	Verd	np	np	np	np	np	np
Cas HCP-1 (I)	46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	46,XY	Telòmer q	18	Vermell	Centròmer	18	Blau	Pintat	1	Vermell	Pintat	18	Verd
Cas HCP-2 (J)	46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)	46,XY	Centròmer	4	Verd	Pintat	11	Verd	Telòmer q	4	Vermell	Centròmer	11	Blau
Cas HCP-3 (K)	46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)	46,XY	Pintat	8	Vermell	Locus	13	Verd	Telòmer q	8	Vermell	Pintat	13	Verd

Cr (cromosoma), np (no procedeix).

En algun cas ha calgut diagnosticar de l'embrió resultant d'algun oòcit; aleshores es fa una *biòpsia de blastòmer en D + 3*.

3.6.3.1 Dona amb cariotip 45,XX,der(14;21)(q10;q10)

S'ha fet una única ronda de FISH aplicant les sondes de cromosoma sencer per al cromosoma 14 (WCP 14 *Spectrum orange*) i per al cromosoma 21 (WCP 21 *Spectrum green*) [figura M-22].

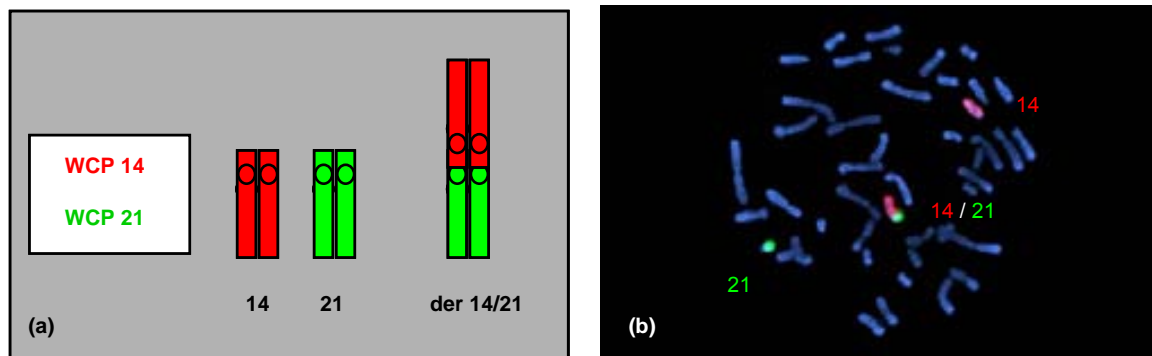


Figura M-22. Representació gràfica de la translocació robertsoniana 45,XX,der(14;21)(q10;q10). (a) sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 14 i per al cromosoma 21. (b): hibridació amb les sondes aplicades sobre una extensió cromosòmica de limfòcit de la pacient. [microscopi de fluorescència 1000x]

3.6.3.2 Dona amb cariotip 45,XX,der(13;14)(q10;q10)

S'han estudiat quatre casos de dones portadores d'una translocació robertsoniana 45,XX,der(13;14)(q10;q10). En tots quatre casos s'ha aplicat una primera ronda de FISH amb una sonda de locus específica per al cromosoma 13 (LSI 13 *Spectrum green*, Vysis) i una sonda telomèrica per al cromosoma 14 (TelVysion 14q *Spectrum orange*, Vysis). En determinats casos s'ha fet una segona ronda de FISH amb una sonda de cromosoma sencer específica per al cromosoma 13 (WCP 13 *Spectrum green*, Vysis) i per al cromosoma 14 (WCP 14 *Spectrum orange*, Vysis) [figura M-23].

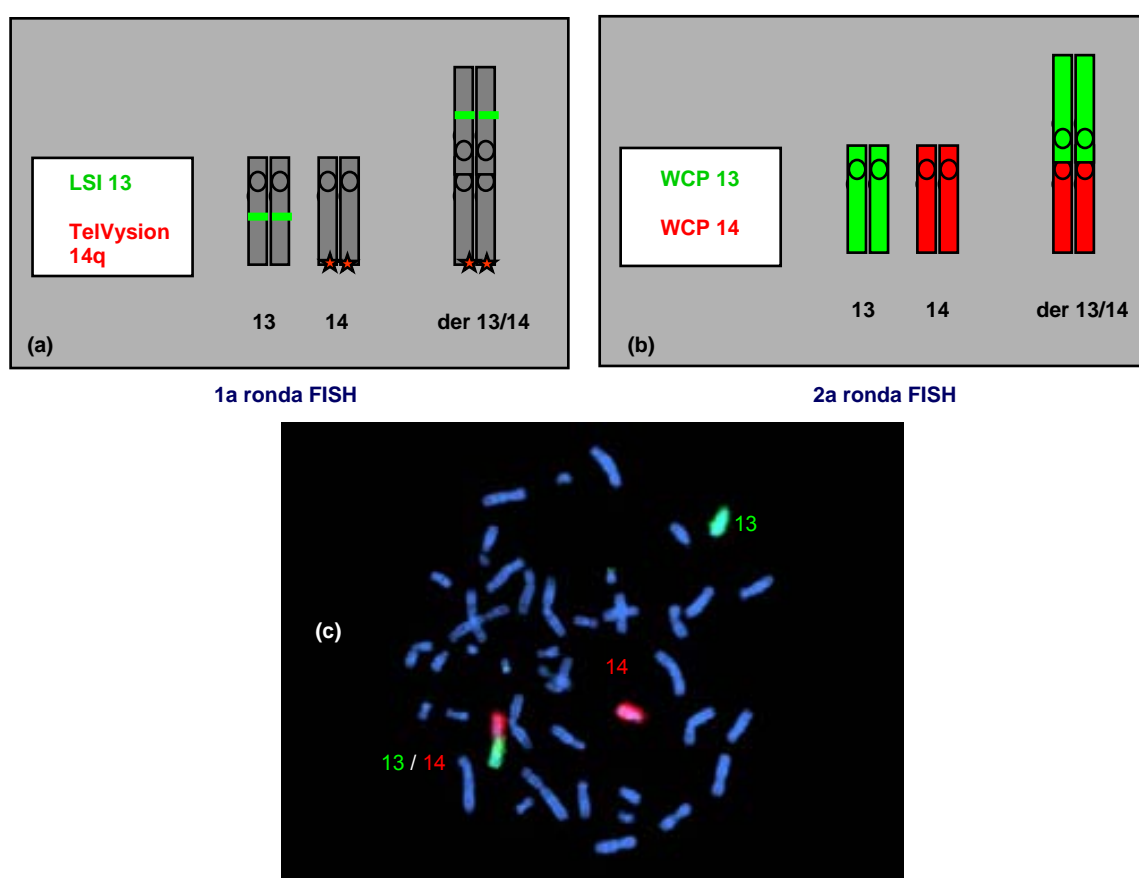


Figura M-23. Representació gràfica de la translocació robertsoniana 46,XX,der(13;14)(q10;q10). (a): sonda de locus específica LSI per al cromosoma 13 i sonda de telòmer q (TelVysion q) per al cromosoma 14. (b): sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 13 i per al cromosoma 14. (c): hibridació amb les sondes de cromosoma sencer aplicades sobre una extensió cromosòmica de limfòcit d'una pacient portadora d'aquesta translocació robertsoniana. [microscopi de fluorescència 1000x]

L'1CP normal o equilibrat a la primera ronda tindrà dues marques verdes corresponents a les dues cromàtides del cromosoma 13 i dues marques vermelles corresponents a les dues cromàtides del cromosoma 14. Els 1CP desequilibrats tindran més o menys marques de cada cromosoma. A la segona

ronda podrem distingir els dominis de cada cromosoma encara que la morfologia cromosòmica no estigui ben preservada.

3.6.3.3 Dona amb cariotip 46,XX,t(4;12)(q22;q23)

S'ha aplicat una primera ronda de FISH amb sondes centromèriques per al cromosoma 4 (CEP 4 *Spectrum orange*, Vysis) i per al cromosoma 12 (CEP 12 *Spectrum green*, Vysis). També s'ha aplicat una segona ronda de FISH amb sondes de cromosoma sencer per al cromosoma 4 (WCP 4 *Spectrum orange*) i per al cromosoma 12 (WCP 12 *Spectrum green*) [figura M-24].

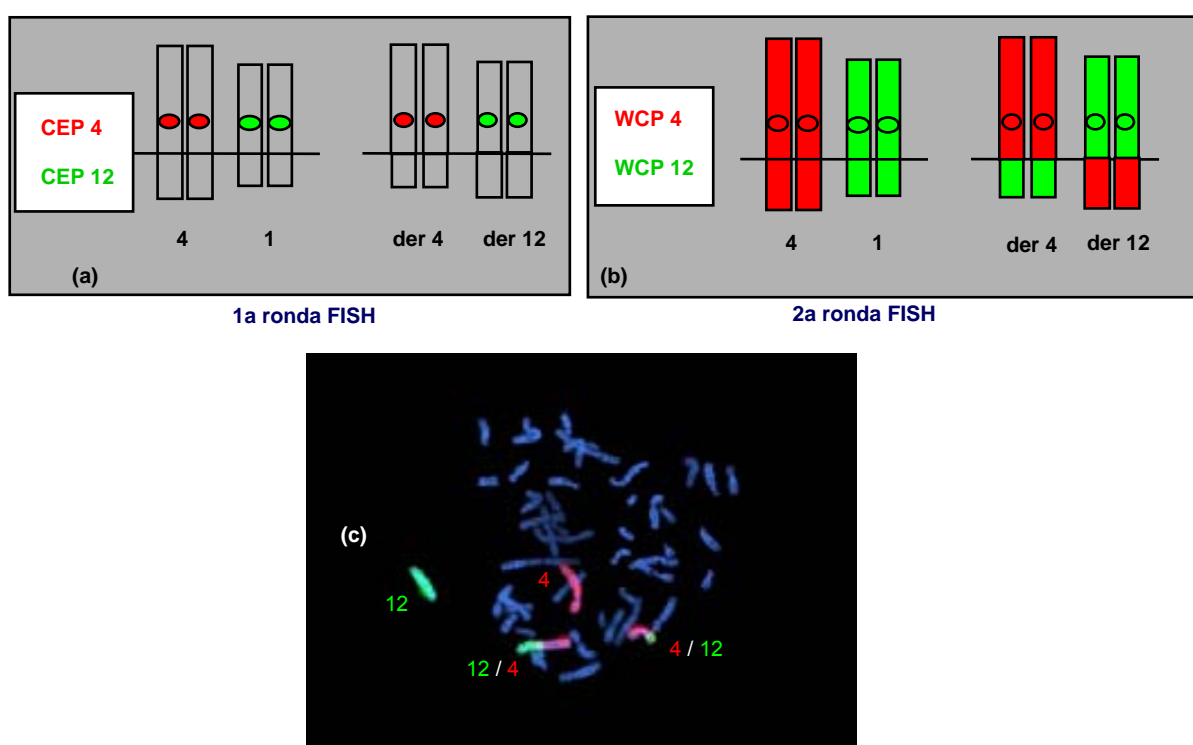


Figura M-24. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(4;12)(q22;q23). (a): sonda centromèrica (CEP) per al cromosoma 4 i per al cromosoma 12. (b): sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 4 i per al cromosoma 12. (c): hibridació amb les sondes de cromosoma sencer sobre una extensió cromosòmica de limfòcit de la pacient. [microscopi de fluorescència 1000x]

3.6.3.4 Dona amb cariotip 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)

S'ha aplicat una primera ronda de FISH amb la sonda telomèrica per al cromosoma 18 (TelVysion 18q *Spectrum orange*, Vysis) i la sonda centromèrica per al cromosoma 18 (CEP 18 *Spectrum aqua*, Vysis). S'ha aplicat una segona ronda de FISH amb les sondes de cromosoma sencer per al cromosoma 1 (WCP 1 *Spectrum orange*, Vysis) i per al cromosoma 18 (WCP 18 *Spectrum green*, Vysis) [figura M-25].

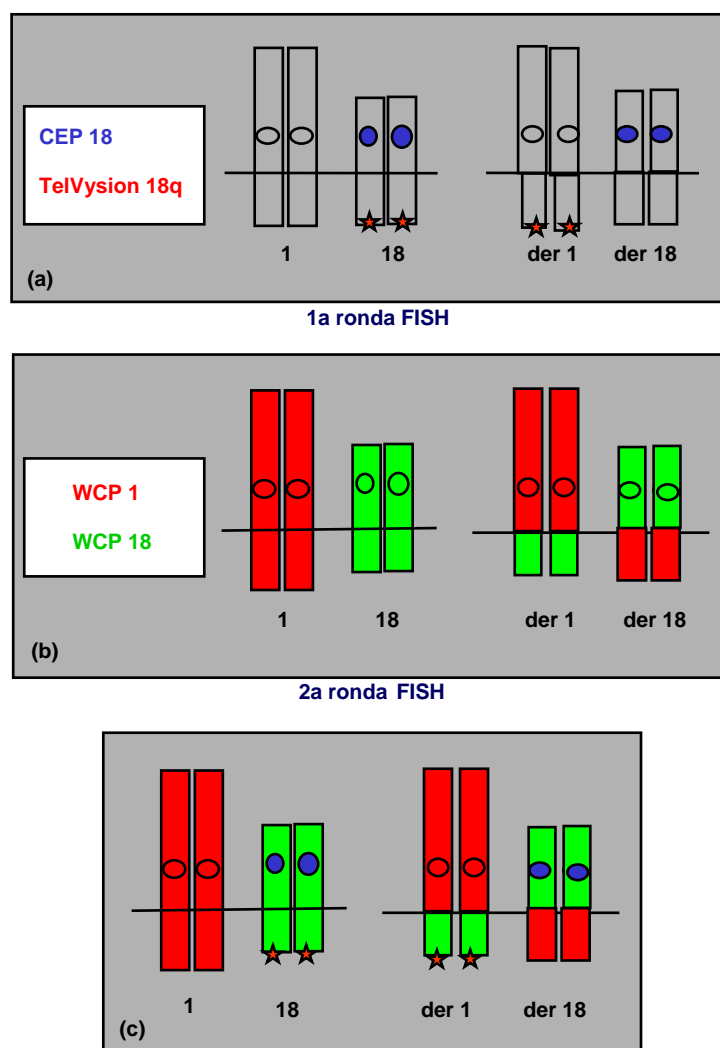


Figura M-25. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3). (a): sonda telomèrica q (TelVysion q) per al cromosoma 18 i la sonda centromèrica (CEP) per al mateix cromosoma. (b): sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 1 i per al cromosoma 18. (c): composició amb totes les sondes aplicades.

3.6.3.5 Dona amb cariotip 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)

També s'han fet dues rondes de FISH. A la primera s'han aplicat la sonda centromèrica per al cromosoma 4 (CEP 4 *Spectrum green*, Vysis) i la sonda telomèrica per al mateix cromosoma (TelVysion 14q *Spectrum orange*, Vysis). A la segona s'han aplicat les sondes per al cromosoma 11, centromèrica (CEP 11 *Spectrum aqua*, Vysis) i de cromosoma sencer (WCP 11 *Spectrum green*, Vysis). En aquest cas marquem cada cromosoma en una ronda diferent. El resultat final només el podem veure en una imatge composta per les marques de totes dues hibridacions. A la imatge composta la marca del cromosoma 11 s'ha pintat de groc per poder distingir el centròmer del cromosoma 4 que és del mateix color [figura M-26].

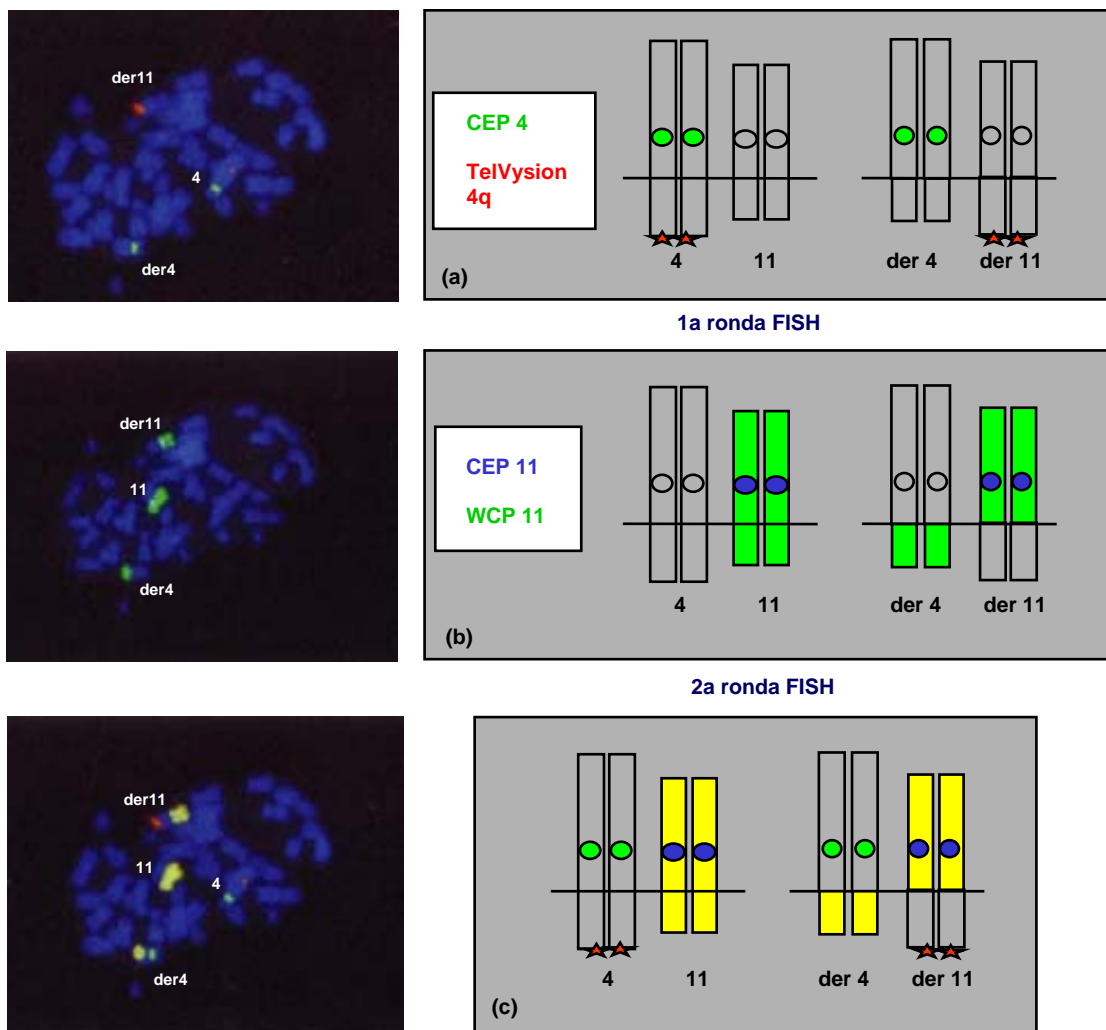


Figura M-26. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23) amb extensions de limfòcits. (a): sonda centromèrica (CEP) per al cromosoma 4 i sonda telomèrica q (TelVysion q) per al mateix cromosoma. (b): sonda CEP per al cromosoma 11 i sonda de cromosoma sencer (WCP) per al mateix cromosoma. (c): composició amb totes les sondes aplicades.

3.6.3.6 Dona amb cariotip 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)

També s'han fet dues rondes de FISH. A la primera s'han aplicat la sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 8 (WCP 8 *Spectrum orange*, Vysis) i la sonda locus específica per al cromosoma 13 (LSI 13 *Spectrum green*, Vysis). A la segona ronda s'han aplicat la sonda telomèrica per al cromosoma 8 (TelVysion 8q *Spectrum orange*, Vysis) i la sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 13 (WCP 13 *Spectrum green*, Vysis). A la imatge composta la marca del cromosoma 8 s'ha pintat de groc per poder distingir el telòmer del cromosoma 8 que és del mateix color, també s'ha pintat la marca locus específica del cromosoma 13, en aquest cas amb blau [figura M-27].

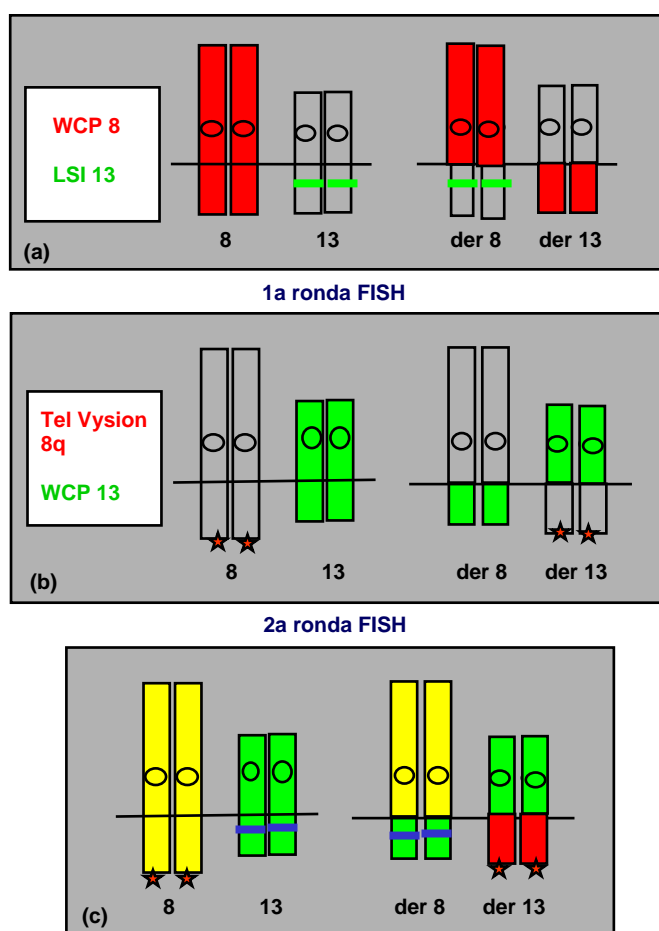


Figura M-27. Representació gràfica de la translocació recíproca 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22). (a): sonda de cromosoma sencer (WCP) per al cromosoma 8 i sonda locus específica (LSI) per al cromosoma 13. (b): sonda telomèrica q (TelVysion q) per al cromosoma 8 i sonda r WCP per al cromosoma 13. (c): composició amb totes les sondes aplicades.

3.6.4 Biòpsia de blastòmer per micromanipulació

En els casos clínics en els quals s'ha fet biòpsia d'embrions en D + 3, aquesta s'ha portat a terme seguint el mateix mètode de micromanipulació utilitzat per fer la biòpsia d'1CP en D + 0. A D + 3 els embrions habitualment tenen entre sis i vuit cèl·lules de les quals s'han biopsiat una o dues. Els blastòmers escollits per ser biopsiats són els que presenten un nucli ben definit. De igual manera que per als oòcits, cada embrió es posa en una gota de medi tamponat coberta amb oli de parafina [vegeu l'apartat 3.3] en una placa a 37°C col·locada sobre la platina també a 37°C d'un microscopi invertit amb dos micromanipuladors. L'embrió se subjecta amb una pipeta sostenidora de manera que el blastòmer que volem biopsiar quedi a la posició equivalent a les dotze o tres de les agulles del rellotge dependent del mètode de biòpsia que s'apliqui. Un cop fet el forat, l'1CP s'aspira amb una pipeta de biòpsia amb un diàmetre intern de 30–40 µm [figura M-28].

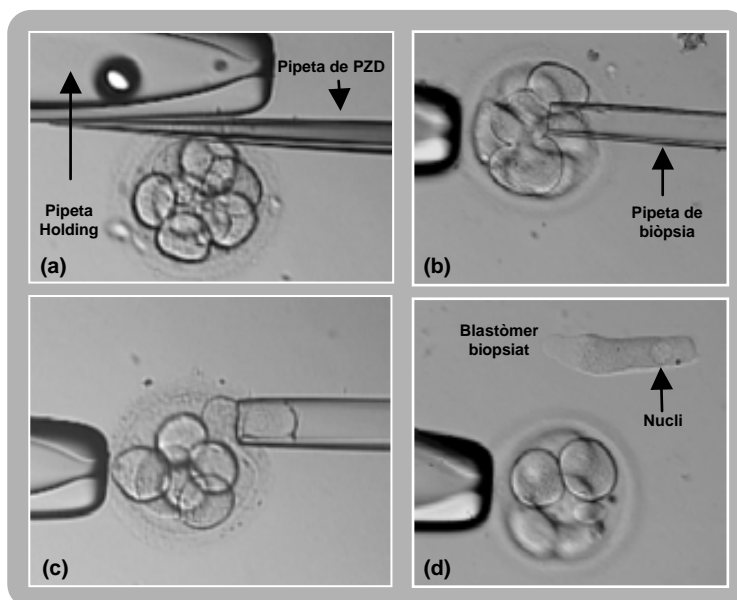


Figura M-28. (a): imatge de l'entrada de la pipeta de biòpsia dins de l'embrió. (b-c): aspiració del blastòmer dins de la pipeta de biòpsia. (d): el blastòmer biopsiat s'expulsa a la mateixa gota on es troba l'embrió. El nucli del blastòmer es veu clarament. [microscopi invertit amb òptica de Hoffman 400x]

3.6.5 Anàlisi estadística de la segregació preferent segons la freqüència de recombinació

S'ha intentat determinar si hi ha una relació entre la presència de *punts calents de recombinació* en els segments intersticials de les translocacions recíproques publicades en les quals s'han diagnosticats almenys nou òcits, i el *tipus de segregació* observada. S'han inclòs en aquest estudi cinc cariotips femenins: 46,XX,t(11;16)(q21;q22) (Munné i col·l. 1998a), 46,XX,t(5;8)(p13;q23) (Pierce i col·l. 1998), 46,XX,t(6;21)(q13;q22.3) (Conn i col·l. 1999), 46,XX,t(11;16)(q21;q22) (Willadsen i col·l. 1999) i un cas inclòs en el present treball:46,XX,t(4;12)(q22;q23) [art.2 vegeu l'apartat 4.7] [taula M-6].

Taula M-6. Cariotips femenins analitzats per comparar la segregació observada i la freqüència de quiasmes.

Cariotip de la dona 46,XX,t(A;B)	Tipus de cèl·lula	Cèl·lules diagnosticades	Referència bibliogràfica
46,XX,t(11;16)(q21;q22)	1CP, BL	17	Munné i col·l. (1998a)
46,XX,t(5;8)(p13;p23)	BI	9	Pierce i col·l. (1998)
46,XX,t(6;21)(q13;q22.3)	BL	9	Conn i col·l. (1999)
46,XX,t(11;16)(q21;q22)	1CP, BL	10	Willadsen i col·l. (1999)
46,XX,t(4;12)(q22;q23)	1CP	11	art.2 (vegeu l'apartat 4.7)

1CP (primer corpuscle polar), BL (blastòmer).

Com que a la bibliografia no hi ha dades sobre les freqüències de recombinació per cariotips femenins, hem utilitzat les dades publicades l'any 1985 per Laurie i Hultén (Laurie i Hultén 1985a i b) en cariotips masculins en metafase I. Les dades serien vàlides tenint en compte que les úniques regions en les quals l'home té una més elevada freqüència de recombinació que la dona són les regions terminals telomèriques (Ledbetter 2000). S'ha aplicat el test de correlació de Pearson a la freqüència de no-disjunció de cromosomes homòlegs en cada translocació i la freqüència de quiasmes en els segments intersticials (Laurie i Hultén 1985a i b) per veure si hi ha una correlació estadísticament significativa.

S'ha fet una comparació entre el tipus de segregació observada en òcits o embrions d'aquestes dones portadores de translocacions recíproques, la freqüència d'un o més quiasmes intersticials a cada braç implicat en la reorganització i la freqüència de no-disjunció de cromosomes homòlegs implicats en la reorganització.

Capítol 4: resultats



Els resultats dels objectius concrets 2.1.1, 2.1.2 i 2.1.4 [vegeu l'apartat 2.2], han estat presentats i publicats a les revistes *Human Reproduction* i *Human Reproduction Update*, recollides en el *Journal Citation Reports® Category Name: Reproductive Biology* [vegeu els apartats 4.6 i 4.7].

En aquesta memòria s'ha optat per redactar detalladament tots els resultats obtinguts ja que hi ha una part que no han estat objecte de publicació (resultats de l'objectiu 2.1.3). Aquests resultats no publicats inclouen, a més de l'estudi citogenètic fet a material biològic desestimat de cicles de FIV [vegeu l'apartat 4.4], els resultats de tres casos clínics de diagnòstic genètic preimplantacional fets amb posterioritat a les publicacions referides anteriorment.

4.1 Resultats metodològics

4.1.1 Obtenció d'extensions cromosòmiques de primer corpuscle polar (1CP) d'òocits d'hàmsster: caracterització morfològica [vegeu l'apartat 4.6 art. 1]

En el present treball s'ha desenvolupat un procediment idoni per a l'obtenció de complements cromosòmics de *primer corpuscle polar* (1CP) fixats individualment sobre portaobjectes. La posada a punt del mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP s'ha desenvolupat en òocits madurs d'hàmsster *Mesocricetus auratus* com a model animal. El procediment s'ha descrit anteriorment i ha estat motiu d'una publicació [vegeu l'apartat 4.6 art. 1].

S'han processat un total de 220 òocits madurs d'hàmsster dels quals s'han aïllat i fixat amb èxit 165 1CP mentre que els trenta-cinc restants s'han perdut durant el tractament hipotònic o la fixació.

En aquest treball s'han identificat, per primera vegada, característiques morfològiques diferencials entre els cromosomes de l'1CP i els de la corresponent *metafase II* (MII), lligades a l'estadi cel·lular meiótic. Aquesta valoració s'ha fet en material cromosòmic tenyit amb colorant Leishman i observat a microscòpia de camp clar. En 105 de 165 (63,6 %) complements cromosòmics d'1CP els cromosomes presenten una morfologia cromosòmica molt similar a la dels cromosomes de l'MII dels òocits [figura R-1 i taula R-1].

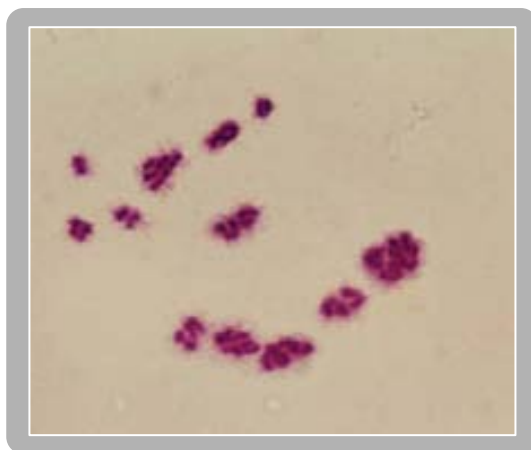


Figura R-1. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP d'hàmsster tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x]

Taula R-1. Característiques dels complements cromosòmics d'1CP d'òcits madurs d'hàmsster.

Morfologia cromosòmica d'1CP	1CP (%)	Euploides (%)	Aneuploides (%)
Preservada	105 (63,6)	100 (95,2)	5 (4,8)
No preservada	60 (36,4)	NA	NA
	165 [taula M-1]		

1CP (primer corpuscle polar), NA (no analitzable).

Ambdós complements cromosòmics presenten vint-i-dos cromosomes amb dues cromàtides germanes separades ($n = 22$, $N = 44$) excepte en la regió del centròmer. Però mentre que els cromosomes del complement cromosòmic de l'òcit II solen tenir un aspecte ondulat i una forma força definida [figura R-2], els cromosomes de l'1CP mostren un aspecte desorganitzat característic, i mostren un contorn poc definit [figura R-3].



Figura R-2. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'òcit II d'hàmsster tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x]

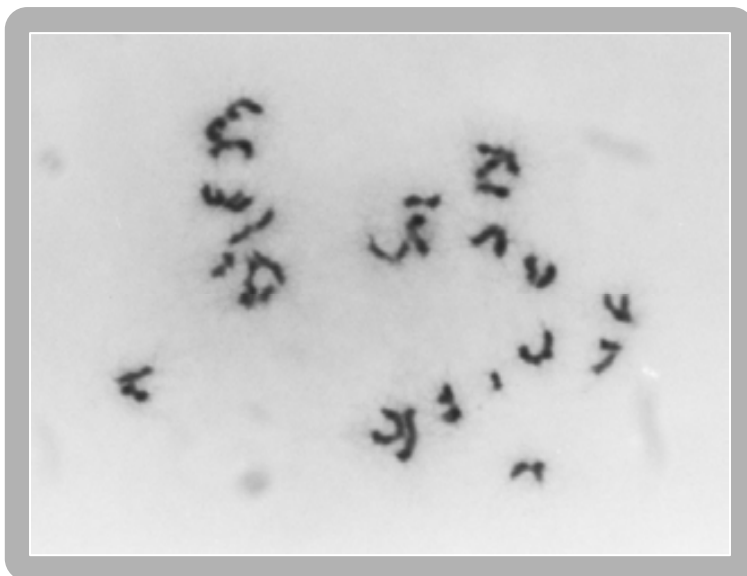


Figura R-3. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP d'hàrmster tenyida amb colorant Leishman i microfotografiada amb pel·lícula blanc i negre. [microscopi de camp clar 1000x]

Els 60 (36,4 %) 1CP restants presenten una morfologia cromosòmica *no preservada*, que recorda, una vegada estès en el portaobjectes, una falsa aparença de nucli interfàsic [taula R-1 i figura R-4].

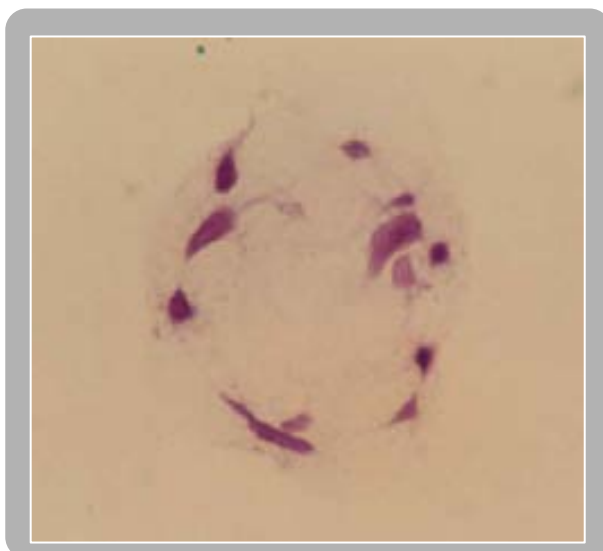


Figura R-4. Extensió d'1CP d'hàrmster sense amb morfologia cromosòmica no preservada i tenyida amb colorant Leishman. [microscopi de camp clar 1000x]

4.1.2 Obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP d'òcits madurs humans descartats de programes de fecundació in vitro (FIV): caracterització morfològica [art .1 vegeu l'apartat 4.6]

S'ha adequat el mètode d'aïllament d'1CP d'òcits madurs d'hàmssters a 1CP d'òcits madurs humans, modificant la solució enzimàtica de *tripsina* usada i augmentant-ne fins a trenta vegades la concentració. La *zona pel·lúcida* (ZP) humana no es dissolia en la solució enzimàtica usada per oòcits d'hàmsster.

Així mateix, s'ha adequat el tractament hipotònic i la fixació d'1CP d'hàmssters per a 1CP humans i s'han posat a punt dos mètodes físics d'aïllament d'aquestes cèl·lules per micromanipulació: físic (làser) i mecànic (PZD).

S'ha evidenciat la necessitat i l'oportunitat de fer una anàlisi de les extensions cromosòmiques a microscòpia de contrast de fases prèviament a l'aplicació de la tècnica d'*hibridació in situ fluorescent* (fluorescent in situ hybridization, FISH) amb sondes específiques, ja que els cromosomes d'1CP s'inflen molt durant el procés de la FISH i perden definició del seu contorn [figura R-5].

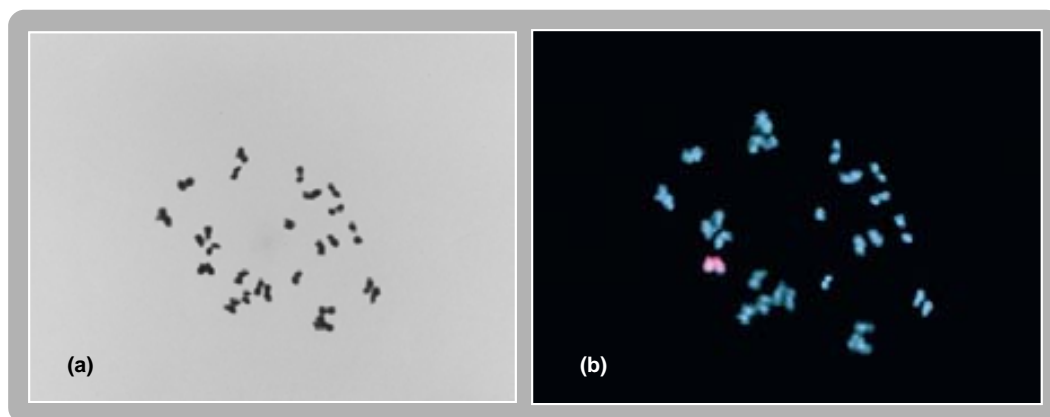


Figura R-5. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà [microscopi de contrast de fases 400x]. (b): la mateixa extensió hibridada amb una sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 11 (vermell). [microscopi de fluorescència 1000x]

Per a la l'aplicació de la FISH al nostre material s'ha adaptat el protocol proposat per la casa comercial, i s'han aconseguit resultats satisfactoris. Abans de la FISH s'ha fet un tractament amb una solució de pepsina a les extensions cromosòmiques fixades que tenien restes de membrana citoplasmàtica, i s'ha aconseguit així millorar substancialment el resultat de la hibridació. Així mateix, s'ha fet una refixació del material amb formaldehid amb la qual cosa s'ha pogut preservar millor la morfologia cromosòmica meiótica. Finalment, s'ha reduït el volum de mescla de FISH aplicada així com la mida del

cobreobjectes, ja que hem fixat una cèl·lula per portaobjectes i hem aconseguit d'aquesta manera un estalvi econòmic sense reducció en la qualitat de la FISH.

S'ha evidenciat que en les extensions cromosòmiques d'1CP, fins i tot quan aquestes presenten un grau baix de preservació de la *morfologia cromosòmica*, es poden aplicar, a més de les *sondes puntuals locus específiques i centromèriques* [figura R-6], també les *sondes de cromosoma sencer*, ja que no es tracta de material cromosòmic en interfase.

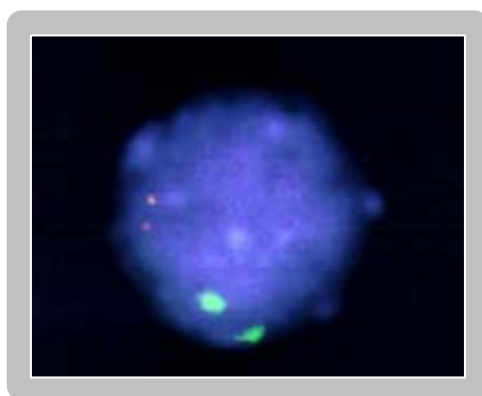


Figura R-6. Extensió d'un complement d'1CP humà amb aparença de nucli interfàsic hibridada amb una sonda de cromosoma locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x]

S'han destinat a la posada a punt del mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques en 1CP humans, un total de 18 òcits madurs *no inseminats* (frescos) descartats de cicles de FIV-ICSI [taula M-2] dels quals 17 (94,4 %) s'han fixat amb èxit. Respecte a la morfologia cromosòmica, en 16 dels 17 (94,1 %) complements cromosòmics d'1CP, els cromosomes presenten una morfologia cromosòmica molt similar a la dels cromosomes de l'MII dels òcits [figura R-7 i taula R-2].

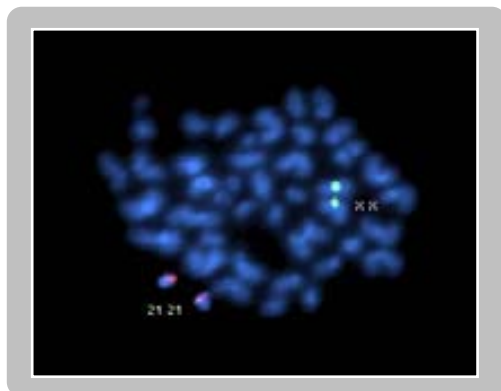


Figura R-7. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb la sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i la sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x]

Taula R-2. Característiques dels complements cromosòmics d'1CP d'òcits madurs humans no inseminats descartats de programes de FIV.

Morfologia cromosòmica d'1CP	Cèl·lules processades	Cèl·lules fixades (%)	1CP vs morfologia cromosòmica (%)	Aneuploidia global (%)
Preservada	np	np	16 (94,1)	0,0
No preservada	np	np	1 (5,8)	1 de 1
	18 [taula M-2]	17 (94,4)	17 (100,0)	1 (5,9)

FIV (fecundació in vitro), 1CP (primer corpuscle polar), np (no procedeix).

En aquests casos, ambdós complements cromosòmics (1CP i MII) presenten vint-i-tres cromosomes amb dues cromàtides germanes (n 23, N 46) separades, excepte en la regió del centròmer, i amb morfologia molt similar a l'observada en l'hàster.

Mentre que els cromosomes del complement de l'òcit II solen tenir un aspecte ondulat i una forma força definida, els cromosomes de l'1CP mostren un aspecte desorganitzat característic, ja que mostren un contorn poc definit i solen ser més curts que els cromosomes de l'òcit en MII [figura R-8].

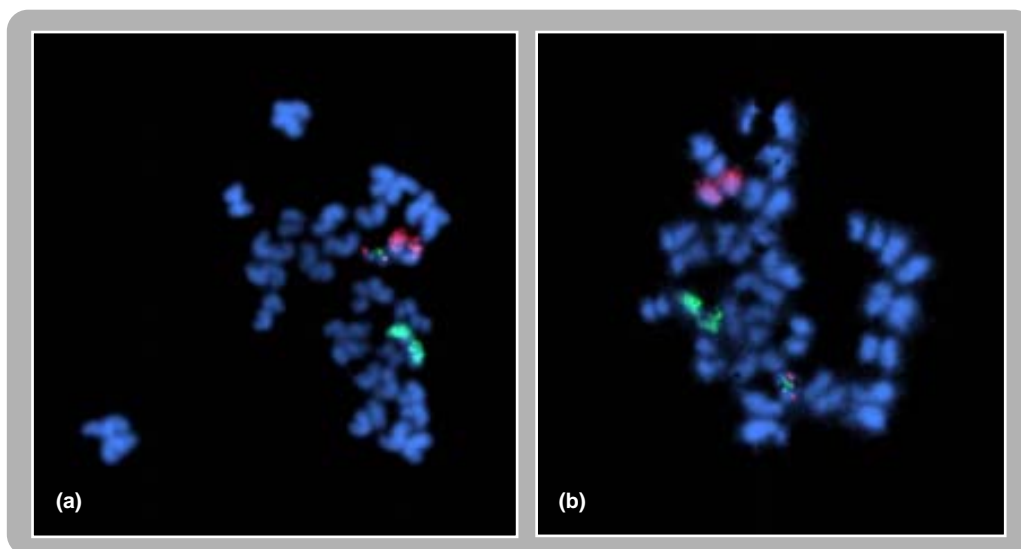


Figura R-8. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'òcit II humà hibridada amb una sonda dual locus específica per al cromosoma 22 (verd-vermell) i amb sondes de cromosoma sencer per als cromosomes 13 (verd) i 14 (vermell). (b): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb les mateixes sondes. [microscopi de fluorescència 1000x]

El restant 1CP (5,9 %) presenta una morfologia cromosòmica no preservada i mostra una falsa aparença de nucli interfàsic [figura R-9].

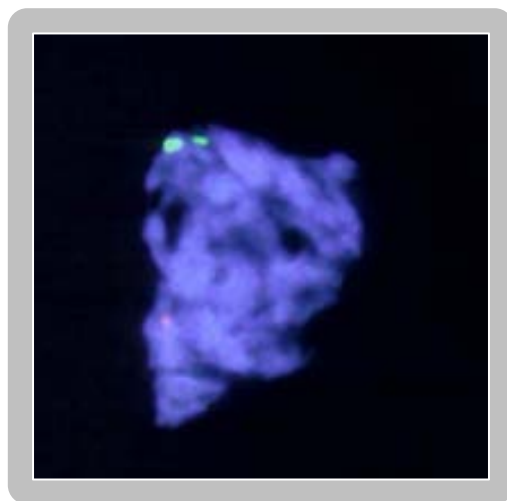


Figura R-9. Extensió d'un complement aneuploide (-ct 21) d'1CP humà que presenta una falsa aparença de nucli interfàsic i hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x]

4.2 Anàlisi de la complementarietat cromosòmica de l'1CP i la corresponent MII en òcits madurs humans descartats de programes de FIV [vegeu l'apartat 4.7 art.2]

D'una banda, s'han processat òcits madurs no inseminats descartats de cicles de FIV-ICSI (òcits frescos): vint-i-un òcits procedents de deu dones entre 30 i 35 anys (mitjana d'edat, 32,1 anys). I, d'altra banda, s'han processat òcits madurs descartats després de la inseminació per FIV convencional (òcits envellits): cinquanta òcits procedents de trenta-cinc dones entre 29 i 37 anys (mitjana d'edat, 33,5 anys) [taula M-2].

