

Tesi Doctoral

Validació de l'anàlisi citogenètica exhaustiva de tot el
complement cromosòmic en cèl·lula única:
Aplicació translacional al Diagnòstic Genètic Preimplantacional
per factor masculí

Memòria presentada per
Laia Ramos Masdeu

Per optar al grau de
Doctora en Biologia Cel·lular

Tesi dirigida per
Dra. Joaquina Navarro
Dr. Jordi Benet
Dr. Albert Obradors

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

Directors

Doctoranda

Dra. Joaquina
Navarro

Dr. Jordi
Benet

Dr. Albert
Obradors

Laia Ramos Masdeu

Bellaterra, novembre de 2013

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes:

- PI08/0012 i PI11/00625 del *Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III*.

- 2009SGR1107 de l'AGAUR, Generalitat de Catalunya.

La doctoranda Laia Ramos Masdeu ha gaudit d'una beca de Personal Investigador en Formació (PIF) de la Universitat Autònoma de Barcelona

A la meva mare i al meu germà

Al meu pare

A l'Ivó

Índex

1. Introducció	3
1.1 Aneuploidia i infertilitat	3
1.2 El diagnòstic genètic preimplantacional aplicat al cribratge d'aneuploidies	5
1.2.1 Indicacions	7
1.2.2 Estadi del desenvolupament embrionari	8
1.3 Tècniques de diagnòstic citogenètic aplicades al PGS	10
1.3.1 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	11
1.3.2 Hibridació genòmica comparada	12
1.3.3 <i>Arrays</i> de CGH	13
1.3.4 <i>Arrays</i> de SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)	15
1.3.5 Seqüenciació massiva	15
1.4 Efecte de la replicació del DNA en el diagnòstic citogenètic de cèl·lula única	16
1.5 Infertilitat d'origen masculí	17
1.5.1 Reorganitzacions cromosòmiques equilibrades	17
1.5.2 Seminograma anòmal i aneuploidies en espermatozoide	19
1.5.3 Fragmentació del DNA espermàtic	21
2. Hipòtesi i objectius	25
3. Material i mètodes	29
3.1 Estadi replicatiu de la cromatina i diagnòstic citogenètic de cèl·lula única	29
3.1.1 Obtenció del material biològic	29
3.1.2 Lisi cel·lular i amplificació del genoma	33
3.1.3 Hibridació genòmica comparada	35
3.2 Diagnòstic genètic preimplantacional per factor masculí i estudi de la fragmentació del DNA espermàtic	40
3.2.1 Selecció de casos clínics	40
3.2.2 Estudi de la fragmentació del DNA espermàtic	41
3.2.3 Aplicació del DGP	43
3.2.4 Reanàlisi d'embrions descartats	44
3.3 Els <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids en l'estudi de cèl·lula única	46
3.3.1 Obtenció del material biològic	46

3.3.2 Protocol d'Agilent per DNA genòmic aplicat a DNA amplificat de cèl·lula única	47
3.3.3 Protocol d'Agilent per DNA amplificat de cèl·lula única	52
3.4 Els <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids aplicats a un DGP per un portador equilibrat d'una translocació Robertsoniana	55
3.4.1 Història clínica dels pacients	55
3.4.2 Aplicació del DGP	55
3.4.3 Anàlisi d'embrions descartats	55
4. Resultats	59
4.1 Valoració de l'efecte de l'estadi replicatiu de la cromatina en el diagnòstic citogenètic de cèl·lula única	59
4.1.1 Estudi del complement cromosòmic complet de fibroblasts aïllats en els diferents estadis del cicle cel·lular	59
4.1.2 Estudi del complement cromosòmic complet de blastòmers aïllats en interfase i metafase	61
4.2 Estudi citogenètic d'embrions humans criopreservats	64
4.3 Resultats del diagnòstic genètic preimplantacional per factor masculí i de l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic	68
4.3.1 Resultats de l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic	68
4.3.2 Resultats dels cicles de DGP per factor masculí	69
4.3.3 Relació entre l'SDF i la citogenètica dels embrions	76
4.4 Posada a punt dels <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids per l'estudi de cèl·lula única i aplicació a un cas de DGP	76
4.4.1 Posada a punt de la metodologia i comparació de resultats amb la CGH sobre metafases i els <i>arrays</i> de CGH de BACs	76
4.4.2 Aplicació dels <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids a un DGP per un portador equilibrat d'una translocació Robertsoniana	81
5. Discussió	87
5.1 Efecte de l'estadi replicatiu de la cromatina en el diagnòstic citogenètic de cèl·lula única	87

5.1.1 Anàlisi del DNA amplificat de fibroblasts mitjançant dos sistemes de WGA	87
5.1.2 Validació del sistema de WGA <i>SurePlex</i> en blastòmers humans	89
5.2 Estudi citogenètic d'embrions humans criopreservats	91
5.3 El diagnòstic genètic preimplantacional per factor masculí	95
5.3.1 DGP en casos de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades	96
5.3.2 DGP en casos de seminograma anòmal i/o increment d'aneuploidies en espermatozoide	100
5.3.3 Fragmentació del DNA espermàtic, citogenètica dels embrions i potencial reproductiu	101
5.4 Els <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids aplicats al DGP	104
5.4.1 Comparació entre els <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids i la CGH sobre metafases	105
5.4.2 Comparació entre els <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids i els <i>arrays</i> de CGH de BACs	106
5.4.3 Aplicació dels <i>arrays</i> de CGH d'oligonucleòtids en un cas de DGP per un portador equilibrat d'una translocació Robertsoniana	107
5.4.4 Metodologies d'anàlisi citogenètica completa i futur del DGP	109
6. Conclusions	117
7. Bibliografia	121
Annexos	139