Taula R-3. Sèrie control per determinar l'eficiència del mètode de FISH en òcits humans madurs no inseminats descartats de programes de FIV: resultats citogenètics.

Tipus de cèl·lula i origen	Cèl·lules processades	Cèl·lules fixades (%)	Concordança 1CP-MII (%)	Aneuploidia global (%)
Òcits no inseminats (frescos)	21	18 (85,7)	18 (100,0)	0,0
Òcits descartats postinseminació FIV convencional (envellits)	50	41 (82,0)	39 (95,1)	2 (5,1)
	71 [taula M-2]	59 (83,0)	57 (96,6)	2 (3,5)

FISH (hibridació in situ fluorescent), FIV (fecundació in vitro), 1CP (primer corpuscle polar), MII (metafase II).

S'han fixat adequadament divuit dels vint-i-un (85,7 %) òcits no inseminats i quaranta-un dels cinquanta (82,0 %) dels òcits descartats postinseminació [taula R-3].

S'ha observat morfologia cromosòmica preservada en 15 (83,3 %) dels 1CP corresponents a les divuit parelles d'òcits no inseminats, mentre que en els òcits descartats postinseminació, únicament s'ha

observat morfologia cromosòmica preservada en sis (14,6 %) dels 1CP de les quaranta-una parelles. Divuit de divuit (100,0 %) parelles 1CP-MII procedents d'òcits no inseminats (frescos) analitzades han mostrat resultats de la FISH concordants per als cromosomes X i 21 i totes eren euploides [figura R-10].

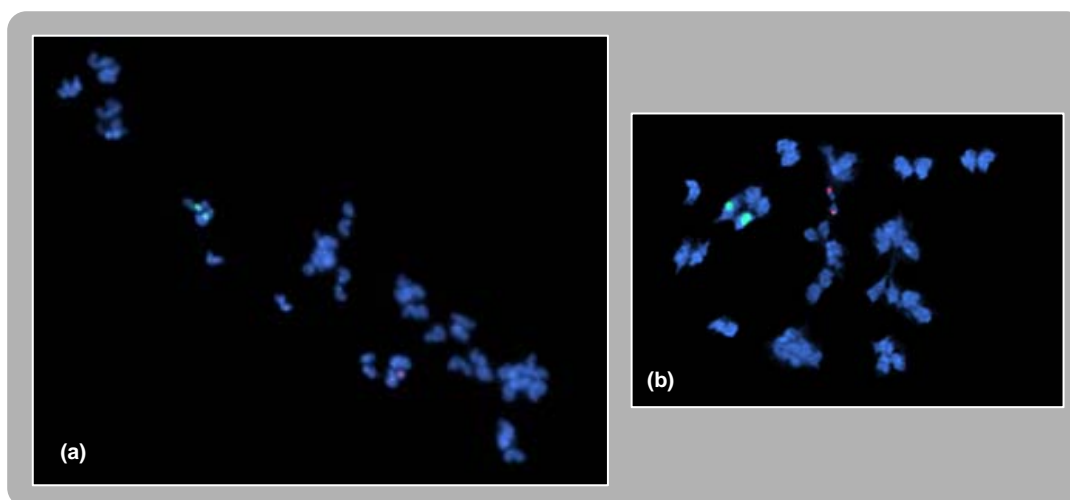


Figura R-10. (a): extensió del complement cromosòmic euploide de l'MII de l'òcit hibridada amb les mateixes sondes. [microscopi de fluorescència 1000x]. (b): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd).

Les *parelles 1CP-MII* procedents d'òcits envellits han mostrat resultats de la FISH concordants per als cromosomes X i 21 en el 95,1 % i el 5,1 % (dos de trenta-nou) dels òcits eren aneuploides [taula R-3]. En un cas, l'1CP presentava un guany del cromosoma 21 i la corresponent MII una pèrdua del cromosoma 21 (1CP +cr 21 i l'MII corresponent -cr 21) conseqüència d'una no-disjunció dels cromosomes 21. En l'altre cas l'1CP presentava una pèrdua d'una cromàtide del cromosoma 21 i la corresponent MII un guany d'una cromàtide del cromosoma 21 (1CP -ct 21 i l'MII corresponent +ct 21) conseqüència d'una separació precoç de les cromàtides germanes del cromosoma 21 [figura R-11].

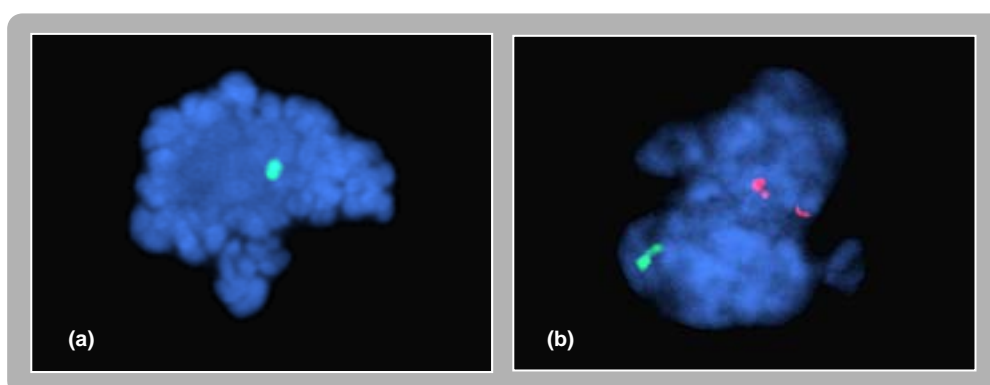


Figura R-11. (a): extensió del complement cromosòmic -ct 21 de l'MII de l'òcit hibridada amb les mateixes sondes. (b): extensió d'un complement cromosòmic +ct 21 d'1CP humà hibridada amb una sonda de locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x]

4.3 Obtenció d'extensions d'òcits immadurs i zigots humans anòmals descartats de programes de FIV

S'han analitzat un total 151 *òcits immadurs* i *zigots anòmals*. S'han inclòs: divuit òcits immadurs no inseminats descartats de cicles de FIV-ICSI, cinquanta-cinc òcits aparentment immadurs descartats postinseminació de cicles de FIV convencional i setanta-vuit zigots anòmals descartats postinseminació de cicles de FIV convencional [taula M-2]. Tots ells s'han processat per a l'anàlisi citogenètica i s'ha fixat adequadament 105 de 151 (69,5 %) cèl·lules: divuit de divuit (100,0 %) òcits immadurs no inseminats, trenta-vuit de cinquanta-cinc (69,0 %) òcits aparentment immadurs descartats postinseminació per FIV convencional i quaranta-nou de setanta-vuit (62,8 %) zigots anòmals [taula R-4].

Taula R-4. Òcits immadurs (MI i VG) i zigots humans descartats de programes de FIV.

Tipus de cèl·lula i origen	Cèl·lules processades	Cèl·lules fixades (%)
Oòcits no inseminats (grup i)	18	18 (100,0)
Oòcits descartats postinseminació FIV convencional (grup i)	55	38 (69,0)
Zigots anòmals descartats postinseminació FIV convencional (grup ii)	78	49 (62,8)
	151 [taula M-2]	105 (69,5) [taula R-5]

FIV (fecundació in vitro), MI (metafase I), VG (vesícula germinal).

S'han classificat les cèl·lules en dos grups, segons l'estadi morfològic que presentaven abans de ser fixades:

Grup i) Oòcits aparentment immadurs (no CP)

Grup ii) Zigots anòmals.

4.4 Anàlisi d'anomalies cromosòmiques numèriques en òcits i zigots humans anòmals descartats de programes de FIV

S'ha obtingut la diagnosi citogenètica en noranta-set de 105 (92,4 %) cèl·lules fixades [taula R-5]. Els cromosomes analitzats varien en cada grup i estan detallats a cada apartat [vegeu els apartats 4.4.1 i 4.4.2].

Taula R-5. Classificació de les cèl·lules anòmales fixades descartades de programes de FIV.

Grups	Tipus de cèl·lula	Posats a MIV	Cèl·lules fixades	Cèl·lules diagnosticades (%)
Grup i: oòcits aparentment immadurs				
No inseminats	MI	No	9	8 (88,8)
	VG	Si	6	6 (100,0)
	MI	Si	3	3 (100,0)
			18	17 (94,4)
Aparentment no fecundats				
	MI	No	30	27 (90,0)
	VG	Si	2	2 (100,0)
	MI	Si	6	5 (83,3)
			38	34 (89,5)
			56	51 (91,1) [taula R-6]
Grup ii: zigots anòmals				
	>2PN	No	20	17 (85,0)
	1PN	No	18	18 (100,0)
	2PN aturat	No	11	11 (100,0)
			49	46 (93,8) [taula R-8]
			105 [taula R-4]	97 (92,4)

FIV (fecundació in vitro), MIV (cultiu in vitro per madurar), MI (metafase I), VG (vesícula germinal), PN (pronucli).

Alguns oòcits immadurs es van deixar en el mateix medi de cultiu unes quantes hores més i van assolir espontàniament l'estadi d'MII in vitro (MIV). No es va posar cap suplement hormonal en el medi de cultiu per tal de promoure la maduració.

4.4.1 Oòcits humans aparentment immadurs descartats de programes de FIV (grup i)

Aquest grup l'han format cinquanta-sis oòcits humans aparentment immadurs fixats per fer-ne l'anàlisi citogenètica [taula R-5]. Aquests oòcits corresponen a: nou oòcits immadurs no inseminats, prèviament tractats amb hialuronidasa i considerats en estadi de MI; nou oòcits aparentment immadurs no inseminats, prèviament tractats amb hialuronidasa, considerats en estadi de MI i que tot i mantenir-los dotze hores en cultiu no havien assolit l'estadi d'MII (sis VGs i tres MIs); trenta oòcits aparentment immadurs, en estadi de MI, i aparentment no fecundats per inseminació convencional; i vuit oòcits aparentment immadurs i que posteriorment a la inseminació convencional no havien assolit l'estadi d'MII (dues VGs i sis MIs).

Aquests oòcits s'han analitzat citogenèticament amb FISH dual per als cromosomes X i 21; amb FISH dual per als cromosomes 11 i 15; amb FISH simple per al cromosoma 11; o amb FISH simple per al cromosoma 22. S'han diagnosticat un total de 51 de les 56 (91,1 %) cèl·lules incloses en aquest grup. L'èxit de diagnòstic ha oscil·lat entre el 83,3 % i el 100,0 %.

Globalment, el 25,4 % de les cèl·lules han estat euploides. S'han observat aneuploïdies, tant per a alguns cromosomes del complement, com aneuploïdies que afectaven el nombre de complements cromosòmics present en l'oòcit. Mostrem a continuació els resultats de l'anàlisi citogenètica

corresponent als diferents tipus de cèl·lules incloses en aquest grup [taula R-6] i es detallen a continuació separatament per a cada tipus d'òcit.

Taula R-6. Resultats citogenètics dels òcits humans aparentment immadurs descartats de programes de FIV (grup i).

Tipus d'òcit i origen	Posats a MIV	Cèl·lules diagnosticades (%)	Euploides (%)	Aneuploides (%)	Complements aneuploides ^a (%)		
					Un complement diploide de cromosomes MII	Dos complements haploides de cromosomes MII	Aneuploïdes de cromosoma o bivalent
No inseminats							
MI	No	8 (88,8)	4 (50,0)	4 (50,0)	–	–	2 cèl·lules 24 bivalents (?) 1 cèl·lula univalent 21 1 cèl·lula -bivalent 21
VG	Sí	6 (100,0)	4 (66,7)	2 (33,3)	1 cèl·lula (nucli PI)	–	1 cèl·lula -cr 11 i 15 (nucli)
MI	Sí	3 (100)	1 (33,3)	2 (66,7)	2 cèl·lules	–	–
		17 (94,4)	9 (52,9)	8 (47,1) ^b	3 (37,5)	–	5 (62,5)
Aparentment no fecundats							
MI	No	27 (90,0)	3 (11,1)	24 (89,0)	13 cèl·lules (54,2)	9 cèl·lules (37,5)	1 cèl·lula -bivalent 21 1 cèl·lula 25 bivalents (?)
VG	Sí	2 (100,0)	0,0	2 (100,0)	–	2 cèl·lules	–
MI	Sí	5 (83,3)	1 (20,0)	4 (80,0)	3 cèl·lules	1 cèl·lula	–
		34 (89,5)	4 (11,8)	30 (88,2) ^b	16 (53,3)	12 (40,0)	2 (6,7)
		51 (91,1) [taula R-5]	13 (25,4)	38 (74,6)	19 (50,0)	12 (31,6)	7 (18,4)

FIV (fecundació in vitro), MIV (cultiu in vitro per madurar), MI (metafase I), VG (vesícula germinal), PI (profase I), cr (cromosoma).

(?) (bivalent/s desconegut/s). ^a cromosomes analitzats (X i 21), (11 i 15) i (11 i 22).

^b Prova exacte de Fisher $p < 0,0215$ (significatiu si $p < 0,05$).

4.4.1.1 Oòcits humans no inseminats, aparentment immadurs, no posats a madurar in vitro (MIV)

Quatre de vuit (50,0 %) oòcits aparentment immadurs no inseminats eren euploides i presentaven un complement cromosòmic en estadi de MI. Els quatre restants eren aneuploides: dos oòcits mostraven un complement cromosòmic *hiperploide* en estadi de MI amb un guany de bivalent que no corresponia ni al cromosoma X, ni al cromosoma 21 analitzats; un oòcit mostrava un complement cromosòmic *hipoploide* en estadi de MI amb un univalent 21; i, finalment, un oòcit amb un complement cromosòmic en estadi de MI *nul·lisòmic* per al cromosoma 21 [taula R-6].

4.4.1.2 Oòcits humans no inseminats, aparentment immadurs i posats a MIV, però que no havien assolit espontàniament l'estadi d'MII

Dels sis oòcits inicialment en estadi de VG, quatre (66,7 %) presentaven un complement cromosòmic euploide en estadi de MI, i dos oòcits eren aneuploides: un mostrava un complement cromosòmic diploide amb morfologia de cromosomes en estadi de MI i l'altre va presentar un complement en estadi de *profase I* (PI), hipoploide per als cromosomes 11 i 15. D'altra banda, un dels tres (33,3 %) oòcits aparentment en estadi de MI presentava un complement cromosòmic euploide en estadi de MI, i els altres dos (66,6 %) eren aneuploides ambdós mostraven un *complement cromosòmic diploide* amb morfologia de cromosomes en estadi d'MII [taula R-6].

En els casos descrits de complement cromosòmic diploide amb morfologia de cromosomes en estadi d'MII, s'observen quaranta-sis cromosomes amb la morfologia típica d'un complement cromosòmic MII haploide [figura R-12]; no obstant això, quan s'observen dos complements cromosòmics haploides, la morfologia dels cromosomes en MII d'un dels complements és més desorganitzada de forma molt semblant a l'aparença dels cromosomes de l'1CP [figura R-13].

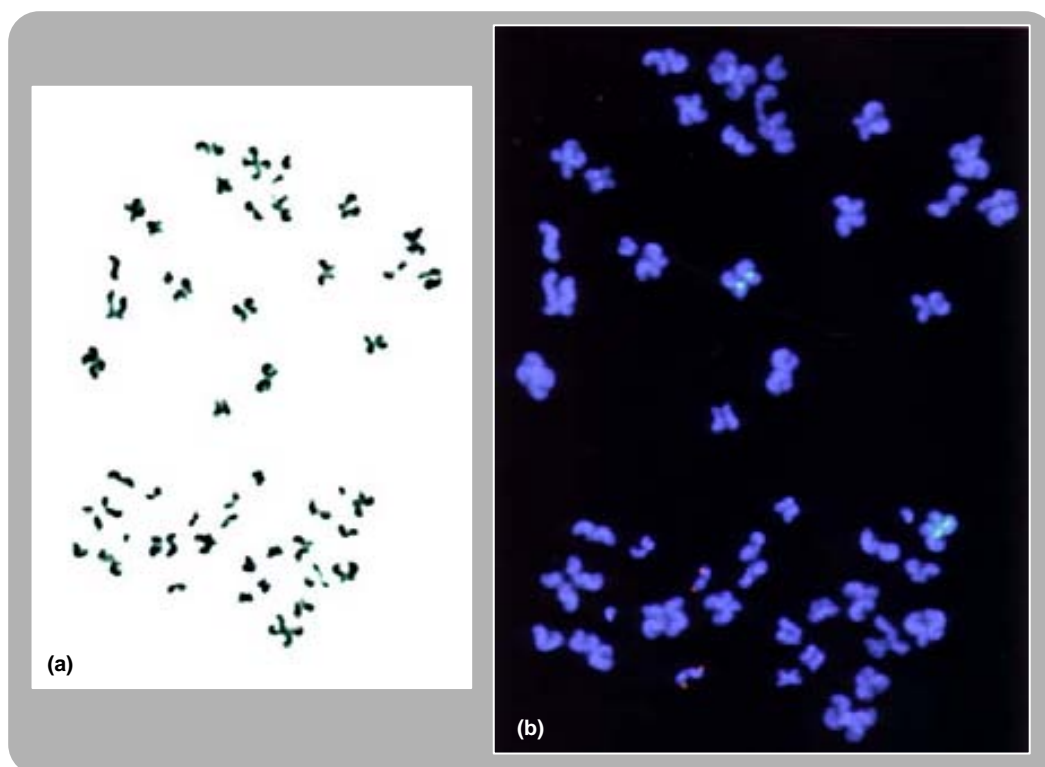


Figura R-12. (a): extensió cromosòmica d'un complement diploide de metafase II humana [microscopi de contrast de fases 400x]. La morfologia cromosòmica d'ambdós complements és encara molt similar. (b): la mateixa extensió cromosòmica hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) i una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd) [microscopi de fluorescència 1000x]



Figura R-13. (a): extensió cromosòmica de dos complements cromosòmics humans de metafase II procedents d'una cèl·lula amb citocinesi anòmala [microscopi de contrast de fases 400x]. La morfologia cromosòmica d'ambdós complements ja és molt diferent. (b): la mateixa extensió cromosòmica hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell) [microscopi de fluorescència 1000x]

4.4.1.3 Oòcits humans aparentment no fecundats i immadurs, no posats a MIV

Únicament un 11,0 % (tres de vint-i-set) dels oòcits aparentment immadurs i no fecundats eren euploides [taula R-6]. Respecte els complements aneuploides (89,0 %), en tretze oòcits hem observat una dotació cromosòmica diploide i la morfologia dels cromosomes corresponia a l'estadi MII; en nou oòcits hem observat dues dotacions cromosòmiques haploides i la morfologia dels cromosomes corresponia a l'estadi d'MII; i, finalment, hem observat dos oòcits amb aneuploidia de cromosoma bivalent en estadi de MI (un oòcit nul·lisòmic per al cromosoma bivalent 21 i l'altre oòcit era hiperploide amb dos cromosomes bivalents de més però cap d'ells no corresponia a cap dels cromosomes X i 21 analitzats) [figura R-14].

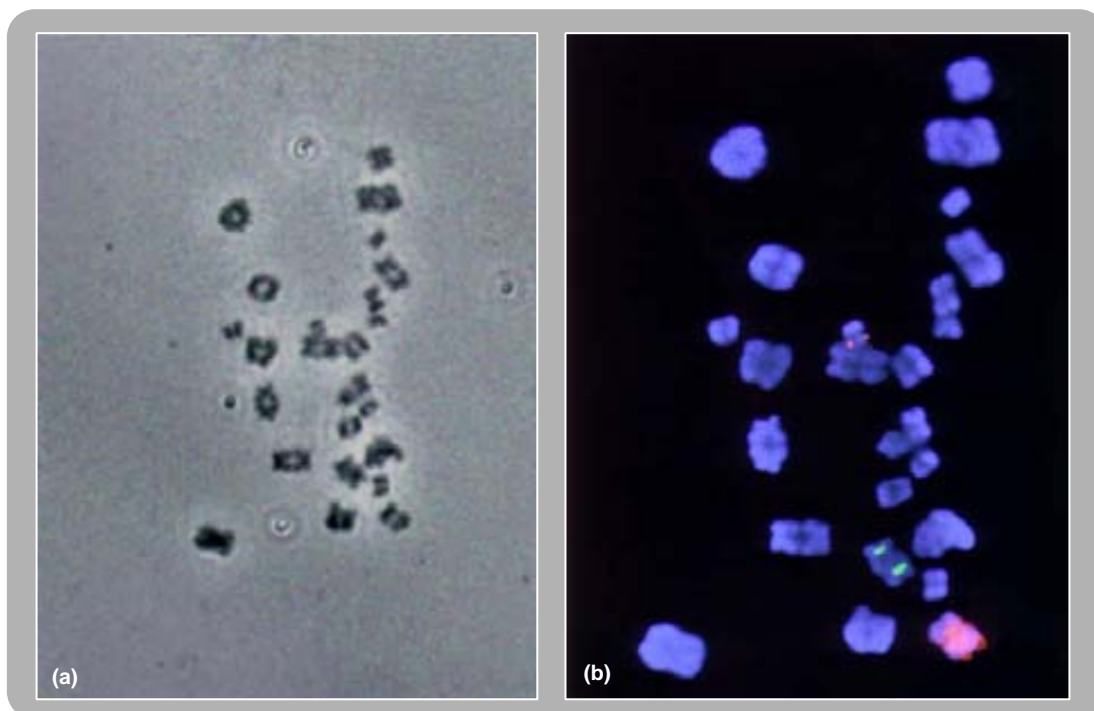


Figura R-14. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide humà de metafase I [microscopi contrast de fases 400x]. (b): la mateixa extensió hibridada amb una sonda locus específica per al cromosoma 21 (vermell), una sonda centromèrica per al cromosoma X (verd) i una sonda de cromosoma sencer per al cromosoma 4 (vermell) [microscopi de fluorescència 1000x]

4.4.1.4 Oòcits humans aparentment no fecundats i immadurs, posats a MIV, però que no havien assolit espontàniament l'estadi d'MII

Els dos (100,0 %) oòcits aparentment immadurs, no fecundats i inicialment en estadi de VG eren aneuploides i presentaven dos complements cromosòmics haploides en estadi d'MII. D'altra banda, únicament un dels cinc (20,0 %) oòcits aparentment en estadi d'MI va presentar un complement cromosòmic en estadi d'MI. La resta, quatre de cinc (80,0 %) eren aneuploides: tres de quatre (75,0 %) presentaven un únic complement cromosòmic diploide amb morfologia de cromosomes en estadi d'MII, i l'oòcit restant presentava dos complements cromosòmics haploides amb morfologia de cromosomes en estadi d'MII [taula R-6].

4.4.2 Zigots humans anòmals descartats de programes de FIV (grup ii)

S'han processat setanta-vuit zigots humans anòmals descartats de programes de FIV postinseminació amb FIV convencional [taula M-2] i s'han fixat adequadament quaranta-nou (62,8 %) de les cèl·lules [taula R-7], corresponents a:

a) Vint zigots amb més de dos pronuclis (> 2PN) descartats de cicles de FIV en el moment de l'observació morfològica de la fecundació, setze-divuit hores després de la inseminació convencional. En concret, s'han fixat disset zigots amb tres pronuclis (3PN), dos zigots amb quatre pronuclis (4PN) i un zigot amb cinc pronuclis (5PN).

b) Divuit zigots amb un sòl pronucli (1PN) descartats de cicles de FIV en el moment de l'observació morfològica de la fecundació, setze-divuit hores després de la inseminació convencional.

c) I finalment, onze zigots amb dos pronuclis (2PN aturats) que no havien dividit 24 hores després de l'observació morfològica de la fecundació.

Taula R-7. Classificació dels zigots fixats (grup ii) descartats de programes de FIV.

Tipus de zigot	Cèl·lules fixades
> 2PN	20
1PN	18
2PN	11
	49 [taula M-2]

FIV (fecundació in vitro), PN (pronucli).

Taula R-8. Ploïdia dels zigots fixats descartats de programes de FIV.

Tipus de zigot	Cèl·lules fixades	Cèl·lules diagnosticades (%)	Tipus de ploïdia (%)				
			Haploïdia	Diploïdia	Triplòidia	Tetraploïdia	Pentaploïdia
> 2PN							
3PN	17	14 (100,0)	–	–	14 (100,0)	–	–
4PN	2	2 (100,0)	–	–	–	2 (100,0)	–
5PN	1	1(100,0)	–	–	–	–	1(100,0)
	20	17 (85,0)	–	–	14 (82,3)	2 (11,7)	1 (5,8)
1PN	18	18 (100,0)	2 (11,1)	16 (88,9)	–	–	–
2PN aturats	11	11 (100,0)	–	11 (100,0)	–	–	–
	49 [taula R-5]	46 (93,8)	2	27	14	2	1

FIV (fecundació in vitro), PN (pronucli).

La *ploïdia* d'aquests zigots s'ha determinat aplicant la FISH amb sondes d'ADN centromèric per als cromosomes X, Y i 18. S'ha establert la ploïdia en quaranta-sis dels quaranta-nou (93,8 %) zigots [taula R-8]:

a) En disset de vint (85,0 %) zigots > 2PN: catorze zigots 3PN, dos zigots 4PN i un zigot 5PN.

b) En divuit de divuit (100,0 %) zigots 1PN.

c) En onze d'onze (100,0 %) zigots 2PN.

Els resultats citogenètics dels quaranta-sis zigots diagnosticats estan inclosos a la taula R-9:

Taula R-9. Resultats citogenètics dels zigots humans diagnosticats (grup ii) descartats de programes de FIV.

Tipus de zigot	Complement (freqüència)	ADN-CEN		Zigot aturat	
		No replicat	Replicat		
		Cr X, Y, X-Y i 18	Cr X i/o 18		
3PN	X18; Y18; Y18	1 (7,1)	1	–	Abans de FS
	XY18; XY18; XY18	1 (7,1)	1	–	Abans de FS
	X18; X18; X18	7 (50,0)	7	–	Abans de FS
	XX1818; XX1818; XX1818	1 (7,1)	–	1	Després de FS
	X18; X18; Y18	4 (28,7)	4	–	Abans de FS
		14	13	1	
4PN	X18; X18; X18; X18	1 (50,0)	1	–	Abans de FS
	X18; X18; Y18; Y18	1 (50,0)	1	–	Abans de FS
		2	2	–	
5PN	X18; X18; X18; X18; Y18	1	1	–	Abans de FS
		1	1	–	
1PN	X18	2 (11,0)	–	–	–
	XX1818	10 ^a (55,6)	–	–	Abans de FS
	XY1818	4 (22,2)	4	–	Abans de FS
	XX18181818	1 (5,6)	–	1	Abans de FS
	XXY1818	1 (5,6)	1	–	FS primerenca
		18	5	1	
2PN	X18; X18	4 ^b (36,4)	4	–	Abans de FS
	XX1818; XX1818	4 (36,4)	–	4	Després de FS
	XX1818; Y1818	1 (9,1)	–	1	FS primerenca PN masculí
	XX1818; XY1818	1 (9,1)	–	1	FS primerenca PN masculí
	XY18; Y18	1 (9,1)	1	–	Abans de FS
		11	5	6	
		46	26	8	

FIV (fecundació in vitro), ADN-CEN (ADN centromèric), Cr (cromosoma), FS (1a fase S mitòtica), PN (pronúci).

^a una primera metafase mitòtica i una primera anafase mitòtica.

^b una primera anafase mitòtica.

4.4.2.1 Zigots humans > 2PN

Com hem mencionat anteriorment, els zigots anòmals s'han analitzat amb sondes d'ADN centromèric per als cromosomes X, Y i 18.

Les marques molt juntes, a una distància menor al diàmetre d'un senyal, s'han considerat equivalents a un cromosoma replicat mentre que les marques separades, a una distància superior al diàmetre d'un senyal, s'han considerat corresponents a dos cromosomes diferents.

Segons el nombre de senyals per a centròmer dels cromosomes analitzats, es pot inferir l'estadi del *cicle cel·lular* en el qual estava el zigot en el moment de ser fixat, és a dir, abans o després de la 1a fase S mitòtica [figura I-8] [taula R-9]:

— Els zigots estan aturats abans de la 1a fase S, és a dir, *abans* que hi hagi hagut la *síntesi d'ADN o replicació de la cromatina*, quan el cromosoma o cromosomes analitzat/s presenta/en només una marca i, per tant, hi ha un sol centròmer.

— Els zigots estan aturats després de la 1a fase S, és a dir, *després* que hi hagi tingut la replicació, quan el cromosoma o cromosomes analitzat/s presenta/en dues marques per cada centròmer i la distància entre les marques d'un mateix cromosoma és inferior al diàmetre d'una marca de centròmer, de manera que no permet pensar en l'existència de dos cromosomes independents.

4.4.2.1.1 Zigots humans 3PN

Els catorze zigots 3PN diagnosticats eren triploides [taula R-8] i sis d'ells mostraven almenys un cromosoma Y: un zigot X18 ; Y18 ; Y18, un zigot XY18 ; XY18 ; XY18 i quatre zigots X18 ; X18 ; Y18 (4) [taula R-9].

Un total de tretze dels catorze (92,8 %) zigots 3PN estaven aturats abans de la 1a fase S del cicle cel·lular. L'altre zigot 3PN estava aturat després de la 1a fase S mitòtica [taula R-9].

Tres de catorze (21,4 %) zigots 3PN, a més de tres pronuclis, contenien un espermatozoide que mostrava el seu pronucli amb una *condensació cromosòmica prematura* (sperm premature chromosome condensation, SPCC) que no va mostrar senyals de FISH.

4.4.2.1.2 Zigots humans 4PN

Els dos zigots 4PN eren tetraploides [taula R-8], un mostrava quatre cromosomes X, i l'altre mostrava dos cromosomes Y i dos X. Els dos zigots estaven aturats abans de la 1a fase S en el moment de ser fixats [taula R-9].

4.4.2.1.3 Zigots humans 5PN

L'únic zigot 5PN era pentaploide [taula R-8] amb quatre cromosomes X i un cromosoma Y. Aquest zigot estava aturat abans de la 1a fase S en el moment de ser fixat [taula R-9].

4.4.2.2 **Zigots humans 1PN**

Els divuit (100,0 %) zigots 1PN es van diagnosticar [taula R-8 i R-9].

Dos dels divuit (11,1 %) zigots van mostrar un nucli X18, ambdós presentaven una marca única per cada cromosoma X i, per tant, en el moment de ser fixats estaven aturats abans de la 1a fase S del cicle

cel·lular. Ambdues marques aparellades correspondrien a un cromosoma de cada pronucli.

Els restants zigots 1PN, setze de divuit (88,9 %) eren zigots diploides: deu cèl·lules (62,5 %) mostraven un complement XX1818 i, d'acord amb el nombre de senyals per l'ADN centromèric dels cromosomes 18 i X, estarien aturats abans de la 1a fase S del cicle cel·lular ja que es visualitzaven dos senyals separats corresponents a cromosomes diferents, un de cada pronucli; quatre cèl·lules (25,0 %) mostraven un complement XY1818, i segons el nombre de senyals per l'ADN centromèric dels cromosomes 18, X i Y, estarien aturats abans de la 1a fase S del cicle cel·lular; una cèl·lula (6,2 %) mostrava un complement XX18181818 i segons el nombre de senyals per l'ADN centromèric dels cromosomes analitzats 18 i X, el centròmer 18 estaria replicat; no obstant això, el centròmer del cromosoma X no hauria replicat encara. Aquest zigot estaria encara en la 1a fase S ja que no tots els cromosomes haurien replicat encara. Finalment, una altra cèl·lula (6,2 %) mostrava un complement XXY1818.

A més, catorze de setze (87,5 %) zigots 1PN diploides mostraven el material cromosòmic en una formació de nucli interfàsic mentre que dos dels zigots 1PN presentaven un complement cromosòmic condensat, en un d'ells aturat a l'estadi de metafase mitòtica, i en l'altre aturat en estadi d'anafase mitòtica.

També s'ha observat que dos dels setze (12,5 %) zigots 1PN, a més a més, contenen un espermatozoide amb SPCC que no va mostrar senyals de FISH.

4.4.2.3 Zigots humans 2PN aturats

Un total d'onze zigots amb 2PN i dos CP en el moment de l'observació morfològica de la fecundació, no van dividir i van restar aturats en estadi de 2PN [taules R-8 i R-9].

Quatre dels onze (36,4 %) 2PN aturats mostraven dos nuclis haploides per als cromosomes estudiats: X i 18, compatibles amb zigots diploides i, d'acord amb el nombre de senyals per l'ADN centromèric d'ambdós cromosomes, cap d'ells no havia replicat i, per tant, estaven aturats abans de la 1a fase S del cicle cel·lular.

Quatre d'onze (36,4 %) 2PN aturats, mostraven dos nuclis haploides XX1818, i d'acord amb el nombre de senyals per l'ADN centromèric dels cromosomes 18 i X, ambdós cromosomes haurien replicat i aquests zigots estarien aturats després de la 1a fase S del cicle cel·lular. Un d'onze (9,1 %) 2PN aturats, mostraven dos nuclis haploides, un presentava un cromosoma Y i es podia distingir el PN femení del masculí. D'acord amb el nombre de senyals per l'ADN centromèric dels cromosomes 18, X i Y, es tractava d'un zigot XX1818;Y1818 i va ser considerat un zigot diploide aturat a la 1a fase S primerenca. El cromosoma 18 d'ambdós nuclis i el cromosoma X del PN femení estaven replicats mentre que el

cromosoma Y del PN masculí no ho estava.

Un d'onze (9,1 %) 2PN aturats, mostrava dos nuclis haploides, un presentava un cromosoma Y i es podia distingir el PN femení del masculí. D'acord amb el nombre de senyals per l'ADN centromèric dels cromosomes 18, X i Y, es tractava d'un zigot XX1818; XY1818. El cromosoma 18 d'ambdós pronuclis i el cromosoma X del PN femení estaven replicats mentre que el PN masculí presentava un cromosoma X i un cromosoma Y ambdós no replicats. Va ser considerat un zigot diploide aturat a la 1a fase S primerenca del cicle cel·lular.

I, finalment, un d'onze (9,1 %) 2PN aturats mostrava dos nuclis haploides. D'acord amb el nombre de senyals per l'ADN centromèric per als cromosomes 18, X i Y, es tractava d'un complement XY18;Y18. Cap cromosoma no hauria replicat encara i, per tant, el zigot estaria aturat en un estadi previ a la 1a fase S del cicle cel·lular.

4.5 Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi d'1CP (DGP-1CP) en dones portadores de translocacions recíproques o robertsonianes

S'ha realitzat el *diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi d'1CP* (DGP-1CP) a nou dones portadores de reorganitzacions cromosòmiques: cinc dones portadores translocacions robertsonianes (sis cicles) i quatre dones portadores de translocacions recíproques (quatre cicles) [taula M-3].

Aquests estudis s'han fet en col·laboració amb tres centres de FIV: Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus de Barcelona (Dx), Servicio de Medicina de la Reproducción de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (FJD), i Servei de Medicina de la Reproducció de l'Hospital Clínic de Barcelona (HPC).

Les sondes emprades en cada cas es determinen tenint en compte els punts de trencament dels cromosomes implicats en les diferents reorganitzacions cromosòmiques. Les sondes s'han assajat prèviament en limfòcits de sang perifèrica, de la pacient en qüestió, per confirmar el cariotip i comprovar que de manera pràctica es podien diferenciar els cromosomes normals dels cromosomes derivatius [taula M-5]. El cariotip dels homes, en tots els casos, era 46,XY.

4.5.1 DGP-1CP a dones portadores de translocacions robertsonianes

A continuació es detallen els resultats obtinguts en el DGP-1CP a cinc dones portadores de translocacions robertsonianes (pacients m, n, p, q i r) en un total de sis cicles [taules R-10, R-11a i R-11b].

Taula R-10. Resultats de DGP-1CP obtinguts en parelles amb la dona portadora d'una translocació robertsoniana i home amb cariotip normal.

Casos clínics	Cariotip de la dona	Edat	CCO		VG		Oòcits		Mètode de biòpsia		Biòpsia vs ICSI		ICSI total		1CP (%)		Oòcits (%)				
			CCO	CCO	VG	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI	MI
Cas Dx-1 (m)	45,XX,der(14,21)(q10,q10)	32	15	0	5	5	10	10	Físic	Abans	15	13 (86,7)	11 (84,6)	11 (100,0)	7 (83,6)	0,0	3 (42,8)	4 (57,2)			
Cas Dx-3 (n)	45,XX,der(13,14)(q10,q10)	37	4	0	1	3	3	3	Físic	Abans	4	4 (100,0)	4 (100,0)	2 (50,0)	2 (100,0)	1 (50,0)	0,0	1 (50,0)			
Cas Dx-4 (p)	45,XX,der(13,14)(q10,q10)	37	15	1	0	14	14	14	Físic	Després	14	12 (85,7)	10 (83,3)	8 (80,0)	8 (100,0)	2 (25,0)	1 (12,5)	5 (62,5)			
Cas FJD-1 (a)	45,XX,der(13,14)(q10,q10)	36	2	0	0	2	2	2	Mecànic	Després	2	2 (100,0)	2 (100,0)	1 (50,0)	1 (100,0)	1 (50,0)	0,0	0,0			
Cas FJD-1 (a ₂)	45,XX,der(13,14)(q10,q10)	36	2	0	0	2	2	2	Mecànic	Després	2	2 (100,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	1 (100,0)	0,0	0,0	1 (50,0)			
Cas Dx-5 (r)	45,XX,der(13,14)(q10,q10)	35	26	14	1	11	11	11	Físic	Després	12	11 (91,7)	10 (80,9)	8 (80,0)	7 (87,5)	0,0	3 (42,8)	4 (57,2)			
			64	15	7	7	42	42			49	44 (89,8)	39 (88,6)	32 (82,0)	26 (81,2)	4 (15,4)	7 (28,9)	15 (57,7)			

DGP (diagnòstic genètic preimplantacional), 1CP (primer corpuscle polar), CCO (complex còmul oòfor), VG (vesícula germinal), MI (metafase I), MI (metafase II), MI (metafase III), MIW (cultiu in vitro per madurar)

*1CP fragmentats n'estan esclous

Taula R-11a. Detall dels resultats obtinguts dels casos clínics de translocacions robertsonianes realitzats.

Casos clínics	1CP	Morfologia cromosòmica preservada	Mètode de biòpsia	Biòpsia vs ICSI	Diagnòstic			Resultat
					1CP	BL	Oòcit o embrió	
Cas Dx-1(m): 45,XX,der(14;21)(q10;q10)								
1CP-1	Fragmentat	–	–	–	–	–	–	2PN sortida artefactual ZP
1CP-2	Fixat	No	Físic	Abans	ND	–	SR	Fecundat
1CP-3	Fixat	No	Físic	Abans	21	–	14 der14;21	3 PN
1CP-4	Pèrdua de biòpsia	–	Físic	Abans	–	–	–	Degenerat
1CP-5	Fixat	No	Físic	Abans	21 der14;21	–	14	Fecundat
1CP-6	Fragmentat	–	–	–	–	–	–	3 PN
1CP-7	Fixat	No	Físic	Abans	14 21 der14;21	–	0	3 PN
1CP-8	Fixat	No	Físic	Abans	14 21	–	der14;21	3 PN
1CP-9	Fixat	No	Físic	Abans	ND	–	SR	Pèrdua d'oòcit a la biòpsia
1CP-10	Fixat	No	Físic	Abans	21 der14;21	–	14	2PN sortida artefactual ZP
1CP-11	Fixat	No	Físic	Abans	21 14	–	der14;21	1 PN
1CP-12	Pèrdua de biòpsia	–	Físic	Abans	–	–	–	Fecundat
1CP-13	Fixat	No	Físic	Abans	ND	–	SR	Fecundat
1CP-14	Fixat	No	Físic	Abans	21 14cts	–	der14;21	Fecundat i transferit [figura R-15]
1CP-15	Fixat	No	Físic	Abans	ND	–	SR	Fecundat
Cas Dx-3 (n): 45,XX,der(13;14)(q10;q10)								
1CP-1	Fixat	No	Físic	–	der13;14	–	13 14	Pèrdua d'oòcit a la biòpsia
1CP-2	Pèrdua de fixació	–	Físic	Abans	–	–	SR	Fecundat ^a
1CP-3	Fixat	Sí	Físic	Abans	13 der13;14	–	Deseq	Fecundat
1CP-4	Pèrdua de fixació	–	Físic	Abans	–	–	SR	No fecundat
Cas Dx-4 (p): 45,XX,der(13;14)(q10;q10)								
1CP-1	Fixat	Sí	Físic	Després	13	–	14 der13;14	Fecundat
1CP-2, BL-2	Pèrdua de fixació	–	Físic	Després	–	14 der13;14	14 der13;14	Fecundat
1CP-3, BL-3	Pèrdua de biòpsia	–	Físic	Després	–	14 der13;14	14 der13;14	Fecundat
1CP-4	Fixat	Sí	Físic	Després	13 der13;14	–	14	Fecundat
1CP-5	Fixat	Sí	Físic	Després	14 der13;14	–	13	Degenerat
1CP-6, BL-6	Fragmentat	–	Físic	Després	–	Alternant	Alternant	Fecundat i transferit
1CP-7, BL-7	Pèrdua de fixació	–	Físic	Després	–	ND	SR	Fecundat
1CP-8	Fixat	Sí	Físic	Després	der13;14	–	13 14	Fecundat
1CP-9	Fixat	Sí	Físic	Després	der13;14	–	13 14	Degenerat
1CP-10	Fixat	Sí	Físic	Després	14	–	13 der13;14	3 PN
CP-11, BL-1	Fragmentat	–	Físic	Després	–	Deseq	Deseq	Fecundat
1CP-12	Fixat	Sí	Físic	Després	13 der13;14	–	14	Degenerat
CP-13, BL-1	Pèrdua de biòpsia	–	Físic	Després	–	Deseq	14 der13;14	Fecundat
1CP-14	Fixat	Sí	Físic	Després	13 14	–	der13;14	Fecundat i transferit [figura R-16]

1CP (primer corpuscle polar), BL (blastòmer), ICSI (injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide), ND (no diagnosticat), der (derivatiu), Deseq (desequilibrat).

SR (sense resultat), cts (cromàtides separades), ZP (zona pel·lúcida).

^a transferit en D+3 per decisió de la pròpia parella.

Taula R-11b. Detall dels resultats obtinguts dels casos clínics de translocacions robertsonianes realitzats.

Casos clínics	1CP	Morfologia cromosòmica preservada	Mètode de biòpsia	Biòpsia vs ICSI	Diagnòstic			Resultat
					1CP	BL	Oòcit o embrió	
Cas FJD-1 (q) cycle 1: 45,XX,der(13;14)(q10;q10)								
1CP-1, BL-1	Fixat	Si	Mecànic	Després	ND	13 der13;14	13 der13;14	Fecundat
1CP-2	Pèrdua de fixació	-	Mecànic	Després	-	-	13 der13;14	No fecundat ^a
Cas FJD-1 (q) cycle 2: 45,XX,der(13;14)(q10;q10)								
1CP-1	Fixat	Si	Mecànic	Després	der13;14	-	13 14	Fecundat i transferit
1CP-2	Fixat	Si	Mecànic	Després	0	-	13 14 der13;14	Fecundat
Cas Dx-5 (r): 45,XX,der(13;14)(q10;q10)								
1CP-1	Fixat	Si	Físic	Després	14 der13/14	-	13	Fecundat
1CP-2, BL-2	Pèrdua de fixació	-	Físic	Després	-	Normal o Eq	-	Fecundat i no evolutiu
1CP-3, BL-3	Pèrdua de fixació	-	Físic	Després	-	ND	ND	Fecundat i fixat
1CP-4	Fixat	Si	Físic	Després	13 14	-	der13/14	Fecundat i transferit
1CP-5	Fixat	Si	Físic	Després	13 14 der13/14	-	0	Fecundat i fixat
1CP-6	Fixat	Si	Físic	Després	13 14	-	der13/14	Fecundat i transferit [figura R-17]
1CP-7	Fixat	Si	Físic	Després	14 der13/14	-	13	Fecundat [figura R-18]
1CP-8, BL-8	Fragmentat	-	Físic	Després	-	Normal o Eq	-	Fecundat i transferit
1CP-9	Pèrdua de biòpsia	-	Físic	Després	-	-	-	Pèrdua d'oòcit a la biòpsia
CP-10, BL-1	Fixat	Si	Físic	Després	ND	Monosomia 14	14 der13/14	Fecundat
1CP-11	Fixat	Si	Físic	Després	13	-	14 der13/14	No fecundat
1CP-12	Fixat	Si	Físic	Després	13 14	-	der13/14	Fecundat i no evolutiu

1CP (primer corpuscle polar), BL (blastòmer), ICSI (injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide), ND (no diagnosticat), SR (sense resultat), Eq (equilibrat).

^a fixat i analitzat per FISH.

4.5.1.1 Cas Dx-1(m): dona amb cariotip 45,XX, der(14;21)(q10;q10)

4.5.1.1.1 Resultats de l'obtenció d'òcits

Després de l'estimulació hormonal, el dia de la punció fol·licular es van recuperar quinze CCO [taules R-10 i R-11a]. Durant el tractament amb hialurodinasa un oòcit es va lissar (oòcit corresponent l'1CP-4). Un cop acabat aquest tractament es van classificar els oòcits: deu oòcits madurs en estadi d'MII i cinc oòcits immadurs en estadi de MI, els quals, al cap d'unes hores van assolir espontàniament l'estadi d'MII en el medi de cultiu (van madurar in vitro) i també es van processar per realitzar l'anàlisi citogenètica del corresponent 1CP [taula R-10].

4.5.1.1.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

Es va fer la biòpsia d'1CP dels oòcits abans de l'ICSI. Els quinze oòcits madurs (deu d'inicialment madurs i cinc d'immadurs que havien madurat espontàniament in vitro) es van anar biopsiant un a un mitjançant l'aïllament de l'1CP per micromanipulació seguint el mètode físic (làser). Seguidament, després de cada biòpsia es va inseminar el corresponent oòcit mitjançant l'ICSI. L'1CP de dos oòcits no es va biopsiar ja que es tractava d'1CP fragmentats (1CP-1 i 1CP-6) [taula-10].

Es van biopsiar amb èxit onze de tretze (84,6 %) oòcits, els dos 1CP restants es van perdre durant el procés de biòpsia (1CP-4 i 1CP-12) [taules R-10 i R-11a]. Es van fixar els onze (100,0 %) 1CP biopsiats. Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5]. Es va diagnosticar el 63,6 % (set d'onze) dels 1CP fixats. El 42,8 % (tres de set) corresponien a oòcits cromosòmicament equilibrats provenint de la segregació cromosòmica 2:1 alternant. Els quatre oòcits restants (57,2 %) eren cromosòmicament desequilibrats: tres provenint d'una cromosòmica 2:1 adjacent, (un oòcit -cr 21 i +cr der14;21; i dos oòcits -cr 21); finalment, un oòcit era nul·lisòmic per als cromosomes implicats en la translocació provenint d'una segregació cromosòmica 3:0 [taules R-10 i R-11a].

4.5.1.1.3 Resultat de la fecundació

El 53,3 % (vuit de quinze) dels oòcits inseminats es van fecundar (2PN) però en dos d'ells el zigot va sortir artefactualment de la zona pel·lúcida. Les cèl·lules restants eren un zigot 1PN, quatre zigots 3PN, un oòcit va degenerar després de l'ICSI i un oòcit que s'havia el lissat el D + 0 en el procés de biòpsia [taula R-11a].

4.5.1.1.4 Transferència embrionària

Finalment, sols es va poder transferir a l'úter matern un embrió derivat d'un oòcit euploide equilibrat amb un cromosoma der4;21. El corresponent 1CP presentava un cromosoma 21 i les dues cromàtides del cromosoma 14 separades. La pacient no va quedar gestant.

4.5.1.2 Cas Dx-3(n): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)

4.5.1.2.1 Resultats de l'obtenció d'òcits

Després de l'estimulació hormonal, el dia de la punció fol·licular es van recuperar quatre CCO. Un cop acabat el tractament amb hialuronidasa es van classificar els òcits: un òcit immadur en estadi de MI i tres òcits madurs en estadi d'MII. L'òcit en estadi de MI va madurar espontàniament in vitro al cap de poques hores i també es va poder processar per realitzar l'anàlisi citogenètica del corresponent 1CP.

4.5.1.2.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

Es va fer la biòpsia de cada 1CP abans de l'ICSI de cada òcit. Els quatre òcits madurs es van biopsiar un a un mitjançant l'aïllament de l'1CP per micromanipulació seguint el mètode físic (làser) i seguidament inseminant mitjançant l'ICSI [taula R-10]. Es van biopsiar tots els 1CP. Un òcit (1CP-1) es va lisar durant el procés de biòpsia i, per tant, no es va poder inseminar. Es van fixar el 50 % (dos de quatre) dels 1CP biopsiats, els altres dos 1CP es van perdre durant el procés de fixació (1CP2 i 1CP-4). Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es van diagnosticar els dos 1CP fixats. Un dels dos òcits va resultar ser normal i euploide per als cromosomes analitzats, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 alternant que s'hauria donat en la meiosi I, mentre que l'altre era desequilibrat amb una pèrdua del cromosoma 14 i un guany d'un cromosoma derivatiu 13;14, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 adjacent [taula R-10 i R-11a].

4.5.1.2.3 Resultat de la fecundació

Dels tres òcits inseminats després de ser biopsiats, dos òcits es van fecundar correctament, en d'ells l'embrió que va resultar no va sortir artefactualment de la zona pel·lúcida. L'altre òcit no va presentar cap pronucli i, per tant, no va fecundar [taula R-11a].

4.5.1.2.4 Transferència embrionària

Un dels dos òcits fecundats, no es va diagnosticar pel fet que l'1CP es va perdre durant el procés de fixació, mentre que l'altre òcit va ser diagnosticat com a cromosòmicament desequilibrat i finalment, per voluntat expressa de la pròpia parella, es va fer la transferència a l'úter matern de l'embrió procedent de l'òcit no diagnosticat. La pacient no va quedar gestant.

4.5.1.3 Cas Dx-4(p): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)

4.5.1.3.1 Resultats de l'obtenció d'òcits

Després de l'estimulació hormonal de la pacient, el dia de la punció fol·licular es van recuperar quinze CCO. Un cop acabat el tractament amb hialuronidasa es van classificar els òcits: un òcit era immadur en estadi de VG i catorze òcits eren madurs en estadi d'MII. En aquest cas, es va descartar del cicle l'òcit en estadi de VG [taules R-10 i R-11a].

4.5.1.3.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

Es va fer l'ICSI de cada òcit abans de la biòpsia del corresponent 1CP. Així doncs, els catorze òcits madurs, es van inseminar un a un mitjançant ICSI i seguidament es van anar biopsiant mitjançant l'aïllament de l'1CP per micromanipulació seguint el mètode físic (làser). Dos òcits no es van biopsiar ja que els 1CP estaven molt fragmentats (1CP-6 i 1CP-11). D'altra banda, els 1CP de dos dels dotze òcits madurs biopsiats, es van perdre durant el procés de biòpsia (1CP-3 i 1CP-13).

Es van fixar el 80,0 % (vuit de deu) dels 1CP biopsiats. Així, a sis òcits no es va poder fer la diagnosi genètica mitjançant l'1CP i es va fer la biòpsia d'un blastòmer dels embrions. La biòpsia de blastòmer es va portar a terme en D + 3 seguint el mateix mètode que per la biòpsia d'1CP però utilitzant una pipeta de 30 µm en comptes de 15–20 µm. Els vuit 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es van diagnosticar el 100,0 % (vuit de vuit) dels 1CP fixats. El 37,5 % (tres de vuit) dels òcits eren cromosòmicament normals o equilibrats, provenint d'una segregació cromosòmica 2:1 alternant, mentre que el 62,5 % (cinc de vuit) dels òcits eren desequilibrats, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 adjacent: un òcit –cr 13 i +cr der13;14 ; un òcit –cr 14 i + cr der13;14; dos òcits -cr 13; i un òcit –cr 14 [taula R-10 i R-11a].

En D + 3 es va biopsiar un blastòmer, dels sis embrions per als quals no es tenia diagnòstic mitjançant l'1CP. Es va diagnosticar el 83,3 % (cinc de sis) dels blastòmers fixats. Només el 20,0 % (un de cinc) dels embrions diagnosticats mitjançant el blastòmer van resultar ser cromosòmicament normals o equilibrats, mentre que el 80,0 % (quatre de cinc) restant eren desequilibrats. Es tractava de tres embrions amb –cr 13 i +cr der13;14 i dos embrions amb altres desequilibris cromosòmics.

Globalment es van diagnosticar 92,8 % (tretze de catorze) òcits madurs o embrions, vuit mitjançant l'1CP i cinc mitjançant el blastòmer. El 30,8 % (quatre de tretze) dels òcits o embrions serien cromosòmicament normals o equilibrats provenint d'una segregació cromosòmica alternant, mentre que el 69,2 % (nou de tretze) restant corresponien a una segregació cromosòmica adjacent. La segregació cromosòmica preferent seria l'adjacent [taula R-11a].

4.5.1.3.3 Resultat de la fecundació

El 71,4 % (deu de catorze) dels oòcits inseminats van fecundar correctament. Del 28,6 % (quatre de catorze) restant hi havia un zigot 3PN i tres oòcits que havien degenerat en cultiu. Cap cèl·lula no havia sortit artefactualment de la zona [taula R-11a].

4.5.1.3.4 Transferència embrionària

Finalment, es van transferir a l'úter matern dos embrions provenint de dos oòcits cromosòmicament normals o equilibrats, un embrió procedent d'un oòcit diagnosticat mitjançant l'1CP i l'altre embrió diagnosticat mitjançant el blastòmer ja que l'1CP no es va biopsiar ja que estava molt fragmentat. La pacient va quedar gestant però es va produir un avortament a la setena setmana de gestació.

4.5.1.4 Cas FJD-1(q): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)

4.5.1.4.1 Resultats de l'obtenció d'oòcits

A aquesta pacient se li van realitzar dos cicles de DGP-1CP en un interval de pocs mesos. Després de l'estimulació hormonal de la pacient, en tots dos cicles, el dia de la punció fol·licular es van recuperar un total de quatre CCO. Un cop acabat el tractament amb hialuronidasa es van classificar els oòcits: quatre oòcits madurs en estadi d'MII.

4.5.1.4.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

En aquests dos cicles es va fer l'ICSI de cada oòcit madur abans de la biòpsia del corresponent 1CP i a continuació la biòpsia mitjançant l'aïllament de l'1CP per micromanipulació seguint el mètode mecànic (PZD). Es van biopsiar amb èxit el 100,0 % (quatre de quatre) dels 1CP i es van fixar amb èxit el 75,0 % (tres de quatre) dels 1CP biopsiats. Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es van diagnosticar dos dels tres 1CP fixats. Un oòcit va resultar ser cromosòmicament equilibrat, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 alternant. L'altre presentava un cromosoma 13, un cromosoma 14 i un de derivatiu 13;14, ja que l'1CP va resultar ser nul·lisòmic, com a resultat d'una segregació cromosòmica 3:0. Es va fer l'anàlisi d'un blastòmer de l'embrió provenint de l'oòcit amb l'1CP no diagnosticat (1CP-1). L'anàlisi va mostrar que el embrió era desequilibrat, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 adjacent en l'oòcit [taula R-10 i R-11b].

4.5.1.4.3 Resultats de la fecundació

El 75,0 % (tres dels quatre) dels oòcits inseminats es van fecundar correctament mentre que un oòcit no presentava cap PN i, per tant, es tractava d'un oòcit no fecundat. Aquest oòcit no fecundat va ser fixat per esbrinar-ne la constitució cromosòmica i va resultar ser un oòcit desequilibrat, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 adjacent [taula R-11b].

4.5.1.4.4 Transferència embrionària

Així doncs, només un dels quatre òcits era cromosòmicament normal, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 alternant, i els altres tres òcits serien desequilibrats i, per tant, provenint d'una segregació cromosòmica 2:1 adjacent [taula R-10]. Finalment, es va transferir a l'úter matern l'embrió provenint de l'òcit cromosòmicament normal però la pacient no va quedar gestant.

4.5.1.5 **Cas Dx-5 (r): dona amb cariotip 45,XX, der(13;14)(q10;q10)**

4.5.1.5.1 Resultats de l'obtenció d'òcits

Després de l'estimulació hormonal de la pacient, el dia de la punció fol·licular es van recuperar vint-i-sis CCO. Un cop acabat el tractament amb hialuronidasa es van classificar els òcits: quinze òcits eren immadurs (atorze VGs i una MI, que va madurar espontàniament en cultiu) i onze òcits eren madurs en estadi d'MII. En aquest cas es van descartar del cicle els òcits en estadi de VG [taules R-10 i R-11b].

4.5.1.5.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

Així doncs, els dotze òcits madurs (onze MII i una MII MIV), es van inseminar un a un mitjançant l'ICSI i seguidament es van biopsiar un a un mitjançant l'aïllament de l'1CP per micromanipulació seguint el mètode físic (làser). L'1CP d'un dels òcits no es va biopsiar ja que estava molt fragmentat (1CP-8) [taula R-10]. D'altra banda, l'1CP d'un dels onze òcits madurs biopsiats, es va perdre durant el procés de biòpsia (1CP-9).

Es van fixar el 80,0 % (vuit de deu) dels 1CP biopsiats. Els 1CP de dos dels òcits biopsiats es van perdre durant el procés de fixació. Així, a quatre dels dotze òcits no es va poder fer el diagnòstic mitjançant l'1CP i es va fer la biòpsia de blastòmer dels embrions. Els vuit 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es van diagnosticar el 87,5 % (set de vuit) dels 1CP fixats. Cap dels set òcits no era cromosòmicament normal, tres (42,8 %) òcits eren equilibrats, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 alternant, mentre que el 57,1 % (quatre de set) dels òcits eren desequilibrats com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:1 adjacent: dos òcits -cr 14 i dos òcits -cr 13 i +cr der13;14 [taula R-10 i R-11b].

En D + 3 es va biopsiar un blastòmer de cadascun dels quatre embrions per als quals no es tenia diagnòstic mitjançant l'1CP (1CP-2, 1CP-3, 1CP-8 i 1CP-10). Es va diagnosticar el 75,0 % (tres de quatre) dels blastòmers fixats. El 66,6 % (dos de tres) dels embrions diagnosticats mitjançant el blastòmer va resultar ser cromosòmicament normal o equilibrat, mentre que el 33,3 % (un de tres) restant era desequilibrat, amb una pèrdua del cromosoma 13.

Globalment es va diagnosticar el 83,3 % (deu de dotze) dels òcits o embrions, set mitjançant l'1CP i tres mitjançant el blastòmer. El 50,0 % (cinc de deu) dels òcits o embrions serien cromosòmicament normals o equilibrats com a resultat d'una segregació cromosòmica alternant, mentre que el 50,0 % restant corresponien a una segregació cromosòmica adjacent. A part dels indicats anteriorment, com a resultat del diagnòstic dels quatre blastòmers embrions biopsiats, també hi hauria tres embrions normals o equilibrats per als cromosomes estudiats i un embrió desequilibrat, com a resultat d'una segregació cromosòmica adjacent. La segregació cromosòmica preferent seria l'adjacent [taula R-11b].

4.5.1.5.3 Resultat de la fecundació

El 83,3 % (deu de dotze) dels òcits inseminats van fecundar correctament. Un òcit no va fecundar i un altre es va lissar durant el procés de biòpsia. Cap cèl·lula no havia sortit artefactualment de la ZP [taula R-11b].

4.5.1.5.4 Transferència embrionària

Finalment, es van transferir a l'úter matern tres embrions provenint de dos òcits cromosòmicament normals o equilibrats, dos embrions procedents de dos òcits diagnosticats mitjançant l'1CP i l'altre embrió diagnosticat mitjançant el blastòmer ja que l'1CP es va perdre durant el procés de fixació. La pacient no va quedar gestant.

4.5.2 **DGP-1CP a dones portadores de translocacions recíproques**

A continuació es detallen els resultats obtinguts en el DGP-1CP a quatre dones portadores de translocacions recíproques (pacients H, I, J i K) en un total de quatre cicles [taula R-12 i R-13].

Taula B.12. Resultats de DGP-1CP obtinguts en parelles amb la dona portadora d'una translocació recíproca (Thome amb cariotip normal)

Casos clínics	Cariotip de la dona	Edat	CCO	Òcits			Mètode de biòpsia	Biòpsia vs ICSI	ICSI MI total	Biòpsies *		1CP (%)		Òcits (%)			
				VG	MI	MI/MIV				Obtinguts	Ficats	Diagnòstics	Normals	Equilibrats	Desequilibrats		
Cas Di-2 (V)	46,XX,t(4;12)(q22;q23)	36	17 ¹	0	2	2	14	Ficac	Abans	8 ²	15	13 (86,7)	10 (76,9)	8 (80,0)	1 (12,5)	0,0	7 (87,5)
Cas HCP-1 (I)	46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	35	10	0	0	0	10	Químic	Després	10	9	8 (88,9)	6 (75,0)	4 (88,9)	1 (25,0)	0,0	3 (75,0)
Cas HCP-2 (J)	46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)	34	5	0	0	0	5	Mecànic	Després	5	5	4 (80,0)	4 (100,0)	3 (75,0)	0,0	0,0	3 (100,0)
Cas HCP-3 (K)	46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)	33	12	1	0	0	11	Mecànic	Després	11	11	11 (100,0)	9 (81,8)	9 (100,0)	0,0	1 (11,1)	8 (88,9)
			44	0	2	2	40			34	40	38 (90,0)	29 (80,0)	24 (82,7)	2 (8,3)	1 (4,2)	21 (87,5)

DGP (diagnòstic genètic preimplantacional), 1CP (primer corpuscle polar), CCC (complet cúmul oòfor), VCG (vesícula germinal), MI (metàfase I), MI (metàfase II), MI/MI (metàfase I), MI/MI (metàfase II), MI/MI (metàfase I), MI/MI (metàfase II), MI/MI (metàfase I), MI/MI (metàfase II), MI/MI (metàfase I), MI/MI (metàfase II)

* 1CP fragmentats n'estan exclòs.

¹ un CCO es va lliar durant el tractament amb hialuronidasa.

² vuit òcits no inactivats i fetsa directament (dos òcits fetsa matèria durant el procés de biòpsia, un òcit amb 1CP fragmentat, dos òcits amb 1CP perdut durant el procés de biòpsia i tres òcits amb 1CP perdut durant el procés de fissió).

Taula R-13. Detall dels resultats obtinguts dels casos clínics de translocacions recíproques realitzats.

Casos clínics	1CP	Morfologia cromosòmica preservada	Mètode de biòpsia	Biòpsia vs ICSI	Diagnòstic			Resultat
					1CP	BL	Oòcit o embrió	
Cas Dx-2 (H): 46,XX,t(4;12)(q22;q23)								
1CP-1	Pèrdua de biòpsia	-	Físic	-	-	-	Pèrdua de fixació	No inseminat ^a
1CP-2	Fixat	No	Físic	Abans	der12	-	4 der4 12	Degenerat
1CP-3	Pèrdua de biòpsia	-	Físic	-	-	-	Pèrdua de fixació	No inseminat ^a
1CP-4	Fixat	Sí	Físic	Abans	der4 der12	-	4 12	2PN sortida artefactual ZP
1CP-5	Fragmentat	-	Físic	-	-	-	12 der12	No inseminat ^a
1CP-6	Fixat	No	Físic	Abans	0	-	4 der4 12 der12	No fecundat
1CP-7	Fixat	No	Físic	Abans	0	-	4 der4 12 der12	Fecundat
1CP-8	Fixat	No	Físic	Abans	ND	-	SR	No fecundat i sortida artefactual ZP
1CP-9	Fixat	Sí	Físic	Abans	4 der4 der12	-	12	Fecundat
1CP-10	Pèrdua de fixació	-	Físic	-	-	-	12 der12	No inseminat ^a
1CP-11	Pèrdua de fixació	-	Físic	-	-	-	12 der12	No inseminat ^a
1CP-12	Fixat	No	Físic	-	4 12 der4	-	der12	Pèrdua biòpsia; No inseminat ^a
1CP-13	Fixat	No	Físic	-	4 der4	-	12 der12	Pèrdua biòpsia; No inseminat ^a
1CP-14	Fixat	No	Físic	Abans	12 der4 der12	-	4	Degenerat
1CP-15	Pèrdua de fixació	-	Físic	-	-	-	SR	No inseminat ^a
1CP-16	Fixat	Sí	Físic	Abans	ND	-	SR	Fecundat
Cas HCP-1 (I): 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)								
1CP-1	Fixat	Sí	Químic	Després	1 18 der18	-	der1	No fecundat ^a
1CP-2	Fixat	Sí	Químic	Després	der1 der18	-	1 18	No fecundat ^a
1CP-3	Pèrdua de fixació	-	Químic	Després	-	-	der1 18	1 PN ^a
1CP-4, BL-4	Fixat	Sí	Químic	Després	ND	ND	ND	Fecundat
1CP-5	Fixat	Sí	Químic	Després	1 der18	-	der1 18	No fecundat ^a
1PB-6, BL-6	Pèrdua de fixació	-	Químic	Després	-	ND	ND	No fecundat ^a
1CP-7	Fragmentat	-	Químic	-	-	-	ND	1 PN ^a
1CP-8	Fixat ^b	No	Químic	Després	ND	-	1 der18	No fecundat ^a
1CP-9	Fixat	Sí	Químic	Després	18 der18	-	1 der 1	3 PN ^a
1CP-10	Pèrdua de biòpsia	-	Químic	Després	-	-	ND	Degenerat ^a
Cas HCP-2 (J): 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23) ^c								
1CP-1	Pèrdua de biòpsia	Sí	Mecànic	Després	ND	-	4 11 der11	3 PN ^a
1CP-2	Fixat	Sí	Mecànic	Després	4 der4	-	11 der11	Fecundat
1CP-3	Fixat	Sí	Mecànic	Després	4 der4 11	-	der11	3 PN
1CP-4	Fixat	Sí	Mecànic	Després	ND	-	4 der4 der11	No fecundat ^a
1CP-5	Fixat	Sí	Mecànic	Després	4 der4 11	-	der11	Fecundat
Cas HCP-3 (K): 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22) ^c								
1CP-1	Fixat	Sí	Mecànic	Després	13	-	8 der8 der13	3 PN
1CP-2	Fixat	Sí	Mecànic	Després	8 der8	-	13 der13	Fecundat
1CP-3	Fixat	Sí	Mecànic	Després	der13	-	8 der8 13	3 PN
1CP-4	Fixat	Sí	Mecànic	Després	8 13 der13	-	der8	Fecundat
1CP-5, BL-5	Pèrdua de fixació	-	Mecànic	Després	-	SR	ND	Fecundat
1PB-6, BL-6	Fixat	Sí	Mecànic	Després	der8 cts 13/der13 ^d	SR	Normal o deseq	Fecundat
1CP-7	Fixat	Sí	Mecànic	Després	8 13/der13 ^d	-	Eq o deseq	3 PN
1CP-8	Fixat	Sí	Mecànic	Després	der8	-	8 13 der13	Fecundat
1CP-9	Fixat	Sí	Mecànic	Després	8 13	-	der8 der13	3 PN
CP-10, BL-1	Pèrdua de fixació	-	Mecànic	Després	-	ND	ND	Fecundat
CP-11, BL-1	Fixat	Sí	Mecànic	Després	8 cs 13/der13 ^d	SR	Eq o deseq	Degenerat

1CP (primer corpuscle polar), ICSI (injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide), ND (no diagnosticat), SR (sense resultat), cts (cromàtides separades), Eq (equilibrat), deseq (desequilibrat), ZP (zona pel·lúcida). ^a fixat i analitzat per FISH, ^b madurat in vitro en D+0, ^c cas no inclòs a l'article 2, ^d cromosoma recombinant amb una cromàtide 13 i una cromàtide der13.

4.5.2.1 Cas Dx-2(H): dona amb cariotip 46,XX,t(4;12)(q22;q23)

4.5.2.1.1 Resultats de l'obtenció d'òcits

Després de l'estimulació hormonal, el dia de la punció fol·licular, es van recuperar disset CCO. Durant el tractament amb hialurodinasa un òcit es va lisar i en finalitzar aquest tractament es van identificar catorze òcits madurs en estadi d'MII i dos òcits immadurs en estadi de MI que van madurar espontàniament al cap d'una hora de ser mantinguts en el medi de cultiu, i també van ser processats per a l'anàlisi citogenètica del corresponent 1CP [taula R-12].

4.5.2.1.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

En aquest cas la inseminació de cada òcit mitjançant l'ICSI es va fer immediatament després de la biòpsia del corresponent 1CP, la biòpsia es va fer mitjançant el mètode físic (làser). Un dels setze òcits presentava l'1CP molt fragmentat (1CP-5) i no es va biopsiar. Es van biopsiar amb èxit el 86,7 % (tretze de 15) dels 1CP sencers, els dos restants es van perdre durant el procés de biòpsia [taules R-12 i R-13].

Es van fixar el 76,9 % (deu de tretze) dels 1CP biopsiats. Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es van diagnosticar el 80,0 % (vuit de deu) dels 1CP fixats. A partir d'aquesta anàlisi un dels vuit (12,5 %) va resultar cromosòmicament normal, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 equilibrada alternant, mentre que el 87,5 % (set de vuit) eren òcits cromosòmicament desequilibrats: un òcit, com a resultat d'una segregació cromosòmica adjacent 2 amb un cromosoma 12 i un cromosoma derivatiu 12; quatre òcits, com a resultat d'una segregació cromosòmica 3:1 (un òcit amb un cromosoma 4, un cromosoma derivatiu 4 i un cromosoma 12; un òcit amb només un cromosoma 12; un òcit amb només un cromosoma 12 derivatiu; i un òcit amb només un cromosoma 4); i dos òcits, com a resultat d'una segregació cromosòmica 4:0 que presentaven els quatre cromosomes implicats en la reorganització [taules R-12 i R-13].

El 50,0 % (vuit de setze) dels òcits madurs no es van inseminar ja que: en dos òcits l'1CP es va malmetre en el procés de la biòpsia (1CP-1 i 1CP-3), en un òcit l'1CP estava fragmentat (1CP-5), en tres òcits l'1CP es va perdre durant el procés de fixació (1CP-10, 1CP-11 i 1CP-15) i dos òcits es van malmetre durant el procés de biòpsia (1CP-12 i 1CP-13). En aquest cas, els vuit òcits no inseminats es van fixar per a l'estudi de la seva constitució cromosòmica. Es van diagnosticar el 62,5 % (cinc de vuit) d'aquest òcits. Tots eren cromosòmicament desequilibrats [taula R-13].

4.5.2.1.3 Resultat de la fecundació

El 50,0 % (quatre de vuit) dels òcits madurs inseminats van fecundar correctament mentre que la resta, dos no es van fecundar i dos van degenerar en el cultiu. El 25,0 % (dos de vuit) dels òcits inseminats després de la biòpsia, van sortir artefactualment de la ZP.

4.5.2.1.4 Transferència embrionària

No es va poder transferir a l'úter matern cap embrió ja que l'únic oòcit cromosòmicament normal per als cromosomes implicats en la translocació va generar un zigot que va sortir artefactualment de la zona pel·lúcida i no va ser evolutiu.

Globalment es van diagnosticar onze oòcits (vuit 1CP i tres MII). Un oòcit (9,1 %) va ser cromosòmicament normal, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 alternant, i els deu oòcits restants (91,9 %) eren desequilibrats. Quatre (36,4 %) oòcits provenint d'una segregació cromosòmica adjacent 2, quatre oòcits més (36,4 %) provenint d'una segregació cromosòmica 3:1 i els dos oòcits restants (18,2 %) provenint d'una segregació cromosòmica 4:0. Dos oòcits, els que van ser malmesos durant la biòpsia de l'1CP (1CP-12 i 1CP-13), van poder ser doblement analitzats (1CP i MI). Els resultats en ambdós casos van ser complementaris i corresponien a una segregació cromosòmica 3:1 i una d'adjacent 2 [taula R-13].

4.5.2.1 Cas HCP-1(I): dona amb cariotip 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)

4.5.2.2.1 Resultats de l'obtenció d'oòcits

Després de l'estimulació hormonal, el dia de la punció fol·licular es van recuperar deu CCO. Un cop acabat el tractament amb hialuronidasa es va veure que tots els oòcits eren madurs en estadi d'MII. Els oòcits es van inseminar mitjançant l'ICSI i immediatament després es van biopsiar mitjançant el mètode químic (àcid Tyrode) [taules R-12 i R-13].

4.5.2.2.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

Un oòcit tenia l'1CP molt fragmentat i no es va biopsiar. La biòpsia es va obtenir amb èxit en el 88,9 % (vuit de nou) dels 1CP; el restant 1CP es va perdre durant el procés de biòpsia. Es van fixar amb èxit el 75,0 % (sis de vuit) dels 1CP biopsiats. Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH detallada aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es va diagnosticar el 66,6 % (quatre de sis) dels 1CP fixats segons aquesta anàlisi. Un dels quatre (25,0 %) dels oòcits, va resultar ser cromosòmicament normal, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 alternant, mentre que els tres oòcits restants eren desequilibrats. Un oòcit, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 adjacent 1 amb un cromosoma derivatiu 1 i un cromosoma 18; un oòcit, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 adjacent 2 amb un cromosoma 1 i un cromosoma 1 derivatiu; i un oòcit, com a resultat d'una segregació cromosòmica 3:1 amb un cromosoma 1 derivatiu [taules R-12 i R-13].

4.5.2.2.3 Resultat de la fecundació

Dels deu oòcits inseminats, només un oòcit (10,0 %) va generar un zigot amb 2PN [taula R-13]. Els nou restants eren: un amb 3PN, dos amb 1PN, cinc no es van fecundar i un oòcit havia degenerat en cultiu.

Cinc de les nou cèl·lules no fecundades correctament i de les quals no es tenia diagnòstic de l'òocit mitjançant l'1CP, es van fixar per obtenir un diagnòstic citogenètic: dos zigots 1PN i tres òocits no fecundats.

4.5.2.2.4 Transferència embrionària

Es van poder diagnosticar dues cèl·lules que es tractaven de dos òocits desequilibrats; per tant, en aquest cas no es va poder fer cap transferència embrionària.

Globalment es van diagnosticar sis òocits (quatre 1CP i dos òocits). Un òocit era citogenèticament normal, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 alternant i els cinc òocits restants eren cromosòmicament desequilibrats: dos òocits originats per una segregació cromosòmica adjacent 1, dos òocits més originats per una segregació adjacent 2 i un òocit per una segregació 3:1. Quatre òocits (1CP-1, 1CP-2, 1CP-5 i 1CP-9) van ser doblement analitzats (1CP i MII). Els resultats dels òocits van ser complementaris [taula R-13].

4.5.2.3 **Cas HPC-2(J): dona amb cariotip 46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)**

4.5.2.3.1 Resultats de l'obtenció d'òocits

Després de l'estimulació hormonal el dia de la punció fol·licular es van recuperar cinc CCO. Un cop realitzat el tractament amb hialuronidasa es va veure que tots els òocits eren madurs en estadi d'MII.

4.5.2.3.2 Resultats de la biòpsia i anàlisi de les cèl·lules fixades

Es va fer la inseminació dels cinc òocits madurs amb l'ICSI immediatament abans de la biòpsia mitjançant el mètode mecànic (PZD)

Es van biopsiar amb èxit el 80,0 % (quatre de cinc) dels 1CP, el restant 1CP es va perdre durant el procés de biòpsia [taules R-12 i R-13].

Es van fixar el 100,0 % (quatre de quatre) dels 1CP biopsiats. Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es van diagnosticar el 75,0 % (tres de quatre) dels 1CP fixats. Els tres òocits eren desequilibrats: un 1CP, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 adjacent 2 amb un cromosoma 4 i un cromosoma derivatiu 4, i dos 1CP, com a resultat d'una segregació cromosòmica 3:1 amb un cromosoma 4, un cromosoma derivatiu 4 i un cromosoma 11 [taula R-12 i R-13].

4.5.2.3.3 Resultat de la fecundació

Dels cinc òcits inseminats, el 40,0 % (dos de cinc) es van fecundar correctament. Dels tres òcits restants, dos tenien 3PN i un no es va fecundar; es van fixar per a fer l'anàlisi citogenètica. En cap cas no es van produir sortides artefactuals de zigots de la seva ZP.

4.5.2.3.4 Transferència embrionària

Es van diagnosticar tots (tres de tres, 100,0 %) però tots tres eren cromosòmicament desequilibrats. En aquest cas no es va poder fer la transferència embrionària a l'úter matern.

Globalment es van diagnosticar els cinc òcits i cap era cromosòmicament normal o equilibrat per als cromosomes implicats en la translocació. Un òcit era originat per segregació cromosòmica adjacent 2, i quatre per una segregació cromosòmica 3:1. Un òcit (1CP-3) va ser doblement analitzat [taula R-13].

4.5.2.4 Cas HPC-3(K): dona amb cariotip 46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)

4.5.2.4.1 Resultats de l'obtenció d'òcits

Després de l'estimulació hormonal, el dia de la punció fol·licular es van recuperar dotze CCO. Un cop acabat el tractament amb hialuronidasa es va veure que onze dels òcits eren madurs, en estadi d'MII, i un òcit era molt immadur (VG) i es va descartar del cicle [taules R-12 i R-13]

4.5.2.4.2 Resultats de la biòpsia i l'anàlisi de les cèl·lules fixades

Es va fer la inseminació dels òcits mitjançant l'ICSI en els onze òcits madurs i immediatament es van biopsiar mitjançant el mètode mecànic (PZD). Es van biopsiar amb èxit el 100,0 % dels 1CP i es van fixar el 81,8 % (nou d'onze) dels 1CP biopsiats. Els 1CP fixats es van analitzar mitjançant la tècnica citogenètica de la FISH aplicant les sondes indicades anteriorment [taula M-5].

Es va diagnosticar el 100,0 % dels 1CP fixats. Un òcit era citogenèticament equilibrat, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 alternant, cinc òcits eren citogenèticament desequilibrats: quatre, com a resultat d'una segregació cromosòmica 3:1 i un òcit, com a resultat d'una segregació cromosòmica 2:2 adjacent 2. A més, tres òcits presentaven, per als cromosomes implicats en la reorganització, cromosomes recombinants amb cromàtides desiguals (una cromàtide 13 i una cromàtide der13), que poden generar tant embrions cromosòmicament desequilibrats com embrions cromosòmicament normals o equilibrats [taules R-12 i R-13].

Es va fer la biòpsia i l'anàlisi citogenètica de dos blastòmers d'embrions de 6–8 cèl·lules (D + 3), en quatre dels embrions (1CP-5, 1CP-6, 1CP-10 i 1CP-11): dos, com a resultat d'òcits amb l'1CP perdut durant el procés de fixació; i dos, com a resultat dels òcits que en els 1CP es va detectar cromosomes

recombinants. No es va obtenir cap diagnòstic conclouent ja que els blastòmers dels quatre embrions van presentar dotacions cromosòmicament caòtiques per als cromosomes analitzats [taula R-12].

4.5.2.4.3 Resultat de la fecundació

Dels onze oòcits inseminats, el 54,4 % (sis d'onze) es van fecundar correctament. Dels cinc oòcits restants, quatre tenien 3PN i un oòcit va degenerar. Cap oòcit inseminat no va sortir artefactualment de la ZP [taula R-12].

4.5.2.4.4 Transferència embrionària

Quatre dels sis oòcits fecundats tenien dotacions cromosòmiques desequilibrades i dels dos restants no es va obtenir informació ni de l'1CP ni del blastòmer. D'acord amb aquests resultats no es va poder transferir cap embrió a l'úter matern ja que cap embrió no era cromosòmicament normal o equilibrat per als cromosomes implicats en la translocació.

4.5.3 Anàlisi de correlació: no-disjunció entre cromosomes homòlegs i incidència de recombinació empírica de segregació

En les *translocacions robertsonianes* realitzades no s'ha observat correlació entre la no-disjunció entre cromosomes homòlegs i la incidència de recombinació. En les *translocacions recíproques*, publicades i incloses en el present treball s'ha observat una correlació positiva, altament significativa, entre la incidència de *no-disjunció de cromosomes homòlegs* (segregacions cromosòmiques 2:2 adjacents 2, les segregacions cromosòmiques 3:1 i la segregació cromosòmica 4:0) i la *freqüència de recombinació* observada per Laurie i Hultén l'any 1985 (Laurie i Hultén 1985a,b) (coeficient de correlació de 0,8698 ($p < 0,01$ Pearson) [figura R-15] [taula R-14].

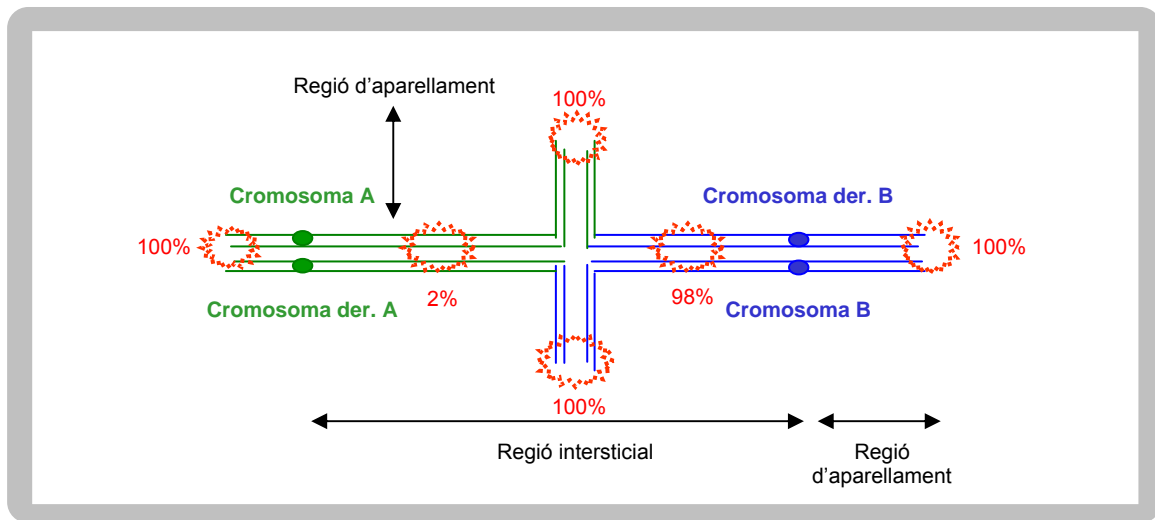


Figura R-15. Tetravalent o figura d'aparellament meiótic de cromosomes implicats en translocació recíproca que es produeix a la profase I. Es visualitzen freqüències de recombinació a les regions telomèriques d'aparellament i a la regió intersticial.

Taula R-14. Comparació entre la segregació cromosòmica observada en òcits o embrions de dones portadores de translocacions recíproques i la freqüència d'un o més quiasmes intersticials a cada braç implicat en la reorganització.

Cariotip de la dona 46,XX,t(A;B)	Tipus de cèl·lula	Cèl·lules diagnosticades	Tipus de segregació cromosòmica						Q Int (%)				No disj (%)		Referència bibliogràfica	
			Normal	Eq	Ad1	Ad2	3:1A	3:1B	4:00	ND o M	A	B	A	B		
																Eq
46,XX,t(11;16)(q21;q22)	1CP, BL	17	2	6	2	1	3	1	1	1	1	24,0	2,0	17,6	23,5	Munné i col·l. (1998d)
46,XX,t(5;8)(p13;p23)	BL	9	2	0	3	0	0	0	0	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Pierce i col·l. (1996)
46,XX,t(6;21)(q13;q22.3)	BL	9	1	0	2	1	2	3	0	0	55,0	5,0	44,4	22,2	0	Conn i col·l. (1999)
46,XX,t(11;16)(q21;q22)	1CP, BL	10	4	2	2	0	1	1	0	0	24,0	2,0	10,0	10,0	0	Willadsen i col·l. (1999)
46,XX,t(4;12)(q22;q23)	1CP	11	1	0	0	4	3	1	2	0	81,0	52,0	81,8	63,8	0	art.2 (vegeu l'aparat 4.7)

Eq (equilibrat), Ad1 (Adjacent 1), Ad2 (Adjacent 2), ND (no diagnosticat), M (mosaic), 1CP (primer corpuscle polar), BL (blastòmer), Q Int (quiasme intersticial), No disj (no disjunció de cromosomes).

* freqüències de cèl·lules amb un o més quiasmes a la regió intersticial en el braç d'algun dels cromosomes A o B implicats en la reorganització (Laure i Hultén 1985a,b).

* freqüències de cèl·lules mostrant una segregació amb no disjunció per algun dels cromosomes A o B.

* els autors no detallen el tipus de segregació cromosòmica 3:1.

4.6 **Article 1**

Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes

Durban M, Benet J, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J.

Hum. Reprod. 1998 13(3):583–587

- pàg. en blanc -

Human Reproduction vol.13 no.3 pp.583-587, 1998

Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes

M.Durban^{1,4}, J.Benet¹, J.Sarquella³, J.Egozcue² and J.Navarro¹

¹Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, ²Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra and ³Clinica de Reproducció Assistida, Clínica Quirón, E-08024 Barcelona, Spain

⁴To whom correspondence should be addressed

Most studies on preconception diagnosis published so far have used polymerase chain reaction (PCR) analysis to identify single gene defects. Although fluorescent DNA probes have been used to obtain a partial cytogenetic diagnosis of aneuploidies in first polar bodies without defined chromosome structures, the analysis of structural chromosome anomalies in the interphase nucleus is not adequate. We describe a procedure to obtain first polar body chromosome complements from hamster and human oocytes. In 63.6% (105 of 165) of hamster first polar bodies the chromosome complement showed a defined chromosome morphology and in 94.1% (16 of 17) of human oocytes fixed after follicular puncture it was possible to obtain high quality, well spread chromosome complements. First polar body chromosomes are fuzzy and shorter than oocyte chromosomes, but fluorescent in-situ hybridization results obtained in human first polar bodies clearly show that it is possible to detect whole chromosomes, centromeres and unique sequences, including the terminal regions of small chromosomes. This suggests that in fresh oocytes, DNA loss resulting from apoptotic chromosome fragmentation has not yet occurred. Using the procedure described, first polar bodies could be used to analyse the meiotic segregation of maternal structural abnormalities and to detect numerical chromosome anomalies in humans.

Key words: aneuploidies/first polar body/hamster/human/preconception diagnosis/structural chromosome abnormalities

Introduction

After the routine clinical application of prenatal diagnosis, preimplantation diagnostic techniques were developed to provide an even earlier warning to couples with a high risk of conceiving an affected child. This type of diagnosis allows the detection of some genetic or chromosome defects at the 6-8-cell stage, and enables only normal embryos to be transferred. Preimplantation diagnosis has been used in X-linked or single gene diseases (for a review see Harper, 1996) and to detect numerical chromosome abnormalities (Munné *et al.*, 1993).

The next approach was the diagnosis of genetic anomalies in germ cells, before fertilization. The aneuploidy rate in males has recently been estimated by fluorescent in-situ hybridization (FISH) studies of decondensed sperm heads (Martinez-Pasarell *et al.*, 1997). In females, the particular characteristics of gametogenesis allow the indirect characterization of the chromosome constitution of the gamete through the study of the first polar body (1PB) and this presents an opportunity for germ line analysis. The 1PB contains a chromosome set complementary to that of the oocyte. Thus, the 1PB can be analysed to obtain information on the chromosomal constitution of the corresponding oocyte, which is maintained in culture for insemination.

Although several studies on human 1PBs have been published, they have been limited to the use of polymerase chain reaction (PCR) to identify single gene defects (Verlinsky *et al.*, 1990) and, more recently, Munné *et al.* (1995) and Verlinsky *et al.* (1995, 1996) have used centromeric DNA probes for partial preconception analysis of aneuploidy using FISH. The major problem with the use of 1PBs for cytogenetic evaluation of the oocyte is the difficulty in visualizing the 1PB chromosome complement (Verlinsky *et al.*, 1996). 1PB chromosome complements with a good chromosome morphology have only been observed in some cases where the 1PB was fixed by chance with the oocyte (in the mouse: Dyvan *et al.*, 1993; in humans: Angell *et al.*, 1994; Benkhalifa *et al.*, 1996; Dailey *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1996; Wójcik *et al.*, 1996). In the present paper, we describe a procedure to obtain 1PB chromosome complements with defined chromosome morphology from hamster oocytes and we present our preliminary results using human 1PBs.

Materials and methods

Source of hamster and human oocytes

Ovulation was induced in adult female Syrian hamsters by i.p. injection of 30-40 IU of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG; Sigma, St Louis, MO, USA) in the morning on day 1 of the oestrous cycle and 30-40 IU of human chorionic gonadotrophin (HCG; Lavet, Madrid, Spain) 16-17 h prior to killing them on day 3 of the cycle. Oocytes were obtained by flushing the dissected oviducts, and cumulus masses were transferred to drops of hyaluronidase 0.1% in Biggers-Whitten-Whittingham medium (BWW) (Sigma) until the oocytes dissociated. Immediately after, they were rinsed in BWW and maintained in an incubator at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. The whole procedure was carried out under subdued light in <30 min.

Human samples were donated by patients undergoing in-vitro fertilization (IVF) cycles or gynaecological operations for different conditions. The Informed Consent Form and the protocol for the

M.Durban *et al.*

study were approved by the Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. The oocytes were predominantly donated oocytes processed immediately after puncture.

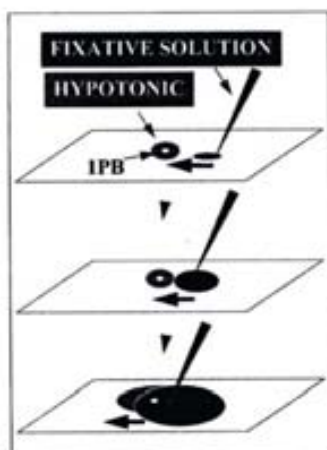


Figure 1. Graphic representation of the way in which the fixative solution should be applied. The fixative should be gently placed next to the hypotonic drop containing the first polar body (IPB), producing a one-way flux (large arrow) onto the slide. The fixative solution must be added under stereomicroscopic control.