Llistat d'acrònims i abreviatures

1CP: primer corpuscle polar

2CP: segon corpuscle polar

aCGH: *array comparative genomic hybridisation*

ADO: *allele drop-out*

AMA: *advanced maternal age*

BACs: *bacterial artificial chromosomes*

CEP: *chromosome enumeration probe*

CGH: *comparative genomic hybridisation*

CNRHA: *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida*

CRAG: Centre de Recerca en Agrigenòmica

DAPI: *4',6-diamino-2-phenylindole*

DGP: diagnòstic genètic preimplantacional

DNA: *deoxyribonucleic acid*

dNTP: *deoxyribonucleotide*

DOP-PCR: *degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction*

dsDNA: *double-strand DNA*

dsSDF: *double-strand sperm DNA fragmentation*

dTTP: *deoxythymidine triphosphate*

dUTP: *deoxyuridine triphosphate*

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embryology*

FISH: *fluorescent in situ hybridisation,*

FIV : *fecundació in vitro*

FSH: *follicle-stimulating hormone*

GnRH: *gonadotropin-releasing hormone*

HCG: *human chorionic gonadotropin*

ICE: *interchromosomal effect*

ICM: *inner cell mass*

ICSI: *intracytoplasmatic sperm injection*

LH: *luteinizing hormone*

LSI: *locus specific identifier*

mCGH: *metaphase comparative genomic hybridisation*

MDA: *multiple displacement amplification*

MESE: *microsurgical epididymal sperm aspiration*

MPS: *massively parallel sequencing*

NGS: *next-generation sequencing*

OMS: Organització Mundial de la Salut

PA: *preferential amplification*

PBS: *phosphate buffered saline*

PCR: *polymerase chain reaction*

PGS: *preimplantation genetic screening*

PVA: *polivinil alcohol*

RCTs: *randomised controled trials*

RIF: *repeated implantation failure*

RM: *recurrent miscarriages*

SCDt: *sperm chromatin dispersion test*

SCSA: *sperm chromatin structure assay*

SDF: *sperm DNA fragmentation*

SDS: dodecil sulfat de sodi

SNP: *single nucleotide polymorphism*

SSC: *standard saline citrate*

ssDNA: *single-strand DNA*

ssSDF: *single-strand sperm DNA fragmentation*

TAE: *Tris-acetate-EDTA*

TBE: *Tris-borate-EDTA*

TE: *Tris-EDTA*

TE: trofectoderma

TEL: sondes telomériques

TESE: *testicular sperm extraction*

TRA: tècniques de reproducció assistida

TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

WGA: *whole genome amplification*

Introducció

1. Introducció

1.1 Aneuploïdia i infertilitat

La reproducció humana té una baixa eficiència pel que fa a la taxa de fecunditat ja que una dona en edat fèrtil tan sols té una probabilitat del 25% de concebre en cada cicle menstrual (Short, 1978). A més, s'ha estimat que el 15% de les parelles que es proposen tenir descendència pateixen d'infertilitat, definida com la impossibilitat d'aconseguir embaràs després d'un any de relacions sexuals regulars (de Kretser, 1997). Segons aquests autors, les causes d'infertilitat poden ser les fallades d'ovulació, els danys tubàrics, la endometriosi i les anomalies en l'esperma; en molts casos, però, la causa d'infertilitat es desconeix, denominant-se infertilitat idiopàtica (Hull *et al.*, 1985). En cas d'infertilitat s'aconsella optar per tècniques de reproducció assistida (TRA) per tal d'augmentar les probabilitats d'èxit reproductiu.

Es coneix que una de les causes més freqüents a l'hora d'impedir la implantació i el desenvolupament embrionari és l'aneuploïdia o la presència a l'embrió d'una dotació cromosòmica diferent a 46,XX o 46,XY. De fet, fins al 70% dels embrions provinents de cicles de fecundació *in vitro* (FIV) de dones joves són aneuploides (Baart *et al.*, 2006; Mertzaniidou *et al.*, 2013b). La taxa d'aneuploïdia és particularment elevada en els embrions provinents de dones d'edat avançada (*advanced maternal age*, AMA) (Munne *et al.*, 2007; Rius *et al.*, 2011a; Capalbo *et al.*, 2013) i en portadors de translocacions equilibrades (Rius *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012), tot i que també és present en casos de fallades d'implantació (Fragouli *et al.*, 2010), avortaments de repetició (Rubio *et al.*, 2003) i esterilitat idiopàtica (Baart *et al.*, 2006). Inclús en embrions provinents de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) per risc de transmissió de malalties monogèniques, en els quals no hi ha un risc incrementat d'aneuploïdies respecte a la població general, s'han detectat fins a un 43% d'embrions aneuploides (Obradors *et al.*, 2008; Obradors *et al.*, 2009; Daina *et al.*, 2012; Daina *et al.*, 2013b).

A més d'aneuploïdies de cromosomes sencers, s'han observat taxes molt variables de desequilibris segmentals en els embrions provinents de cicles de FIV (12-70%) (Wells i Delhanty, 2000; Voullaire *et al.*, 2002; Daphnis *et al.*, 2008; Vanneste *et al.*, 2009;

Introducció

Mertzanidou *et al.*, 2013a). Aquests desequilibris segmentals, descrits com a guanys i pèrdues de segments cromosòmics, generalment s'expliquen per trencaments cromosòmics en llocs fràgils del genoma (Wells i Delhanty, 2000; Daphnis *et al.*, 2008).

Les aneuploïdies de l'embrió poden tenir un origen meiòtic, és a dir, provenir d'anomalies cromosòmiques generades durant la formació dels gàmetes, o bé un origen mitòtic, a causa d'errors generats durant les divisions cel·lulars de l'embrió. Al llarg de la gametogènesi femenina s'ha observat la presència d'aneuploïdies en oòcits tant de dones amb indicacions per TRA com de donants joves (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004a; Obradors *et al.*, 2010; Daina *et al.*, 2013a). Les aneuploïdies presents als oòcits han estat reconegudes com una font important d'aneuploïdia als embrions, sobretot en pacients d'AMA (Munne *et al.*, 2007; Rius *et al.*, 2011a; Capalbo *et al.*, 2013). En la gametogènesi masculina també s'ha observat la presència d'aneuploïdies en espermatozoides d'homes fèrtils, tot i que amb incidències més baixes que en els gàmetes femenins (Templado *et al.*, 1988; Templado *et al.*, 2005) i amb una contribució a una citogenètica embrionària anòmala menys evident (Gianaroli *et al.*, 2000).

La generació d'errors d'origen mitòtic a l'embrió en estadi de 6-8 cèl·lules ha estat demostrada per la presència de mosaïcisme, disomies uniparentals i freqüents desequilibris segmentals recíprocs entre blastòmers (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Vanneste *et al.*, 2009). L'activitat de contínua proliferació cel·lular en els primers estadis del desenvolupament embrionari generaria una inestabilitat cromosòmica comparable a la dels processos tumorals, que donaria lloc a un elevat grau d'aneuploïdia i desequilibris segmentals (Vanneste *et al.*, 2009).

S'ha postulat que les aneuploïdies per cromosomes grans o per múltiples cromosomes, així com la majoria de monosomies (excepte la del cromosoma X), no permeten la implantació embrionària, ja que no han estat observades en avortaments espontanis (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000). L'aneuploïdia no només afecta la implantació embrionària, sinó que també és la causa del 50% dels avortaments espontanis (Hassold *et al.*, 1980). Aquestes aneuploïdies poden ser poliploïdies, és a dir, alteracions en el nombre de còpies de tot un complement cromosòmic (matern o patern), o bé monosomies i trisomies (pèrdues i guanys cromosòmics). La meitat dels

avortaments espontanis són causats per trisomies dels cromosomes 16, 21 o 22, i el 10% es produeixen a causa de la monosomia del cromosoma X (Hassold *et al.*, 1980).

Pel que fa a la viabilitat embrionària en cas d'implantació, tan sols algunes aneuploïdies poden donar lloc al naixement d'individus afectats de diferents síndromes. L'única monosomia viable és la del cromosoma X, que dona lloc a la síndrome de Turner (45,X), mentre que la resta d'aneuploïdies viables són guanys dels cromosomes sexuals i dels autosomes 13, 18 i 21. Les dotacions 47,XXY, i menys freqüentment 48,XXYY i 48,XXXY, són les causants de la síndrome de Klinefelter. També són viables les trisomies de les síndromes 47,XXX i 47,XYY. Pel que fa als autosomes, la trisomia del cromosoma 21 és la més freqüent, causant la síndrome de Down, mentre que les trisomies del cromosoma 18 (síndrome d'Edwards) i del cromosoma 13 (síndrome de Patau) són menys freqüents i presenten una taxa de supervivència després dels primers mesos de vida inferior al 10% (Jacobs i Hassold, 1995).

Certes anomalies estructurals desequilibrades també poden donar lloc al naixement d'individus afectats de diferents síndromes, com per exemple, la monosomia 1p36, la síndrome del *Cri du chat* o -5p, la síndrome -18q, o la síndrome de DiGeorge o -22q11.2.

1.2 El diagnòstic genètic preimplantacional aplicat al cribratge d'aneuploïdies

El DGP, en el seu origen, tenia l'objectiu de seleccionar, per a la seva transferència a l'úter matern, embrions no afectes de malalties monogèniques de les quals els progenitors n'eren portadors o afectes. Així, en la seva primera aplicació clínica, es van seleccionar embrions del gènere femení per evitar l'aparició de dues malalties lligades al cromosoma X: l'adrenoleucodistròfia i el retard mental lligat al cromosoma X (Handyside *et al.*, 1990).

El DGP va evolucionar ràpidament cap a la detecció, en embrions, dels al·lells sans i els al·lells causants de malalties genètiques lligades a qualsevol dels autosomes o cromosomes sexuals, de les quals els progenitors n'eren portadors o afectes (Handyside *et al.*, 1992; Verlinsky *et al.*, 1992; Snabes *et al.*, 1994). Les malalties monogèniques d'herència autosòmica recessiva, autosòmica dominant o lligada al cromosoma X, a les

Introducció

quals actualment s'aplica el DGP de forma més freqüent, són: la fibrosi quística, la β -talassèmia, l'atròfia muscular espinal, la distròfia miotònica tipus I, la malaltia de Huntington, la distròfia muscular de Duchenne i la distròfia muscular de Becker, la síndrome X fràgil i l'hemofília. El llistat de totes les malalties a les quals s'ha aplicat el DGP fins a l'any 2008 pot trobar-se als reculls "*PGD Consortium data collection*" de la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) (Goossens *et al.*, 2012).

El cribatge d'aneuploidies o PGS (*preimplantation genetic screening*) és una variant del DGP que va sorgir per tal de seleccionar, per a la seva transferència, embrions euploides per a determinats cromosomes. D'aquesta manera, es volia evitar el naixement de nens afectes de les síndromes causades per les aneuploidies viables dels cromosomes 13, 18, 21, X i Y, a més d'incrementar les possibilitats d'embaràs en els cicles de FIV (Munne *et al.*, 1995; Gianaroli *et al.*, 2003; Munne *et al.*, 2003). Inicialment, a causa de les limitacions de la tècnica emprada, tan sols s'analitzaven els cromosomes implicats en les síndromes viables (Munne i Weier, 1996; Verlinsky *et al.*, 1996), tot i que en el treball de Munné *et al.* (1995) s'analitzaven els cromosomes X, Y, 18 i 16, aquest últim sovint implicat en avortaments de primer trimestre (Munne *et al.*, 1995). Les metodologies d'anàlisi citogenètica aplicades al PGS han evolucionat molt, de manera que en l'actualitat és possible analitzar tot el complement cromosòmic de l'embrió i no tan sols un cert nombre de cromosomes (Rius *et al.*, 2010).

Alguns assaigs clínics (*randomised controled trials*, RCTs) han descrit millores en les taxes d'implantació i embaràs en els cicles de FIV en què es realitza un cribatge d'aneuploidies, sobretot en casos d'AMA (Gianaroli *et al.*, 1999; Munne *et al.*, 1999; Munne *et al.*, 2003; Werlin *et al.*, 2003), encara que d'altres inclús obtenen resultats negatius en aplicar el PGS (Staessen *et al.*, 2004; Twisk *et al.*, 2008; Schoolcraft *et al.*, 2009; Debrock *et al.*, 2010).

L'estadi del desenvolupament en què es realitza l'anàlisi citogenètica dels embrions o el fet d'estudiar tan sols un nombre limitat de cromosomes poden ser factors determinants en aquest efecte beneficiós o no beneficiós dels cicles FIV-PGS respecte a la FIV convencional (Northrop *et al.*, 2010; Rius *et al.*, 2010). Aquests dos punts s'analitzaran als apartats 1.2.2 i 1.3, respectivament.