Figure 2. Complete hamster first polar body complement from a mature oocyte showing 22 chromosomes with a well defined chromosome morphology.

Table I. Characteristics of the first polar body (IPB) chromosome complements from hamster and human oocytes

	Hamster IPB (%)	Human IPB (%)
Defined chromosome morphology	105 (63.6)	16 (94.1)
Undefined chromosome morphology	60 (36.4)	1 (5.9)
Total	165 (100)	17 (100)

584

Isolation of hamster and human IPBs

Hamster and human IPBs were isolated enzymatically or mechanically as follows. (i) In the enzymatic procedure, trypsin was used at a concentration of 1 mg/ml BWW (Sigma) for hamster oocytes and of 30 mg/ml PBS (Difco, Detroit, MI, USA) for human oocytes, for 1–3 min under a stereomicroscope. When the zona began to disappear, the oocyte was rinsed in BWW and the IPB was carefully separated from the oocyte. (ii) The mechanical procedure was carried out with a micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan); IPBs from hamster oocytes were recovered after a local digestion of the zona with acid Tyrode (pH 2) and aspirated with a glass microneedle 20 µm in diameter. For human IPBs the procedure used was the one previously described by Verlinsky *et al.* (1990).

IPB chromosome complement fixation

In all cases the free IPB was gently placed into a tiny well containing hypotonic solution (1% trisodium citrate). The hypotonic treatment was controlled under a stereomicroscope until the IPB lost brightness (5–10 min). It was then gently placed onto a clean slide previously covered with a 1% trimethoxysilane film (Fluka, Buchs, Switzerland) (Ward *et al.*, 1995). Using a micropipette, a 20 µl drop of ethanol:acetic acid (1:1) was gently added onto the slide beside the IPB, for a gentle fixation. When the fixative solution covered the IPB, a second drop was added and, if needed, one or two more drops (Figure 1). Finally the slides were air-dried and observed under a phase contrast microscope (×40).

Chromosome analysis

Hamster IPB complements were solid-stained with conventional Leishman's stain. The slides were observed and photographed with a Leitz Dialux 22 3-lambda Plocemopak photomicroscope (Leica, Madrid, Spain) using Agfa Copex Rapid AHU (50 ASA) film. Eventually, phase contrast microscopy was performed with an Olympus PROVIS-AX70 microscope and metaphases were captured and analysed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging, Sunderland, UK).

Human IPB complements were first photographed under phase contrast and then analysed by FISH. We used directly labelled fluorescent commercial probes (Vysis, New York, NY, USA): whole chromosome 11 and whole chromosome 22 probes for single and double FISH (WCP 11 Spectrum Orange and WCP 22 Spectrum Green), and centromeric and locus specific DNA probes for dual FISH (LSI 21q22.13-q22.2 Spectrum Orange and CEP Xp11-q11 Spectrum Green), and for triple FISH (adding the double probe LSI 22q11.2/22q13.3, Spectrum Orange/Spectrum Green). FISH analysis was carried out immediately or in preparations kept at –20°C. The slides were treated with PBS for 5 min, 50 mM MgCl₂/PBS for 5 min, 1% formaldehyde/50 mM MgCl₂/PBS for 10 min, PBS for 5 min and finally dehydrated in 70, 90 and 100% ethanol. A volume of 2.5 µl of the hybridization mix containing the probes was placed on 8×8 mm² coverslips and mounted to the slides. The probes and the slides were simultaneously denatured by placing the slides on to a hot plate for 3–5 min at 74°C. After overnight incubation at 37°C in a humidified chamber, the slides were washed using the protocol provided by Vysis. Phase contrast and fluorescence microscopy were performed with an Olympus PROVIS-AX70 microscope equipped with the appropriate filter set for FITC, Rhodamine and DAPI (Olympus, Hamburg, Germany). After direct analysis, phase contrast and FISH metaphases were captured and analysed using a Cytovision Ultra workstation (Applied Imaging).

Results

The method was developed in an animal model. A total of 200 Syrian hamster oocytes were processed immediately after

First polar body chromosome complements

recovery, 165 IPBs were successfully fixed and the remaining 35 were accidentally lost (Table 1). In 105 (63.6%) IPBs the chromosome complement showed a defined chromosome

morphology similar to metaphase II chromosomes, with separated chromatids still joined by the centromere, but showing a 'hairy' aspect as a special feature (Figure 2). Of

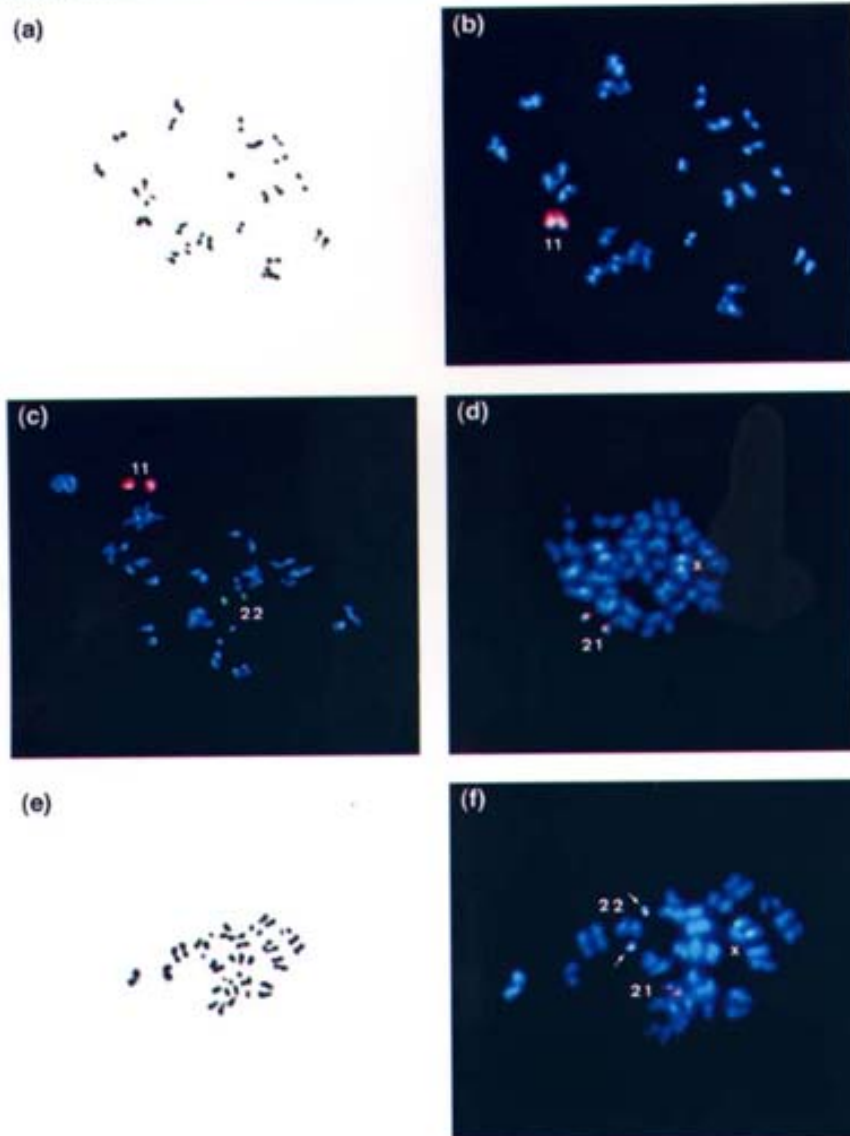


Figure 3. (a) Complete human first polar body (IPB) chromosome complement by phase contrast microscopy and (b) the same IPB complement showing painting of chromosome 11 with the WCP 11 Spectrum Orange. (c) Complete human IPB complement with double painting of chromosomes 11 and 22 with the whole chromosome probes WCP 11 Spectrum Orange and WCP 22 Spectrum Green. (d) Complete human IPB complement showing hybridization with the LSI 21q22.13-q22.2 Spectrum Orange probe and CEP Xp11-q11 Spectrum Green probe for chromosomes 21 and X respectively. Note that one of the 21 chromatids shows a split LSI signal, which is common when using this probe. (e) Complete human IPB complement by phase contrast microscopy and (f) the same complement hybridized with probes LSI 21q22.13-q22.2 Spectrum Orange, LSI 22q11.2/22q13.3, Spectrum Orange/Spectrum Green (arrows) and CEP Xp11-q11 Spectrum Green probes for chromosomes 21, 22 and X. The two signals for the double probe on chromosome 22 can be clearly distinguished.

585

M.Durban *et al.*

these 105 IPBs, a total of 100 (95.2%) showed a complete complement with 22 chromosomes, while five complements (4.8%) were hypohaploid, three with 21 chromosomes and two with 20 chromosomes. The remaining 60 (36.4%) IPBs showed no defined chromosome morphology.

Encouraged by the high frequency of good quality hamster IPB chromosome complements obtained in this first approach, we decided to adapt the procedure to human oocytes. A total of 21 donated human oocytes were processed immediately after puncture. Seventeen of them were successfully fixed and the remaining four were accidentally lost during fixation during the early attempts to adapt the method to human oocytes. In 16 of the 17 IPB (94.1%) it was possible to obtain well spread, high quality chromosome complements (Table 1). Human IPB chromosomes are fuzzy and shorter than metaphase II chromosomes and also show separated centromere regions and chromatids. These IPB chromosomes were suitable for in-situ hybridization analysis using fluorescent commercial probes. Figure 3a and b shows a complete human IPB chromosome complement observed by phase contrast microscopy and hybridized with a whole chromosome probe for chromosome 11 (WCP 11 Spectrum Orange). Figure 3c shows a complete human IPB chromosome complement hybridized with whole chromosome probes for chromosomes 11 and 22 (WCP 11 Spectrum Orange and WCP 22 Spectrum Green, respectively). Figure 3d shows a complete human IPB complement hybridized with the LSI 21q22.13-q22.2 Spectrum Orange and CEP Xp11-q11 Spectrum Green probes for chromosomes 21 and X. Figure 3e and f shows a complete IPB chromosome complement observed by phase contrast microscopy and hybridized with three probes (LSI 21q22.13-q22.2 Spectrum Orange, LSI 22q11.2/22q13.3 Spectrum Orange/Spectrum Green, and CEP Xp11-q11 Spectrum Green) for chromosomes 21, 22 and X.

Discussion

So far it has been extremely difficult to obtain good quality chromosome complements from IPBs (Verlinsky *et al.*, 1996). For this reason, IPBs have only been used for the detection of genetic defects by PCR and for the indirect diagnosis of numerical chromosome abnormalities using IPB complements without any defined chromosome morphology. This material is not suitable for cytogenetic analysis of structural chromosome abnormalities. We have developed for the first time a hypotonic treatment and a fixative procedure to obtain good IPB complements in a high proportion of cases. With this procedure it is possible to obtain well spread chromosome complements that can be accurately analysed by FISH for structural and numerical chromosome anomalies.

The reason for using FISH is that the high degree of contraction and fuzzy morphology of IPB chromosomes makes it difficult or impossible to obtain G-banding. IPB complements show a high sensitivity to the FISH denaturation step and therefore it is useful to obtain phase contrast images prior to the FISH procedure, to facilitate chromosome identification. FISH results in human IPBs from fresh oocytes clearly show that, despite their fuzzy aspect, it is possible to detect whole

chromosomes, centromeres and unique sequences, including interstitial regions (LSI 21q22.13-q22.2 and LSI 22q11.2) and very terminal regions (LSI 22q13.3) (Figure 3). Our results seem to indicate that the DNA loss related to DNA fragmentation involved in apoptosis, recently described by Takase *et al.* (1995) and Fujino *et al.* (1996) in incubated oocytes, has not yet taken place in fresh oocytes.

Only five hamster IPBs of the group with defined chromosome morphology (Table 1) showed an incomplete number of chromosomes and at least two of them, with 20 chromosomes, most probably resulted from the loss of chromosomes during fixation. The other three, with 21 chromosomes, could result from non-disjunction. The low level of artificial chromosome loss detected, when compared to studies of oocytes, could be explained by the characteristics of the fixative solution used [ethanol:acetic acid (1:1) instead of (3:1)] because the lower proportion of alcohol resulted in a slower evaporation of the fixative, and the increased proportion of acetic acid made the fixative solution more efficient in the disruption of the IPB membranes. The way in which the fixative was applied, gently placing it next to the IPB, and the use of the trimethoxysilane film also improved the results by reducing the area in which the chromosomes were spread, minimizing the artificial losses. In summary, the essential factors for routinely obtaining good chromosome spreads from IPBs are: (i) to work with IPBs from fresh oocytes, (ii) to use a long hypotonic treatment under stereomicroscopic control, (iii) to use a modified fixative solution (ethanol:acetic acid, 1:1), (iv) to produce a one-way flux of fixative on the slide and (v) to use trimethoxysilane coated slides.

The procedure described could be extended to clinical preconception cytogenetic diagnosis, because it allows the detection not only of aneuploidies (which are of maternal meiotic I origin in 80-95% of cases) but also of structural chromosome abnormalities, even when small segments of chromosomes are involved, because the transmission of chromosome anomalies to the offspring depends mainly on the segregation of the anomaly at meiosis I. The technique would be especially indicated in those couples where the woman is the carrier of a structural chromosome reorganization because, according to sperm chromosome studies, in these cases the risk of conceiving a chromosomally unbalanced child ranges from 15 to 90% (Templado *et al.*, 1988). The analysis of IPB chromosomes would allow the identification of the type of segregation that has taken place and, consequently, predict if the embryo would be normal or not (Egozcue *et al.*, 1996). Furthermore, the clinical application of IPB chromosome analyses in preconception diagnosis would be especially indicated in those couples who, on moral grounds, would reject embryo selection after preimplantation diagnosis (Egozcue, 1994) or abortion after prenatal diagnosis.

Acknowledgements

We thank Drs L.C.Pous-Ivern and J.M^a Gely (Cl. de Reproducció Assistida, Cl. Quirón, Barcelona); A.Laiz (F.I.V.T.E-Navarra, Pamplona); L.I.Cabero (Dpt. de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital de la Vall Hebrón and Cl. del Remei, Barcelona); A.Fresnadillo and M.Lafont (Dpt. de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Mútua de

First polar body chromosome complements

Terrassa, Terrassa); S.Marina and D.Campany (Lab. C.E.F.E.R., Cl. Teknon, Barcelona); J.J.Espinós, I.Baguñà and L.C.Carbonell (Cl. Delfos and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); P.N.Barri and A.Veiga (Dpt. de Ginecologia i Obstetrícia del Institut Dexeus, Barcelona) for their collaboration in the project, and A.Niubó and M.Nadal, for technical support. This work has been performed with financial support from Fundació Catalana Síndrome de Down/Marató TV3, and the Unitat de Biologia received support from CIRIT, Generalitat de Catalunya, Spain (1995SGR-0478).

References

- Angell, R.R., Xian, J., Keith, J. *et al.* (1994) First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **65**, 94-202.
- Benkhalifa, M., Ménço, Y., Junny, L. *et al.* (1996) Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 140-147.
- Dailcy, T., Dale, B., Cohen, J. and Munné, S. (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 176-184.
- Dyvan, A., de Sutter, P. and Verlinsky, Y. (1993) Okadaic acid induces premature chromosome condensation reflecting the cell cycle progression in one cell stage mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **34**, 403-415.
- Egozcue, J. (1994) Polar body analysis. Possible pitfalls in preconception diagnosis of single gene and chromosome disorders. *Hum. Reprod.*, **9**, 1208.
- Egozcue, J., Santaló, J., Vidal, F. *et al.* (1996) Diagnóstico preimplantario. Aspectos citogenéticos. In Remohí, J., Simón, C., Pellicer, A. and Bonilla-Musoles, F. (eds), *Reproducción Humana*. McGraw-Hill, New York, pp. 470-474.
- Fujino, Y., Ozaki, K., Yamamasu, S. *et al.* (1996) DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum. Reprod.*, **11**, 1480-1483.
- Harper, J.C. (1996) Preimplantation diagnosis of inherited disease by embryo biopsy: an update of the world figures. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 90-95.
- Martinez-Pasarell, O., Márquez, C., Coll, M.D. *et al.* (1997) Analysis of human sperm-derived pronuclei by three-colour fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, **12**, 641-645.
- Munné, S., Lee, A., Rosenwaks, Z. *et al.* (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, **8**, 2185-2191.
- Munné, S., Dailcy, T., Sultan, K.M. *et al.* (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Mol. Hum. Reprod.*, **1**, *Hum. Reprod.*, **10**, 1014-1020.
- Takase, K., Ishikawa, M. and Hoshiai, H. (1995) Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Tohoku. J. Exp. Med.*, **175**, 69-76.
- Templado, C., Benet, J., Genescà, A. *et al.* (1988) Human sperm chromosomes. *Hum. Reprod.*, **3**, 133-138.
- Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lidchez, A. *et al.* (1990) Analysis of polar-body: preconception genetic diagnosis. *Hum. Reprod.*, **5**, 826-829.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidline, M. *et al.* (1995) Pregnancies following preconceptional diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, **10**, 1923-1927.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidline, M. *et al.* (1996) Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 157-162.
- Wall, M.B., Marks, K., Smith, T.A. *et al.* (1996) Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected 'failed-fertilized' human oocytes. *Hum. Reprod.*, **10**, 2230-2238.
- Ward, S.A., Armstrong, S.T., Bromwich, P. and Hultén, M. (1995) Development of FISH for human MII oocytes. *Chromosome Res.*, **3** (Suppl. 1), 125.
- Wójcik, C., Guzmán, J.F., Pinatel, M.C. *et al.* (1996) Morphological and cytogenetic observations of unfertilized human oocytes and abnormal embryos obtained after ovarian stimulation with pure follicle stimulating hormone following pituitary desensitization. *Hum. Reprod.*, **10**, 2617-2622.

Received on August 1, 1997; accepted on November 19, 1997

- pàg. en blanc -

4.7 Article 2

PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body

Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Lailla JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J.

Hum. Reprod. Update 2001 7(6):591-602

Figure 1(a, b, c and d) : seleccionada per la portada del *Hum. Reprod.* 7(6)

Fe d'errates: *figure 1. (e): WCP 13 spectrum green and WCP 14 spectrum red. Tables III and IV:* les freqüències d'òcits normals, equilibrats i desequilibrats estan calculades respecte del nombre d'1CP biopsiats i no respecte del nombre d'1CP diagnosticats. A les taules D-4 i D-5, per a tots els casos, les freqüències estan calculades a partir del nombre d'òcits diagnosticats. També cal tenir en compte que a les taules III i IV de l'article 2 no hi consten els casos clínics que es van fer posteriorment a la publicació d'aquest article.

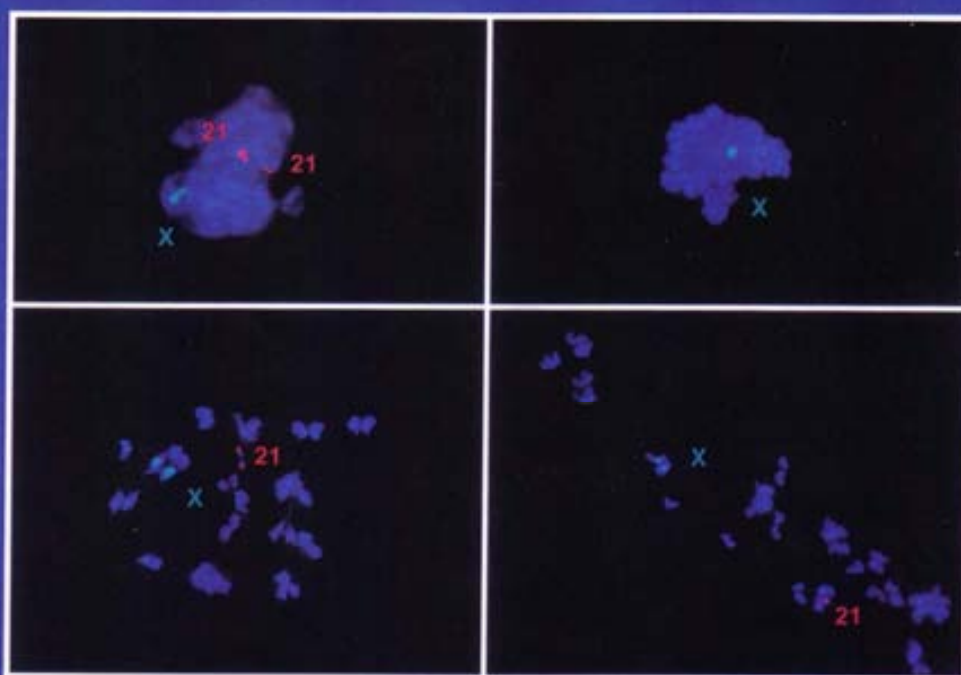
- pàg. en blanc -

Human Reproduction Update

ISSN-1355-4786

Volume 7, Number 6 November/December 2001


www.humupd.oupjournals.org



Published in association with ESHRE by Oxford University Press



Human Reproduction Update


Universitat Autònoma de Barcelona
Biblioteca de Ciències
i d'Enginyeries

B.C.J.M. Fauser
Editor-in-Chief

Managing Editor
H.K. Beard
Senior Editor
A.C. Williams

**Senior
Production Editor**
B.C. Hilton
Production Editor
P.A. James

Editorial Office
Moor Barns Farmhouse,
Madingley Road,
Coton,
Cambridge CB3 7PG, UK
Tel: 01954 212404
Fax: 01954 212357/8/9
E-mail: editorial@humanreproduction.co.uk

Associate Editors

B. Tarlatzis Greece
P. Devroey Brussels
P. Bouchard France
H.G. Burger Australia
A.F. Glasier UK

R. Gosden Canada
A. Trounson Australia
J.F. Strauss USA
J.L. Simpson USA
N.E. Skakkeback Denmark

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Published for the
European Society of Human Reproduction and Embryology
by Oxford University Press,
Oxford, UK



The front cover of *Human Reproduction Update* shows examples of first polar body (left hand side) and corresponding metaphase II (right hand side) chromosome analysis, see pages 591–602.

Human Reproduction Update, Vol.7, No.6 pp. 591-602, 2001

PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis

M.Durban^{1,6}, J.Benet¹, M.Boada², E.Fernández³, J.M^a.Calafell⁴, J.M^a.Laila⁵, J.F. Sánchez-García¹, A.Pujol¹, J.Egozcue¹ and J.Navarro¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, ²Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Pg. Bonanova 89-91, E-08017 Barcelona, ³Laboratori de FIV, Fundació Jiménez Díaz, Avda. Reyes Catòlics 2, E-28040 Madrid, ⁴Unitat de Reproducció Assistida, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, E-08036 Barcelona and ⁵Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Hospital Sant Joan de Déu, Pg. St. Joan de Déu 2, E-08950 Esplugues de Llobregat, Spain

⁶To whom correspondence should be addressed at: Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. E-mail: joaquima.navarro@uab.es

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) using the first polar body (IPB) is a modality of PGD that can be used when the woman is the carrier of a genetic disease or of a balanced chromosomal reorganization. PGD using IPB biopsy in carriers of balanced chromosome reorganizations has not become generalized. Here, we describe our experience based on the analysis of unfertilized or fresh, non-inseminated control oocytes, by fixing separately the IPB and the corresponding oocyte, and on the study of six clinical cases of PGD using IPB biopsy (four Robertsonian translocations and two reciprocal translocations). In fresh oocytes, the chromosome morphology of the IPB was well preserved, and the results were always concordant for each oocyte-IPB pair. This indicates that the IPB can be reliably used for the diagnosis of chromosome reorganizations. In these studies the technical problems encountered when performing PGD using IPB biopsies for chromosome studies are also addressed. Three different strategies of IPB biopsy (laser beam, partial zona dissection and acid Tyrode's) and two different protocols (intracytoplasmic sperm injection before or after IPB biopsy) and their effect on the percentage of oocytes diagnosed and the fertilization rate, are discussed. In reciprocal translocation cases, published in the literature or studied by us, in which at least nine oocytes had been diagnosed, a correlation has been found between the frequency of non-disjunction observed and the theoretical recombination rate. To date, PGD by IPB analysis alone or combined with blastomere biopsies in female carriers of chromosomal rearrangements has been used in 18 cases, with a further six cases reported here. A total of 325 cumulus-oocyte complexes have been obtained, of which 294 were biopsied and 224 were diagnosed. A total of 52 embryos was transferred, 19 of which implanted and 17 produced full-term pregnancies.

Key words: first polar body biopsy/TISH/preimplantation genetic diagnosis/reciprocal translocations/Robertsonian translocations

TABLE OF CONTENTS

Introduction
 Technical aspects
 Clinical application and review of results
 Theoretical considerations on chromosome segregation
 Conclusions
 References

Introduction

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is usually based on the analysis of one or two blastomeres obtained from cleavage-stage

embryos, but it may also be based on the analysis of the first polar body (IPB). PGD of IPB biopsies can be used when the woman is the carrier of a genetic disease or of a balanced chromosomal reorganization. Genetic analysis of the IPB allows the indirect diagnosis of its corresponding oocyte. PGD of IPB biopsies has the advantage that doubtful or difficult diagnoses can be confirmed by PGD in blastomeres, thus avoiding the need of establishing a pregnancy and its eventual termination.

To date, PGD of IPB biopsies has been widely used for the diagnosis of monogenic diseases, such as cystic fibrosis (Cieslak *et al.*, 2000) in spite of the fact that oocytes with heterozygotic chromosomes (up to 50%) can produce either normal offspring or

M.Durban *et al.*

affected children. In these cases, confirmation by second polar body (2PB) biopsy or by blastomere biopsy is mandatory. On the other hand, its use in female carriers of balanced chromosome reorganizations has not become generalized, probably because most IPBs are fixed in interphase or as degenerated chromatin. This may be due to the technical problems encountered in obtaining good chromosome spreads (Verlinsky *et al.*, 1996; Munné, 2000), to the difficulty of handling such a small cell as the IPB, or because the PGD of IPB biopsies does not allow the analysis of the paternal contribution to the genetic endowment of the embryo.

It must be noted that although over 1000 cycles have been performed for the diagnosis of aneuploidies or genetic diseases in IPBs (Report of the 9th Annual Meeting of the International Working Group on Preimplantation Genetics, in association with the 11th IVF Congress, 2000) only 28 PGD cycles using IPB biopsies, and one cycle using IPB plus blastomere biopsies are included in the data collection II of the ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2000), covering the period until May 1, 2000. Of these, only three cycles were performed for the diagnosis of translocations. In contrast, the Report of the 9th Annual Meeting of the International Working Group on Preimplantation Genetics, in association with the 11th IVF Congress (2000) refers to 35 cases of translocation at the St Barnabas centre without providing details on the characteristics of the translocations, or on the results.

The first case of PGD using IPB biopsy in a female carrier of a balanced translocation was published in 1998 (Munné *et al.*, 1998a). Although the procedure is safe, to date only 18 cases of PGD using IPB biopsy in translocation carriers had been reported. The obstetrical and neonatal outcome of the first 109 live births after PGD for Mendelian disorders and aneuploidies using IPB biopsies has been reviewed (Strom *et al.*, 2000).

Here, we address the technical problems encountered when performing PGD for chromosome studies using IPB biopsies, describe our experience (six cases) and review all other cases reported so far in the literature (18 cases).

Technical aspects

After several years of experience in the use of hamster and human oocytes for PGD using IPB biopsies (Durban *et al.*, 1998), it has been possible to solve a number of technical problems that can be avoided by following the recommendations given below. The main technical difficulties encountered were: (i) reliability of results; (ii) quality of IPB chromosome preparations; (iii) fertilization efficiency; and (iv) fluorescence in-situ hybridization (FISH) efficiency and IPB diagnosis.

Figure 1. (a) Abnormal first polar body (IPB) chromosome complement from an unfertilized human oocyte showing two chromosomes 21 and one chromosome X hybridized with LSI 21 spectrum orange and CEP X spectrum green probes. (b) The corresponding human metaphase II showing no chromosome 21 and one X chromosome using the same probes. (c) Normal, complete IPB chromosome complement from a fresh (not inseminated) human oocyte showing hybridization with LSI 21 spectrum orange and CEP X spectrum green probes for chromosomes 21 and X respectively. (d) The corresponding normal complete human metaphase II (MII) showing hybridization with LSI 21 spectrum orange and CEP X spectrum green probes for chromosomes 21 and X respectively. (e) Normal IPB corresponding to a balanced oocyte from a 45,XX,der(14:21)(q10;q10) patient showing hybridization with WCP 14 spectrum orange and WCP 21 spectrum green probes for chromosomes 14 and 21 respectively. Chromosome 14 shows separated chromatids. Note that although in this spread the chromosome morphology is not well preserved, painting probes show a discrete profile. (f) IPB fixed as chromatin clumps showing two derivative chromosomes corresponding to a normal oocyte from a 46,XX,t(4;12)(p22;q23) patient, hybridized with WCP 4 spectrum orange and WCP 12 spectrum green probes for chromosomes 4 and 12 respectively. (g) IPB with preserved chromosome morphology showing a normal chromosome constitution, corresponding to a balanced oocyte from a 45,XX,der(13;14)(q10;q10) patient, hybridized with WCP 13 spectrum green and WCP 14 spectrum orange probes for chromosomes 13 and 14 respectively.

592

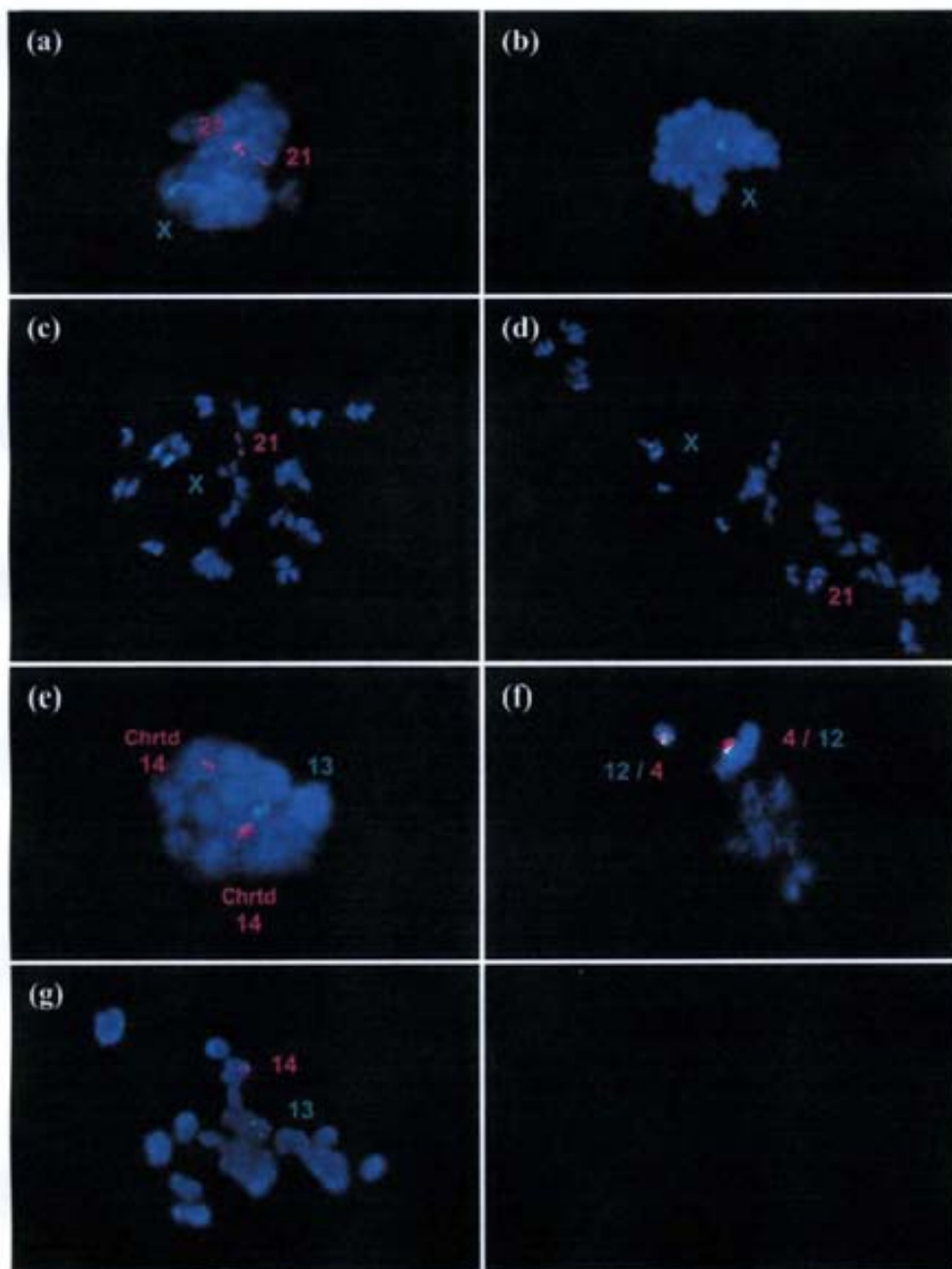
Reliability of results

Analyses of the concordance between the chromosome complements of the IPB and the metaphase II (MII) oocyte had been previously carried out (Munné *et al.*, 1993; Dailey *et al.*, 1996; Dyban *et al.*, 1996) by jointly fixing the oocyte and the IPB. All results showed a high degree of concordance in the pair, and demonstrated that a high percentage (>90%) of chromosome complements could be analysed. In order to confirm the reciprocity of the chromosome sets of the IPB and the oocyte and the possible influence of ageing, a study was carried out in 41 inseminated, unfertilized oocytes and in 18 fresh oocytes donated by patients undergoing IVF cycles or gynaecological operations by fixing the MII oocyte and the IPB separately. The Ethics Committees of the Universitat Autònoma de Barcelona and of the IVF centres taking part approved the Informed Consent Form and the protocol for the study. The IPB was separated from the MII oocyte either enzymatically using trypsin (Difco, Detroit, MI, USA) 30 mg/ml in phosphate-buffered saline (PBS) for 2 min, or mechanically by micromanipulation (Narishige, Técnicas Médicas MAB, Spain). Both cells were fixed differently: the IPB following a published method (Durban *et al.*, 1998), and the MII oocyte following a modified Tarkowski's method (Tarkowski, 1966). In order to establish the concordance between the chromosome complement of the IPB and that of the oocyte, and other than counting, several sets of probes were used, combining centromere probes (CEP), locus-specific probes (LSI), telomere probes (Tel) and whole chromosome painting (WCP) probes. The probes were different depending on the case, but were the same for each oocyte-IPB pair. These directly labelled probes (Vyxis, New York, USA and Cambio, UK) were used in single, double and triple FISH sequences in one or two rounds.

In unfertilized oocytes (aged 24–36 h post-puncture), which are the ones normally used to determine the incidence of chromosome abnormalities in female gametes, the chromosome morphology was only preserved in six of 41 IPBs (14.6%), and data were available from only 18 of 41 pairs (43.9%). However, all cases that could be analysed were concordant for the pair, even in two cases of aneuploidy: one pair in which the IPB was X/21,21 and the oocyte X/0 (Figure 1a and b), and another in which the IPB was X/1/2 of 21 and the oocyte X/21, 1/2 of 21 as a result of predivision.

In fresh oocytes, the chromosome morphology of the IPB was preserved in 15 of 18 pairs (83.3%) (Figure 1c and d) and the chromosome complements were concordant in 16 of 16 pairs (100.0%). Two cases could not be analysed due to the presence of membrane and cytoplasmic remnants. All oocytes and IPBs were chromosomally normal.

PGD in carriers of balanced translocations by IPB analysis



M.Durban *et al.*

Both the lower frequency of analysable chromosome sets and the increased incidence of chromosome anomalies may be related to ageing, because IPBs degenerate very quickly, and only chromatin clumps that do not always hybridize correctly can be obtained, and because ageing *in vitro* may induce chromosome alterations.

In IPBs and MII oocytes, the chromosomes are short and chromatids are widely separated. Furthermore, IPB chromosomes are fuzzy, probably because IPB chromosome complements are no longer under the effect of the active maturation promoting factor present in the oocyte (Sagata, 1996). However, the use of FISH allows a high degree of resolution, and several probes can be used on the same chromosomes. Chromosome identification is possible using spectral karyotyping (SKY) (Márquez *et al.*, 1998).

Quality of chromosome preparations

Obtaining high-quality chromosome preparations from oocytes or blastomeres is not easy, and in the case of IPBs it is even more difficult—a difficulty that has been recently acknowledged (Cicislak *et al.*, 2000). In fact, the use of fresh oocytes as the most direct approach to obtain chromosome spreads from IPBs was also first demonstrated only recently (Durban *et al.*, 1998). To solve this problem in blastomeres, several authors have used premature chromosome condensation systems, including okadaic acid (Grossmann *et al.*, 1995). More recently, high-quality blastomere chromosome complements were obtained by fusing blastomeres with bovine oocytes (Willadsen *et al.*, 1999) and mouse zygotes (Evisikov and Verlinsky, 1999), followed by SKY karyotyping. However, the only studies in which percentages are reported (Evisikov and Verlinsky, 1999; Willadsen *et al.*, 1999) show that the success rate is not much higher than 50% for any single cell. Furthermore, these approaches are extremely expensive and time-consuming.

In our laboratory, the technique used described to obtain direct chromosome preparations (Durban *et al.*, 1998) was used. These preparations were analysed using the most advantageous combination of FISH probes, and as a result of these analyses some factors which appear to be crucial to obtain high percentages of spreads with a preserved chromosome morphology have been identified.

The present protocol allows us not only to obtain IPB spreads with preserved chromosome morphology, but also a fertilization rate of 73% using laser or partial zona dissection (PZD). The aims of the protocol were to biopsy the IPB as soon as possible after the oocyte had been aspirated and microinjected. The rationale for each step is discussed below:

Since the purpose is to obtain the IPB biopsy as soon as possible, it is recommended that the oocyte be denuded from cumulus cells as soon as the cumulus-oocyte complex (COC) is obtained, rather than this being performed ~2 h later, as is usually done in a standard protocol.

Fertilization efficiency

Once the oocyte has been denuded, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) should be performed before the IPB is biopsied. If ICSI is performed 12 h after retrieval and 6 h after IPB biopsy (as was our case initially), the fertilization rate is only 42.3%. If this period was shortened to 6–7 h after retrieval (Munné, 2000),

the fertilization rate increased to 62.5%. Moreover, if ICSI is carried out immediately after retrieval and before IPB biopsy, the fertilization rate can be increased to 72.2%. The reasons for this are basically two-fold. First, if the IPB is biopsied before ICSI, the reference of the IPB is lost, and since the oocyte may rotate inside the zona pellucida (ZP), the ICSI needle can damage the meiotic spindle and prevent the extrusion of the 2PB, producing zygotes with three pronuclei. Alternatively, it may damage the oocyte in such a way that the development of the zygote is arrested after decondensation of the sperm head (zygotes with two pronuclei) or even earlier (zygotes with one pronucleus). Recently, the effects of sperm placement during ICSI relative to the MII spindle on fertility and preimplantation development were evaluated (Blake *et al.*, 2000). The results showed that embryos originating from oocytes injected with the polar body positioned at 7 or 11 o'clock implant at a higher rate, although the data are not significant. In the same way, the regions that are safe or dangerous for ICSI in the oocyte, taking into account the position of the IPB, have also been defined (Hardarson *et al.*, 2000). The second reason is that the opening in the ZP produced by the biopsy procedure may result in the artefactual hatching of the oocyte or the zygote. The incidence of these problems is reflected in Tables I and II (see Clinical application and review of results).

The biopsy procedure should be carried out after ICSI has taken place, and using a laser beam or a mechanical procedure to drill the ZP. The laser beam (a 1.48 µm non-contact diode laser; Fertilase, Medical Technologies, Montreux, Switzerland) adapted to an inverted microscope is very convenient, but expensive. This laser system has been never used before for human IPB biopsy. However, the efficacy of such a system for zona drilling and its usefulness for assisted hatching was initially demonstrated in humans (Germond *et al.*, 1995), and subsequently applied to blastocyst biopsy (Veiga *et al.*, 1997) and blastomere biopsy (Boada *et al.*, 1998). In our hands, biopsy using a laser system after ICSI yielded a high fertilization rate (71.4%). The mechanical procedure is more time-consuming but cheaper, and possible secondary effects on the ZP are avoided. We also obtained a similar fertilization rate (75.0%) using this biopsy system. While in PGD by IPB analysis only three embryos have been transferred after using the laser system, with the mechanical system 49 embryos have been transferred. Until now, pregnancies have only been obtained using the mechanical system. More cases using the laser system will be needed before statistically valid comparisons can be made.

The use of acid Tyrode's is not recommended (Malter and Cohen, 1989; Santaló *et al.*, 1995). Although good quality chromosome preparations may be obtained from IPBs biopsied with this system, the oocyte may be easily damaged and the fertilization rate is reduced (10.0%).

The IPB should be removed using a pipette of a diameter slightly larger than that of the IPB (~20–30 µm). If a smaller micropipette is used, the IPB may be mechanically damaged and even lysed. In biopsies obtained using a small pipette (~10 µm), only 14.2% of preparations with a preserved chromosome morphology were obtained (Table I, case m; Table II, case H), while using a pipette of a larger diameter this proportion grew to 89.4% (Table I, cases n, p and q; Table II, case I; see also Clinical application and review of results). It is also important to remove

PGD in carriers of balanced translocations by IPB analysis

Table I. Clinical case results: preimplantation genetic diagnosis (PGD) of Robertsonian translocations using IPB biopsy

Oocyte analysed	IPB	Preserved IPB chromosome morphology	ICSI versus biopsy	IPB diagnosis	Blastomere diagnosis	Oocyte or embryo diagnosis	ICSI result and transfer
Case m: 45,XX,der(14;21)(q10;q10)							
IPB-1	Fragmented	-	Post	-	-	-	Artefactual hatched 2 PN
IPB-2	Fixed	No	Post	Undiagnosed	-	No result	Fertilized
IPB-3	Fixed	No	Post	21	-	14 der14;21	3 PN
IPB-4	Lost during biopsy	-	Post	-	-	-	Degenerated
IPB-5	Fixed	No	Post	21 der14;21	-	14	Fertilized
IPB-6	Fragmented	-	Post	-	-	-	3 PN
IPB-7	Fixed	No	Post	14 21 der14;21	-	0	3 PN
IPB-8	Fixed	No	Post	14 21	-	der14;21	3 PN
IPB-9	Fixed	No	Post	Undiagnosed	-	No result	Lysed
IPB-10	Fixed	No	Post	21 der14;21	-	14	Artefactual hatched 2 PN
IPB-11	Fixed	No	Post	21 14	-	der14;21	1 PN
IPB-12	Lost during biopsy	-	Post	-	-	-	Fertilized
IPB-13	Fixed	No	Post	Undiagnosed	-	No result	Fertilized
IPB-14	Fixed	No	Post	21 14sc	-	der14;21	Fertilized and transferred
IPB-15	Fixed	No	Post	Undiagnosed	-	No result	Fertilized
Case n: 45,XX,der(13;14)(q10;q10)							
IPB-1	Fixed	No	-	der13;14	-	13 14	Damaged during biopsy
IPB-2	Lost during fixation	-	Post	-	-	No result	Fertilized*
IPB-3	Fixed	Yes	Post	13 der13;14	-	Unbalanced	Fertilized
IPB-4	Lost during fixation	-	Post	-	-	No result	Unfertilized
Case p: 45,XX,der(13;14)(q10;q10)							
IPB-1	Fixed	Yes	Pre	13	-	14 der13;14	Fertilized
IPB-2, Bli-2	Lost during fixation	-	Pre	-	14 der13;14	14 der13;14	Fertilized
IPB-3, Bli-3	Lost during biopsy	-	Pre	-	14 der13;14	14 der13;14	Fertilized
IPB-4	Fixed	Yes	Pre	13 der13;14	-	14	Fertilized
IPB-5	Fixed	Yes	Pre	14 der13;14	-	13	Degenerated
IPB-6, Bli-6	Fragmented	-	Pre	-	Alternate	Alternate	Fertilized and transferred
IPB-7, Bli-7	Lost during fixation	-	Pre	-	Undiagnosed	No result	Fertilized
IPB-8	Fixed	Yes	Pre	der13;14	-	13 14	Fertilized
IPB-9	Fixed	Yes	Pre	der13;14	-	13 14	Degenerated
IPB-10	Fixed	Yes	Pre	14	-	13 der13;14	3 PN
IPB-11, Bli-11	Fragmented	-	Pre	-	Unbalanced	Unbalanced	Fertilized
IPB-12	Fixed	Yes	Pre	13 der13;14	-	14	Degenerated
IPB-13, Bli-13	Lost during biopsy	-	Pre	-	Unbalanced	14 der13;14	Fertilized
IPB-14	Fixed	Yes	Pre	13 14	-	der13;14	Fertilized and transferred
Case q cycle 1: 45,XX,der(13;14)(q10;q10)							
IPB-1, Bli-1	Fixed	Yes	Pre	Undiagnosed	13 der13;14	13 der13;14	Fertilized
IPB-2	Lost during fixation	-	Pre	-	-	13 der13;14	Unfertilized*
Case q cycle 2: 45,XX,der(13;14)(q10;q10)							
IPB-1	Fixed	Yes	Pre	der13;14	-	13 14	Fertilized and transferred
IPB-2, Bli-2	Fixed	Yes	Pre	0	-	13 14 der13;14	Fertilized

*Transferred by decision of the couple on day 3

*Fixed and analysed by FISH

Bli = blastomere; ICSI = intracytoplasmic sperm injection; IPB = first polar body; PN = pronucleus; sc = separated chromatids.

the IPB when it has become completely detached from the oocyte (otherwise, the membrane may be ruptured), but as soon as possible after ICSI (<30 min), because the IPB must be biopsied before the 2PB is extruded.