1.2.1 Indicacions

El cribatge d'aneuploïdies s'acostuma a aplicar a casos de FIV per edat materna avançada i en portadors de translocacions cromosòmiques equilibrades a causa de l'elevada taxa d'aneuploïdies en els embrions generats (Rius *et al.*, 2011a; Rius *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012; Capalbo *et al.*, 2013).

L'edat materna avançada està associada a un increment en la taxa d'aneuploïdies d'origen meiótic en els oòcits i, conseqüentment, en els embrions generats (Kuliev *et al.*, 2005; Munne *et al.*, 2007; Handyside *et al.*, 2012), causant una disminució en la capacitat de concebre de forma natural (Leridon, 2004). Generalment, les pacients de cicles de FIV amb 37 anys o més d'edat es consideren de risc per la presència d'aneuploïdies en els embrions, ja que hi podria haver un increment de les fallades d'implantació, avortaments espontanis o el naixement de descendència afecte d'aneuploïdies viables (Spandorfer *et al.*, 2004; Hassold *et al.*, 2007).

Pel que fa a les translocacions cromosòmiques equilibrades, aquestes poden donar lloc a gàmetes amb desequilibris de cromosomes sencers (aneuploïdies) o de fragments cromosòmics relatius als cromosomes implicats en la reorganització, encara que en alguns casos també s'ha evidenciat un increment en el nombre d'aneuploïdies de cromosomes no implicats en la reorganització a causa de l'efecte intercromosòmic (Gianaroli *et al.*, 2002; Rius *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012), un mecanisme força controvertit que es detallarà més endavant.

El PGS, però, també es recomana a pacients que, havent-se sotmès a cicles de FIV convencionals, no han aconseguit un èxit reproductiu encara que no se'n coneguin les causes. Així, el PGS sovint s'aplica a pacients amb indicacions de fallades recurrents d'implantació (*repeated implantation failure*, RIF) (Fragouli *et al.*, 2010), situació que es descriu després de tres o més cicles de FIV sense èxit, o després d'haver-se transferit 10 o més embrions de bona qualitat en els diversos cicles de FIV, als quals s'hagi sotmès la parella (Goossens *et al.*, 2012). En casos de RIF s'ha detectat una elevada incidència d'aneuploïdies complexes, afectant més de dos cromosomes per embrió, fet que dona suport a l'efecte beneficiós del PGS en aquestes parelles (Voullaire *et al.*, 2002).

Introducció

En parelles amb avortaments de repetició (*recurrent miscarriages*, RM) que han sofert tres o més avortaments consecutius, també s'indica l'aplicació del PGS ja que, com s'ha comentat prèviament, el 50% dels avortaments espontanis presenten aneuploïdies (Hassold *et al.*, 1980). En embrions de parelles amb RM s'ha observat una incidència d'aneuploïdies del 50-60% (Pellicer *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2003; Munne *et al.*, 2005a).

En casos d'infertilitat per factor masculí a causa d'un seminograma anòmal, ja sigui per azoospermia o per anomalies morfològiques en els espermatozoides, també es recomana l'aplicació del PGS, ja que en factors masculins severos s'ha observat un increment en les aneuploïdies *de novo* dels embrions, sobretot pel que fa als cromosomes sexuals (Gianaroli *et al.*, 2000; Platteau *et al.*, 2004; Gianaroli *et al.*, 2005). Aquest fet ha estat observat sobretot en embrions generats mitjançant aspiració de l'esperma epididimal (*microsurgical epididymal sperm aspiration*, MESE) o testicular (*testicular sperm extraction*, TESE) de cicles de FIV per azoospermia obstructiva i no obstructiva (Gianaroli *et al.*, 2005).

També, per tal d'augmentar les possibilitats d'implantació dels embrions transferits, el PGS s'ha aplicat paral·lelament al DGP per risc de transmissió de malalties monogèniques a la descendència. Així, a més de l'estudi de l'afectació monogènica, s'ha realitzat un cribatge d'aneuploïdies en oòcits mitjançant l'anàlisi del corpuscle polar, o en blastòmers de l'embrió a l'estadi de 6-8 cèl·lules (Obradors *et al.*, 2008; Obradors *et al.*, 2009; Daina *et al.*, 2012; Rechitsky *et al.*, 2013).

1.2.2 Estadi del desenvolupament embrionari

Un dels factors més controvertits al llarg de la història del DGP, a més de la tècnica d'anàlisi citogenètica emprada, que es comentarà a l'apartat 1.3, és l'estadi de desenvolupament embrionari òptim per a dur-lo a terme.

Actualment, el PGS es realitza de forma més freqüent en embrions a l'estadi de 6-8 cèl·lules o Dia +3 del desenvolupament embrionari, a partir d'un o dos blastòmers biopsiats (Harper i Sengupta, 2012). Principalment hi ha dues problemàtiques associades a aquest tipus de material: el mosaïcisme i l'elevat grau d'aneuploïdia en

aquest estadi. El mosaïcisme és la presència de cèl·lules amb diferents dotacions cromosòmiques a l'embrió, situació descrita en un 60-70% dels embrions (Vanneste *et al.*, 2009; Mertzanidou *et al.*, 2013b). És per aquest motiu que alguns autors han proposat l'anàlisi simultània de dos blastòmers biopsiats del mateix embrió (Van de Velde *et al.*, 2000; Baart *et al.*, 2006), tot i la possible disminució de la seva supervivència a causa de la doble biòpsia.

Un dels avantatges del PGS en embrions a l'estadi de 6-8 cèl·lules és la possibilitat, segons la tècnica emprada, d'obtenir el diagnòstic citogenètic en Dia +4 o Dia +5 de desenvolupament, permetent la transferència embrionària dins del mateix cicle de FIV i evitant la criopreservació dels embrions (Rius *et al.*, 2010).

L'anàlisi citogenètica d'embrions a l'estadi de blastocist està prenent força en les aplicacions més recents del PGS, ja que la biòpsia de diverses cèl·lules (5-10) del trofòderma (TE) presenta, entre d'altres, l'avantatge de minimitzar l'efecte del mosaïcisme i l'augment de la taxa d'euploïdia dels embrions en aquest estadi del desenvolupament. A més, en el DGP per malalties monogèniques, permet reduir la possible fallada d'amplificació d'un dels al·lels (*allele drop-out*, ADO) o l'amplificació preferencial (*preferential amplification*, PA), fenòmens àmpliament observats en l'anàlisi d'una sola cèl·lula (Harper i Delhanty, 2000; Wilton *et al.*, 2009).

La presència de mosaïcisme també ha estat observada a l'estadi de blastocist, detectant-se dotacions cromosòmiques diferents entre el TE i la massa cel·lular interna (*inner cell mass*, ICM) amb incidències extremadament variables (4-70% dels embrions) (Derhaag *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). L'anàlisi de més d'una cèl·lula del TE permet identificar les aneuploïdies presents de forma majoritària, minimitzant, en canvi, les aneuploïdies complementàries compensades entre cèl·lules.

A més, s'ha demostrat un augment en les taxes d'euploïdia a mesura que avança el desenvolupament embrionari i inclús s'ha observat que embrions amb aneuploïdies detectades en Dia +3 de desenvolupament embrionari van resultar ser euploides en ser reanaltzats en estadis més avançats (Li *et al.*, 2005; Munne *et al.*, 2005b; Fragouli *et al.*, 2008; Barbash-Hazan *et al.*, 2009; Northrop *et al.*, 2010; Dekel-Naftali *et al.*, 2013). En aquest sentit, diverses teories apunten a una capacitat d'autocorrecció dels embrions a partir del Dia +4, de forma que hi podria haver una selecció a favor de la proliferació de les cèl·lules euploides i en contra de les cèl·lules aneuploides (Wolstenholme, 1996; Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Ambartsumyan i Clark, 2008). De fet,

Introducció

alguns estudis han proposat l'existència d'una autoselecció embrionària per la qual els embrions aneuploides més difícilment assoleixen l'estadi de mòrula i blastocist (Clouston *et al.*, 1997; Evsikov i Verlinsky, 1998; Sandalinas *et al.*, 2001).

Els principals inconvenients de l'elecció de l'estadi de blastocist pel PGS són, d'una banda, la dificultat d'alguns embrions d'assolir aquest estadi, ja sigui per l'esmentada autoselecció embrionària o per la limitació de les tècniques de cultiu; i de l'altra, la necessitat de criopreservar els embrions mentre s'analitzen per, si és el cas, poder-los transferir en un altre cicle de FIV. La criopreservació és necessària ja que és en aquest estadi quan es produeix l'eclosió embrionària o *hatching*, moment en el qual l'embrió queda desproveït de la zona pel·lúcida i adquireix la capacitat d'implantar a l'úter matern. Determinats estudis han demostrat que la criopreservació limita la supervivència embrionària i pot inclús incrementar-ne el grau d'aneuploïdia (Laverge *et al.*, 1998; Daphnis *et al.*, 2008). A partir de l'aplicació de la tècnica de congelació embrionària per vitrificació, però, s'ha aconseguit incrementar la taxa de supervivència embrionària postdescongelació fins a un 94% (Van Landuyt *et al.*, 2013), obtenint-se taxes d'implantació embrionària i d'embaràs similars entre cicles amb transferència embrionària en fresc i amb vitrificació dels embrions (Ku *et al.*, 2012), o inclús taxes superiors en cicles amb vitrificació (Shapiro *et al.*, 2013).

Una altra opció del PGS és l'anàlisi del primer i segon corpuscle polar (1CP, 2CP), ja que la majoria de les aneuploïdies són d'origen matern (Verlinsky *et al.*, 2001; Fishel *et al.*, 2010). Aquesta aproximació, tot i que és menys agressiva pel desenvolupament de l'embrió i permet la transferència en fresc, no aporta en cap cas informació de les aneuploïdies d'origen masculí ni de les generades per errors produïts en les primeres divisions mitòtiques de l'embrió.

1.3 Tècniques de diagnòstic citogenètic aplicades al PGS

Diverses metodologies han estat aplicades al PGS des de l'any 1995, en què es va aplicar la hibridació *in situ* fluorescent (*fluorescent in situ hybridisation*, FISH) per l'estudi de quatre o cinc cromosomes (Munne *et al.*, 1995; Munne i Weier, 1996; Verlinsky *et al.*, 1996).

Al llarg dels anys s'han implementat tècniques d'anàlisi del complement cromosòmic complet, tot augmentant progressivament la resolució de les tècniques per així poder detectar desequilibris cromosòmics de menor longitud (Figura 1).

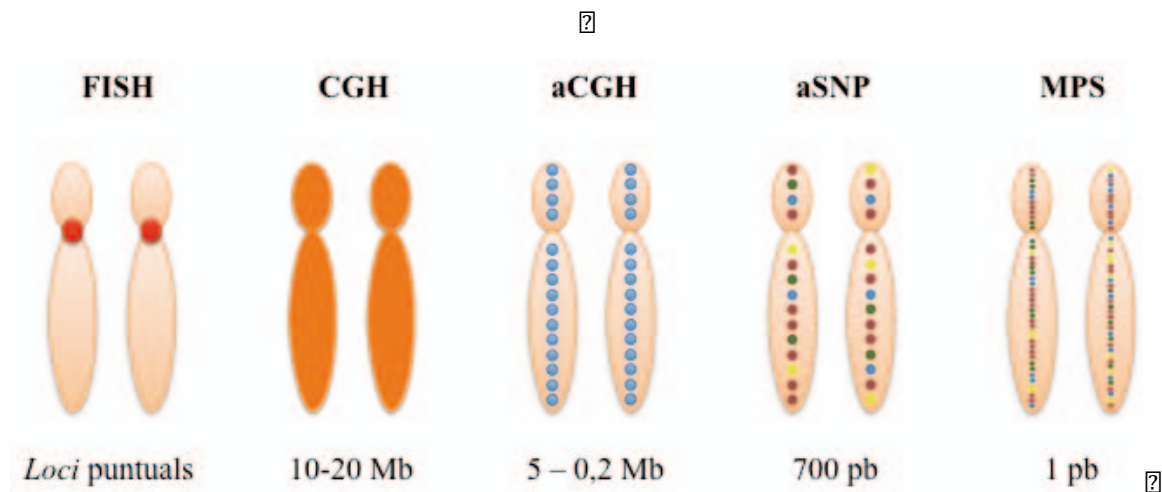


Figura 1. Tècniques citogenètiques i resolucions d'anàlisi obtingudes: FISH (*fluorescent in situ hybridisation*), CGH (*comparative genomic hybridisation*), aCGH (*array-comparative genomic hybridisation*), aSNP (*array-single nucleotide polymorphism*) i MPS (*massively parallel sequencing*).