Once biopsied, the IPB and its corresponding oocyte are placed in numbered, but separate drops of medium. The reason for using separate drops is that, in a single drop, one cell may be damaged while handling the other. The drops are prepared with freshly

filtered medium, to avoid the presence of debris that could be confused with the IPB.

The hypotonic shock needed to obtain chromosome spreads should also be performed as quickly as possible. To that end, treatment with 1% trisodium citrate for 10 min (Durban *et al.*, 1998) was changed to a treatment with 0.5% trisodium citrate for 5 min. In clinical cases, use of the long hypotonic treatment led to only 17.3% of spreads having a preserved chromosome

M.Durban *et al.***Table II.** Clinical case results: preimplantation genetic diagnosis (PGD) of reciprocal translocations using IPB biopsy

Oocytes analysed	IPB	Preserved IPB chromosome morphology	ICSI versus biopsy	IPB diagnosis	Blastomere diagnosis	Oocyte or embryo diagnosis	ICSI result and transfer
Case H: 46,XX,t(4;12)(q22;q23)							
IPB-1	Lost during biopsy	-	-	-	-	Lost during fixation	Not inseminated*
IPB-2	Fixed	No	Post	der12	-	4 der4 12	Degenerated
IPB-3	Lost during biopsy	-	-	-	-	Lost during fixation	Not inseminated*
IPB-4	Fixed	Yes	Post	der4 der12	-	4 12	Artefactual hatched 2 PN
IPB-5	Fragmented	-	-	-	-	12 der12	Not inseminated*
IPB-6	Fixed	No	Post	0	-	4 der4 12 der12	Unfertilized
IPB-7	Fixed	No	Post	0	-	4 der4 12 der12	Fertilized
IPB-8	Fixed	No	Post	Undiagnosed	-	No result	Artefactual hatched and unfertilized
IPB-9	Fixed	Yes	Post	4 der4 der12	-	12	Fertilized
IPB-10	Lost during fixation	-	-	-	-	12 der12	Not inseminated*
IPB-11	Lost during fixation	-	-	-	-	12 der12	Not inseminated*
IPB-12	Fixed	No	-	4 12 der4	-	der12	Not inseminated*
IPB-13	Fixed	No	-	4 der4	-	12 der12	Not inseminated*
IPB-14	Fixed	No	Post	12 der4 der12	-	4	Degenerated
IPB-15	Lost during fixation	-	-	-	-	Not analysable	Not inseminated*
IPB-16	Fixed	Yes	Post	Undiagnosed	-	No result	Fertilized
Case I: 46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)							
IPB-1	Fixed	Yes	Pre	1 18 der18	-	der1	Unfertilized*
IPB-2	Fixed	Yes	Pre	der1 der18	-	1 18	Unfertilized*
IPB-3	Lost during fixation	-	Pre	-	-	der1 18	1 PN*
IPB-4, Blt-4	Fixed	Yes	Pre	Undiagnosed	Undiagnosed	Undiagnosed	Fertilized
IPB-5	Fixed	Yes	Pre	1 der18	-	der1 18	Unfertilized*
IPB-6, Blt-6	Lost during fixation	-	Pre	-	Undiagnosed	Undiagnosed	Unfertilized*
IPB-7	Fragmented	-	-	-	-	Undiagnosed	1 PN*
IPB-8	Fixed*	No	Pre	Undiagnosed	-	1 der18	Unfertilized*
IPB-9	Fixed	Yes	Pre	18 der18	-	1 der 1	3 PN*
IPB-10	Lost during biopsy	-	Pre	-	-	Undiagnosed	Degenerated*

*Fixed and analysed by FISH.

*Matured *in vitro* on day 0.

Blt = blastomere; ICSI = intracytoplasmic sperm injection; IPB = first polar body; PN = pronucleus.

morphology. By comparison, using the short hypotonic treatment led to 94.1% of the preparations having a preserved chromosome morphology.

Fixation is also a crucial step in obtaining good quality chromosome preparations. The fixative is placed on the slide and allowed to spread while evaporating; in this way, artefactual chromosome losses are reduced to a minimum. However, higher quality preparations of fixed IPBs were also obtained when a change was made from using a solution of ethanol:acetic acid (1:1) at room temperature to using a methanol:acetic acid (1:1) solution prepared at least one month in advance and kept in the freezer at -20°C. The use of cold fixative is a classic approach. The reason why a fixative prepared in advance spreads better is unknown, but it is recommended that the fixative is tested on a clean, empty slide before being used to fix fresh IPBs; moreover, it should only be used if spreading is satisfactory. It is also recommended that the fixative be added as soon as the drop of hypotonic solution begins to dry. In this way, the IPB is fixed *in situ*, and the risk of losing the IPB or some chromosomes is almost completely eliminated.

In order to increase the efficiency of FISH, it is important to eliminate membrane and cytoplasmic remnants (Creslak *et al.*, 2000). This is done by treating the slide with pepsin (Sigma, Spain) at 50 µg/ml in HCl 10 mmol/l at 37°C for 0.5–5 min, rinsing at room temperature with purified water, and allowing the slide to air-dry before adding a drop of freshly prepared Carnoy's fixative (methanol:acetic acid, 3:1). After cleansing, the slide is checked under phase contrast microscopy, and the protocol repeated if membrane remnants are still present. Before performing the first and second rounds of FISH, the preparations are treated with 50 mmol/l MgCl₂/PBS for 5 min, post-fixed with 1% formaldehyde in 50 mmol/l MgCl₂/PBS for 10 min, cleansed in PBS for 5 min, and then dehydrated in 70, 80 and 95% ethanol (5 min each) to better preserve the morphology of the chromosomes during the following, successive rounds of FISH.

Images are captured under phase contrast and also after 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, because in these images the morphology of the chromosomes is well preserved. To that end, slides are stained with a 25% DAPI II (Vysis, New York, USA)/75% Antifade (Vectashield, CA, USA) solution for

PGD in carriers of balanced translocations by IPB analysis

Table III. Robertsonian translocations: patient data and IPB biopsy

Pt. no.	Reference	Female karyotype	Age (years)	SA (n)	COC (n)	Biopsy technique	IPBs biopsied (n) ^a
a	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	–	–	–	PZD	32
b	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	–	–	–	PZD	21
c	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	–	–	101	PZD	32
d	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	–	–	–	PZD	16
e	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	–	PZD	11
f	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	–	PZD	13
g	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	–	PZD	15
h	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	77	PZD	15
i	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	–	PZD	11
j	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	–	PZD	6
k	Munné <i>et al.</i> (2000)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	–	–	–	PZD	8
m	Present study	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	32	3	15	Laser	13
n	Present study	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	37	5	5	Laser	4
p	Present study	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	37	4	18	Laser	12
q	Present study	45,XX,der(13;14)(q10;q10) ^b	36	0	4	PZD	4

^aFragmented IPBs are not included.

^bReferred to the couple because her sister experienced three spontaneous abortions and had two children who were carriers of the translocation.

COC = cumulus-oocyte complex; IPB = first polar body; PZD = partial zona dissection; SA = spontaneous abortion.

Table IV. Reciprocal translocations: patient data and IPB biopsy

Pt. no.	Reference	Female karyotype	Age (years)	SA (n)	COC (n)	Biopsy technique	IPBs biopsied (n) ^a
A	Munné <i>et al.</i> (1998a)	46,XX,t(4;14)(p15;q24)	37	2	8	PZD	6
B	Munné <i>et al.</i> (1998b)	46,XX,t(7;20)(q22;q11.2)	28	4	8	PZD	8
C	Munné <i>et al.</i> (1998b)	46,XX,t(14;18)(q22;q11)	36	5	18	PZD	8
D	Munné <i>et al.</i> (1998c)	46,XX,t(12;20)(p13.1;q13.3)	43	1	9	PZD	2
E	Munné <i>et al.</i> (1998d)	46,XX,t(11;16)(q21;q22)	32	5	19	PZD	19
F	Willadsen <i>et al.</i> (1999)	46,XX,t(9;11)(p24;q12)	37	>2	6	PZD	5
G	Willadsen <i>et al.</i> (1999)	46,XX,t(11;16)(q21;q22)	31	>2	11	PZD	11
H	Present study	46,XX,t(4;12)(q22;q23)	35	2	16	Laser	15
I	Present study	46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	35	2	10	Tynde	9

^aFragmented IPBs are not included.

COC = cumulus-oocyte complex; IPB = first polar body; PZD = partial zona dissection; SA = spontaneous abortion.

5 min. To remove DAPI, slides are rinsed in 0.1% Tween 20/2×SSC at room temperature under constant agitation for 5 min, dehydrated in 70, 80 and 95% ethanol (5 min each), and then air-dried.

FISH is performed in different rounds and using different probes depending on the characteristics of the chromosome reorganization. Note that even in cases of poorly spread IPB chromosome complements it is possible to distinguish separated chromatids using painting probes (Figure 1e). In most cases, the first round of FISH is carried out using the appropriate combination of centromere, telomere and/or locus-specific probes, and the second round using WCP probes. In this way, it is usually possible to diagnose all successfully fixed IPBs. If needed, the diagnosis can be confirmed by PGD using blastomere biopsies. However, in some cases the translocation can be so terminal that it will not be detected with WCP probes, or even telomeric probes. In these cases, probes specifically produced for the region(s) involved may be used (Munné *et al.*, 1998c).

Clinical application and review of results

Until now, and including our own experience, only 24 cases of female translocation carriers using IPB analysis have been performed. Eighteen cases had been reported in the literature: 11 Robertsonian translocations (Munné *et al.*, 2000) (Table III, cases a–k) and seven reciprocal translocations (Munné *et al.*, 1998a–d; Willadsen *et al.*, 1999) (Table IV, cases A–G). So far, we have had the opportunity to analyse using PGD of IPBs in four female carriers of Robertsonian translocations (Table III, cases m, n, p and q) and in two female carriers of a reciprocal translocation (Table IV, cases H and I). Full details of these cases are given in Tables I and II. The protocol was progressively changed to include the modifications detailed above, which were used in full only in cases p and q (Table III), and in case I (Table IV). In a recent report (Cieslak *et al.*, 2000), the authors referred to several cases studied, but gave no details on the results from any of them.

M.Durban *et al.*

Table V. Robertsonian translocations: results of IPB analysis

Pt no.	IPBs biopsied ^a	Probes	No. of oocytes			
			Normal (%)	Balanced (%)	UnB (%)	ND (%) ^b
a	32	WCP14, WCP21 ^c	9 (28.1)	8 (25.0)	11 (34.3)	4 (12.5)
b	21	WCP14, WCP21	7 (33.3)	1 (4.7)	11 (52.3)	2 (9.5)
c	32	WCP14, WCP21	10 (31.2)	4 (12.5)	10 (31.2)	8 (25.0)
d	10	WCP14, WCP21	6 (37.5)	5 (31.2)	4 (25.0)	1 (6.2)
e	11	WCP13, WCP14 ^d	6 (54.5)	1 (9.0)	4 (36.3)	0
f	13	WCP13, WCP14	9 (69.2)	3 (23.0)	1 (7.6)	0
g	15	WCP13, WCP14	3 (20.0)	2 (13.3)	6 (40.0)	4 (26.6)
h	13	WCP13, WCP14	4 (30.7)	4 (30.7)	5 (38.4)	0
i	11	WCP13, WCP14	7 (63.6)	0	2 (18.1)	2 (18.1)
j	6	WCP13, WCP14	2 (33.3)	0	3 (50.0)	1 (16.6)
k	8	WCP13, WCP14	4 (50.0)	2 (25.0)	1 (12.5)	1 (12.5)
m	13	WCP14, WCP21	0	3 (23.0)	4 (30.7)	6 (46.1)
n	4	R1:LSI13, Tel14q/R2: W13, W14	0	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)
p	12	R1:LSI13, Tel14q/R2: W13, W14	1 (8.3)	2 (16.6)	5 (41.6)	4 (33.3)
q	4	R1:LSI13, Tel14q/R2: W13, W14	1 (25.0)	0	1 (25.0)	2 (50.0)

^aFragmented IPBs are not included.^bIPBs lost during biopsy or fixation, or FISH not informative.^cAn LSI13 or LSI21 probe was also added in some cases when it became available.

IPB = first polar body; ND = no diagnosis; UnB = unbalanced.

Probes: WCP, LSI, CEP, Tel (Vysis); W (Cambio); cep, 4ptel, wcp (Oncor).

Table VI. Reciprocal translocations: results of IPB analysis

Pt no.	IPBs biopsied ^a	Probes	No. of oocytes			
			Normal (%)	Balanced (%)	UnB (%)	ND (%) ^b
A	6	WCP4, 4ptel, wcp14	0	2 (33.3)	3 (50.0)	1 (16.6)
B	8	WCP7, CEP7, WCP20, cep20	0	3 (37.5)	3 (37.5)	2 (25.0)
C	8	WCP14, WCP18, CEP 18	1 (12.5)	1 (12.5)	3 (37.5)	3 (37.5)
D	2	CEP12, YACs 858D9, 923C8	1 (50.0)	0	1 (50.0)	0
E	19	WCP11, CEP11, CEP16	5 ^c (26.3)	1 (5.2)	5 (26.3)	8 (42.1)
F	5	WCP9, CEP9, WCP11, 11qtel	0	2 (40.0)	0	3 (60.0)
G	11	WCP11, CEP11, WCP16	3 ^d (27.2)	1 (9.0)	3 ^e (27.2)	4 (36.3)
H	15	R1: CEP4, CEP12/R2: W4, W12	0	1 (6.6)	7 (46.6)	7 (46.6)
I	9	R1: Tel18q, CEP18, W18/ R2: W1, W18	1 (11.1)	0	3 (33.3)	5 (55.5)

^aFragmented IPBs are not included.^bIPBs lost during biopsy or fixation, or FISH not informative.^cTwo as a result of chromatid recombination.^dOne as a result of recombination between chromatids and not whole chromosomes.^eOne haploid IPB = first polar body; ND = no diagnosis; UnB = unbalanced.

In our cases, a total of 80 oocytes was recovered from six patients. Of these oocytes, 63 (78.7%) were mature, and 57 of them could be processed for IPB analysis, while six were fragmented IPBs (Tables I and II). The remaining oocytes were either lysed during removal of the cumulus cells (8.7%) or immature oocytes (12.5%). In four cases IPB biopsy was carried out drilling the ZP with a laser beam, in one case it was carried out by PZD, and in another case using acid Tyrode's.

In summary, PGD by IPB analysis has been used in 24 female translocation carriers: 325 COCs have been obtained (220 from Robertsonian translocation carriers and 105 from reciprocal translocation carriers), 294 (90.5%) of the oocytes were biopsied

(211 from Robertsonian translocation carriers and 83 from reciprocal translocation carriers), and 224 (68.9%) of the oocytes were diagnosed by FISH (174 from Robertsonian translocation and 50 from reciprocal translocation carriers).

The FISH strategies used so far include WCP (Table V; cases a-k and m) (Figure 1f and g) combined with telomere, centromere or locus-specific probes in a single hybridization round (Table VI; cases A-G) or in two successive hybridization rounds (Table V; cases n-q; cases H and I).

In Robertsonian translocations, the percentages of IPB diagnosis have been ~80%, with three cases reaching 100% (Table VII). In reciprocal translocations (Table VIII) the

PGD in carriers of balanced translocations by IPB analysis

Table VII. Robertsonian translocations: preimplantation genetic diagnosis (PGD) using IPB biopsy

Pt no.	IPB diagnosis ^a	Embryos transferred	Pregnancy	Outcome
a	87.5			
b	90.4			
c	75.0			
d	93.7			
e	100.0			
f	100.0			
g	73.3			
h	100.0			
i	81.8			
j	83.3			
k	87.5			
m	53.9	1	0	-
n	50.0	0 ^b	-	-
p	75.0	2 ^c	1	SA, 7th week
q	50.0	0+1 ^d	-	-

Authors summarized 16 cycles of PGD using IPB biopsy from 11 patients. Seven achieved pregnancy after 41 embryo transfers with 13 implantation sacs. One pregnancy (two fetuses) was ongoing, and of 11 fetuses, nine were chromosomally normal and two were balanced.

Table VIII. Reciprocal translocations: preimplantation genetic diagnosis (PGD) using IPB biopsy

Pt no.	IPB Diagnosis ^a	Embryos transferred	Pregnancy	Outcome
A	83.4	0+2 ^b	1	SA, 7th week
B	75.0	2	2	2 babies
C	62.5	0	-	-
D	100.0	1	0	-
E	57.9	0+0 ^b	0	-
F	40.0	1	1	1 baby
G	63.6	1	1	-
H	53.4	0	-	-
I	44.4	0	-	-

^aFragmented IPBs are not included.

^bTwo cycles of PGD and two embryo transfers.

SA = spontaneous abortion.

Table IX. Comparison between the observed segregation in oocytes or embryos from female reciprocal translocation carriers and the frequency of one or more interstitial chiasma in each arm involved in the reorganization

Female karyotype	Type of cell	Diagnosed cells	Type of segregation							Interstitial chiasmata (%) ^a		Non-disjoined homologues (%) ^b		Reference		
			Nor	Bal	Ad1	Ad2	3:1A	3:1B	4:0	ND or mosaic	A	B	A		B	
46,XX,t(11;16)(q21;q22)	IPB, Btt	17	2	6	2	1	3	1	1	1	1	24.0	2.0	17.6	23.5	Munné et al. (1998d)
46,XX,t(5;8)(p13;p23)	Btt	9	2	0	3	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	Pierce et al. (1998)
46,XX,t(6;21)(q13;q22.3)	Btt	9	1	0	2	1	2	3	0	0	55.0	5.0	44.4	22.2	Conn et al. (1999)	
46,XX,t(11;16)(q21;q22)	IPB, Btt	10	4	2	2	0	1	1	0	0	24.0	2.0	10.0	10.0	Willadsen et al. (1999)	
46,XX,t(4;12)(q22;q23)	IPB	11	1	0	0	4	3	1	2	0	81.0	52.0	81.8	63.8	Present study	

^aFrequencies of cells with one or more chiasma in the interstitial region on the arm of either chromosome A or B involved in the reorganization (Laurie and Hublin 1985a,b).

^bFrequencies of cells showing a segregation with non-disjunction for either chromosomes A or B.

Ad1 = adjacent 1; Ad2 = adjacent 2; Bal = balanced; Diag. = diagnosed; hom. = homologues; ND = no diagnosis; Nor = normal.

percentages of IPB diagnosis have varied considerably, from 40 to 80%, with a single case in which only two oocytes were biopsied and diagnosis was possible in both (100%).

Tables V and VI show the well-known tendency of many female carriers of balanced translocations to produce high percentages of unbalanced oocytes, which cannot be used for fertilization or, if fertilized, result in abnormal embryos which also cannot be transferred.

Summarising data of PGD by IPB analysis in reciprocal translocation female carriers, 60.3% (105/174) of the oocytes diagnosed were either normal ($n=69$) or balanced ($n=36$), while 39.7% (69/174) were unbalanced.

With regard to Robertsonian translocations (Table V), 10 cases of Rob (13;14) and five cases of Rob (14;21) have been studied (Munné et al., 2000). As can be seen in Table V, the percentage of

unbalanced oocytes varied widely, from 7.6 to 52.3%, although in most cases the frequency of unbalanced oocytes ranged from 25 to 40%. Summarising data of PGD by IPB analysis in Robertsonian translocations, 44% (22/50) of the oocytes diagnosed were either normal ($n=11$) or balanced ($n=11$), while 56% (28/50) were unbalanced.

It should be noted that in Robertsonian translocations, if the number of oocytes available for biopsy is high (i.e. >10), the percentage of diagnosed IPBs tends to be higher than the mean (80%) (Table VII). On the other hand, in reciprocal translocations the percentage of diagnosed oocytes does not increase with the number of oocytes available.

PGD using IPB biopsy, as a consequence, provides information from a large number of the oocytes including those that ultimately will not be fertilized, thus allowing for more reliable genetic

M.Durban *et al.*

counselling. Summarising all the cases in which PGD of 1PB biopsies was used, 76.2% (224/294) of the oocytes biopsied were diagnosed.

As indicated above, after PGD using 1PB biopsy it is possible to carry out a PGD using blastomere biopsies in those embryos not diagnosed due to different causes (fragmented 1PB, 1PB lost during biopsy, 1PB lost during fixation, 1PB showing chromosomes with two different chromatids after a meiotic recombination process, or 1PB with non informative FISH). To date, PGD in 1PB biopsies has been used in combination with blastomere biopsies in six cases (Table IV, case E from Munné *et al.*, 1998c; Table IV, cases F and G from Willadsen *et al.*, 1999; and Table IV, case I and Table III, cases p and q of the present report). In five of these (all except case I) the 1PB biopsy was performed using the laser system or PZD; the frequency of undiagnosed oocytes after 1PB analysis was 43.3% (23/53), a percentage that was reduced to 16.9% (9/53) after PGD blastomere analysis. Only three embryos were diagnosed as normal or balanced after the double biopsy procedure, and were finally transferred. Two of them implanted, with one producing a normal, full-term pregnancy, indicating that embryo development was not affected. However, many more cases will have to be analysed to draw reliable conclusions.

To date, and using PGD by 1PB analysis, 52 embryos have been transferred, 19 implanted, and 17 gave a positive heart beat test (pregnancy rate 32.7%). The ESHRE PGD Consortium (2000) considered 175 cases carriers of a chromosome disorder performed by PGD using blastomere analysis; 308 embryos were transferred, 40 implanted and 30 gave a positive heart beat test (pregnancy rate 9.7%).

Theoretical considerations on chromosome segregation

In Robertsonian translocations there is no correlation between the number of chiasmata and the type of segregation, because the number of chiasmata in the trivalent does not depend on the presence of recombination hot spots. The resolution of chiasmata is not interfered with, by the presence of centromere regions, and segregation depends on the orientation of the centromeres.

Otherwise, in reciprocal translocations the presence of a high frequency of recombination between homologues could favour the adjacent II type of segregation following the mechanism proposed (Lamb *et al.*, 1996) to explain one of the origins of non-disjunction, while the presence of open configurations would favour the 3:1 and 4:0 types of segregation. Thus, the segregation resulting from the resolution of the quadrivalent could be influenced by the presence of an increased number of chiasmata in one or both interstitial regions, and by the presence or absence of chiasmata in the pairing regions of the quadrivalent.

We have tried to determine if a correlation exists between the presence of recombination hot spots in the interstitial segments of these reciprocal translocations in which at least nine oocytes had been diagnosed, and the type of segregation observed (Table IX). Since no data on recombination frequencies for the female karyotype exist, we have used published data (Laurie and Hultén, 1985a,b) in the male karyotype at metaphase I. The data should be valid, taking into account that the only regions in which the

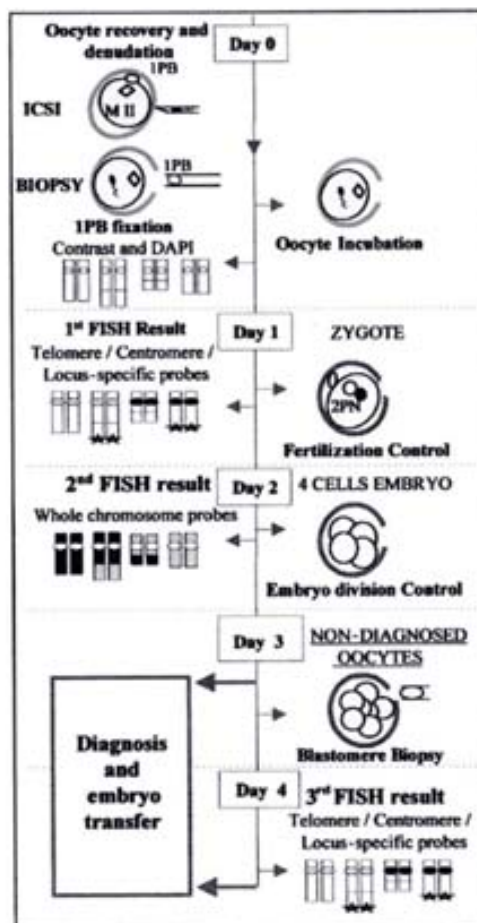


Figure 2. Proposed preimplantation genetic diagnosis (PGD) protocol. If FISH of the 1PB is not informative, or one of the chromatids shows recombination, a blastomere biopsy is performed.

human male has a higher frequency of recombination than the human female are the terminal telomeric regions (Ledbetter, 2000). By applying Pearson's correlation test to the frequency of non-disjunction of homologues in each translocation and the frequency of chiasmata in the interstitial segments (Laurie and Hultén, 1985a,b), a correlation coefficient of 0.8698 ($P < 0.01$) was found, which was highly significant. Thus, it is suggested that resolution of the quadrivalent and segregation of the chromosomes involved in the translocation is highly related to the presence or absence of interstitial chiasmata. This is supported by the absence of adjacent II segregation in one reported case of a translocation 46,XX,t(5;8)(p13;q23) in which the frequency of interstitial chiasmata in the chromosomes involved was zero (Pierce *et al.*, 1998).

Conclusions

These conclusions are based on our personal experience with PGD using 1PB biopsy and on previously published data (Munné *et al.*, 1998a-c, 2000; Willadsen *et al.*, 1999). The following considerations (see also Figure 2) can be useful to obtain a higher fertilization and diagnostic efficiency, as well as better 1PB chromosome preparations. Other equally valid diagnostic strategies can also be found (Munné *et al.*, 1998a-c, 2000; Willadsen *et al.*, 1999).

First, in our hands it is useful to perform ICSI in all oocytes with an apparently normal 1PB previous to PZD or laser biopsy. Second, it seems adequate to remove the 1PB once detached from the oocyte, using a smooth-opening pipette with a diameter slightly larger than the 1PB. Third, as hypotonic treatment it is most effective to use 0.5% trisodium citrate for 5 min, whilst methanol:acetic acid (1:1) which has been kept in the freezer is most effective as a fixative. Fourth, it is a good strategy to obtain phase contrast microscopy and DAPI images before FISH is applied. Subsequently, centromere, locus-specific, yeast artificial chromosomes, telomere or WCP probes for the chromosomes involved in the translocation can be used. Fifth, in case of undiagnosed oocytes due to fragmented 1PBs, 1PBs lost during biopsy or fixation, or even in cases in which the 1PB seems to have recombinant chromatids, it is possible to perform blastomere biopsy.

As a final conclusion, in female carriers of chromosome reorganizations, PGD using 1PB seems to be at least as good an approach as PGD of blastomeres, to select the oocytes to be fertilized. To date, the results obtained using PGD of 1PBs are far better than those obtained using blastomere biopsies, although this might be related to the characteristics of the translocations analysed, to a different behaviour of the translocation depending on the sex of the carrier, or even to chance, taking into account the low number of embryos transferred using these two procedures.

Acknowledgements

For the provision of control oocytes, the authors thank Des J.Sarquella, J.M^a Gely and L.C.Pous-Ivern (Cl. de Reproducció Assistida, Cl. Quirón, Barcelona); A.Laiz, J.Elizalde, A.Lara and M.Ciriza (Instituto Navarro de Ginecología, Pamplona); J.J.Cabero (Dpt de Ginecología i Obstetrícia de l'H. de la Vall Hebrón and Cl. del Romei, Barcelona); M.Lafont and A.Fresnadillo (Dpt de Ginecología i Obstetrícia de l'H. Mútua de Terrassa, Terrassa); S.Marina (CEFER, Cl.Tekón, Barcelona); D.Company (IMER, Barcelona); J.J.Espínola, I.Baguñà and L.C.Carbonell (Cl. Delfos and H. de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona) and A.M^a Espín (H. Sant Joan de Déu, Barcelona). For clinical cases, they thank Des A.Veiga, I.Belil and P.N.Barrí (Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Barcelona), M.Carrera (Centro de Patología Celular, Institut Universitari Dexeus, Barcelona), E.Vidal and J.Balazsch (Servei de Reproducció Assistida, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona), J.Santolá (U. Biología Celular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra), and M.Fernández and A. de la Fuente (U. FIV, Fundación Jiménez Díaz, Madrid) for their collaboration in the project. This work has been performed with financial support from Fundació Catalana Síndrome de Down/Marató TV3 (1994-98), FIS (98/0031-02, 1998-00) and CIRIT (1997-SGR-00030), Spain.

References

- Blake, M., Garrisi, J., Tomkin, G. *et al.* (2000) Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil. Steril.*, **73**, 31-37.
Boada, M., Carrera, M., De la Iglesia, C. *et al.* (1998) Successful use of a laser

PGD in carriers of balanced translocations by 1PB analysis

- for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **15**, 302-307.
Cieslak, J., Eviskov, S., Ivakhenko, V. *et al.* (2000) Preimplantation diagnosis for maternally and paternally derived translocations using conversion of single blastomeres and second polar bodies into interphase chromosomes. *Hum. Reprod.*, **15** (Abstracts Book 1), 48.
Conn, C.M., Harper, J.C., Winston, R.M.L. and Delhanty, J.D.A. (1998) Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum. Genet.*, **102**, 117-123.
Dailey, T., Dale, B., Cohen, J. *et al.* (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 176-184.
Darban, M., Benet, J., Sarquella, J. *et al.* (1998) Chromosome studies in first polar bodies from hamster and human oocytes. *Hum. Reprod.*, **13**, 583-587.
Dyban, A., Freidline, M., Severova, E. *et al.* (1996) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent *in situ* hybridisation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 73-78.
ESHRE PGD Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection II (May 2000). *Hum. Reprod.*, **15**, 2673-2683.
Eviskov, S. and Verlinsky, Y. (1999) Visualisation of chromosomes in single human blastomeres. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **16**, 133-137.
Germond, M., Nocera, D., Senn, A. *et al.* (1995) Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48 µm diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil. Steril.*, **64**, 604-611.
Grossmann, M., Calafell, J.M., Veiga, A. *et al.* (1995) The use of okadaic acid to induce premature DNA condensation both in mouse and human embryos. *Chrom. Res.*, **3** (Suppl.1), 115.
Harderson, T., Lundin, K. and Hamberger, L. (2000) The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum. Reprod.*, **15**, 1372-1376.
Lamb, N.L., Freeman, S.B., Avage-Austin, A. *et al.* (1996) Susceptible chiasmate configuration of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature Genet.*, **14**, 400-405.
Laurie, D.A. and Hultén, M.A. (1985a) Further studies on bivalent chiasma frequency in human with normal karyotype. *Ann. Hum. Genet.*, **49**, 189-201.
Laurie, D.A. and Hultén, M.A. (1985b) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann. Hum. Genet.*, **49**, 203-214.
Ledbetter, D.H. (2000) FISH and 'Cytogenetic Chip' technology for detection of cryptic deletions and translocations. 10th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Abstracts Book, ISPD, Barcelona University Press, p. 50.
Malter, H.E. and Cohen, J. (1989) Partial zona dissection of the human oocytes: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona penetration. *Fertil. Steril.*, **51**, 139-148.
Márquez, C., Cohen, J. and Munné, S. (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies using spectral karyotyping. *Cytogenet. Cell Genet.*, **81**, 254-258.
Munné, S. (2000) Diagnosis of translocations with FISH. Spectral karyotyping. Abstract no S-32. 10th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Abstracts Book, ISPD, Barcelona University Press, pp. 105-107.
Munné, S., Lee, A., Rosenwaks, Z. *et al.* (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, **8**, 2185-2191.
Munné, S., Scott, R., Sable, D. and Cohen, J. (1998a) First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil. Steril.*, **69**, 675-681.
Munné, S., Morrison, L., Fung, J. *et al.* (1998b) Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **15**, 290-296.
Munné, S., Fung, J., Cassel, M.J. *et al.* (1998c) Preimplantation genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis. *Hum. Genet.*, **102**, 663-674.
Munné, S., Muhterem, B., Schimmel, T. *et al.* (1998d) Case report: chromatid exchange and prodivision of chromatids as other sources of abnormal oocytes detected by preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Prenat. Diagn.*, **18**, 1450-1458.
Munné, S., Escudero, T., Sandalinas, M. *et al.* (2000) Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet. Cell Genet.*, **90**, 303-308.
Pierce, K.E., Fitzgerald, L.M., Seibel, M.M. and Zilberstein, M. (1998) Preimplantation genetic diagnosis of chromosomes balanced in embryos

M.Durban et al.

- from a patient with a balanced reciprocal translocation. *Mod. Hum. Reprod.*, **4**, 167-172.
- Report of the 9th Annual Meeting of the International Working Group on Preimplantation Genetics, in association with the 11th IVF Congress, Sydney, Australia, May 10, 1999 (2000) Preimplantation Genetic Diagnosis – an integral part of assisted reproduction. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **17**, 75-79.
- Sagata, N. (1996) Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.*, **6**, 22-28.
- Santaló, J., Veiga, A., Calafell, J.M. et al. (1995) Evaluation of cytogenetic analysis for preimplantation diagnosis. *Fertil. Steril.*, **64**, 44-50.
- Strom, C.M., Levin, R., Strom, S. et al. (2000) Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants. *Pediatrics*, **106**, 650-653.
- Tarkowski, A.K. (1966) An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics*, **5**, 394-400.
- Veiga, A., Sandalinas, M., Benkhalifa, M. et al. (1997) Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote*, **5**, 351-354.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidline, M. et al. (1996) Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **13**, 157-162.
- Willadsen, S., Levron, J., Munné, S. et al. (1999) Rapid visualisation of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with in-vitro matured bovine eggs. *Hum. Reprod.*, **14**, 470-475.

Received on May 18, 2001; accepted on July 25, 2001

Capítol 5: discussió



5.1 Caracterització dels complements cromosòmics de *primer corpuscle polar* (1CP)

5.1.1 Oòcit d'hàmsster: procediment metodològic d'obtenció de cromosomes d'1CP

En aquest treball s'ha desenvolupat per primera vegada un procediment de fixació específic per a obtenir i estudiar el complement cromosòmic de *primer corpuscle polar* (1CP). Aquest procediment ha permès obtenir bones extensions de complements cromosòmics en el 63,6 % d'1CP mentre que en el 36,4 % restant els complements cromosòmics han mostrat una falsa aparença de nucli interfàsic [taula R-1].

Les característiques morfològiques dels *cromosomes d'1CP*, i del corresponent oòcit, estan lligades a l'estadi meiòtic en el qual es troben: la *metafase II* (MII), propi dels oòcits madurs quan surten del fol·licle en el moment de l'ovulació o l'oocitació.

El complement cromosòmic de l'oòcit d'hàmsster presenta *vint-i-dos cromosomes* (n) amb les dues cromàtides (N) germanes separades, amb aparença ondulada i només unides pel centròmer (n = 22, N = 44) [figura R-2].

El complement cromosòmic del corresponent 1CP també presenta els vint-i-dos cromosomes amb les dues cromàtides germanes només unides pel centròmer (n = 22, N = 44) [figura R-1].

El grau d'empaquetament de la *cromatina* és menor en els cromosomes d'1CP que en els cromosomes de l'MII, a la vegada que la separació entre cromàtides germanes al nivell del centròmer és més gran en el complement cromosòmic d'1CP que en el complement cromosòmic de l'MII.

L'oòcit d'hàmsster, escollit com a model per al desenvolupament del procediment de fixació d'1CP, ha estat molt adequat ja que en el nostre grup de treball tenim gran experiència en l'obtenció d'oòcits de femelles d'hàmsster estimulades amb hormones gonadotrofines (Benet i col·l. 1986), a més que el complement cromosòmic d'hàmsster i el complement cromosòmic humà presenten similitud en el nombre de cromosomes (N = 22 cromosomes en l'oòcit d'hàmsster i N = 23 cromosomes en l'oòcit humà). També presenten similitud en la morfologia cromosòmica ja que ambdues espècies tenen un cariotip amb cromosomes metacèntrics, submetacèntrics i acrocèntrics. Per exemple, el cromosoma X d'hàmsster i el cromosoma 1 humà són ambdós metacèntrics i els més llargs del complement.

5.1.2 Oòcit d'humà: adequació del procediment metodològic d'obtenció de cromosomes d'1CP

L'any 1994 (Angell i col·l. 1994), ja havien observat extensions cromosòmiques d'1CP humà amb morfologia cromosòmica preservada, però com que es feia la fixació conjunta de l'oòcit en MII i el corresponent 1CP, aquestes bones extensions del complement cromosòmic d'1CP s'obtenien de forma esporàdica.

5.1.2.1 Aïllament de l'1CP humà

L'adequació del nostre procediment, desenvolupat per a l'estudi dels 1CP d'oòcits d'hàmsster, en primer lloc ha consistit a augmentar fins a trenta vegades la concentració de tripsina en la solució d'aïllament dels 1CP per aconseguir dissoldre adequadament la zona pel·lúcida dels oòcits humans.

5.1.2.2 Tractament hipotònic per a l'1CP humà

S'ha optat per aplicar un tractament de xoc hipotònic curt, amb citrat trisòdic 0,5 % durant cinc minuts, en lloc del tractament hipotònic llarg (citrat trisòdic a l'1,0 % durant 10 minuts) aplicat a 1CP d'oòcits d'hàmsster [vegeu l'apartat 4.6 art.1] ja que s'obtenen millors resultats. Aplicant el tractament hipotònic llarg, només el 17,3 % de les extensions cromosòmiques mostraven una morfologia cromosòmica preservada, mentre que aplicant el tractament hipotònic curt aquest percentatge és més alt (94,1 %), aquestes extensions amb morfologia cromosòmica preservada són òptimes per a l'anàlisi citogenètica posterior [taula-R2].

5.1.2.3 Procediment de fixació per a l'1CP humà

No s'han fet canvis específics per a la fixació de l'1CP humà. Com ja hem explicat, l'aplicació del fixador sobre el portaobjectes quan la solució hipotònica comença a assecat-se, fa que l'1CP quedi fixat en el portaobjectes minimitzant la pèrdua total o la pèrdua d'alguns cromosomes. Aquest procediment és crucial per obtenir extensions amb morfologia cromosòmica ben preservada, també en 1CP humà.

A més, la forma en què el fixador és afegit: a prop de l'1CP, provocant un flux suau, és imprescindible per obtenir extensions cromosòmiques amb bona qualitat, ben diferents de les obtingudes aplicant el fixador amb el mètode tradicional de Tarkowski (1966).

Emprant una solució d'etanol:àcid acètic (1:1) en comptes de la proporció clàssica (1:3), s'ha observat una reducció en el nombre de pèrdues cromosòmiques. Aquest efecte es podria explicar pel fet que, amb l'increment d'àcid acètic, l'evaporació del fixador és més lenta i, a més, s'afavoreix la ruptura de la membrana citoplasmàtica de l'1CP.

El tipus d'alcohol emprat i la temperatura del fixador també han estat considerats d'importància, la qualitat de les extensions cromosòmiques d'1CP ha estat òptima emprant una solució fixadora metanol:àcid acètic (1:1) mantinguda a -20°C preparada almenys un mes abans, en lloc d'una solució d'etanol:àcid acètic (1:1) a temperatura ambient recent preparada. De tota manera, és recomanable que prèviament al procés de fixació es provin un parell de solucions fixadores amb diferent concentració d'àcid acètic, tipus d'alcohol i també diferents temperatures per triar la que més bé llisqui sobre el portaobjectes ja que pot dependre de les condicions ambientals del laboratori en dia de la fixació.

5.1.2.4 Tractament previ del portaobjectes amb trimetoxisilà

El tractament dels portaobjectes amb trimetoxisilà abans de ser usats per fixar els 1CP, és bàsic en el procediment desenvolupat. L'aplicació d'aquest producte aconseguix que la solució fixadora llisqui més suaument i es mantingui més estona, augmentant el grau d'extensió dels cromosomes. Al mateix temps, però, l'adherència dels cromosomes al portaobjectes és més forta, la qual cosa minimitza les pèrdues cromosòmiques artefactuals que podrien tenir lloc durant el procés de fixació.

5.1.2.5 Tècnica d'anàlisi citogenètica per a l'1CP humà

Com s'ha dit anteriorment, el complement cromosòmic d'1CP, es troba en estadi de MII i els cromosomes són més curts i d'aspecte més desorganitzat o *pelut* que no pas els cromosomes de l'oòcit també en MII. És per aquest motiu que és molt difícil, o quasi impossible, identificar cromosomes concrets aplicant les tècniques de bandes G, aleshores està molt indicat aplicar la tècnica d'*hibridació in situ fluorescent* (FISH), que permet localitzar una regió cromosòmica específica per hibridació amb una sonda associada a un fluorocrom (Pinkel i col·l. 1988).

El fet que els cromosomes d'1CP es desorganitzin molt en el pas de desnaturalització de la FISH ha fet molt útil primerament, guardar imatges de les extensions cromosòmiques obtingudes, a microscòpia de contrast de fases i també tenyides amb el colorant DAPI, prèvies al tractament de la FISH. Amb aquests dos passos, a partir de la morfologia cromosòmica inicial, es facilitarà molt la identificació cromosòmica posterior.

Amb la finalitat de facilitar l'accés de les sondes d'ADN emprades en la FISH per a les diverses regions d'homologia, és molt útil eliminar les possibles restes de membrana citoplasmàtica amb un tractament amb pepsina (Cieslak i col·l. 2000).

En les nostres mans i un cop eliminades les restes citoplasmàtiques amb la pepsina, és molt adequat tractar les preparacions amb una solució de formaldehid per aconseguir preservar millor la morfologia cromosòmica.

La nostra experiència ens diu que sobre les extensions de cromosomes d'1CP, la FISH es pot fer en una, dues o fins i tot tres rondes; combinant diferents sondes adequades, per exemple, als cromosomes implicats en una reorganització: sondes puntuals o sondes que pinten cromosomes sencers.

És important remarcar que també en casos de complements cromosòmics d'1CP poc extensos, és possible distingir cromàtides separades aplicant sondes que pinten el cromosoma sencer. Això es deu principalment al fet que el material cromosòmic d'1CP està organitzat en cromosomes en MII i no en estadi interfàsic com es pensava inicialment (Verlinsky i col·l. 1996). Aconsellem que a la primera ronda de la FISH s'apliquin les sondes més puntuals: centromèriques, telomèriques i/o de seqüència única (locus específica) ja que els cromosomes estan més compactes i els senyals puntuals es visualitzen millor. A la segona ronda de la FISH ja es poden aplicar les sondes que pinten el cromosoma sencer ja que encara que els cromosomes estiguin més desorganitzats les imatges prèvies de microscòpia de contrast de fases i de DAPI són de gran ajut en la identificació.

Els nostres resultats de la FISH obtinguts en 1CP d'oòcits humans no inseminats mostren clarament que malgrat l'aspecte desorganitzat (despentinat), és possible detectar cromosomes sencers, cromàtides lliures, centròmers i seqüències úniques intersticials o terminals. En canvi, en extensions d'1CP d'oòcits envellits freqüentment no s'obtenen tan bons resultats de la FISH analitzant els mateixos cromosomes. Aquests resultats sembla que indiquen que la fragmentació de l'ADN implicada en la mort cel·lular programada (apoptosi), descrita per Takase i col·l. (1995) i Fujino i col·l. (1996) en oòcits incubats, i que comportaria pèrdua d'ADN afectaria d'alguna manera els resultats de la FISH. Aquesta pèrdua no s'observa en oòcits frescos o no afecta les regions que s'analitzen mitjançant la FISH.

5.1.2.6 Aplicació clínica del mètode d'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP humà

Amb el mètode desenvolupat, aplicat a extensions d'1CP humà, es pot plantejar adequadament l'anàlisi citogenètica indirecta d'oòcits humans mitjançant la FISH, la qual cosa permet detectar tant anomalies cromosòmiques numèriques com estructurals. Com ja s'ha dit, es poden aplicar sondes específiques centromèriques, telomèriques i de seqüència única (locus específica), a més de les sondes de pintat de cromosomes sencers, que no poden ser aplicades en nuclis interfàsics de blastòmers ja que mostren marques difoses. Això té molt d'interès quan es tracta d'oòcits de dones portadores de reorganitzacions cromosòmiques (Munné i col·l. 1998a).

5.2 Aspecte del complement cromosòmic de l'MII i del corresponent 1CP

5.2.1 Complement cromosòmic de l'MII

En els oòcits humans el complement cromosòmic està en estadi de MII i presenta els *vint-i-tres cromosomes* formats per dues cromàtides germanes ($n = 23$, $N = 46$). Els cromosomes de l'oòcit II humà estan altament condensats i són més curts que els cromosomes que s'observen en les extensions cromosòmiques de metafases mitòtiques de cultius de limfòcits de sang perifèrica. Les dues cromàtides germanes estan separades, però encara íntimament unides pels centròmers, i tenen un aspecte ondulat [figura D-1].

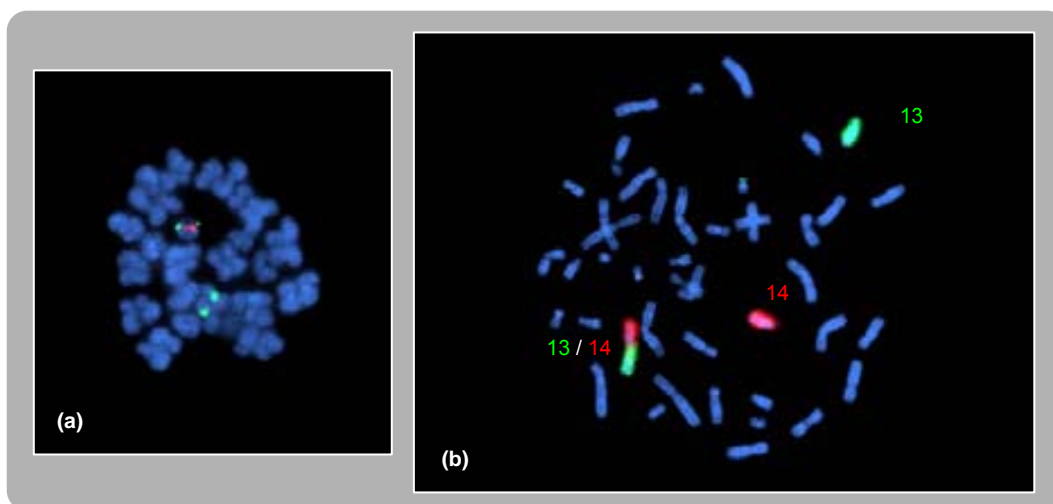


Figura D-1. (a): extensió cromosòmica d'un complement euploide d'oòcit II humà hibridada amb una sonda dual locus específica per al cromosoma 22 (verd-vermell) i amb una sonda de centròmer per al cromosoma X (verd). (b): extensió cromosòmica d'un complement de limfòcit humà procedent de sang perifèrica d'una dona 46,XX,t(13;14). Extensió hibridada amb les sondes de cromosoma sencer per als cromosomes 13 (verd) i 14 (vermell). [microscopi de fluorescència 1000x]. Vegeu l'annex 2 de l'apartat 7.

En aquests complements cromosòmics, generalment les sondes centromèriques donen un senyal gran o bé dos senyals més petits (cadascun la meitat d'un senyal gran), corresponents a les dues cromàtides de cada cromosoma homòleg. Les sondes locus específiques i telomèriques generalment donen dos senyals més o menys separats. La presència de senyals de més es considera una aneuploidia. L'absència de senyals només es considera una aneuploidia quan s'acompanya del guany de material complementari en el corresponent 1CP.

5.2.2 Complement cromosòmic de l'1CP

Hem evidenciat que els cromosomes del complement cromosòmic de l'1CP també estan en estadi de MII. El complement cromosòmic de l'1CP també té els vint-i-tres cromosomes formats per dues cromàtides germanes encara unides pel centròmer però acostumen a ser més curts que els de l'òcit II. A més, les dues cromàtides germanes de cada cromosoma solen estar més separades dels centròmers (*predivisió de cromàtides equilibrada*) que en el complement cromosòmic de l'MII. La morfologia cromosòmica de l'1CP és més desorganitzada (amb un aspecte *pelut*), amb un contorn poc definit [figura D-2]. L'estadi més desorganitzat dels cromosomes d'1CP es deu probablement al fet que aquest no està sota l'efecte del *factor promotor de la condensació cromosòmica* present en el citoplasma de l'òcit i absent en l'1CP (Sagata 1996).

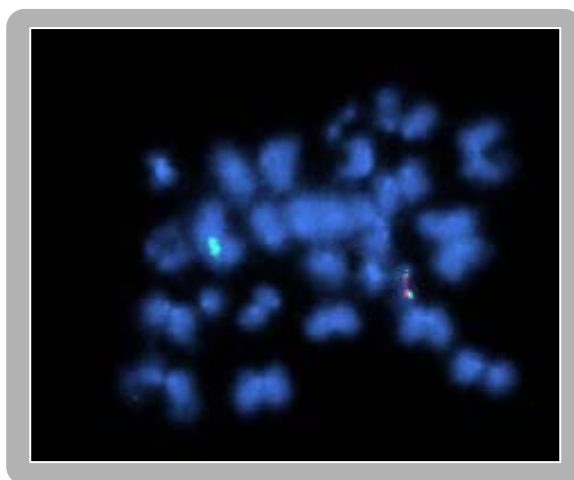


Figura D-2. Extensió cromosòmica d'un complement euploide d'1CP humà hibridada amb una sonda dual locus específica per al cromosoma 22 (verd-vermell) i amb una sonda de centròmer per al cromosoma X (verd). [microscopi de fluorescència 1000x]. Vegeu l'annex 2 de l'apartat 7.

5.3 Estudi de la complementarietat cromosòmica de l'1CP humà i la corresponent MII d'òcits madurs humans [vegeu l'apartat 4.7 art.2]

5.3.1 Complementos cromosòmics i morfologia

En el present treball s'ha fet l'estudi de *complementarietat* aplicant protocols específics de fixació per a cadascuna de les cèl·lules de les parelles *1CP-MII* procedents d'òcits madurs no inseminats (òcits frescos) i d'òcits madurs descartats postinseminació (òcits envellits), tots ells donats per les pacients. Els resultats han evidenciat que en els òcits frescos la morfologia cromosòmica de l'1CP està preservada en el 83,3 % dels òcits i s'ha obtingut el resultat citogenètic complementari en ambdues cèl·lules en tots els òcits. En canvi, en els òcits envellits la morfologia cromosòmica està preservada

únicament en el 14,6 % dels oòcits i només s'ha obtingut el resultat citogenètic complementari en ambdues cèl·lules en el 43,9 % dels oòcits. L'envelliment dels oòcits durant el cultiu in vitro influeix en el fet d'aconseguir, o no, el resultat citogenètic complementari en parelles 1CP-MII [vegeu l'apartat 4.7 art.2].

5.3.2 Estudis de complementarietat 1CP-MII: concordança, taxa d'aneuploïdia global, taxa i tipus d'aneuploïdia per al cromosoma 21 i per al cromosoma X

En el present treball hem fixat per separat l'1CP i la corresponent MII, i s'ha evidenciat que la metodologia de fixació i d'anàlisi aplicades és l'adequada ja que en un elevat percentatge (més del 90,0 %) les parelles 1CP-MII han estat concordants. La concordança entre ambdues dotacions complementàries (1CP i MII), ja havia estat descrita en estudis fets amb oòcits descartats postinseminació, però en aquests estudis es fixaven els oòcits sencers (1CP i MII conjuntament) (Munné i col·l. 1995b; Dyban i col·l. 1996; Dailey i col·l. 1996) [taules D-1 i D-2].

Taula D-1. Estudi de concordància citogenètica i d'aneuploidia fetes en parelles ICP-MII: procedència dels òcits i tècnica d'anàlisi aplicada

Referència bibliogràfica	Procedència oocitària		Pacients		Tècnica d'anàlisi aplicada en	
	Nrs.	Rang d'edats	Mitjana d'edat	ICP	MII	
ICP i MII fixats conjuntament						
Munné i col.l. (1995)	no consta	no consta	no consta	FISH 13-21*, 16 o 18 X	FISH 13-21*, 16 o 18 X	
Dalry i col.l. (1996)	no consta	25 a 45	36,2	FISH 18, 13-21* X	FISH 18, 13-21* X	
Durban i col.l. (1996)	no consta	no consta	no consta	FISH 18 X	FISH 18 X	
ICP i MII processats per separat						
Artica 2 (vegeu apartat 4.7)	MII descartats postinseminació de cicles de FIV (envellits)	no consta	no consta	FISH 21 X	FISH 21 X	
Artica 2 (vegeu apartat 4.7)	MII no inseminats (frescos)	11	30 a 35	FISH 21 X	FISH 21 X	
Pujol i col.l. (2003a)	MIVG MTV+ o MII descartats de cicles de FIVCSI (envellits)	60	18 a 45	FISH 9 cromosomes ^b	FISH 9 cromosomes ^b	
Guillemet-Mateo i col.l. (2004a)	MIVG MTV+ o MII descartats de cicles de FIVCSI (envellits)	21	21 a 41	CGH 22 cromosomes	CGH 22 cromosomes	
Guillemet-Mateo i col.l. (2004b)	MIVG MTV+ o MII descartats de cicles de FIVCSI (envellits)	46	23 a 42	CGH 22 cromosomes	FISH 9 cromosomes ^b	
Guillemet-Mateo i col.l. (2005)	MIVG MTV+ o MII descartats de cicles de FIVCSI (envellits)	34	no consta	CGH 22 cromosomes	CerM-FISH 22 cromosomes	
			33,9			

ICP (primer corpuscle polar), MII (metàfase II), VG (vesícula germinal), MTV+ (irradiació in vitro espontània), FIV (fecundació in vitro convencional), FISH (hibridació in situ fluorescent), CGH (hibridació genòmica comparada).

* per al cromosoma 13 i per al cromosoma 21 és la mateixa sonda.

^b total de ICP analitzats amb o sense parella MII corresponent.

Taula D-2. Estudi de concordància citogenètica i d'aneuploidia fetes en parelles ICP-MII: resultats citogenètics

Referència bibliogràfica	Òcits processats	Parella ICP-MII		Concordància ICP-MII (%)	Nrs. total af aneuploidia	Tipus d'aneuploidia cromosoma 21 X	Ries d'aneuploidia (%)			
		obtingudes	diagnòstiques				cr 21	cr X		
ICP i MII fixats conjuntament										
Munné i col.l. (1995)	172	80 (46,2)	76 (91,5)	92,1	689 (4 cr 7)	ND cr 13 i/o 21 (3), PO cr 13 i/o 21 (5), PO cr X (8)	no processat	0,0 vs 100,0	no processat	0,72
Dalry i col.l. (1996)	275	188 (68,4)	186 (100,0)	89,4	752 (4 cr 7)	ND cr 13 i/o 21 (10), PO cr 13 o 21 (1), ND cr X (2), PO cr X (1)	no processat	66,5 vs 33,3	no processat	0,39
Durban i col.l. (1996)	no consta	no consta	156	100,0	312	PO cr X (1)	no processat	0,0 vs 100,0	no processat	0,32
ICP i MII processats per separat										
Artica 2 (vegeu apartat 4.7)	50	41 (82,0)	41 (100,0)	96,1	82	ND cr 21 (1), PO cr 21 (1)	no processat	50,0 vs 50,0	0,0	2,4
Artica 2 (vegeu apartat 4.7)	21	18 (85,7)	18 (100,0)	100,0	36	no processat	no processat	no processat	0,0	0,0
Pujol i col.l. (2003a)	89	54 (60,7)	46 (95,1)	74,2	414	ND cr 21 (1), PO cr 21 (1), ND cr X (2), PO cr X (1)	no processat	50,0 vs 50,0	66,5 vs 33,3	0,48
Guillemet-Mateo i col.l. (2004a)	43	40 (93,0)	30 (70,0)	80,0	550	ND cr 21 (1), ND cr X (1)	*	*	*	0,36
Guillemet-Mateo i col.l. (2004b)	65	54 (81,8)	43 (77,8)	88,1	504	PO cr 21 (1), ND cr X (1)	no processat	0,0 vs 100,0	100,0 vs 0,0	0,15
Guillemet-Mateo i col.l. (2005)	48	no consta	14	93,0	256	PO cr 21 (1)	no processat	0,0 vs 100,0	0,0	0,39
			611	91,5	175					0,63

ICP (primer corpuscle polar), MII (metàfase II), Cr (cromosoma), Cr (cromosoma), ND (no detectat de cromosoma), PO (probabilitat de cromosoma equitativa), cr (cromosoma).

* Múltiplex no permet distingir entre anomalies de cromosoma i de cromàtic.

Altres autors (Pujol i col·l. 2003) han fet més estudis de concordança i aneuploïdia en parelles 1CP-MII, fixant també ambdues cèl·lules per separat i aplicant el protocol de fixació d'1CP descrit en el present treball.

En el treball citat (Pujol i col·l. 2003) s'analitzen nou cromosomes (1, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22 i X) en cinquanta-quatre parelles 1CP-MII procedents d'oòcits descartats postinseminació i d'oòcits immadurs (MI i VG) espontàniament madurats in vitro, en el qual troben *concordança* de resultats en el 74,2 % de les parelles i una taxa d'aneuploïdia global del 58,7 %. En concret, per al cromosoma 21 presenten aneuploïdia quatre parelles: en una d'elles (25,0 %) l'aneuploïdia és deguda a *no-disjunció*, amb pèrdua d'un univalent en l'1CP i guany d'un univalent en l'MII (1CP -cr 21 i l'MII corresponent +cr 21); i en les altres tres (75 %) parelles l'aneuploïdia és deguda a *separació precoç de cromàtides o predivisió*, dues parelles amb pèrdua d'una cromàtide en l'1CP i amb guany en l'MII (1CP -ct 21 i l'MII corresponent +ct 21) i una parella amb la situació contrària (1CP +ct 21 i l'MII corresponent -ct 21). Respecte al cromosoma X presenten aneuploïdia tres parelles: en dues d'elles l'aneuploïdia és deguda a *no-disjunció* amb pèrdua d'un univalent en l'1CP i amb guany d'un univalent en l'MII (1CP -cr X i MII corresponent +cr X) i a l'altra parella l'aneuploïdia és conseqüència d'una predivisió de cromàtides amb pèrdua de cromàtide en l'1CP i amb guany en l'MII (1CP -ct X i corresponent MII +ct X).

Aquests mateixos (Pujol i col·l. 2003) fan evident que tan sols un 25,8 % del que habitualment es consideren pèrdues cromosòmiques serien *artefactes* de la tècnica de fixació, mentre que pràcticament el 75,0 % restant són pèrdues cromosòmiques no artefactuals i, per tant, aneuploïdies reals. Aquests autors, a més, calculen la taxa d'aneuploïdia de cada cromosoma analitzat, respecte del nombre total de cromosomes diagnosticats i extrapolen que cadascun dels vint-i-tres cromosomes d'un oòcit té un 0,89 % de risc d'estar implicat en aneuploïdia. En concret, descriuen que per al cromosoma 21 el risc és del 0,76 % i que per al cromosoma X el risc és del 0,66 %. Si apliquem aquest càlcul en el nostre treball, el valor d'aneuploïdia observat per al cromosoma 21 seria del 2,4 % mentre que per al cromosoma X seria nul·la. La diferència podria ser deguda a variacions en el grandària de la mostra analitzada en cada estudi [taules D-1 i D-2].

Gutiérrez-Mateo i col·l. (2004a,b i 2005) analitzen també parelles 1CP i MII fixant les cèl·lules separatament, però mentre l'anàlisi per als 1CP el fan mitjançant la tècnica molecular *d'hibridació genòmica comparada* (CGH), les corresponents MIIs les analitzen mitjançant CGH, FISH convencional o *CenM-FISH*.

— La CGH és una tècnica citogenètica molecular que permet analitzar del complement cromosòmic sencer, sense la necessitat de fixar el material ni de tenir els cromosomes en metafase. La CGH es basa en la hibridació competitiva d'un ADN control marcat en verd amb l'ADN de la mostra a estudiar marcat en vermell, sobre una extensió cromosòmica de

limfòcits d'un individu control (en ADN de tumors: Kallionemi i col·l. 1992; en cèl·lules aïllades: Voullaire i col·l. 1999; Wells i col·l. 1999).

— La CenM-FISH és una variant tecnològica de la FISH que també permet la identificació de tots els cromosomes (exceptuant-ne els cromosomes 13 i 21) mitjançant 24 colors basant-se en la utilització de sondes específiques de les regions alfa satèl·lit dels centròmers (Nietzel i col·l. 2001).

Gutiérrez-Mateo i col·l. (2004a) analitzen, mitjançant la CGH, vint-i-cinc parelles 1CP-MII procedents d'òcits immadurs madurats espontàniament in vitro i procedents de dones amb cariotip normal. En aquest estudi la *concordança* 1CP-MII és del 76,0 % i la *freqüència d'aneuploidia global* és del 48,0 %. Respecte a la taxa d'aneuploidia per a un cromosoma concret, els cromosomes 21 i X mostren la taxa més elevada del complement cromosòmic (8,0 % cadascun), després del cromosoma 15 amb un 12,0 %. S'analitzen els vint-i-dos cromosomes presents en òcits humans. Tenint en compte que s'analitzen vint-i-dos cromosomes en vint-i-cinc parelles 1CP-MII i, per tant, un total de 550 cromosomes, i que només s'observa una aneuploidia per al cromosoma 21 (no-disjunció) i una aneuploidia per al cromosoma X (no-disjunció); el risc d'estar implicat en aneuploidia per al cromosoma 21 o per al cromosoma X seria del 0,008 % per a cadascun [taules D-1 i D-2].

En un altre treball, Gutiérrez-Mateo i col·l. (2004b) analitzen els 1CP per CGH i les corresponents MIIs per FISH. En quaranta-dues parelles 1CP-MII procedents d'òcits immadurs madurats espontàniament in vitro o d'òcits madurs descartats postinseminació, la *concordança* 1CP-MII és del 88,1 % i la *freqüència global d'aneuploidia* és del 57,1 %. En concret, per als cromosomes 21 i X la freqüència d'aneuploidia és del 2,4 % per a cadascun: una parella amb l'1CP amb pèrdua de cromosoma o cromàtide 21 (no distingible) i MII guany cromàtide 21; per tant, l'1CP tindria una pèrdua cromàtide (1CP –ct 21 i corresponent MII +ct 21); i una altra parella amb pèrdua de cromosoma X en l'1CP i guany en l'MII (1CP –cr X i corresponent MII +cr X). Tenint en compte que s'analitzen 22 cromosomes en 42 parelles 1CP-MII i, per tant, un total de 924 cromosomes; el risc d'estar implicat en aneuploidia per al cromosoma 21 o per al cromosoma X seria del 0,1 % per a cadascun [taules D-1 i D-2].

L'any 2005, Gutiérrez i col·l. (2005) analitzen els 1CP per CGH i les corresponents MIIs per CenM-FISH i FISH convencional (per confirmar l'aneuploidia detectada per CenM-FISH). En catorze parelles 1CP-MII procedents d'òcits immadurs madurats espontàniament in vitro i d'òcits madurs descartats postinseminació, la *concordança* 1CP-MII és del 93,0 % i la *freqüència global d'aneuploidia* és del 30,8 %. En concret, per als cromosomes 21 i X la freqüència d'aneuploidia és del 6,2 % i nul·la, respectivament. Només una parella presenta en l'1CP, pèrdua de cromosoma o cromàtide 21 (no distingible per CGH) i guany de cromàtide en l'MII; per tant, pèrdua de cromàtide en l'1CP (1CP –ct 21 i corresponent MII +ct 21). Tenint en compte que s'analitzen vint-i-dos cromosomes en tretze parelles 1CP-MII i, per tant, un total de 256 cromosomes; el risc d'estar implicat en aneuploidia per al cromosoma 21 seria del 0,39 % i nul·la per al cromosoma X [taules D-1 i D-2].

Globalment en els diferents estudis realitzats [taules D-1 i D-2] s'han analitzat 661 parelles 1CP-MII i en un 91,5 % de les quals s'observa *concordança* entre ambdós complements cromosòmics (oscil·lant entre el 74,2 % i el 100,0 %). L'elevada concordança citogenètica entre l'1CP i la corresponent MII fa evident que la segregació cromosòmica durant l'anafase I és un procés altament controlat, per tal que cada cromosoma vagi a pols oposats, generant les dues cèl·lules filles (1CP i MII) amb dotacions cromosòmiques complementàries. Això no obstant, també s'ha evidenciat que hi ha mecanismes de no-disjunció de cromosomes i de predivisió de cromàtides no equilibrada, essent aquests processos molt habituals durant la formació de les cèl·lules germinals femenines.

La taxa mitjana d'*aneuploidia global* en els diferents estudis [taula D-2] és de 17,5 %, amb una oscil·lació entre el 0,0 % i el 58,7 %. La taxa d'aneuploidia que hem trobat en òcits madurs descartats postinseminació i analitzant dos cromosomes (21 i X), és del 5,1 %. Altres autors també han trobat una taxa d'aneuploidia baixa (3,2 %), fixant conjuntament la 1CP i la corresponent MII procedents d'òcits descartats postinseminació i analitzant també només dos cromosomes (18 i X) (Dyban i col·l. 1996). Com ja hem mencionat, per contra, altres autors han trobat una taxa d'aneuploidia molt alta: 58,7 % (Pujol i col·l. 2003) i 57,1 % (Gutiérrez-Mateo i col·l. 2004b), analitzant nou i vint-i-dos cromosomes respectivament. Les diferències es poden donar degudes al nombre de cromosomes analitzats.

Nosaltres hem trobat un 0,0 % d'aneuploidia en òcits no inseminats (frescos) i un 5,1 % en òcits descartats postinseminació (envellits). Munné i col·l. 1995b, establint quatre grups d'òcits en funció de les hores de cultiu in vitro (< 6, 24–48, 72 i ≥ 96 hores) observen que en els 1CP la predivisió de cromàtides equilibrada augmenta significativament amb el l'augment de les hores de cultiu, implicant alguns o tots els cromosomes. En canvi, la predivisió de cromàtides no equilibrada i la no-disjunció de cromosomes no augmenten significativament en funció de l'augment d'hores de cultiu. Dailey i col·l. 1996, observen els mateixos resultats.

El *risc d'aneuploidia (%) per cromosoma* es calcula de la manera següent: *nombre de cèl·lules aneuploides per a aquell cromosoma / nombre total de cromosomes estudiats x 100*. El risc mitjà d'aneuploidia per al cromosoma 21 (estudiat en sis estudis) és del 0,63 %, mentre que per al cromosoma X (estudiat en nou estudis) és del 0,29 % i, per tant, més baix [taula D-2].

El mecanisme responsable d'aneuploidia per al cromosoma 21 és aproximadament en un 33,3 % conseqüència de no-disjunció i en un 66,6 % conseqüència de predivisió de cromàtides no equilibrada; i per al cromosoma X, l'aneuploidia es deu en un 40,0 % a no-disjunció i en un 60,0 % a predivisió de cromàtides no equilibrada [taula D-2].

Quan es comparen òcits de *dones joves* (< 35–37 anys) amb òcits de *dones d'edat avançada* (> 37–40 anys o més) s'observa un increment significatiu en la no-disjunció i la predivisió de cromàtides no

equilibrada, però no es troba un increment significatiu de *predivisió de cromàtides equilibrada* relacionat amb l'edat materna (Munné i col·l. 1995b; Dailey i col·l. 1996; Gutiérrez-Mateo i col·l. 2004a).

Tant la *no-disjunció* com la *predivisió de cromàtides no equilibrada* tenen una correlació positiva amb l'edat materna (Sandalinas i col·l. 2002; Pellestor i col·l. 2003). En dones d'edat avançada hi ha desequilibris hormonals que afecten l'ambient ovàric (Wardburton i col·l. 1996) o una disminució en l'habilitat per formar un fus meiòtic normal (Battaglia i col·l. 1996), mecanismes que causarien una disminució de la segregació dels cromosomes i implicarien una major incidència d'aneuploidies en òcits de dones d'edat avançada. Per tant, l'edat materna és un factor predisposant a no-disjunció i predivisió de cromàtides no equilibrada.

La taxa d'aneuploïdia (5,1 %) que nosaltres hem trobat en òcits madurs descartats postinseminació (envellits) procedents de dones d'entre 29–37 anys [taules R-3 i D-2] és comparable a la trobada per Dailey i col·l. (1996) en els grups d'edat de 25–34 i de 35–39 anys. Aquests autors van estimar taxes d'aneuploïdia de 4,9 %, 11,5 % i 29,8 % en òcits de dones entre 25–34 anys, 35–39 anys i 40–45 anys, respectivament. També, Pellestor i col·l. (2003) observen que, en una sèrie de 3.042 òcits no fecundats descartats postinseminació (envellits) i procedents de dones entre 19 i 46 anys, les alteracions cromosòmiques originades per no-disjunció tenen una correlació positiva amb l'edat materna avançada.

5.4 Citogenètica d'òcits aparentment immadurs i de zigots anòmals humans descartats de programes de FIV

5.4.1 Oòcits humans aparentment immadurs (grup i)

En el present treball s'han diagnosticat el 91,1 % d'òcits aparentment immadurs i el 25,4 % dels complements cromosòmics estaven en estadi immadur o de *metafase I* (MI) i eren euploides per als cromosomes estudiats. La resta d'òcits eren aneuploides i les alteracions més observades han estat: la presència de *complements MII diploides* (50,0 %) i la presència de *dos complements cromosòmics separats en estadi de MII* (31,6 %) [taula R-6].

En concret, en el grup d'òcits descartats postinseminació, només l'11,1 % eren complements euploides. Benkhalifa i col·l. 1996, després de la fixació de 135 òcits d'aquest mateix tipus, descriu un valor més alt d'euploidies (33 %).

Hem observat aquests tipus d'alteracions en òcits immadurs aparentment no fecundats que no havien madurat espontàniament en cultiu (80,0 %) i en òcits MI no inseminats (66,7 %). Per contra, Gras i

col·l. (1992) no van observar complements MII diploides després d'analitzar vint òcits naturalment ovulats i no inseminats. Els autors relacionen aquest fet a factors associats a l'estimulació hormonal portada a terme en els protocols de FIV, que podrien afectar la meiosi incrementant la freqüència de complements MII diploides. Els òcits diploides serien la conseqüència d'una disfunció del fus de la primera divisió meiòtica, probablement més freqüent en dones grans, i incrementada per l'estimulació hormonal.

Els òcits que arriben a l'estadi de MII però que no extrusionen l'1CP mostren els dos jocs de cromosomes en MII alineats en *una mateixa placa metafàsica* (MII diploide) o formant *dues plaques metafàsiques separades*. Els nostres resultats indiquen que es donen ambdós tipus d'alteracions, conseqüència d'errors en la segregació i migració cromosòmica, i d'un procés de citocinesi anòmala, la qual cosa és freqüent en òcits aparentment en MI que no fecunden amb inseminació convencional.

Considerant com a òcits euploides les *vesícules germinals* (VG) amb nucli diploide i els òcits MI amb vint-i-tres bivalents, hem observat una menor freqüència d'euploïdies en òcits descartats postinseminació (envellits) que en òcits frescos, essent del 11,8 % i 52,9 %, respectivament.

Sense tenir en compte l'únic complement aneuploide que presentava un nucli en profase I procedent d'una VG descartat postinseminació, els complements MI aneuploides es van deure a la pèrdua d'un bivalent o al guany d'un o més bivalents. Aquesta aneuploïdia també podria deure's a l'existència de *mosaicisme gonadal* com a conseqüència de *no-disjunció* de la línia germinal amb coexistència, en l'ovari d'oogònies trisòmiques i monosòmiques amb oogònies normals (Mahmood i col·l. 2000). Aquest mecanisme ja ha estat descrit en altres treballs en els quals estudis citogenètics d'òcits (1CP i la corresponent MII) van mostrar absència de complementarietat deguda a un guany cromosòmic (Mahmood i col·l. 2000; Pujol i col·l. 2003); en alguns casos, per la presència d'una cromàtide extra tant en l'1CP com en l'MII (Mahmood i col·l. 2000) o un cromosoma extra en un dels complements i una dotació euploide per a aquell cromosoma en l'altre complement (Pujol i col·l. 2003). Diversos autors (Pujol i col·l. 2003; Gutiérrez-Mateo i col·l. 2004a i b) han observat, en òcits descartats de cicles de FIV, que aquesta alteració és més o menys freqüent dependent de cada cas.

En el nostre treball, en un òcit en MI no inseminat hem observat un univalent (una cèl·lula amb un univalent 22). Aquest tipus d'anomalia ja va ser descrita l'any 1995 (Angell 1995) en dones d'edat avançada, conseqüència d'una predivisió no equilibrada de cromàtides. Com hem mencionat anteriorment, segons Munné i col·l. (1995b) i Dailey i col·l. (1996), la *predivisió de cromàtides equilibrada*, es veu significativament incrementada amb el temps de cultiu; en canvi, la *no-disjunció d'univalents* i la *predivisió de cromàtides no equilibrada* no incrementen significativament amb el temps de cultiu o l'envelliment in vitro de l'òcit.

A la fase S del *cicle cel·lular*, abans d'entrar a la meiosi, cada cromosoma es duplica i dona lloc a dues cromàtides germanes estretament unides. La producció de gàmetes haploides requereix la segregació

dels cromosomes homòlegs a la primera divisió meiótica i la segregació de cromàtides germanes a la segona divisió meiótica.

La *cohesina*, un complex proteic amb forma d'anell, és responsable del manteniment i la regulació de la cohesió entre cromàtides germanes des de la fase S fins a la seva segregació a l'anafase II (Gorr i col·l. 2006; Takahashi i col·l. 2004). Aquest complex de proteïnes nuclears se situa a la regió centromèrica i també al llarg dels braços de les cromàtides germanes (Michaelis i col·l. 1997) i té la funció de mantenir unides les cromàtides oposant-se a la força feta per als microtúbuls units al cinetocors dels cromosomes, que intenten separar els cromosomes homòlegs.

L'acció de la *separasa* a la meiosi I permet la pèrdua de cohesió entre els braços de les cromàtides germanes, però no dels centròmers. Aquest fet facilita la resolució dels quiasmes i permet la segregació dels homòlegs. Les *shugoshins*, unes proteïnes presents en els centròmers, protegeixen les cohesines d'aquesta regió. A la meiosi II, la tensió generada en els cinetocors acaba amb la protecció que fan les *shugoshins*, fent que les cohesines d'aquesta regió siguin accessibles a la separasa i es doni la segregació de les cromàtides germanes (Lee i col·l. 2008).

L'activitat de la separasa està regulada per la *securina* (el seu inhibidor) i un inhibidor de la fosforilació (Fan i col·l. 2006). S'ha demostrat que la microinjecció d'anticossos antiseparasa eviten la formació del primer corpuscle polar (Gorr i col·l. 2006). Una cohesió deficient ha estat causa d'aneuploidia en òcits de dones d'edat avançada (Hodges i col·l. 2005).

S'ha descrit que ratolins amb una mutació en la *proteïna meiosi específica de la cohesina* (SMC1 beta), presenten una reducció de la longitud del complex sinapteinemal i del nombre de quiasmes. Aquests efectes en la meiosi depenen de l'edat i són similars als observats en dones d'edat avançada. Aquest resultat indica una pèrdua de funció d'aquesta proteïna (SMC1 beta o relacionada) segons l'edat i pot explicar els efectes de l'edat materna en la incidència d'aneuploidies en humans (Gilliland i Hawley 2005). Els òcits humans poden estar molts anys aturats en la profase I abans de la seva maduració. La reducció del nombre de quiasmes pot comportar una segregació aberrant. La no-disjunció durant la meiosi augmenta amb l'edat materna, és a dir, amb l'envelliment dels òcits.

Els *mitocondris* són els orgànuls cel·lulars responsables de la fosforilació oxidativa, la principal font d'energia de totes les cèl·lules eucariotes. En òcits i embrions, sembla que els mitocondris aporten l'energia suficient perquè pugui tenir lloc la fecundació suportant la formació de la placa metafàsica durant la meiosi II, i per la implantació (Bartmann i col·l. 2004). Considerant que la meiosi és un procés dependent d'energia i que el trifosfat d'adensosina (ATP) és necessari per a la unió de les cohesines (Weitzer i col·l. 2003; Uhlman 2004), és possible que en dones d'edat avançada es doni una disminució del nombre i la qualitat dels mitocondris i es produeixi una deficiència en el procés de fosforilació oxidativa que afectaria negativament la unió de les cohesines (altament dependent d'energia) i resultaria en un augment en la incidència de predivisió de cromàtides equilibrada i aneuploidia en els òcits, i per

tant, també en una baixa implantació embrionària. Com que els mitocondris s'hereten de mares a fills, és important que els mitocondris dels oòcits estiguin intactes (Bartmann i col·l. 2004), s'ha evidenciat que les dones d'edat avançada acumulen més mutacions en l'ADN mitocondrial, fet que pot ser responsable d'aneuploidies i d'una baixa implantació (Bartmann i col·l. 2004). En un estudi (Chan i col·l. 2005) amb oòcits no fecundats, descriuen que el nombre de còpies d'ADN mitocondrial té una correlació negativa amb l'edat de la dona. L'augment en delacions de l'ADN mitocondrial i la disminució de còpies d'ADN mitocondrial en dones més grans suggereix que aquest dos paràmetres poden reflectir un envelliment de l'ovari (Chan i col·l. 2005). En oòcits que després d'una estimulació hormonal no han assolit l'estadi de MII també es podria donar un envelliment causat per una depleció mitocondrial que podria afectar la maduració nuclear i citoplasmàtica dels oòcits, la fecundació i la taxa d'implantació dels embrions resultants.

El *cultiu* prolongat dels oòcits immadurs podria portar cap a un envelliment de l'oòcit que afectaria la fosforilació oxidativa i condicionaria l'ATP necessari per al manteniment del fus acromàtic i per a la citocinesi, i donaria lloc a la separació de cromosomes sense extrusió de l'1CP, formant-se majoritàriament un complement diploide de cromosomes en MII o dos complements haploides en MII. Com hem dit anteriorment, el complex cohesina té la funció de mantenir unides les cromàtides oposant-se a la força feta per als microtúbuls units al cinetocors dels cromosomes, que intenten separar els cromosomes homòlegs. Amb una mancança de suficient ATP, la unió de cromàtides desestabilitzaria i podria afectar la integritat del fus acromàtic i, per tant, ser una causa d'aneuploidia.

En oòcits immadurs no inseminats hem trobat un 37,5 % de complements diploides MII o dos complements haploides MII, en oòcits immadurs aparentment no fecundats, la proporció és més alta (88,2 %) [taula R-6]. Cal tenir en compte que els oòcits inseminats porten de mitjana setze hores més de cultiu. Hem observat una predivisió de cromàtides equilibrada en els complements de MII, ja sigui en un complement diploide com en dos complements MII haploides. Sandalinas i col·l. 2002 descriuen que la predivisió de cromàtides equilibrada augmenta amb el temps de cultiu in vitro.

5.4.2 Zigots humans anòmals (grup ii)

En el present treball hem processat zigots anòmals amb més de dos *pronuclis* (> 2PN), zigots amb un sol pronucli (1PN) i zigots amb dos pronuclis però no dividits després de l'observació de la fecundació (2PN aturats).

Depenen del possible origen del pronucli o pronuclis de més, es diu que un zigot té origen *digínic* quan es creu que dos pronuclis d'un zigot 3PN procedeixen de la línia cel·lular femenina; i *diàndric* quan dos pronuclis d'un zigot 3PN procedeixen de línia cel·lular masculina.

Els zigots *multipronuclears* poden ser originats bàsicament per la *no-extrusió del segon corpuscle polar* 2CP (origen digínic) o per *dispèrmia* (origen diàndric). Un oòcit MII euploide penetrat per dos espermatozoides haploides (dispèrmia) pot ser conseqüència d'un retard en la reacció cortical i originar un zigot triploide diàndric. La *no-extrusió de l'1CP* porta a un oòcit *diploide*, i un oòcit diploide fecundat per un espermatozoide haploide pot resultar en un zigot *triploide* digínic. A més, els zigots 3PN amb un sol CP i tres pronuclis, poden resultar de la unió d'un espermatozoide haploide i un oòcit haploide, i que el pronucli femení de més s'hagi format per raó d'una distribució cromosòmica irregular durant la segona divisió meiótica o a una *no-extrusió del 2CP*; o també pot resultar de l'*endoreduplicació* d'un pronucli d'oòcit normal 23,X i penetració d'un espermatozoide normal (Rosenbusch i col·l. 1997a). Cohen i col·l. 1994 van descriure que els zigots 3PN observats després de la FIV convencional han estat més freqüentment originats per una fecundació dispèrmica. Aquest no és el cas d'òcits inseminats per ICSI.

Una altra possibilitat, suggerida per Macas i col·l. (1996a,b) és que un petit grup de cromosomes materns es podria separar de la resta després de la fecundació. Es veurien tres pronuclis però, de fet, es tractaria d'un zigot diploide. Aquest fenomen només ha estat provat en zigots 3PN procedents d'inseminació per ICSI.

Les regions cromosòmiques analitzades, ADN centromèric del cromosoma Y i ADN centromèric del cromosoma 18, havien replicat en moments molt similars de la fase S. Atès que en els zigots analitzats no hem observat cap regió centromèrica del cromosoma Y, podem assumir que aquesta regió replica més tard que les altres regions analitzades.

Tenint en compte que la 1a fase S mitòtica té lloc després de la fecundació, i d'acord amb els nostres resultats [taula R-9], els zigots > 2PN i 1PN han estat aturats majoritàriament abans en un estadi previ a la 1a fase S mentre que els zigots 2PN es van aturar tant abans com un cop ja iniciada aquesta fase mitòtica.

5.4.2.1 Zigots humans > 2PN

La freqüència de zigots > 2PN observada en el present treball ha estat del 5,2 %, comparable a la descrita per Rosenbusch i col·l. (1997b), que oscil·la entre el 5,0 a 7,0 %. Els zigots > 2PN més freqüents (85,0 %) han estat els zigots amb tres pronuclis (3PN), seguits amb un 10,0 % pels zigots amb quatre pronuclis (4PN) i un 5,0 % dels zigots amb cinc pronuclis (5PN). Rosenbusch i col·l. 1997b, descriuen freqüències similars: 82,3 %, 11,7 % i 5,8 % respectivament.

5.4.2.1.1 Zigots humans 3PN

Tots els zigots 3PN diagnosticats eren triploides [taula R-8] i el 42,8 % mostrava almenys un cromosoma Y [taula D-3]. Si els espermatozoides tenen una probabilitat igual de ser *portadors de cromosoma X* o *Y*, aquesta freqüència és una mica inferior a l'esperada.

Taula D-3. Possible origen dels pronuclis dels zigots humans diagnosticats (grup ii) descartats de programes de FIV.

Tipus de zigot	Complement (freqüència)	Origen	
3PN	X18 ; Y18 ; Y18	1 (7,1)	Diàndric
	XY18 ; XY18 ; XY18	1 (7,1)	Triàndric
	X18 ; X18 ; X18	7 (50,0)	Digínic o diàndric
	XX1818 ; XX1818 ; XX1818	1 (7,1)	Digínic o diàndric
	X18 ; X18 ; Y18	4 (28,7)	Digínic o diàndric
	<u>14</u>		
4PN	X18 ; X18 ; X18 ; X18	1 (50,0)	Triàndric o diàndric-digínic
	X18 ; X18 ; Y18 ; Y18	1 (50,0)	Triàndric o diàndric-digínic
	<u>2</u>		
5PN	X18 ; X18 ; X18 ; X18 ; Y18	1	Tetraàndric o triàndric-digínic
	<u>1</u>		
1PN	X18	2 (11,0)	Partenogenètic (haploide)
	XX1818	10 ^a (55,6)	Asincronia de PN. Penetració per esp X
	XY1818	4 (22,2)	Asincronia de PN. Penetració per esp Y
	XX18181818	1 (5,6)	Asincronia de PN. Penetració per esp X
	XXY1818	1 (5,6)	Asincronia de PN. Penetració per esp XY o digínic
	<u>18</u>		
2PN	X18 ; X18	4 ^b (36,4)	Penetració per esp X
	XX1818 ; XX1818	4 (36,4)	Penetració per esp X
	XX1818 ; Y1818	1 (9,1)	Penetració per esp Y
	XX1818 ; XY1818	1 (9,1)	Penetració per esp XY o digínic
	XY18 ; Y18	1 (9,1)	Diàndric: oòcit nul·lisòmic penetrat per esp. XY18 i esp Y18
	<u>11</u>		

FIV (fecundació in vitro), PN (pronucli), esp (espermatozoide).

^a una primera metafase mitòtica i una primera anafase mitòtica.

^b una primera anafase mitòtica.

També hem observat que la distribució de la proporció XXX: XXY: XYY ha estat 8:1:1 [taula D-3]. Si els gàmetes femenins i masculins tenen una probabilitat igual de participar en la triploïdia, aleshores la constitució XXX: XXY: XYY podria ser en una proporció 2:3:1 (Pieters i col·l. 1992) però nosaltres hem trobat un increment en XXX la qual cosa indica una major proporció de digínia.

La majoria de complements XXX podrien ser interpretats com zigots 3PN d'origen digínic. Per contra, Rosenbusch i col·l. (1997b) té una proporció de cromosomes sexuals de 9:10:5 i observen un increment en XYY. Uns resultats idèntics han estat observats per Staessen i Van Steirteghem (1997). L'origen patern només pot ser determinat per la presència d'un cromosoma Y. Nosaltres hem trobat un zigot 3PN: XY; XY; XY, probablement triàndric (la penetració d'un oòcit nul·lisòmic per tres espermatozoides XY; i un zigot 3PN: XX; XX; XX, probablement digínic (oòcit disòmic) o diàndric (penetrat per dos espermatozoides X).

Un dels catorze (7,1 %) zigots podria tenir únicament un origen diàndric (penetració de dos espermatozoides portadors de cromosoma Y) ja que presentava dos nuclis amb un cromosoma Y i un nucli amb un cromosoma X (que prové de l'òcit) [taula D-3] [figura D-3].

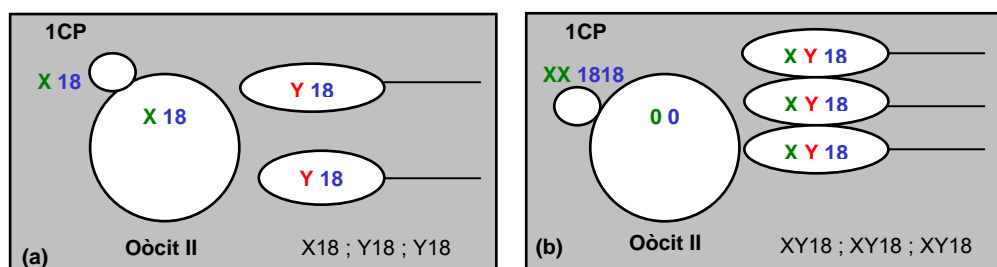


Figura D-3. Representació gràfica de la interpretació: (a) d'un zigot 3PN: X18 ; Y18 ; Y18. (b): d'un zigot 3PN: XY18 ; XY18 ; XY18.

Un altre dels catorze (7,1 %) zigots tindria un origen triàndric ja que presenta un cromosoma Y a cada nucli. Una teoria, tot i que seria molt poc probable, podria ser que un oòcit nul·lisòmic per als cromosomes X i 18, hagués estat penetrat per tres espermatozoides XY18 [figura D-3] [taula D-3].

I els dotze zigots restants (85,7 %) podrien tenir un origen digínic (per exemple, per no-extrusió de l'1CP) o diàndric (per penetració de dos espermatozoides X18 o bé, un espermatozoide X18 i un espermatozoide Y18) [taula D-3].

Segons el nombre de senyals de centròmer dels cromosomes analitzats: X, Y i 18; es pot inferir l'estadi del cicle cel·lular (abans o després de la 1a fase S) en el que estava el zigot en el moment de ser fixat [taula R-9]. Les marques molt juntes, a una distància menor al diàmetre d'un senyal, s'han considerat equivalents a un cromosoma replicat mentre que les marques separades, a una distància superior al diàmetre d'un senyal, s'han considerat corresponents a dos cromosomes diferents.

Un total de tretze dels catorze (92,8 %) zigots 3PN estaven aturats abans de la 1a fase S del cicle cel·lular. L'altre zigot 3PN estava aturat després de la 1a fase S, ja que presentava dues marques per cada centròmer i la distància entre les marques d'un mateix cromosoma era inferior al diàmetre d'una marca de centròmer i no permetria pensar en l'existència de dos cromosomes independents [taula R-9].

Tres de catorze (21,4 %) zigots 3PN, a més de tres pronuclis, contenien un espermatozoide que mostrava el seu pronucli amb una *condensació cromosòmica prematura* (sperm premature chromosome condensation, SPCC) que no va mostrar senyals de FISH.

Rosenbusch i col (1997b) analitzen cinquanta-un zigots 3PN procedents de cicles de FIV convencional i el 76,5 % d'aquests presenta dos corpuscles polars. Grossmann i col·l. (1997) van analitzar trenta-tres zigots 3PN procedents de cicles de ICSI i van observar que el 36 % d'aquests zigots de fet eren diploides. Aquests fet podria ser degut a una distribució dels cromosomes materns en dos jocs. Dels

zigots 3PN confirmats per FISH, el ràtio X:Y observat concorda amb una no-extrusió del 2CP com a principal origen del tercer PN (origen digínic). Això no obstant, com hem mencionat, els zigots 3PN procedents de FIV i analitzats en el nostre treball tots eren triploides amb origen majoritàriament digínic.

5.4.2.1.2 Zigots humans 4PN

En el nostre treball, els dos zigots 4PN eren tetraploides [taula R-8], un mostrava quatre cromosomes X i l'altre mostrava dos cromosomes Y i dos X [taula D-3].