1.3.1 Hibridació *in situ* fluorescent

Inicialment, la tècnica citogenètica aplicada al PGS va ser la hibridació *in situ* fluorescent per a un nombre determinat de cromosomes (*fluorescent in situ hybridisation*, FISH) (Munne *et al.*, 1995). La FISH ha estat la tècnica tradicionalment més emprada fins a la implementació de metodologies d'anàlisi del complement cromosòmic complet, com la hibridació genòmica comparada i les metodologies d'*arrays*, que es comentaran a continuació.

La FISH requereix la fixació del material cel·lular a analitzar en un portaobjectes i la posterior hibridació de sondes fluorescents puntuals, específiques per determinats cromosomes. En general, s'analitzen 9 cromosomes que s'han vist implicats tant en les síndromes viables descrites com en avortaments espontanis (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) (Pujol *et al.*, 2003). La FISH permet inferir una dotació diploide (dos senyals) o aneuploide (\neq dos senyals) pels cromosomes analitzats en funció de la dotació de la regió cromosòmica puntual analitzada, que pot ser centromèrica (*chromosome enumeration probe*, CEP), telomèrica (TEL) o locus específica (*locus specific identifier*, LSI).

Introducció

Diversos RCTs en els quals es valora l'efecte del PGS mitjançant la FISH en els cicles de FIV evidencien que no s'aconsegueix incrementar les taxes d'embaràs obtingudes i es veuen, en algun cas, inclús disminuïdes (Staessen *et al.*, 2004; Twisk *et al.*, 2008; Schoolcraft *et al.*, 2009; Debrock *et al.*, 2010). Això és atribuïble al reduït nombre de cromosomes analitzats, dels quals tan sols se n'analitza una regió o *locus*. La impossibilitat de la FISH d'analitzar el complement cromosòmic complet constitueix una important limitació en el planteig del PGS.

1.3.2 Hibridació genòmica comparada

La hibridació genòmica comparada (*comparative genomic hybridisation*, CGH) sobre metafases, possibilita l'anàlisi del complement cromosòmic sencer (cromosomes de l'1 al 22 i sexuals) mitjançant una hibridació competitiva de dos DNAs marcats fluorescentment amb diferents colors (generalment, verd i vermell). Les sondes de DNA provinents de la cèl·lula a testar i les sondes de DNA control o de referència (generalment provinents de cèl·lules 46,XY) s'hibriden sobre una extensió de metafases 46,XY fixades en un portaobjectes. Mitjançant un microscopi de fluorescència dotat d'una càmera es capturen un mínim de 12 metafases híbrides. Emprant un programa informàtic s'integren les intensitats d'ambdós colors fluorescents per cada cromosoma, obtingudes en les diferents metafases cariotipades. S'obté un perfil de CGH per cada cromosoma que en mostra la situació d'euploïdia, guany o pèrdua en funció de les ràtios entre el DNA problema i el DNA control (Figura 2).

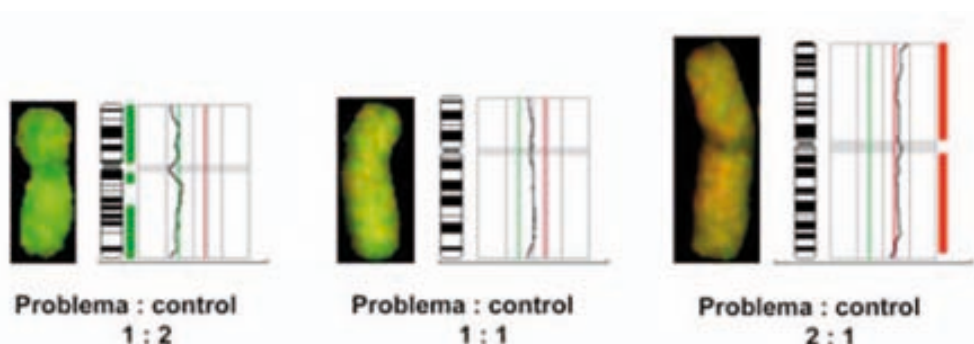


Figura 2. Perfils de CGH mostrant una pèrdua cromosòmica (perfil desplaçat cap a l'esquerra i aparició d'una barra verda), una situació d'euploïdia (perfil centrat) i un guany cromosòmic (perfil desplaçat cap a la dreta i aparició d'una barra vermella).

En aplicar la CGH al PGS, atès que es parteix d'una única cèl·lula (corpuscle polar o blastòmer) o d'un nombre reduït de cèl·lules del TE, es requereix l'amplificació del DNA cel·lular mitjançant tècniques d'amplificació del genoma complet (*whole genome amplification*, WGA). La quantitat de DNA necessària per a l'anàlisi és d'uns 200 ng. En aquest sentit, diversos sistemes de WGA han estat validats (Blanco *et al.*, 1989; Saunders *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1992; Fiegler *et al.*, 2003), essent la *Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction* (DOP-PCR) la més freqüentment usada per a la CGH de cèl·lules aïllades (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b; Obradors *et al.*, 2010; Rius *et al.*, 2010; Rius *et al.*, 2011a; Daina *et al.*, 2012).