Els zigots 4PN poden venir de la fecundació d'un zigot diploide per dos espermatozoides haploides o per un espermatozoide diploide. Això no obstant, Rosenbusch i col·l. (1997b) van descriure que la inhibició de la primera divisió mitòtica d'un oòcit madur penetrat per un espermatozoide haploide sembla que és el fenomen més important. Els mateixos autors descriuen que també és possible que un oòcit haploide sigui penetrat per tres espermatozoides haploides. El resultat és un zigot polispermic (Rosenbusch i col·l. 1997b).

Ambdós complements podrien ser compatibles amb zigots triàndrics, el primer penetrat per tres espermatozoides portadors dels cromosomes X i 18; i el segon penetrat per un espermatozoide portador dels cromosomes X i 18, i dos espermatozoides portadors dels cromosomes Y i 18. També podria haver-se donat el cas d'origen diàndric i digínic alhora [taula D-3].

En tots dos zigots els centròmers X, Y i 18 estaven aturats abans de la 1a fase S del cicle cel·lular ja que presentaven a cada nucli una marca per cada cromosoma.

5.4.2.1.3 Zigots humans 5PN

L'únic zigot 5PN era pentaploide [taula R-8] amb quatre cromosomes X i un cromosoma Y [taula D-3]. El complement cromosòmic observat seria compatible amb un oòcit penetrat per quatre espermatozoides: tres espermatozoides portadors dels cromosomes X i 18; i un espermatozoide portador dels cromosomes Y i 18 (origen tetraàndric). També seria compatible un origen triàndric-digínic.

Aquest zigot en el moment de la seva fixació estava aturat abans de la replicació cromosòmica, és a dir, abans de la 1a fase S del cicle cel·lular [taula R-9].

5.4.2.2 Zigots humans 1PN

Un altre tipus de zigot anòmal trobat en FIV és el zigot amb *un sol pronucli* (1PN). En el nostre estudi, un 3,5 % dels CCO inseminats per FIV convencional van donar lloc a zigots 1PN. Aquesta freqüència és similar a l'observada per altres autors: 5,5 % (Staessen i col·l. 1993) i 3,0 % (Munné i col·l. 1993).

En el nostre treball hem fixat i analitzat per FISH els 1PN abans d'una possible divisió. L'11,1 % d'aquests zigots van ser diagnosticats com a nuclis *haploides* i la resta (88,9 %) de zigots 1PN van ser diagnosticats com a nuclis *diploides* [taula R-8]. La diploïdia en embrions resultants de la divisió de zigots 1PN només pot ser deguda a una *activació partenogenètica* (endoreduplicació o no-extrusió del 2CP) o a una *asincronia* en la formació dels pronuclis després de la fecundació (Munné i col·l. 1993).

Staessen i col·l. (1993) van observar que si després de quatre a sis hores més des de l'observació habitual de la fecundació (setze-divuit hores postinseminació) es feia una segona observació morfològica dels zigots 1PN, el 25 % mostraven aleshores un segon pronucli, essent de fet penetrats però amb formació dels pronucli masculí i femení asincrònica. Els autors van portar a terme una anàlisi citogenètica dels embrions resultants de 99 zigots 1PN: un 12,2 % eren embrions haploides resultants d'una activació espontània (partenogenètica), el 80,5 % eren diploides resultants d'una formació asincrònica dels pronuclis i el 7,3 % eren triploides. Munné i col·l. (1993) analitzen per FISH 21 embrions resultants de zigots 1PN i observen que el 42,8 % d'ells tenen cromosoma Y. Aquests autors extrapolen que més d'un 80 % del zigots 1PN poden estar originats d'òcits fecundats. Les freqüències trobades en ambdós treballs també són comparables als nostres resultats d'haploïdia i diploïdia (11,1 % i 88,9 %, respectivament), analitzant zigots 1PN abans d'una possible divisió mitòtica.

En els nostres resultats, cap dels dos nuclis haploides (X18) diagnosticats procedents de zigots 1PN no contenia el cromosoma Y, i un 31,2 % (cinc de setze) de nuclis diploides procedents de zigots 1PN sí que contenien el cromosoma Y [taula D-3]. Staessen i col·l. (1997), van trobar que contenien cromosoma Y el 6,7 % de nuclis haploides i el 44,6 % de nuclis diploides. La presència de nuclis amb cromosoma Y en zigots 1PN de FIV és evidència de fecundació, excloent-ne l'activació partenogenètica.

En el nostre treball, el 88,9 % dels zigots 1PN mostren un complement diploide amb dues marques per al cromosoma 18 que podrien tenir el seu origen en la formació d'un zigot euploide i trobar-se en un procés d'asincronia en la formació dels pronuclis femení i masculí. Un zigot mostrava un complement XXY1818 que podria ser originat per l'entrada d'un espermatozoide portador dels cromosomes Y i 18 i, d'acord amb el nombre de senyals d'ADN centromèric dels cromosomes 18, X i Y, sols el cromosoma X estaria replicat. Una altra explicació seria que l'òcit hagués estat penetrat per un espermatozoide portador de cromosoma Y; i els cromosomes X i 18 estiguessin replicats; per tant, aquest zigot estaria aturat en un estat primerenc de la 1a fase S mitòtica [taula R-9].

5.4.2.3 Zigots humans 2PN aturats

Després de verificar la correcta fecundació, un total d'onze zigots amb 2PN i dos CP, no van dividir i van restar aturats en estadi de 2PN [taula R-9]. Aquests zigots no evolutius van ser fixats i analitzats [taula D-3].

El 72,8 % dels zigots 2PN aturats mostraven dos nuclis haploides per als cromosomes X i 18; per tant, els oòcits haurien estat penetrats per un espermatozoide portador de cromosoma X. La resta de zigots 2PN aturats mostraven dos nuclis haploides. Dos d'aquests zigots presentaven un cromosoma Y i es podia distingir el PN femení del masculí. Es tractaria de dos oòcits penetrats per un espermatozoide portador de cromosoma Y cadascun. I, finalment, un altre zigot 2PN aturat mostrava un complement XY18;Y18; en aquest cas, es tractaria d'un oòcit nul-lisòmic per als cromosomes X i 18 que hauria estat penetrat per un espermatozoide portador de cromosoma Y i un espermatozoide portador dels cromosomes X i Y.

Si els zigots 2PN són conseqüència d'un retard en la 1a fase en comptes de conseqüència d'una aturada, un període de cultiu més prolongat després de l'observació de pronuclis permetria l'observació d'un estat de replicació més avançat. Això no obstant, com que després de deu hores de cultiu en cinc dels onze zigots 2PN no s'observa replicació de les regions analitzades, probablement l'aturada embrionària seria més freqüentment conseqüència d'un retard en la 1a fase S.

5.4.3 Cromosomes d'espermatozoide condensats prematurament (SPCC)

En el nostre estudi hem observat *cromosomes d'espermatozoide condensats prematurament* (SPCC) en: 21,4 % dels zigots 3PN, 11,1 % dels zigots 1PN diploides, en 5,8 % dels oòcits aparentment immadurs no fecundats i en 4,2 % dels oòcits madurs no fecundats. Cap zigot 1PN haploide no mostra SPCC com podríem esperar en una activació espontània (partenogenètica). De fet, els oòcits madurs i immadurs aparentment no fecundats amb presència de SPCC sí que haurien estat fecundats però no haurien seguit endavant la meiosi. Zenzes i Casper (1992b) en una revisió descriuen que del 3,0 al 16,0 % dels oòcits madurs aparentment no fecundats mostren SPCC. Benkhalifa i col·l. (1996), observen un 26,6 % d'oòcits madurs no fecundats amb SPCC i descriuen que aquesta elevada proporció de SPCC podria estar donada per un retard en la penetració de l'espermatozoide en oòcits que estan degenerant.

Hem observat SPCC en diferent fase de condensació. Alguns oòcits no fecundats descartats postinseminació i zigots anòmals mostraven un o dos jocs de complement cromosòmic d'espermatozoide en estadi de profase. Els cromosomes d'espermatozoide poden ser condensats abans de la replicació de l'ADN, per raó d'una activació prematura dels factors involucrats en la condensació.

5.5 Diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi citogenètica del primer corpuscle polar (DGP-1CP)

5.5.1 Protocol d'aplicació del DGP-1CP a casos clínics

5.5.1.1 Denudació dels oòcits

En la realització del *diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi del corpuscle polar* (DGP-1CP) és recomanable disgregar els CCO amb *hialurodinasa* just immediatament després de la punció fol·licular o com a màxim al cap d'una hora, fet en el qual coincideixen altres autors (Vialard i col·l. 2006; Magli i col·l. 2006).

5.5.1.2 Moment de fer la biòpsia d'1CP i l'ICSI

A partir de la nostra experiència, optem per fer la inseminació de l'oòcit, mitjançant ICSI, immediatament abans de procedir a la *biòpsia* de l'1CP, la qual s'ha de fer abans de la formació del 2CP, és a dir, no més tard de 45 minuts post ICSI. Amb això s'evita entre d'altres coses, fer malbé la placa metafàsica de l'oòcit ja que la posició de l'1CP indica la seva posició [vegeu l'apartat 4.7 art.2].

Vialard i col·l. (2006), biopsien els 1CP immediatament després de la disgregació enzimàtica dels CCO. Magli i col·l. (2006), en cicles de DGP-1CP en dones de més de 38 anys, també fan la biòpsia dels oòcits madurs immediatament després de la denudació, i per als oòcits immadurs, esperen de quatre a sis hores mantenint els oòcits en medi de cultiu amb suplement d'hormona fol·liculostimulant recombinant i hormona luteïnitzant recombinant (rFSH i rLH, respectivament), fins que madurin.

Com s'ha dit anteriorment, si l'1CP es biopsia abans de l'ICSI, la referència de l'1CP es perd, i com que l'oòcit pot rotar dins la zona pel·lúcida, la pipeta d'ICSI pot danyar la *placa meiótica* de l'oòcit. Això pot impedir la formació del 2CP, i es produeixen zigots amb tres pronuclis (3PN), o bé danyar l'oòcit de manera que el desenvolupament del zigot s'aturi després de la descondensació del nucli de l'espermatozoide (zigots amb 2PN) o fins i tot abans (zigots amb un PN). Blake i col·l. (2000), han avaluat els efectes de la posició de l'espermatozoide durant l'ICSI i el dany ocasionat a la placa meiótica de l'oòcit relacionat amb la fecundació i el desenvolupament preimplantacional. Aquests autors mostren que els embrions originats per oòcits microinjectats deixant l'1CP en la posició equivalent a les set o onze de les agulles del rellotge, tenen una taxa d'implantació més alta, tot i que els resultats no són

estadísticament significatius. De la mateixa manera, les regions més segures o perilloses per realitzar l'ICSI, tenint en compte la posició de l'1CP, també han estat definides per Hardarson i col·l. (2000). Això no obstant, Vialard i col·l. (2006), fan l'ICSI al cap de quatre hores, després de tenir el resultat de la FISH. Els autors comenten que procuren inseminar els oòcits i deixen el tall a la posició equivalent a les sis o dotze de les agulles del rellotge per evitar que la microinjecció danyi la placa metafàsica de l'oòcit. Aquests autors fan l'ICSI després de tenir el resultat de la FISH en casos de cribratge d'aneuploidies per edat materna avançada ja que a França no es pot fer aquest estudi en embrions; per tant, han de diagnosticar els oòcits abans de ser inseminats. Magli i col·l. (2006) també realitzen l'ICSI després de tenir el resultat de la FISH; en aquest cas, el motiu és que a Itàlia només es poden inseminar tres oòcits per cicle. Cap d'aquests treballs mencionats no descriuen sortides embrionàries prematures de la zona pel·lúcida com a conseqüència d'artefactes de la tècnica (la biòpsia de l'1CP).

Com hem mencionat anteriorment, els nostres resultats han evidenciat que quan l'1CP es biòpsia abans de l'ICSI, el forat que queda a la zona pel·lúcida facilita una sortida prematura artificial de l'oòcit o del zigot de l'interior de la zona. Per aquest motiu es va modificar el moment de la realització de la biòpsia d'1CP respecte del moment de fer l'ICSI. Es va establir com a més idoni realitzar l'ICSI abans de la biòpsia d'1CP [vegeu l'apartat 4.7 art.2]. Mentre la taxa de fecundació és només d'un 42,4 % quan l'ICSI es fa després de la biòpsia de l'1CP, aquesta taxa augmenta fins a un 72,3 % quan la biòpsia de l'1CP es fa immediatament després de l'ICSI, just després de fer el tractament enzimàtic per eliminar les cèl·lules del cúmul. Aquests valors són molt semblants als que s'obtenen de forma general en cicles de FIV .

Vialard i col·l. (2006), en el seu treball descriuen que, si cal, practiquen un segon tall en el punt de microinjecció per tal de reduir la pressió interna dins l'oòcit i reduir el risc de sortida de citoplasma. Aquests autors presenten una taxa de fecundació del 64,5 %.

5.5.1.3 Mètode de biòpsia d'1CP

L'èxit en la biòpsia de l'1CP és un requisit imprescindible per arribar al diagnòstic, un dany a l'oòcit durant la retirada de l'1CP pot portar a la seva pèrdua. El mètode de biòpsia emprat pot ser crític.

La nostra experiència inclou la realització de biòpsia amb els tres diferents mètodes existents: el mètode físic (làser), el mètode mecànic (PZD) i el mètode químic (àcid Tyrode) [taules R-11a,b i R-12]. El mètode de biòpsia escollit en cada cas clínic depenia del centre de reproducció on es feia el cas.

El sistema *làser*, adaptat al tambor dels objectius del microscopi invertit, és un sistema molt còmode i segur però té el desavantatge que és molt car. El forat de la ZP es produeix per l'exposició de la

superfície de la ZP a un làser de llum infraroja de baixa longitud d'ona que és poc absorbit per l'aigua del medi de cultiu. L'eficàcia d'aquest mètode per fer un forat a la ZP va ser avaluada en oòcits i embrions de ratolí l'any 1995 (Germond i col·l. 1995). També ha estat aplicat a biòpsies d'embrions humans preimplantacionals en estadi de cèl·lules i en estadi de blastocist (Veiga i col·l. 1997 ; Boada i col·l. 1998, respectivament) i Petit i col·l. l'any 2002 (Petit i col·l. 2002) van aconseguir un embaràs realitzant un DGP-1CP biopsiant amb aquest mètode.

Nosaltres hem utilitzat el sistema làser en cinc casos: [m, n, p, r] [taula R-10] i [H] [taula R-12]. Amb aquest mètode de biòpsia seguit de l'ICSI hem aconseguït una taxa de fecundació elevada (71,4 %) [vegeu l'apartat 4.7 art.2]. Si tenim en compte les dades del cas [r] [taula R-10], no inclòs a l'article 2, la taxa de fecundació obtinguda encara és més elevada (76,9 %).

El sistema *mecànic* també és un sistema vàlid, tot i que habitualment es triga una mica més a obtenir l'1CP, té l'avantatge que és més econòmic que el sistema làser. Un gran avantatge d'aquest mètode és que s'eviten possibles efectes secundaris del làser sobre la ZP (com, per exemple, l'enduriment). Nosaltres hem aplicat el sistema mecànic en tres cicles de DGP-1CP, casos: [q] [taula R-10] i [J, K] [taula R-12]. Amb aquest mètode de biòpsia la taxa de fecundació obtinguda, també després de l'ICSI, és inferior (55,0 %) a l'obtinguda utilitzant el sistema làser.

Finalment, el sistema *químic* (àcid Tyrode) només l'hem aplicat en un cas: [I] [taula R-12]. El forat creat a la ZP sol ser massa gran ja amb el flux d'àcid és difícil de controlar-ne la creació. Però el problema més greu és l'acidificació local del medi o l'entrada d'àcid a la zona pel·lúcida i a l'espai perivitel·lí que pot induir danys o fins i tot la lisi de l'oòcit. Aquest sistema es bo per a oòcits i embrions de ratolí, però per a oòcits humans es requereix major quantitat d'àcid Tyrode. La taxa de fecundació obtinguda fou només del 10,0 %.

De tots, el sistema làser és el que permet fer un forat a la ZP de mida desitjada de forma molt precisa i permet obtenir una taxa de fecundació superior.

5.5.1.4 Biòpsia d'1CP seguida de biòpsia de blastòmer

El tipus de cèl·lula biopsiada (corpuscle polar, blastòmers o ambdós) i el nombre de procediments de biòpsia realitzats depèn del cas estudiat. Cieslak-Janzen i col·l. (2006), fan un estudi retrospectiu en una sèrie de 9.925 oòcits/embrions biopsiats després d'un a tres procediments de biòpsia (blastòmer només; 1CP-2CP a D + 1 i blastòmer a D + 3, o 1CP a D + 0 i 2CP a D + 1), en comparació amb 28.126 oòcits/embrions control. En aquest estudi l'1CP estava sempre biopsiat abans de l'ICSI. La taxa de fecundació i el nombre d'1PN i 3PN, en oòcits amb 1CP biopsiats abans de l'ICSI i els oòcits

control, no presenta diferències significatives. Tampoc no van trobar diferències significatives en la formació de blastocits entre els embrions resultants d'òcits amb biòpsia d'1CP, embrions biopsiats a D + 3 a la vegada resultants d'òcits biopsiats, i embrions control. Aquests i d'altres autors (Magli i col·l. 2004) conclouen que la biòpsia múltiple no afecta la viabilitat de l'embrió.

5.5.1.5 Obtenció de complements d'1CP

Un cop fet el forat a la ZP l'1CP ha de ser extret de dins d'aquesta amb una pipeta amb un diàmetre una mica més gran que l'1CP, aproximadament 20–30 µm. Si s'utilitza una pipeta més petita, l'1CP es danya o lisa fàcilment. Biopsiant l'1CP amb pipeta petita (per exemple, 10 µm de secció), hem obtingut únicament un 14,2 % d'extensions de complements cromosòmics amb morfologia cromosòmica preservada, mentre que utilitzant una pipeta de diàmetre superior al de l'1CP, la proporció augmenta fins a un 89,4 %.

Per a l'extracció de l'1CP, és un factor important que l'1CP estigui completament separat de l'òcit II en el moment de la biòpsia; d'altra banda, l'1CP o fins i tot l'òcit poden resultar malmesos mentre estem aspirant l'1CP. Això pot influir negativament en l'obtenció d'extensions cromosòmiques d'1CP [vegeu l'apartat 4.7 art.2].

5.5.2 DGP-1CP en dones portadores de reorganitzacions cromosòmiques: revisió de resultats

El procediment descrit, com que la cèl·lula biopsiada prové directament de l'òcit, és d'aplicació exclusiva al diagnòstic citogenètic preimplantacional d'anomalies cromosòmiques d'origen matern.

Aquest procediment permet detectar d'*aneuploidies* (que són d'origen matern en un 80–95 % dels casos) però també d'*anomalies cromosòmiques estructurals* (per exemple translocacions robertsonianes que són degudes a mares portadores en un 63,9 % i translocacions recíproques en un 69,6 %) , fins i tot quan els fragments cromosòmics implicats en la reorganització són petits.

La transmissió a la descendència d'anomalies cromosòmiques derivades de reorganitzacions depèn del tipus de segregació cromosòmica durant l'anafase I i l'anafase II meiótiques.

El DGP-1CP està especialment indicat en parelles en què és la *dona la portadora d'una reorganització cromosòmica estructural* perquè, d'acord amb estudis de cromosomes d'espermatozoide, en aquests casos, el risc de concebre un descendent cromosòmicament desequilibrat varia del 15 al 90 % (Templado i col·l. 1988). L'anàlisi dels cromosomes de l'1CP permet identificar el tipus de segregació que ha tingut lloc i, consegüentment, predir si l'embrió resultant de la fecundació d'aquell òcit és

desequilibrat o normal/equilibrat (Egozcue i col·l. 1996).

A més del casos de DGP-1CP realitzats pel nostre grup, s'han publicat resultats de vint-i-quatre casos DGP-1CP de dones portadores de translocacions. Divuit casos han estat descrits a la literatura: 11 casos de translocacions robertsonianes (Munné i col·l. 2000a) [taula D-4 i taula III vegeu l'apartat 4.7 art.2] i set casos de translocacions recíproques (Munné i col·l. 1998a,b,c i d; Willadsen i col·l. 1999) [taula D-5 i taula IV vegeu l'apartat 4.7 art.2].

En el present treball s'han inclòs els nou casos de DGP-1CP que hem realitzat en dones portadores de translocacions: cinc casos [m, n, p, q, r] (sis cicles) de dones portadores de translocacions robertsonianes [taula D-4], dels quals quatre [m, n, p, q] són inclosos a l'article 2 [taula III vegeu l'apartat 4.7] i un altre cas [r] fet posteriorment a la publicació de l'article 2. I quatre casos [H, I, J, K] (quatre cicles) de dones portadores de translocacions recíproques [taula D-5] dels quals dos casos [H, I] són inclosos a l'article 2 [taula III vegeu l'apartat 4.7] i dos casos [J, K] realitzats posteriorment a la publicació d'aquest article [taula D-5].

Taula D-4. Translocacions robertsonianes: dades pacients i biòpsia d'1CP.

Pacients	Referència bibliogràfica	Cariotip de la dona	Edat	CCOs	MII	MII MIV	Mètode de biòpsia	Biòpsia 1CP ^a (n)
a	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)					Mecànic	32
b	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)					Mecànic	21
c	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)					Mecànic	32
d	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)					Mecànic	16
e	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	11
f	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	13
g	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	15
h	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	13
i	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	11
j	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	6
k	Munné i col·l. (2000c)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)					Mecànic	8
m	Article 2 (vegeu l'apartat 4.7)	45,XX,der(14;21)(q10;q10)	32	21	10	5	Físic	13
n	Article 2 (vegeu l'apartat 4.7)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	37	4	3	1	Físic	4
p	Article 2 (vegeu l'apartat 4.7)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	37	15	14	0	Físic	12
q ^b	Article 2 (vegeu l'apartat 4.7)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	36	4	4	0	Mecànic	4
r	no publicat (vegeu l'apartat 4.5)	45,XX,der(13;14)(q10;q10)	35	26	11	1	Físic	11
Total		16 casos		248				222
<i>Present treball</i>		5 casos		70	42*	7*	44 de 49* (89,8)	

MIV (maduració espontànea in vitro), 1CP (primer corpuscle polar), ^a 1CPs fragmentats n'estan exclosos, ^b dades de dos cicles de la mateixa pacient.

Taula D-5. Translocacions recíproques: dades pacients i biòpsia d'1CP.

Pacients	Referència bibliogràfica	Cariotip de la dona	Edat	CCOs	MII	MII MIV	Mètode de biòpsia	Biòpsia 1CP ^a (%)
A	Munné i col·l. (1998a)	46,XX,t(4;14)(p15;q24)	37	8			Mecànic	6
B	Munné i col·l. (1998b)	46,XX,t(7;20)(q22;q11.2)	28	8			Mecànic	8
C	Munné i col·l. (1998b)	46,XX,t(14;18)(q22;q11)	36	18			Mecànic	8
D	Munné i col·l. (1998c)	46,XX,t(12;20)(p13.1;q13.3)	43	9			Mecànic	2
E	Munné i col·l. (1998d)	46,XX,t(11;16)(q21;q22)	32	19			Mecànic	19
F	Willadsen i col·l. (1999)	46,XX,t(9;11)(p24;q12)	37	6			Mecànic	5
G	Willadsen i col·l. (1999)	46,XX,t(11;16)(q21;q22)	31	11			Mecànic	11
H	Article 2 (vegeu l'apartat 4.7)	46,XX,t(4;12)(q22;q23)	35	17	14	2	Físic	15
I	Article 2 (vegeu l'apartat 4.7)	46,XX,t(1;18)(p34.3;q12.3)	35	10	10	0	Químic	9
J	no publicat (vegeu l'apartat 4.5)	46,XX,t(4;11)(q31.1;q23)	34	5	5	0	Mecànic	5
K	no publicat (vegeu l'apartat 4.5)	46,XX,t(8;13)(q24.1;q22)	33	12	11	0	Mecànic	11
		11 casos		123				99
<i>Present treball</i>		4 casos		44	40*	2*	40 de 42* (95,2)	
								MIV (maduració espontànea in vitro), 1CP (primer corpuscle polar), ^a 1CP fragmentats n'estan exclosos, ^b dades de dos cicles de la mateixa pacient.
Total (taules D-4 i D-5)		27 casos		368				321

El protocol que proposem és el resultat d'una adaptació progressiva als casos clínics realitzats que inclou les modificacions assenyalades anteriorment, aplicades fins als casos:

- [p, q] [taula III vegeu l'apartat 4.7],
- [r] no inclòs a l'article 2,
- [I] [taula IV vegeu l'apartat 4.7],
- [K] no inclòs a l'article.

Cieslak i col·l. (2000) refereixen diversos casos estudiats però no donen detalls dels resultats de cap d'ells. També Findikli i col·l. (2003) refereixen casos de DGP amb 1CP-2CP però no en donen detalls ja que engloben vint-i-vuit cicles de DGP per translocacions robertsonianes (set casos) i recíproques (setze casos), d'origen matern, mitjançant anàlisi d'1CP-2CP (tres cicles) o mitjançant l'anàlisi de blastòmer (vint-i-cinc cicles).

En els nostres casos [m, n, p, q] [taula D-4] i casos [H, I, J, K] [taula D-5], es van obtenir un total de 111 CCO de nou pacients. D'aquests CCO, vuitanta-tres (74,8 %) eren oòcits madurs, vuit (7,2 %) eren oòcits immadurs en estadi de MI que van madurar espontàniament en el medi de cultiu, i la resta d'oòcits es van lissar durant l'eliminació de les cèl·lules del cúmul o oòcits immadurs que no van madurar en el medi de cultiu. Dels noranta-un oòcits madurs (vuitanta-tres MII i vuit MII MIV+), set no es van biopsiar perquè tenien l'1CP fragmentat. Vuitanta-quatre oòcits es van biopsiar i el 89,3 % (setanta-cinc de vuitanta-quatre) dels 1CP es van obtenir amb èxit. En sis cicles, la biòpsia dels 1CP es va fer amb el mètode físic (làser), en tres cicles la biòpsia dels 1CP es va fer amb el mètode mecànic (PZD) i en un únic cas la biòpsia dels 1CP es va fer amb el mètode químic (àcid Tyrode). El mètode de biòpsia més àmpliament utilitzat ha estat el mètode mecànic (PZD) [taules D-4 i D-5]; això no obstant a nosaltres ens ha donat millors resultats el mètode físic (làser).

Tenint en compte el vint-i-quatre casos publicats i descrits detalladament, més els tres casos [r, J, K] no publicats, el DGP-1CP s'ha aplicat a vint-i-set dones portadores de translocacions [taula D-4 i D-5], s'han recuperat 368 CCO (246 procedents de dones portadores de translocacions robertsonianes i 122 procedents de dones portadores de translocacions recíproques), 321 (87,2 %) dels oòcits van ser biopsiats (222 oòcits procedents de dones portadores de translocacions robertsonianes i 99 oòcits procedents de portadores de translocacions recíproques) i la resta corresponien a oòcits immadurs o amb 1CP fragmentat que no van ser biopsiats. A partir de l'anàlisi dels 321 1CP biopsiats, es van diagnosticar el 75,7 % (243 de 321) dels oòcits (181 oòcits procedents de dones portadores de translocacions robertsonianes i 62 oòcits procedents de portadores de translocacions recíproques), els oòcits restants no van poder ser diagnosticats a causa de la pèrdua de l'1CP durant la fixació o per no tenir resultat de la FISH en 1CP [taules D-6 i D-7].

Taula D-6. Translocacions robertsonianes: resultats de l'anàlisi de l'anàlisi citogenètic de l'1CP.

Pacient	Biòpsia 1CP ^a	Sondes	Òcits (%)			
			Diagnosticats	Normals	Equilibrats	Desequilibrats
a	32	Pintat 14, Pintat 21 ^a	28 (87,5)	32,1	28,6	39,3
b	21	Pintat 14, Pintat 21	19 (90,5)	36,8	5,3	57,9
c	32	Pintat 14, Pintat 21	24 (75,0)	41,7	16,7	41,6
d	16	Pintat 14, Pintat 21	15 (93,8)	40,0	33,3	26,7
e	11	Pintat 13, Pintat 14 ^b	11 (100,0)	54,5	9,0	36,5
f	13	Pintat 13, Pintat 14	13 (100,0)	69,2	23,1	7,7
g	15	Pintat 13, Pintat 14	11 (73,4)	27,3	18,2	54,5
h	13	Pintat 13, Pintat 14	13 (100,0)	30,8	30,8	38,4
i	11	Pintat 13, Pintat 14	9 (81,9)	77,8	0,0	22,2
j	6	Pintat 13, Pintat 14	5 (83,4)	40,0	0,0	60,0
k	8	Pintat 13, Pintat 14	7 (87,5)	57,1	28,6	14,3
m	13	Pintat 14, Pintat 21	7 (63,6)	0,0	3 (42,8)	4 (57,2)
n	4	R1: Locus 13, Telòmer 14q / R2: Pintat 13, Pintat 14	2 (50,0)	1 (50,0)	0,0	1 (50,0)
p	12	R1: Locus 13, Telòmer 14q / R2: Pintat 13, Pintat 14	8 (100,0)	2 (25,0)	1 (12,5)	5 (62,5)
q1 ^c	2	R1: Locus 13, Telòmer 14q / R2: Pintat 13, Pintat 14	1 (100,0)	1 (50,0)	0,0	0,0
q2 ^c	2	R1: Locus 13, Telòmer 14q / R2: Pintat 13, Pintat 14	1 (100,0)	0,0	0,0	1 (50,0)
r	11	R1: Locus 13, Telòmer 14q / R2: Pintat 13, Pintat 14	7 (87,5)	0,0	3 (42,8)	4 (57,2)
222			181 (81,5)	71 (39,2)	37 (20,4)	73 (40,3)

1CP (primer corpuscle polar), Diag (diagnòstic), Eq (equilibrat), Deseq (desequilibrat), R (ronda de FISH).

^a 1CPs fragmentats n'estan exclosos.^b una sonda locus específica 13 o 21 també va ser afegida en alguns casos.^c dades de dos cicles de la mateixa pacient.

Taula D-7. Translocacions recíproques: resultats de l'anàlisi citogenètic de l'1CP.

Pacient	Biòpsia 1CP ^a	Sondes	Òcits (%)			
			Diagnosticats	Normals	Equilibrats	Desequilibrats
A	6	Pintat 4, Telòmer 4pl, Pintat 14	5 (83,4)	0,0	40,0	60,0
B	8	Pintat 7, Centròmer 7, Pintat 20, Centròmer 20	6 (75,0)	0,0	50,0	50,0
C	8	Pintat 14, Pintat 18, Centròmer 18	5 (62,5)	12,5	20,0	67,5
D	2	Centròmer 12, YACs 858D9, 922C8	2 (100,0)	50,0	0,0	50,0
E	19	Pintat 11, Centròmer 11, Centròmer 16	11 (57,9)	45,4 ^b	9,0	45,6
F	5	Pintat 9, Centròmer 9, Pintat 11, Telòmer 11q	2 (40,0)	0,0	100,0	0,0
G	11	Pintat 11, Centròmer 11, Pintat 16	7 (63,6)	42,9	14,3	42,8
H	15	R1: Centròmer 4, Centròmer 12 / R2: Pintat 4, Pintat 12	8 (80,0)	12,5	0,0	87,5
I	9	R1: Telòmer 18q, Centròmer 18, Pintat 18 / R2: Pintat 1, Pintat 18	4 (66,6)	25,0	0,0	75,0
J	5	R1: Centròmer Pintat 11 / R2: Telòmer 4q, Centròmer 11	3 (75,0)	0,0	0,0	100,0
K	11	R1: Pintat 8, Locus 13 / R2: Telòmer 8, Pintat 13	9 (100,0)	0,0	11,1	88,9
99			62 (62,6)	12 (19,3)	11 (17,7)	39 (62,9)

1CP (primer corpuscle polar), Eq (equilibrat), Deseq (desequilibrat), ND (no diagnòstic), R (ronda de FISH).

^a 1CPs fragmentats n'estan exclosos.^b dos resultat de recombinació de cromàtides.^c un resultat de recombinació entre cromàtides i no cromosomes sencers.^d 1 haploide.

Les estratègies de FISH aplicades fins ara inclouen, o només sondes de cromosoma sencer [taula V vegeu l'apartat 4.7 art.2 i taula D-6; casos a-m], o bé combinades amb sondes telomèriques, centromèriques o de locus específic en una ronda de FISH [taula VI vegeu l'apartat 4.7 art.2 i taula D-7; casos A-G] o en dues rondes de FISH [taules V i VI vegeu l'apartat 4.7 art.2 i taules D-6 i D-7; casos n-r; casos H i K].

En les translocacions robertsonianes, els percentatge global de diagnosi d'òcits mitjançant 1CP ha estat del 81,5 % (amb una oscil·lació entre el 50,0 % i 100,0 %) amb quatre casos que arriben al 100,0 % [taula D-6].

En les translocacions recíproques el percentatge global de diagnosi d'òcits mitjançant 1CP ha estat del 62,6 % (amb una oscil·lació entre el 40,0 % i el 82,0 %) amb un únic cas que arriba al 100 %, en el qual només es van biopsiar i diagnosticar dos oòcits [taula D-7].

Fins ara han estat publicats detalladament setze casos de dones portadores de translocacions robertsonianes, onze casos de dones amb cariotip 45,XX,t(13;14)(q10;q19) i cinc casos de dones amb cariotip 45,XX,t(14;21)(q10;q10) [taules D-4] (Munné i col·l. 2000a; vegeu l'apartat 4.7 art.2 i el present treball). S'ha pogut observar que el percentatge d'òcits desequilibrats varia àmpliament, del 7,7 % al 62,5 % [taules D-6].

Resumint les dades de DGP-1CP en translocacions robertsonianes, del 81,5 % (181 de 222) d'òcits diagnosticats, el 39,2 % van ser normals, el 20,4 % van ser equilibrats; per tant, aproximadament un 60 % d'òcits eren normals o equilibrats. És important remarcar que en translocacions robertsonianes, si el nombre d'òcits aptes per ser biopsiats és alt, per exemple superior a deu, el percentatge d'1CP diagnosticats es manté en la mitjana (81,2 %) [taula D-4].

Paral·lelament, fins ara han estat publicats detalladament onze casos de dones portadores de translocacions recíproques, tots ells amb cariotip diferent [taula D-5]. El percentatge d'òcits desequilibrats varia una mica menys que en translocacions robertsonianes. Resumint les dades del DGPI-1CP en dones portadores de translocacions recíproques, el 62,6 % (62 de 99) dels oòcits van poder ser diagnosticats. El 19,3 % dels oòcits van ser normals i el 17,7 % dels oòcits van ser equilibrats; per tant, aproximadament el 40 % dels oòcits van ser normals o equilibrats resultants d'una segregació 2:2 alternant [taula D-5].

Així doncs, el percentatge d'òcits *normal/equilibrat* respecte d'òcits desequilibrats són contraris en translocacions robertsonianes (60 % normal/equilibrat i 40 % desequilibrat) respecte de translocacions recíproques (40 % normal/equilibrats i 60 % desequilibrat). Findikli i col·l. (2003), descriu una relació similar entre translocacions robertsonianes (45 % normal/equilibrat i 55 % desequilibrat) i translocacions recíproques (30 % normal/equilibrat i 70 % desequilibrats).

El DGP-1CP aporta informació de gairebé el total dels oòcits recuperats, incloent-hi els que no fecundarien, la qual cosa permet un consell genètic més complet del risc de tenir descendència

anòmala. A més, com hem indicat anteriorment, després de realitzar el DGP-1CP, si és el cas, també és possible portar a terme el diagnòstic dels embrions derivats d'òcits no diagnosticats. Les causes poden ser diverses: 1CP no biopsiats perquè estaven fragmentats, 1CP perduts durant el procés de biòpsia, 1CP perduts durant el procés de fixació, 1CP mostrant dues cromàtides diferents com a conseqüència de la recombinació meiótica, o 1CP amb resultat de la FISH no informatiu.

S'ha aplicat el *DGP-1CP en combinació amb biòpsia de blastòmer* en tres casos de translocacions robertsonianes: taules D-4 i R-11, casos [p, q, r]. I també en dos casos de translocacions recíproques: taules D-5 i R-13, casos [I-K]. En aquests cinc casos la freqüència d'òcits sense diagnòstic després de la biòpsia i anàlisi d'1CP va ser del 34,7 % (disset de quaranta-nou, incloent-hi quatre òcits amb 1CP fragmentat que no van ser biopsiats), després de biòpsia i anàlisi d'onze embrions (64,7 %) es van diagnosticar el 81,8 % (nou d'onze) dels embrions i, per tant, la taxa global de no-diagnosi va baixar finalment, sent del 16,3 % (vuit de quaranta-nou). Tres embrions van ser diagnosticats com a normals o equilibrats després del sistema de doble anàlisi, la qual cosa permet, en el cas [p] i cas [q] [taula R-11a] la transferència de dos embrions.

En el present treball s'han pogut transferir cinc embrions de quatre cicles de translocacions robertsonianes [taula R-11a] i cap dels embrions obtinguts en els de casos de translocacions recíproques [taula R-13]:

- [m] Un embrió procedent d'un òcit equilibrat amb el cromosoma der14;21.
- [p] Dos embrions transferits, un embrió procedent d'un òcit normal o equilibrat per als cromosomes 13 i 14; i un embrió procedent d'un òcit equilibrat amb el cromosoma der13 i 14.
- [q] Un embrió procedent d'un òcit normal per als cromosomes 13 i 14.
- [r] Un embrió procedent d'un òcit equilibrat amb el cromosoma der 13;14.

Les dades sobre embrions transferits i taxa de gestació dels casos publicats per DGP-1CP d'anomalies cromosòmiques robertsonianes i recíproques, estan detallades a les taules D-8 i D-9, respectivament.

Taula D-8. Translocacions robertsonianes: resultat final del DGP-1CP.

Pacient	Diagnòstic de l'òcit (%)	Embrions transferits	Gestació	Evolució de la gestació
a	87,5			
b	90,4			
c	75,0			
d	93,7			
e	100,0			
f	100,0			
g	73,3			
h	100,0			
i	81,8			
j	83,3			
k	87,5			
Els autors resumeixen d'onze pacients, setze cicles de DGP-1CP. Set aconseguixen l'embaràs amb tretze embrions implantats. Un embaràs (dos fetus) evolutiu, i onze fetus, nou cromosòmicament de normals i dos d'equilibrats.				
m	53,9	1	–	–
n	50,0	0 ^a	–	–
p	75,0	2 ^b	única	Avortament 7a setmana
q1	50,0	0+1 ^c	–	–
q2	100,0	1	–	–
r	63,6	3	–	–

DGP-1CP (diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant primer corpuscle polar).

^a un embrió sense diagnòstic transferit per desig de la parella.^b un de diagnosticat mitjançant biòpsia de 1CP i un de diagnosticat mitjançant biòpsia de blastòme^c no és possible distingir entre normal o equilibrat.

Taula D-9. Translocacions recíproques: resultat final del DGP-1CP.

Pacient	Diagnòstic de l'òcit (%)	Embrions transferits	Gestació	Evolució de la gestació
A	83,4	0+2 ^a	única	Avortament 7a setmana
B	75,0	2	doble	dos nounats
C	62,5	0	–	–
D	100,0	1	–	–
E	57,9	0+0 ^a	–	–
F	40,0	1	única	un nounat
G	63,6	1	única	–
H	53,4	0	–	–
I	44,4	0	–	–
J	60,0	0	–	–
K	81,8	0	–	–

DGP-1CP (diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant primer corpuscle polar).

^a dos cicles de DGP i dues transferències embrionàries.

Cal tenir en compte que la taxa de gestació, a part de la transferència d'embrions normals o equilibrats, també es veu afectada per la qualitat i el nombre d'embrions transferits. A més, també cal considerar el risc citogenètic afegit que alguns treballs evidencien en portadors de translocacions. Aquests presentarien un important increment d'alteracions d'altres cromosomes no implicats en les reorganitzacions (efectes intercromosòmics) (Pujol i col·l. 2003, 2004 i 2006) i que també estarien impeding la implantació embrionària.

L'eficàcia global de DGP depèn del rendiment del mètode de diagnòstic, del nombre d'òcits disponibles, de la seva fecundació i del potencial de creixement dels embrions. Sempre s'aconseja que la mare se sotmeti a un diagnòstic prenatal clàssic (amniocentesi, biòpsia de còrion) per confirmar el

diagnòstic. També cal tenir en compte que hi ha una sèrie de riscos durant el DGP, tal com el dany produït a l'òocit o embrió durant el procés de biòpsia i/o la pèrdua de cèl·lules biopsiades durant el processament i l'anàlisi. Cal avisar També cal avisar la parella de la possibilitat de no poder obtenir l'anàlisi genètica d'alguna cèl·lula, així com de l'error de diagnòstic inherent a la tècnica. Si el nombre d'embrions normals o equilibrats és baix es pot valorar la possibilitat de congelar embrions per a fer-ne transferència d'un nombre major d'embrions en cicles posteriors.

Findikli i col·l. (2003) han fet un estudi sobre els efectes de les translocacions comparant els resultats amb embrions control. Apliquen el DGP analitzant 1CP-2CP i majoritàriament també amb l'anàlisi de blastòmer. Aquests autors descriuen en aquests embrions una taxa de fecundació menor, més retard en el desenvolupament embrionari, i una menor taxa de formació de blastocits. Per aquests motius la taxa d'embaràs no és elevada.

El DGP-1CP ha estat utilitzat àmpliament per a l'anàlisi d'anomalies gèniques (mitjançant PCR) i anomalies numèriques (mitjançant FISH). Com hem dit anteriorment, també ha estat utilitzat almenys en vint-i-set casos de translocacions descrits detalladament (mitjançant FISH) (Munné i col·l. 1998a,b,c, 2000; Willadsen i col·l. 1999; vegeu l'apartat 4.7 art.2; i el present treball). Però també en nous camps com el tipatge de HLA (Verlinsky i col·l. 2001) i també per anomalies d'herència mitocondrial (Briggs i col·l. 2000).

A part de la PCR i la FISH convencional també s'apliquen tècniques més noves com la *hibridació genòmica comparada* (compared genomic hybridization, CGH) (Wells i col·l. 2002; i Gutiérrez-Mateo i col·l. 2005). Recents avenços inclouen la reducció de pèrdues d'amplificació o amplificació preferent d'un al·lel (*allele dropout*, ADO) (Rechitsky i col·l. 1996) utilitzant variants de la PCR clàssica en corpuscles polars, tal com la *multiplex nested PCR* (Rechitsky i col·l. 1998; Verlinsky i col·l. 1997 i 1999), i el desenvolupament de protocols més curts utilitzant la PEP (*primer extension preamplification*) (Zhang i col·l. 1992; Sermon i col·l. 1996; Sánchez-García i col·l. 2005) per caracteritzar anomalies gèniques de gen únic, com per exemple la fibrosi cística. També s'ha aplicat la tècnica de PRINS (*primer in situ reaction*) (Petit i col·l. 2000) i la realització d'un cariotip espectral (*spectral karyotyping*, SKY) (Márquez i col·l. 1998) per caracteritzar la majoria d'anomalies cromosòmiques.

L'ESHRE recull els cicles realitzats de DGP des de l'any 1997 i l'últim recull correspon a les dades generades a desembre 2003 (Sermon i col·l. 2007). Cal tenir en compte que globalment els anys 1998–2003 s'han fet 200 cicles de DGP per translocacions robertsonianes d'origen matern i només quatre s'han fet mitjançant 1CP. Pel que fa a translocacions recíproques d'origen matern, el recull de la ESHRE descriu 405 cicles i només tres han estat fets mitjançant biòpsia i anàlisi d'1CP [taula D-10].

Taula D-10. Cicles de DGP realitzats en parelles amb la dona portadora d'una translocació cromosòmica.

	Translocació robertsoniana		Translocació recíproca	
	ESHRE (1998 a 2003) Sermon i col·l. 2007	Present treball	ESHRE (1998 a 2003) Sermon i col·l. 2007	Present treball
Cicles	200	6	405	4
Tipus de cèl·lula				
1CP	4	6	3	4
Blastòmer	196	3	399	2
Blastocist	0	0	3	0
Mètode de biòpsia				
Químic (àcid Tyrode)	132	0	305	1
Físic (làser)	63	4	88	1
Mecànic (PZD)	5	2	12	2
Embriologia				
CCO recuperats	2992	68	6438	43 ^b
Oòcits inseminats	2498	49 ^a	5616	34 ^c
Oòcits fecundats	1827	31	4202	12
Cèl·lules biopsiades	1466	44	3373	40
Biòpsies totals exitoses	1343	39	3320	36
Embrions diagnosticats	1312	26	3080	25
Embrions transferibles	407	14	640	3
Embrions transferits	315	7	544	0
Embrions congelats	28	0	25	0
Resultats clínics				
Cicles amb transferència	163	4	280	0
βhCG positiva	49	1	76	0
Batec cardíac positiu	38	1	58	0

DGP (diagnòstic genètic preimplantacional), ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology).

1CP (primer corpuscle polar), CCO (complex cúmul oòfor).

^a 18 oòcits inseminats després de la biòpsia.^b 8 no inseminats, fixats i analitzats.^c 8 oòcits inseminats després de la biòpsia.