Fins a l'aplicació de la CGH sobre metafases no havia estat possible l'anàlisi de tot el complement cromosòmic en una sola ronda d'hibridació ni l'anàlisi de tota la longitud cromosòmica, podent-se detectar desequilibris segmentals de fins a 10-20 Mb de longitud (Wells *et al.*, 1999). Tot i haver estat aplicada al PGS des de fa anys de forma força continuada (Wilton *et al.*, 2001; Obradors *et al.*, 2008; Schoolcraft *et al.*, 2010; Alfarawati *et al.*, 2011b; Daina *et al.*, 2012), la CGH sobre metafases no s'ha acabat d'implementar de forma extensiva a causa de la laboriositat del seu protocol i el temps requerit per a l'anàlisi dels resultats. A més, fins a l'aplicació al DGP de la variant ràpida de la CGH sobre metafases (Rius *et al.*, 2010), era imprescindible criopreservar els embrions potencialment transferibles, ja que amb el mètode convencional es requeria un temps d'hibridació de 40 a 72 hores (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b).

1.3.3 Arrays de CGH

En els darrers anys s'ha adaptat l'estratègia de la CGH a les plataformes d'*array*, de manera que en lloc de realitzar-se la hibridació de les sondes de DNA problema i control sobre extensions de metafases, aquesta es realitza sobre una matriu de seqüències de DNA fixades ordenadament sobre un portaobjectes. Aquestes seqüències, que poden provenir de biblioteques de BACs (*bacterial artificial chromosomes*) o ser generades *in situ* com a oligonucleòtids de síntesi química, representen una gran part del genoma cel·lular sense incloure'n les seqüències repetitives del DNA no analitzables. Aquesta metodologia aporta un increment considerable en la capacitat de resolució

Introducció

respecte a la CGH sobre metafases (Geigl *et al.*, 2009), assolint-se les 5 Mb en els *arrays* de BACs i una resolució teòrica de fins a 20 kb en els *arrays* d'oligonucleòtids. Els *arrays* de CGH de BACs i d'oligonucleòtids també requereixen disposar d'una quantitat de DNA mínima, superior als ≈ 7 pg presents en una cèl·lula aïllada, amb la qual cosa requereixen l'aplicació de sistemes de WGA. Darrerament s'han validat els sistemes de WGA més adequats a aquesta metodologia, com el *SurePlex DNA Amplification System* (BlueGnome) (Fiorentino *et al.*, 2011; Fragouli *et al.*, 2011; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2011; Capalbo *et al.*, 2013), el *Genomeplex Single Cell Whole Genome Amplification Kit* (Sigma-Aldrich) (Fiegler *et al.*, 2007; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011) o la *Multiple Displacement Amplification* (MDA) (Le Caignec *et al.*, 2006; Hellani *et al.*, 2008; Traversa *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011).

Els *arrays* de CGH de BACs són els més àmpliament utilitzats en el PGS i més concretament, el *24Sure BAC array* (BlueGnome), que conté 3.000 sondes de BACs d'unes 150-200 kb de llargària que cobreixen aproximadament el 25% del genoma (Fiorentino *et al.*, 2011; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Capalbo *et al.*, 2013). Altres plataformes d'*arrays* de BACs també han estat aplicades amb èxit a casos de PGS (Le Caignec *et al.*, 2006; Fiegler *et al.*, 2007; Vanneste *et al.*, 2011).

Els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids, com el *SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit* (Agilent Technologies) proporcionen una resolució encara superior i una millor cobertura del genoma que els *arrays* de CGH de BACs, ja que contenen un major nombre de seqüències de DNA (de 80.000 a un milió) de menor longitud (25-85 nucleòtids). Aquest sistema d'*array* de CGH, tot i que de forma més puntual, també ha estat aplicat amb èxit al PGS de blastòmers aïllats (Hellani *et al.*, 2008) i de cèl·lules del trofòderma (Traversa *et al.*, 2011).

D'igual manera que amb la CGH sobre metafases, els *arrays* de CGH aplicats a blastòmers biopsiats en Dia +3 de desenvolupament també permeten la transferència embrionària dins el mateix cicle de FIV, evitant-ne la criopreservació (Hellani *et al.*, 2008).

1.3.4 Arrays de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)

Els *arrays* de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) permeten determinar la seqüència de centenars de milers de nucleòtids polimòrfics del genoma. Aplicats al DGP permeten descriure l'haplotip de l'embrió, de manera que es pot determinar la dotació de tot el complement cromosòmic amb una resolució de fins a 7,7 kb (Treff *et al.*, 2010; Schoolcraft *et al.*, 2011; Treff *et al.*, 2011). Un avantatge dels *arrays* de SNPs respecte a la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH és que no tan sols permeten determinar els guanys i pèrdues cromosòmiques, sinó també les disomies uniparentals. A més, mitjançant els *arrays* de SNPs, es pot determinar el genotip d'al·lels associats a malalties de transmissió mendeliana de les quals els progenitors en siguin portadors o afectes, paral·lelament a l'anàlisi citogenètica (Handyside *et al.*, 2010). Per dur a terme aquest doble estudi cal disposar dels haplotips paternals, sense els quals no seria possible establir-ne el diagnòstic.

Tot i que aquesta metodologia ha estat aplicada al PGS amb cèl·lules del trofèctoderma (Schoolcraft *et al.*, 2011; Treff *et al.*, 2011), avui dia encara no s'ha aplicat de forma extensiva a causa, principalment, de la complexitat de la seva anàlisi i les problemàtiques associades als sistemes de WGA (Iwamoto *et al.*, 2007; Munne, 2012). Cal tenir en compte, a més, que l'anàlisi a l'estadi de blastocist implica, en la majoria de casos, la criopreservació embrionària.

1.3.5 Seqüenciació massiva

El futur del DGP apunta cap a l'aplicació de metodologies de seqüenciació del DNA genòmic com ara la seqüenciació massiva (*massively parallel sequencing*, MPS o *next-generation sequencing*, NGS). Aquesta tècnica, que engloba diferents aproximacions metodològiques, és actualment aplicada a la seqüenciació de mutacions causants de malalties genètiques (Wei *et al.*, 2011; Corrales *et al.*, 2012), la caracterització de mostres tumorals (Navin *et al.*, 2011) i el diagnòstic prenatal (Dan *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2012).

En el diagnòstic prenatal s'ha aconseguit detectar aneuploidies per diferents cromosomes mitjançant la MPS de DNA fetal obtingut per mètodes no invasius (Benn *et al.*, 2013). La MPS, una vegada optimitzada pel DGP, permetrà l'anàlisi de l'afectació monogènica i la citogenètica de tot el complement cromosòmic embrionari,

amb una resolució d'un sol parell de bases. Aquesta tècnica, a més, permet l'anàlisi de diverses mostres en paral·lel en un mateix xip a un cost similar al de les metodologies actuals (Treff *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2013). No obstant això, la seva optimització per a l'aplicació rutinària al DGP és encara un repte a assolir.