Molt recentment la Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS 2008) ha publicat unes línies directrius per a l'actuació clínica en l'atenció a pacients que pateixen una determinada anomalies gèniques o cromosòmiques que inclou entre d'altres punts, les indicacions, el tractament de FIV, el tipus de cèl·lula biopsiada, el tipus d'anàlisi, els embrions transferibles i descartats; i el seguiment de les gestacions. La biòpsia d'1CP es recomana fer-la mitjançant el mètode mecànic i no es comenta el moment en que es fa l'ICSI respecte la biòpsia d'1CP.

5.5.3 Correlació entre la segregació cromosòmica preferent i la freqüència de recombinació meiòtica

S'han evidenciat per primera vegada una correlació significativa positiva (coeficient de correlació de 0,8698, $p < 0,01$) entre la freqüència de *punts calents de recombinació* en els segments intersticials dels tetravalents i la incidència de complements amb *no-disjunció dels cromosomes homòlegs* [taula R-14]. La taxa de recombinació s'ha extrapolat a partir de les freqüències de recombinació publicades l'any 1985 per Laurie i Hultén (Laurie i Hultén 1985a i b). D'aquesta manera, se suggereix que la resolució del tetravalent i la segregació dels cromosomes implicats en la translocació està altament relacionada amb la presència o l'absència de quiasmes intersticials. Aquest fet està relacionat amb l'absència del tipus de segregació adjacent II en el cas, descrit per Pierce i col·l. (1998), d'una translocació 46,XX,t(5;8)(p13;q23) en la qual la freqüència de quiasmes intersticials en els cromosomes implicats és zero.

Pel que fa a les translocacions robertsonianes no s'ha observat cap correlació positiva entre el nombre de quiasmes i la incidència de no-disjunció entre homòlegs. El nombre de quiasmes en els trivalents no depèn de la presència de punts calents de recombinació; en la resolució de quiasme del trivalent no interfereix la presència de regions centromèriques sinó que dependria probablement de l'orientació dels centròmers en el trivalent.

5.5.4 Avantatges i desavantatges del DGP-1CP

Evidentment l'aplicació del DGP-1CP només està indicada en casos en els quals és la dona la portadora de l'anomalia cromosòmica genètica o citogenètica, i el pare és normal.

Un gran avantatge del DGP-1CP és que fent l'estudi de l'òocit podem conèixer la constitució cromosòmica de tots els òocits madurs recuperats, incloent-hi els òocits que no es fecunden, zigots anòmals (1PN, > 2PN i 2PN aturats), o embrions no evolutius (embrions massa lents o fragmentats). D'aquesta manera es pot donar un diagnòstic més extens de la cohort d'òocits de la pacient. A més, en cas d'un diagnòstic dubtós mitjançant l'1CP, eventualment es pot fer una confirmació mitjançant la biòpsia del 2CP del zigot o d'un blastòmer de l'embrió de sis-vuit cèl·lules resultants d'aquell òocit. Aquest fet no és possible en el clàssic DGP mitjançant blastòmers. Tot i així, després de qualsevol DGP, ja sigui mitjançant 1CP o blastòmer, per confirmar el diagnòstic i com que no s'analitzen tots els cromosomes del complement, està indicat fer el diagnòstic prenatal en cas d'embaràs.

A més, en el DGP-1CP s'obvia la problemàtica del mosaïcisme que s'ha evidenciat molt freqüent en les primeres divisions embrionàries (Munné i col·l. 2002b) la qual cosa dificulta el diagnòstic amb el blastòmer i la possible selecció d'embrions citogenèticament normals aptes per a la transferència.

El DGP-1CP és una alternativa al DGP mitjançant blastòmer, per a parelles amb objeccions morals sobre la selecció d'embrions, o per a països em què el diagnòstic genètic d'embrions està legalment prohibit. A Alemanya, l'única opció per fer DGP és l'anàlisi de CP abans de la singàmia (Tomi i col·l. 2006) i a França l'única opció possible de cribratge d'aneuploïdies en dones d'edat avançada és el DGP-1CP abans de la inseminació dels oòcits, s'inseminen els oòcits amb resultat de la FISH normal (Vialard i col·l. 2006).

Els desavantatges principals estan relacionats amb el fet que per al diagnòstic d'anomalies monogèniques, com la fibrosi cística (Cieslak i col·l. 2000) els oòcits amb cromosomes heterozigòtics poden produir tant descendència normal com anòmala. Quan la mare és heterozigòtica per a una anomalia gènica, la recombinació té lloc entre el cromosoma amb l'al·lel normal i el cromosoma amb l'al·lel anòmal, els oòcits amb 1CP heterozigòtic han de ser descartats perquè a la meiosi II l'oòcit té la mateixa possibilitat de retenir la cromàtide que conté l'al·lel normal que la cromàtide que conté l'al·lel anòmal. Com a resultat, una proporció significativa d'oòcits que podrien haver estat inseminats no poden ser utilitzats, i la possibilitat de reproducció és reduïda considerablement. En aquests casos cal la confirmació per biòpsia i l'anàlisi del 2CP (Verlinsky i col·l. 1997), o bé de blastòmer. Això no obstant, en aquest cas la fecundació de l'oòcit s'ha d'haver produït perquè el 2CP sigui extrusionat com a resultat del final de la meiosi II i, en aquest cas, la constitució cromosòmica de l'1CP es ressentirà ja que estarà en un estadi avançat de deteriorament. Per als casos de parelles amb objeccions morals o limitacions legals, la biòpsia del 2CP no es podria fer.

També s'ha de tenir en compte que tot i haver diagnosticat l'oòcit indirectament a través de l'1CP, encara es pot donar una segregació anòmala i/o recombinació entre cromàtides, fet que també requeriria una anàlisi posterior del 2CP per tal de veure el resultat de la segona divisió meiòtica. S'han obtingut metafases de 2CP via electrocució del nucli del 2CP amb zigots intactes o enucleats de ratolí i fixant els heterocarions resultants quan són a l'estadi de la primera divisió mitòtica (Verlinsky i Evsikov 1999) descriuen un mètode que combina la biòpsia d'1CP i 2CP.

Un altre desavantatge rau en el fet que la contribució paterna al complement de l'embrió no es pot conèixer, llevat que es faci per biòpsia de blastòmer, especialment d'interès en casos de diagnòstic d'aneuploïdies.

5.5.5 Consideracions sobre la regulació de les tècniques de reproducció assistida

Soini i col·l. (2006) fan un repàs de les regulacions nacionals sobre *tècniques de reproducció assistida* (TRA) a països europeus. Les TRA a la majoria de països estan regulades i les lleis actuals daten dels anys 1990 al 2004, essent la llei espanyola la més recent (*Llei 14/2006*). Hi ha països en què la llei és molt restrictiva, en concret a Itàlia i a països poc restrictius com Espanya.

Les diferències bàsicament rauen en punts polèmics com la donació de gàmetes i/o embrions, l'anonimat o no de la donació, el nombre de fills permesos per donant, l'edat de la dona, el nombre d'embrions a transferir, la congelació d'embrions, la recerca en embrions i l'aplicació del DGP.

Centrant-nos en el DGP, aquest no està permès a Àustria ni a Itàlia. Hi ha altres països en què el DGP està o no permès només en determinades circumstàncies; per exemple, a Noruega només està permès en casos greus d'anomalies lligades al sexe sense tractament, a Suècia només està permès en malalties serioses i incurables, a França no està permès el DGP per cribratge d'aneuploidies per edat materna avançada, i a Alemanya i Suïssa no està permès el DGP en embrions; només està permès en corpuscles polars. També hi ha altres països en els quals no està permès o bé no està regulat, com ara Bèlgica, Finlàndia, Holanda, Grècia i Dinamarca.

Si ens fixem en el punt de vista religiós dels europeus, cal tenir en compte que els cristians no comparteixen les mateixes opinions. El Vaticà no aprova la reproducció assistida, mentre que l'Església anglicana i la Protestant accepten moltes formes de TRA. L'Islam permet la congelació d'embrions però no es poden donar; la donació d'òcits no és èticament acceptable i en general no està permesa. El DGP per indicació mèdica sí que està permès. A Israel hi ha la concentració més alta per càpita de clíniques de FIV. El deure de procreació és el primer manament de la Torà jueva. Moltes formes de TRA estan permeses, incloent-hi el DGP, tot i que està desaprovaada la donació de gàmetes. La comunitat ortodoxa també permet el DGP.

- pàg. en blanc -

Capítol 6: conclusions



- 1- S'ha desenvolupat, per primera vegada, un procediment de fixació del *primer corpuscle polar* (1CP) d'òocits de mamífer (hàmmster i humà) que permet obtenir extensions dels complements cromosòmics amb morfologia cromosòmica preservada i en estadi de *metafase II meiótica*. S'ha pogut evidenciar que els cromosomes d'1CP tenen un grau d'empaquetament menor i un aspecte desorganitzat amb un contorn menys definit que l'observat en els òocits corresponents [objectius concrets 2.1.1.1 i 2.1.1.2].
- 2- El mètode desenvolupat consisteix en l'aplicació d'un tractament hipotònic curt (0,5 M de citrat sòdic durant 5 minuts) la qual cosa deixa que la solució hipotònica comenci a assecar-se sobre el portaobjectes prèviament tractat amb trimetoxisilà, abans d'aplicar-hi un flux suau de fixador etanol : àcid acètic (1:1) fred. La reducció de la proporció d'alcohol en el fixador emprat (1:1 en comptes de la proporció clàssica 3:1) i la temperatura del fixador afavoreixen la seva més lenta evaporació i es redueixen les pèrdues cromosòmiques artefactuals. El flux suau de fixador, a més del tractament previ dels portaobjectes amb trimetoxisilà, també són fonamentals per obtenir una bona qualitat de les extensions cromosòmiques [objectius concrets 2.1.1.1 i 2.1.1.2].
- 3- S'ha demostrat mitjançant l'aplicació de l'*hibridació in situ fluorescent* (FISH) que les *dotacions cromosòmiques de l'1CP i de corresponent òocit en MII són complementàries*. Així, l'anàlisi de l'1CP dona informació indirecta de l'òocit i pot ser aplicat en el *diagnòstic genètic preimplantacional mitjançant l'anàlisi d'1CP* (DGP-1CP) [objectiu concret 2.1.1.3].
- 4- S'ha observat una taxa baixa d'aneuploïdia per als cromosomes estudiats en *òocits descartats postinseminació* (envellits) del 5,1 % i nul·la en *òocits no inseminats* (frescos). Les taxes d'aneuploïdia trobades a la bibliografia oscil·len entre el 3,1 % i el 58,7 % [objectiu concret 2.1.2].
- 5- S'han estudiat *òocits immadurs humans anòmals* descartats de cicles de fecundació in vitro (FIV) i s'ha demostrat que un 25,4 % eren complements euploides en metafase I (MI) i la resta eren aneuploides amb complements cromosòmics MII diploides, dos complements cromosòmics MII separats o amb guany o pèrdua de bivalents en MI. S'ha observat una incidència major d'aneuploïdia en òocits immadurs descartats postinseminació (88,2 %) que en òocits immadurs no inseminats (47,1 %) [objectiu concret 2.1.3].
- 6- S'han estudiat *zigots humans anòmals* descartats de cicles de FIV amb inseminació convencional per tenir més de dos pronuclis i, en tots ells, la ploïdia corresponia al nombre de nuclis observat. En zigots >2PN la ploïdia correspon al nombre de nuclis observat abans de la fixació. Per contra els zigots amb un sol pronucli poden ser haploides (11,1 %) o diploides (88,9 %). Les taxes de ploïdia en zigots 1PN trobades a la bibliografia són un 20 % i un 80 %, respectivament [objectiu concret 2.1.3].

- 7- El DGP-1CP mitjançant la FISH permet detectar d'*aneuploidies d'origen matern* (de primera divisió meiótica) i d'*alteracions cromosòmiques estructurals derivades de reorganitzacions cromosòmica d'origen matern*. Dels DGP-1CP realitzats s'ha fet evident que el òcits de dones portadores de *translocacions robertsonianes* són normals o equilibrats en el 59,6 % dels òcits mentre que són desequilibrats en el 40,4 % restant. També del DGP-1CP s'ha fet evident que els òcits diagnosticats de dones portadores de *translocacions recíproques* són normals o equilibrats en el 37,0 % mentre que son desequilibrats en el 63 % restants [objectiu concret 2.1.3].
- 8- S'ha proposat un protocol d'aplicació del DGP-1CP. I inclou la inseminació dels òcits amb *injecció intracitoplasmàtica d'un espermatozoide* (ICSI) just abans de la *biòpsia d'1CP* per tal d'evitar sortides artefactuals dels zigots de la zona pel·lúcida. La biòpsia de l'1CP es pot fer pel mètode mecànic o amb làser i es requereix una pipeta de punta arrodonida i de diàmetre una mica superior al del 1CP (20 µm). L'ús d'àcid Tyrode en biòpsia d'1CP no és recomanable ja que pot afectar la qualitat cromosòmica i la taxa de fecundació [objectiu concret 2.1.4].
- 9- El DGP-1CP per *seleccionar indirectament* els embrions a transferir en famílies en les que l'origen del risc citogenètic és femení, és una aproximació més adequada que la biòpsia i anàlisi de blastòmers. El DGP-1CP permet l'aplicació de la FISH emprant tant sondes d'ADN per cromosomes sencers, centròmers o seqüències úniques intersticials o terminals. A més DGP-1CP possibilita, en cas d'1CP fragmentats o no informatius, realitzar una *segona anàlisi*, ara de l'embrió de sis-vuit cèl·lules (D + 3), mitjançant biòpsia i anàlisi de *blastòmer* aplicant la FISH [objectiu concret 2.1.4].
- 10- S'ha evidenciat per primera vegada una correlació significativament positiva (coeficient de correlació de Pearson de 0,8698, $p < 0,01$) entre la freqüència de *punts calents de recombinació* en els segments intersticials dels tetravalents i la incidència de complements amb *no-disjunció* de cromosomes homòlegs en dones portadores de translocacions recíproques [objectiu concret 2.1.4].

Capítol 7: bibliografia



- Les referències bibliogràfiques estan endreçades per primer cognom del primer autor i any de publicació. No hi ha primers autors que comencin per les lletres [i], [q], [x] i [y].
- Portades de revistes científiques.
- Pàgines web utilitzades.

A

A

-
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1987) *Biología Molecular de la Célula – 4ª Edición* - ED. Omega – ISBN 84-282-0752-6
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell – 4th Edition* - Garland Science - ISBN 0815332181
- Angell RR. (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum. Genet.* 86(4):383-387.
- Angell RR, Xian J, Keith J. (1993) Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum. Reprod.* 8:1047-1054.
- Angell RR, Xian J, Keith J, Ledger W, Baird DT. (1994) First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet. Cell Genet.* 65(3):194-202.
- Angell RR. (1995) Mechanism of chromosome nondisjunction in human oocytes. *Prog. Clin. Biol. Res.* 393:13-26.
- Antonarakis SE. (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of ADN polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N. Engl. J. Med.* 324(13):872-876.
- Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M i col·l. (1992) The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using ADN polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 50(3):544-550.

B

B

-
- Bánk EB. (1965) Pregnancy following artificial insemination in cases of paternal oligospermia. *Zentralbl. Gynakol.* 87(30):1046-1049.
- Bartmann AK, Salata Romao G, da Silveira Ramos E, Ferriani RA. (2004) Why Do Older Women Have Poor Implantation Rates? A Possible Role of the Mitochondria. *J. Assist. Reprod. Genet.* 21:79-83.
- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum. Reprod.* 11(10):2217-2222.
- Benet J, Genescà A, Navarro J, Egozcue J, Templado C. (1986) G-banding of human sperm chromosomes. *Hum. Genet.* 73(2):181-182.

- Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB. (1996) Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13(2):140-148.
- Biggers JD. (1971) Metabolism of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 14:41-54. Review.
- Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J. (2000) Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil. Steril.* 73(1):31-37.
- Boada M, Carrera M, De la Iglesia C, Sandalinas M, Barri P, Veiga A. (1998) Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15:302-307.
- Boué J, Bou A, Lazar P. (1975) Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12(1):11-26.
- Brambati B, Simoni G. (1983) Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet* 12;1(8324):586.
- Briggs DA, Power NJ, Lamb V, Rutherford AJ, Gosden RG. (2000) Amplification of ADN sequences in polar bodies from human oocytes for diagnosis of mitochondrial disease. *Lancet* 29;355(9214):1520-1521.
- Byсков AG, Faddy MJ, Lemmen JG, Andersen CY. (2005) Eggs forever?. *Differentiation.* 2005 Dec;73(9-10):438-46.

C

C

- Chan CC, Liu VW, Lau EY, Yeung WS, Ng EH, Ho PC. (2005) Mitochondrial ADN content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 11(12):843-6.
- Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. (1999) Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil. Steril.* 71(2):308-313.
- Cieslak J, Evsikov S, Ivakhnenko V i col.l. (2000) Preimplantation diagnosis for maternally and paternally derived translocations using conversion of single blastomeres and second polar bodies into interphase chromosomes. [Abstr. N°0-123] *Hum. Reprod.* 15 (Abstracts Book 1):48.
- 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(6):1826-1829.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Wiemer K. (1990) Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.* 5(1):7-13.
- Cohen J, Alikani M, Liu HC, Rosenwaks Z. (1994) Rescue of human embryos by micromanipulation. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.-I.* 8(1):95-116. Review.
- Conn CM, Cozzi J, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. (1999) Preimplantation genetic diagnosis for couples at high risk of Down syndrome pregnancy owing to parental translocation or mosaicism. *J. Med. Genet.* 36:45-50.

D

D

-
- Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II. *Am. J. of Hum. Genet.* 59:176-184.
- De Vita R, Calugi A, Cavallo D, Eleuteri P, Vizzone A. (1993) Flow cytometric and cytogenetic analyses in human spontaneous abortions. *Hum. Genet.* 91(5):409-415.
- De Braekeleer M, Dao TN. (1990) Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum. Reprod.* 5(5):519-528.
- Dyban A, Freidine M, Severova E, Cieslak J, Ivakhnenko V, Verlinsky Y. (1996) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by fluorescent *in situ* hybridization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13:73-78.

E

E

-
- Egozcue J. (1996) Preimplantation diagnosis in older patients. Of course not. *Hum. Reprod.* 11(10):2077-2078.
- Egozcue J, Navarro J, Santaló J, Vidal F, Benet J. (2006) Cytogenetic in preimplantation diagnosis. *Cytogenetics and Infertility*. Ed. Transworld Research Network – ISBN: 81-7895-303-3.
- Eiben B, Bartels I, Bähr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R i col·l. (1990) Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am. J. Hum. Genet.* 47(4):656-663.

F

F

-
- Fan HY, Sun QY, Zou H. (2006) Regulation of Separase in meiosis: Separase is activated at the metaphase I-II transition in *Xenopus* oocytes during meiosis. *Cell Cycle* 5(2):198-204.
- Findikli N, Kahraman S, Kumtepe Y, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, Berkil H, Melil S. (2003) Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases. *Reprod. Biomed. Online* 7(5):563-571.
- Fishel S. (1991) Presentation of six pregnancies established by sub-zonal insemination (SUZI). *Hum. Reprod.* 6(1):124-130.
- FIVCAT.NET 2001, Informe de la Generalitat sobre Reproducció Humana a Catalunya 2001. Servei d'informació i Estudis. Direcció General de Recursos Sanitaris. Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya, 2004. www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/pdf/fivcat2001.pdf
- FIVCAT.NET 2004, Informe de la Generalitat sobre Reproducció Humana a Catalunya 2004. Servei d'informació i Estudis. Direcció General de Recursos Sanitaris. Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya, 2007. www.gencat.net/salut/depsan/units/sanitat/pdf/fivcat2004.pdf

Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, Nakamura H, Ogita S, sato E, Inoue M. (1996) ADN fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum. Reprod.* 11(7):1480-1483.

G

G

Garcia M, Dietrich AJ, Freixa L, Vink AC, Ponsà M, Egozcue J. (1987) Development of the first meiotic prophase stages in human fetal oocytes observed by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 77(3):223-232.

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(12):3138-3148.

Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Thornhill A, Viville S, Wilton L. (2000) European Society of Human Reproduction and Embryology Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium Steering Committee. ESHRE preimplantation genetic diagnosis (PGD) consortium: data collection II (May 2000). *Hum. Reprod.* 5(12):2673-2683.

Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacrétaz G, Fakan S. (1995) Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil. Steril.* 64(3):604-611.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti A, Munné S. (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing *in vitro* fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil. Steril.* 72:837-844.

Gilliland WD, Hawley RS. (2005) Cohesin and the maternal age effect. *Cell* 23(3):371-373.

Gorr IH, Reis A, Boos D, Wühr M, Madgwick S, Jones KT, Stemmann O. (2006) Essential CDK1-inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nat. Cell Biol.* 8(9):1035-1037.

Gras L, McBain J, Trounson A, Kola I. (1992) The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) unseminated human oocytes. *Hum. Reprod.* 7(10):1396-401. Erratum in: *Hum. Reprod.* 2003 85(3):481.

Grossmann M, Calafell JM, Brandy N, Vanrell JA, Rubio C, Pellicer A, Egozcue J, Vidal F, Santaló J. (1997) Origin of triprounucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 12(12):2762-2765.

Guttenbach M, Engel W, Schmid M. (1997) Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. *Hum. Genet.* 100:1-21.

Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez M, Sánchez-García JF, Egozcue J, Navarro J, Munné S. (2004a) Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Hum. Reprod.* 19:2859-2868.

Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García J, Bermúdez M, Belil I, Egozcue J, Munné S, Navarro J. (2004b) Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum. Reprod.* 19:2118-2125.

Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Starke H, Oliver-Bonet M, Munné S, Liehr T, Navarro J. (2005) Karyotyping of human oocytes by cenM-FISH, a new 24-colour centromere-specific technique. *Hum. Reprod.* 20(12):3395-3401.

H

H

- Hardarson T, Lundin K, Hamberger L. (2000) The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum. Reprod.* 15:1372-1376.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. (1989) Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by ADN amplification. *Lancet* 18;1(8634):347-349.
- Handyside A, Kontogianni E, Hardy K, Winston R. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific ADN amplification. *Nature* 344:768-770.
- Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C, Muntjewerff N, Repping S, SenGupta S, Scriven PN, Traeger-Synodinos J, Vesela K, Wilton L, Sermon KD. (2006) ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum. Reprod.* 21(1):3-21.
- Harris M. (1978) Louise: the test-tube miracle. *Nurs Mirror.* 147(18):xv-xvi+.
- Hassold TJ, Matsuyama A, Newlands IM, Matsuura JS, Jacobs PA, Manuel B, Tsuei J. (1978) A cytogenetic study of spontaneous abortions in Hawaii. *Ann. Hum. Genet.* 41(4):443-454.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. (1996) Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol. Mutagen.* 28(3):167-175. Review.
- Hassold T, Hunt P. (1001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2(4):280-91. Review
- Heng BC, Cao T, Bested SM, Tong GQ, Ng SC. (2005) "Waste" follicular aspirate from fertility treatment--a potential source of human germline stem cells?. *Stem Cells Dev.* 14(1):11-4.
- Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA. (2005) SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat. Genet.* 37(12):1351-1355.

J

J

- Jacobs P, Hassold T. (1995) The origin of numerical chromosomal abnormalities. *Advances in Genet.* 33:101-133.
- Jacobson CB, Barter RH. (1967) Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am. J. Obstet. Gynecol.-I.* 99(6):796-802.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 11;428(6979):145-50. Erratum in: *Nature.* 2004 26;430(7003):1062.

K

K

- Kallionemi A, Kallionemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.

Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K. (1993) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum. Genet.* 90(5):533-41.

Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Kalakoutis G, Angastiniotis M, Verlinsky Y. (2005) Preimplantation diagnosis and HLA typing for haemoglobin disorders. *Reprod. Biomed. Online* 11(3):362-70.

L

L

Laurie DA, Hultén MA. (1985a) Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann. Hum. Genet.* 49(Pt 3):203-214.

Laurie DA, Hultén MA. (1985b) Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann. Hum. Genet.* 49(Pt 3):189-201.

Ledbetter DH. (2000) FISH and "Cytogenetic Chip" technology for detection of cryptic deletions and translocations. 10th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, Abstracts Book:50.

Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, Miyake M, Watanabe Y. (2008) Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol.* 10(1):42-52.

Llei 9/1985, de 5 de julio, sobre despenalización del aborto que modifica el art. 417 bis del Código Penal: despenalización parcial
www.pcb.ub.es/bioeticaidret/archivos/norm/Ley_Organica9-1985.pdf

Llei 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.
www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19947-19956.pdf

Llei 35/1988, de 22 de noviembre, sobre técnicas de reproducción humana asistida.
www.datadiar.com/actual/legislacion/penal/l35_88.htm

M

M

Macas E, Imthurn B, Roselli M, Keller PJ. (1996a) Chromosome analysis of single- and multipronucleated human zygotes proceeded after the intracytoplasmic sperm injection procedure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13(4):345-350.

Macas E, Imthurn B, Rosselli M, Keller PJ. (1996b) The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 11(11):2496-2501.

Machin GA, Crolla JA. (1974) Chromosome constitution of 500 infants dying during the perinatal period. With an appendix concerning other genetic disorders among these infants. *Humangenetik* 23(3):183-98.

Magli M, Gianaroli L, Ferraretti A, Toschi M, Esposito F, Fasolino M. (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum. Reprod.* 19:1163-1169.

- Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Feliciani E, Gianaroli L. (2006) First meiosis errors in immature oocytes generated by stimulated cycles. *Fertil. Steril.* 86(3):629-635.
- Mahmood R, Brierley C, Faed M, Mills J, Delhanty J. (2000) Mechanisms of maternal aneuploidy: FISH analysis of oocytes and polar bodies in patients undergoing assisted conception. *Hum. Genet.* 106:620-626.
- Martin RH, Ko E, Rademaker A. (1991) Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am. J. Med. Genet.* 39(3):321-331.
- Márquez C, Cohen J, Munné S. (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet. Cell Genet.* 81:254-258.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91(1):35-45.
- Mikamo K, Kamiguchi Y. (1983) Primary incidences of spontaneous chromosomal anomalies and their origins and causal mechanisms in the Chinese hamster. *Mutat. Res.* 108(1-3):265-78.
- Miller OJ, Therman E. (2000) Human Chromosomes. Ed. Springer. ISBN 038795046X
- Monk M, Handyside AH. (1988) Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Reprod. Fertil.* 82(1):365-368.
- Montag M, Van der Ven K, Delacrétaz G, Rink K, Van der Ven H. (1998) Laser-assisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil. Steril.* 69(3):539-342.
- Montag M. (2004) Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing. *Reprod. Biomed. Online* 9:425-429.
- Muggleton-Harris AL, Glazier AM, Pickering S, Wall M. (1995) Genetic diagnosis using polymerase chain reaction and fluorescent in-situ hybridization analysis of biopsied cells from both the cleavage and blastocyst stages of individual cultured human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 10(1):183-192.
- Munné S, Tang YX, Grifo J, Cohen J. (1993) Origin of single pronucleated human zygotes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 10(4):276-279.
- Munné S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. (1994) Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol. Reprod.* 51(3):373-379.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. (1995a) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 64(2):382-391.
- Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. (1995b) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum. Reprod.* 10(4):1014-1020.
- Munné S, Weier HU. (1996) Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;75(4):263-70
- Munné S, Scott R, Sable D, Cohen J. (1998a) First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil. Steril.* 69:675-681.

- Munné S, Morrison L, Fung J, Márquez C, Weier U, Bahçe M, Sable D, Grundfeld L, Schoolcraft B, Scott R, Cohen J. (1998b) Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15(5):290-296.
- Munné S, Fung J, Cassel M, Márquez C, Weier H. (1998c) Preimplantation Genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis. *Hum. Genet.* 102:663-674.
- Munné S, Bahçe M, Schimmel T, Sadowy S, Cohen J. (1998d) Case report: chromatid exchange and predivision of chromatids as other sources of abnormal oocytes detected by preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Prenat. Diagn.* 18(13):1450-1458.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. (2000a) Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil. Steril.* 73(6):1209-1128.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Cohen J. (2002b) Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod. Biomed. Online* 4(3):223-232.
- Munné S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J. (2000c) Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet. Cell Genet.* 90(3-4):303-308.

N
N

- Nicolaidis P, Petersen MB. (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum. Reprod.* 13(2):313-319. Review.
- Nielsen J. (1975) Chromosome examination of newborn children: purpose and ethical aspects. *Humangenetik* 26(3):215-222.
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Séller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U i col-l. (2001) A new multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum. Genet.* 108:199-204.
- Nilsson L. (1990) Nacer: La gran aventura. 1º Edición - Salvat Editores – ISBN: 84 345 5242-6.

P
P

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 4;340(8810):17-8.
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. (2003) Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum. Genet.* 112(2):195-203.
- Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. (2005) The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Hum. Reprod. Update* 11:15-32.
- Petit C, Martel-Petit V, Fleurentin A, Monnier-Barbarino P, Joveaux P, Gerard H. (2000) Use of PRINS for preconception screening of polar bodies for common aneuploidies. *Prenat. Diagn.* 20:1067-1071.

- Petit C, Bergère M, Lombroso R, Monnier-Barbarino P, Selva J, Gérard H (2002) First pregnancies after polar body biopsy laser-assisted and FISH analysis. *Hum. Reprod.* 17:59-60. Abstracts book 1.
- Pierce K, LM F, Seibel M, Zilberstein M. (1998) Preimplantation genetic diagnosis of chromosome balance in embryos from a patient with a balanced reciprocal translocation. *Molec. Hum. Reprod.* 4:167-172.
- Pieters MH, Dumoulin JC, Ignoul-Vanvuchelen RC, Bras M, Evers JL, Geraedts JP. (1992) Triploidy after in vitro fertilization: cytogenetic analysis of human zygotes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9(1):68-76.
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J. (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(23):9138-9142.
- Plachot M. (1989) Chromosome analysis of spontaneous abortions after IVF. A European survey. *Hum. Reprod.* 4(4):425-429.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS). (2008) *Reprod. Biomed. Online* 1:134-147.
- 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* 126:701-711.
- Pujol A, Benet J, Campillo M, Codina-Pascual M, Egozcue J, Navarro J. (2004) The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD. *Cytogenet. Genome Res.* 105(1):29-35.
- 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. *Reprod.* 131(6):1025-1035.

R**R**

-
- Rechitsky S, Freidine M, Verlinsky Y, Strom CM. (1996) Allele dropout in sequential PCR and FISH analysis of single cells (cell cycling). *J. Assist. Reprod. Genet.* 13(2):115-124.
- 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(5):253-257.
- Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, Morris R, Verlinsky Y. (2004) Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *Reprod. Biomed. Online* 9(2):210-221.
- 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(1):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(4):317-321.
- Rosenbusch B, Schneider M, Sterzik K. (1997a) The chromosomal constitution of multipronuclear zygotes resulting from in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 12(10):2257-2262.

- Rosenbusch B, Schneider M, Sterzik K. (1997b) Triploidy caused by endoreduplication in a human zygote obtained after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 12(5):1059-1061.
- Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C. (2002) Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum. Reprod.* 17(9):2388-2393.
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A. (2003) Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum. Reprod.* 18:182-188.

S

S

- Sagata N. (1996) Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell. Biol.* 6(1):22-28.
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S. (2002) Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Molec. Hum. Reprod.* 8:580-585.
- Santaló J, Badenas J, Català V, Egozcue J. (1987) Chromosomes of mouse embryos in vivo and in vitro: effect of manipulation, maternal age and gamete ageing. *Hum. Reprod.* 2(8):717-719.
- Sánchez-García JF, Benet J, Gutiérrez-Mateo C, Luis Seculi J, Monros E, Navarro J. (2005) Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol. Hum. Reprod.* 11:463-468.
- Sermon K, Lissens W, Joris H, Van Steirteghem A, Liebaers I. (1996) Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: single blastomere analysis using short PEP protocols. *Mol. Hum. Reprod.* 2(3):209-212.
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, De Die C. (2005) ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum. Reprod.* 20(1):19-34.
- Sermon K, Michiels A, Harton G, Moutou C, Repping S, Scriven PN, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, Vesela K, Viville S, Wilton L, Harper JC. (2007) ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum. Reprod.* 22:323-336.
- Simón C, Rubio C, Vidal F, Gimenez C, Moreno C, Parrilla JJ, Pellicer A. (1998) Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod. Fertil. Dev.* 10(1):87-92.
- Sociedad Española de Fertilidad, SEF. (1999) Esterilidad: Guía para pacientes.
- Sociedad Española de Fertilidad, SEF. (2005) Guía para pacientes sin hijos. <http://nuevo.sefertilidad.com/diagnostico/index.php>
- Sociedad Española de Fertilidad, SEF. (2007) Registro SEF 2004 – Informe IA – Informe FIV+ICSI <http://www.registrosef.com/index.asp?opc=2>
- Soini S, Ibarreta D, Anastasiadou V, Aymé S, Braga S, Cornel M, Coviello DA, Evers-Kiebooms G, Geraedts J, Gianaroli L, Harper J, Kosztolanyi G, Lundin K, Rodrigues-Cerezo E, Sermon K, Sequeiros J, Tranebjaerg L, Kääriäinen H; ESHG; ESHRE.

(2006) The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. *Eur. J. Hum. Genet.* 14(5):588-645.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1993) Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 8(2):221-223.

Staessen C, Van Steirteghem AC. (1997) The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 12(2):321-327.

Staessen C, Van Assche E, Joris H, Bonduelle M, Vandervorst M, Liebaers I, Van Steirteghem A. (1999) Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Molec. Hum. Reprod.* 4:382-389.

Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. (2002) Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum. Reprod.* 17(2):446-451.

T

T

Takase K, Ishikawa M, Hoshiai H. (1995) Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova. *Tohoku J. Exp. Med.* 175(1):69-76.

Takahashi TS, Yiu P, Chou MF, Gygi S, Walter JC. (2004) Recruitment of Xenopus Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex. *Nat. Cell Biol.* 6(10):991-996.

Tarkowski A. (1966) An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 5:394-400.

Templado C, Benet J, Genescà A, Navarro J, Caballin MR, Mirò R, Egozcue J. (1988) Human sperm chromosomes. *Hum. Reprod.* 3(2):133-138.

Tomi D, Schultze-Mosgau A, Eckhold J, Schopper B, Al-Hasani S, Steglich C, Gal A, Axt-Fliedner R, Schwinger E, Diedrich K, Griesinger G. (2006) First pregnancy and life after preimplantation genetic diagnosis by polar body analysis for mucopolysaccharidosis type I. *Reprod. Biomed. Online.* 12(2):215-220.

U

U

Uhlmann F. (2004) The mechanism of sister chromatid cohesion. *Exp. Cell Res.* 296:80-85.

V

V

Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, Barri PN, Ménéz Y. (1997) Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 5(4):351-354.

Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom C. (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* 5:826-829.

- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J (1995) Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod.* 10: 1923-1927.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. (1996) Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13(2):157-162.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Walle J, White M, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. (1997) Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem. Mol. Med.* 62(2):182-187.
- Verlinsky Y, Evsikov S. (1999) A simplified and efficient method for obtaining metaphase chromosomes from individual human blastomeres. *Fertil. Steril.* 72:1127-1133.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. (2001) Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* 285(24):3130-3133.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Evsikov S, Galat V, Kuliev A. (2002) Nuclear transfer for full karyotyping and preimplantation diagnosis for translocations. *Reprod. Biomed. Online* 5:300-305.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Masciangelo C, Levy M, Kaplan B, Lederer K, Kuliev A. (2002) Preimplantation diagnosis for neurofibromatosis. *Reprod. Biomed. Online* 4(3):218-222.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Laziuk K, Librach C, Genovese R, Kuliev A. (2006) Preimplantation genetic diagnosis for Pelizaeus-Merzbacher disease with testing for age-related aneuploidies. *Reprod. Biomed. Online* 12(1):83-88.
- Vialard F, Petit C, Bergere M, Gomes DM, Martel-Petit V, Lombroso R, Ville Y, Gerard H, Selva J. (2006) Evidence of a high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age. *Hum. Reprod.* 21(5):1172-1178.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. (1999) Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat. Diag.* 19:846-851.

W

W

- Wardburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B. (1986) Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. In: Porter L, Willey A (eds) *Perinatal genetics: diagnosis and treatment*. Academic Press, New York. 133-148.
- Weitzer S, Lehane C, Uhlmann F. (2003) A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to ADN. *Curr. Biol.* 13(22):1930-1940.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA. (1999) Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization. *Nuclei Ac. Res.* 27:1214-1218.
- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty J, Munné S. (2002) First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil. Steril.* 78:543-549.

Willadsen S, Levron J, Munné S, Schimmel T, Márquez C, Scott R, Cohen J. (1999) Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with in-vitro matured bovine eggs. *Hum. Reprod.* 14(2):470-475.

World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. (1999) 4th edition – Cambridge University Press - ISBN 0 512 64599 9.

Z**Z**

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5847-5851.

Zenzes MT, Wang P, Casper RF. (1992a) Evidence for maternal predisposition to chromosome aneuploidy in multiple oocytes of some in vitro fertilization patients. *Fertil. Steril.* 57(1):143-149.

Zenzes MT, Casper RF. (1992b) Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum. Genet.* 88(4):367-375. Review.

Portades de revistes científiques

Hum. Reprod. Update 2001 7(6):591-602. ISSN-1355-4786 *Figure 1(a, b, c and d)* : PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body. Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Laila JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J. [vegeu l'apartat 4.7]

Rev. Iberoamericana de Fertil. y Reprod. Hum. 1997 XIV (2). ISSN-1132-0249 – [vegeu l'anne 1 d'aquest apartat].

Rev. Iberoamericana de Fertil. y Reprod. Hum. 1998 XV (3).ISSN-1132-0249.- [vegeu l'annex 2 d'aquest apartat].

Pàgines web utilitzades

Adaptació per a la Figura I-5:

<http://www.educa.aragob.es/iescarin/depart/biogeno/varios/BiologiaCurtis/Seccion%207/7%20-%20Capitulo%2050.htm>

Adaptació per a la Figura I-12

<http://biologia.fciencias.unam.mx/bioanim3/03esperm/sld010.htm>

Index Citation Reports®:

<http://scientific.thomson.com/products/jcr/>

Recerca de bibliografia científica:

Pub Med. US National Library of Medicine

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

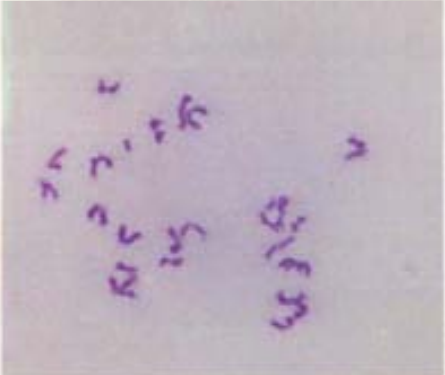
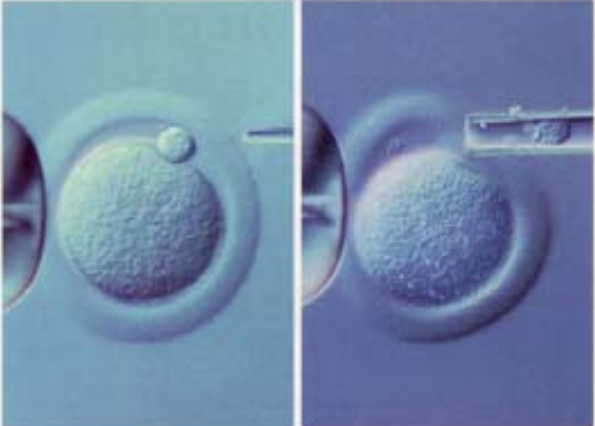
Recerca de terminologia en català:

Cerca Term. Term Cat. Centre de Terminologia.

<http://www.termcat.es/>

REVISTA IBEROAMERICANA DE
FERTILIDAD
Y REPRODUCCION HUMANA

✪CORH




- Selección de sexo
- Cáncer epitelial de ovario: Pronóstico actual
- Comparación de dos dispositivos para la toma citológica endometrial directa
- Superovulación e inseminación intrauterina
- Embarazo ectópico en pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida y cirugía de reconstrucción tubárica
- Alfa 1-4 glucosidasa (Maltasa) epididimaria: Determinación por colorimetría de punto final y su utilidad en la investigación de la infertilidad masculina
- Elección del modelo de dispositivo intrauterino con cavimetría realizada por ecografía previa a la inserción: 1500 casos
- Test de apgar e infección por VIH/SIDA: un estudio en ancianos/as de adicciones a drogas por vía parenteral (ADVP)
- Interrupción voluntaria del embarazo
- Endometriosis vésico-ureteral: la nefrectomía es una realidad

Volumen XIV - Nº 2 - MARZO - ABRIL 1997

REVISTA IBEROAMERICANA DE
FERTILIDAD
Y REPRODUCCION HUMANA
CORH

Volumen XIV - N° 2 - MARZO - ABRIL 1997

EDITA  editorial
Médica

I.S.S.N. N° 1132-0249

DIRECTOR GENERAL
José Luis Berenguer

DIRECTOR MEDICO
HONORARIO
José M^a Bedoya

EDITOR Y DIRECTOR
CIENTIFICO
Luis C. Pous-Ivern

DISEÑO Y CONFECCION
Grupo Fotocomposición

PUBLICIDAD
Editorial Médica

REDACTOR JEFE
Pura Ramos

DPTO. DE COORDINACION
Federico de Goyarts

TODA CORRESPONDENCIA SOBRE PUBLICACION DE ORIGINALES
DEBERA DIRIGIRSE A:

Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana
Secretaría General: *José M^a Gely* - Mare de Deu de la Salut, 7B, 6^aE
08024 Barcelona, España

LA REVISTA IBEROAMERICANA DE FERTILIDAD Y REPRODUCCION
HUMANA no se identifica ni se hace responsable de las opiniones de
los autores de los trabajos.
Autorizado Ministerio de Sanidad y Consumo S.V.R. 387

COPYRIGHT 1987 - REVISTA IBEROAMERICANA DE FERTILIDAD
Y REPRODUCCION HUMANA

C/ Gamonal, 5 - 5ª Planta - N° 9
-Edificio Valencia-
28031 Madrid
Centralita y Fax: 91 - 777 53 60

FOTOCOMPOSICION, FOTOMECANICA Y MAQUETACION:
Grupo Fotocomposición, Madrid.

Foto Portada: Gentileza Mercè Durban. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Fundació Catalana Síndrome de Down.
Biopsia por micromanipulació del primer corpúsculo polar para diagnòstic citogenètic preconceptual del ovocito. Ovocito de hamster.

Annex 2

REVISTA IBEROAMERICANA DE
FERTILIDAD
Y REPRODUCCION HUMANA

ICORH

NÚMERO MONOGRÁFICO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (1ª PARTE)

- *Análisis crítico de la inseminación artificial como técnica de reproducción asistida*
- *Nuevas gonadotropinas*
- *Análogos de la GnRH en reproducción asistida: Una promesa cumplida*
- *La hiperestimulación ovárica*
- *Los embarazos multifetales*
- *Manejo de las bajas respondedoras en FIV*
- *La alta respuesta en FIV*

MII 1 cp. humano
Microscopía contraste de fase

MII 1 cp. humano
LM 22 D60azorg / LM 22q11.1
CEP X

MII óocito humano
LM 22 D60azorg / LM 22q11.1
CEP X

Volumen XV - Nº 3 - MAYO - JUNIO 1998

REVISTA IBEROAMERICANA DE
FERTILIDAD
Y REPRODUCCION HUMANA
CORH

Volumen XV - Nº 3 - MAYO - JUNIO - 1998

EDITA **M** editorial
édica

I.S.B.N. Nº 1132-0249

DIRECTOR GENERAL
José Luis Berenguer

**DIRECTOR MEDICO
HONORARIO**
José M^o Bedoya

**EDITOR Y DIRECTOR
CIENTIFICO**
Luis C. Pous-Ivern

DISEÑO Y CONFECCION
Grupo Fotocomposición

PUBLICIDAD
Editorial Médica

REDACTOR JEFE
Pura Ramos

DPTO. DE COORDINACION
Federico de Goyarts

TODA CORRESPONDENCIA SOBRE PUBLICACION DE ORIGINALES
DEBERA DIRIGIRSE A:

Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana
Secretaría General: *José M^o Gely* - Mare de Deu de la Salut, 78, 6^oE
08024 Barcelona, España

LA REVISTA IBEROAMERICANA DE FERTILIDAD Y REPRODUCCION
HUMANA no se identifica ni se hace responsable de las opiniones de
los autores de los trabajos.
Autorizado Ministerio de Sanidad y Consumo S.V.R. 387

**COPYRIGHT 1987 - REVISTA IBEROAMERICANA DE FERTILIDAD
Y REPRODUCCION HUMANA**

C/ Gamonal, 5 - 5^a Planta - Nº 9
-Edificio Valencia-
28031 Madrid
Centralita y Fax: 91 - 777 53 60

FOTOCOMPOSICIÓN, FOTOMECANICA Y MAQUETACION:
Grupo Fotocomposición, Madrid.

Foto Portada: Genèleza Mercè Durban, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Fundació Catalana Síndrome de Down.
Complements cromosòmics de una pareja ovocito II-1^o corpuscle polar humà analitzat mitjançant hibridació "in situ" fluorescente.

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

2008

Tesi doctoral

Mercè Durban Llenas