1.4 Efecte de la replicació del DNA en el diagnòstic citogenètic de cèl·lula única

Els blastòmers, al llarg de les primeres divisions cel·lulars de l'embrió, presenten un cicle cel·lular amb dos estadis: la interfase i la mitosi, tenint inactius o molt relaxats els punts de control G1 i G2 típics de les cèl·lules somàtiques en divisió (Harrison *et al.*, 2000; Ambartsumyan i Clark, 2008). La interfase o fase S és l'estadi en què es produeix la replicació de la cromatina cel·lular i presenta una durada d'entre 11 i 16 hores. En canvi, durant la metafase o fase M, els blastòmers es divideixen en un procés mitòtic d'aproximadament una hora de durada. Tenint en compte que cada regió cromosòmica té un moment específic de replicació dins la fase S (inicial o tardà), depenent del moment particular de progressió de la replicació de la cromatina, cada *locus* individual pot presentar una, dues o tres còpies en funció de si encara no ha replicat o si ja ha replicat en un o en ambdós cromosomes homòlegs. A la fase M, teòricament, tots els *loci* han de presentar quatre còpies. En base a això, en analitzar un sol blastòmer biopsiat d'un embrió a l'estadi de 6-8 cèl·lules, l'estadi del cicle cel·lular en què es trobi pot tenir un efecte en la fidelitat del diagnòstic citogenètic.

En un estudi mitjançant la FISH de regions CEP, TEL i LSI de tres cromosomes diferents en cèl·lules proliferants (en les fases G1, S, G2 i M) i no proliferants (en G0), es va evidenciar que l'estadi replicatiu de les cèl·lules podia ser responsable d'errors en el diagnòstic citogenètic com a conseqüència dels diferents moments de replicació de cada regió analitzada dins de la fase S (Pujol *et al.*, 2004). Aquest treball va concloure que la replicació del DNA pot generar diagnòstics citogenètics erronis en un 7% de les cèl·lules en proliferació. Aquests errors podrien veure's incrementats en emprar tècniques de diagnòstic citogenètica de tot el complement cromosòmic, com és el cas de la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH. Recentment, tot emprant *arrays* de CGH de BACs s'han pogut detectar dominis de replicació del DNA en limfoblasts aïllats en

fase S (Van der Aa *et al.*, 2013). Resulta de gran interès pel PGS poder determinar si tant l'estadi cel·lular com els sistemes de WGA emprats tenen algun efecte en el diagnòstic citogenètic, sobretot quan s'apliquen tècniques d'anàlisi del complement cromosòmic complet de cèl·lules aïllades, com la CGH o els *arrays* de CGH.

1.5 Infertilitat d'origen masculí

Aproximadament el 50% dels casos d'infertilitat presenten una implicació de factor masculí (Fleming *et al.*, 1995; de Kretser, 1997), ja sigui per la presència d'anomalies citogenètiques en l'individu o per altres factors, sovint relacionats amb la qualitat de l'esperma.

La infertilitat masculina és causada per anomalies en el cariotip en un 2-14% dels casos (Egozcue *et al.*, 2000; Shi i Martin, 2000). Aquestes anomalies poden ser causades per reorganitzacions cromosòmiques equilibrades, com les translocacions (Robertsonianes o recíproques) i les inversions; o per desequilibris cromosòmics, com les microdeleccions del cromosoma Y o les aneuploïdies dels cromosomes sexuals (Harton i Tempest, 2012).

1.5.1 Reorganitzacions cromosòmiques equilibrades

Les translocacions Robertsonianes comporten la fusió dels centròmers de dos cromosomes acrocèntrics (13, 14, 15, 21 i 22) donant lloc a un únic cromosoma derivatiu anòmal amb els dos braços "q" units. La translocació Robertsoniana més freqüent és la $t(13;14)(q10;q10)$, present en el 75% dels casos, seguit de la $t(14;21)(q10;q10)$, amb una freqüència del 10% (Miller i Therman, 2001). Durant la gametogènesi, la presència d'una translocació Robertsoniana dona lloc a una figura meiótica anomenada trivalent, constituïda pels dos cromosomes normals i el cromosoma derivatiu. Es poden generar diferents tipus de segregacions meiótiques: la 2:1 alternant, que dona lloc a gàmetes amb dotacions cromosòmiques normals o equilibrades; la 2:1 adjacent, que genera gàmetes amb monosomies i disomies dels cromosomes implicats en la reorganització; i la 3:0, que dona lloc a gàmetes nul·lisòmics i disòmics pels cromosomes implicats en la reorganització.

Introducció

Les translocacions recíproques són aquelles que es generen per l'intercanvi de fragments terminals entre dos cromosomes no homòlegs, donant lloc a dos cromosomes derivatius anòmals. En aquest cas, durant la gametogènesi es genera una figura meiòtica anomenada quadrivalent, constituïda pels dos cromosomes normals i els dos cromosomes derivatius. Es poden produir diferents tipus de segregacions meiòtiques: la 2:2 alternant, la 2:2 adjacent-1, la 2:2 adjacent-2, la 3:1 i la 4:0. Dels 32 tipus hipotètics de complements cromosòmics possibles, tan sols els quatre tipus de resultats de la segregació 2:2 alternant constituïran gàmetes normals o equilibrats.

La generació de gàmetes cromosòmicament desequilibrats tant en portadors de translocacions Robertsonianes com recíproques, justifica la disminució de la fertilitat d'aquests individus, sovint provocant avortaments de repetició en les parelles (Stern *et al.*, 1999).

En individus portadors de translocacions Robertsonianes o recíproques s'ha descrit un increment de les aneuploïdies de cromosomes no implicats en la reorganització durant la gametogènesi. Aquest fenomen, descrit com a efecte intercromosòmic (*interchromosomal effect*, ICE), seria causat per la interferència dels cromosomes implicats en la reorganització sobre la correcta segregació meiòtica de la resta de cromosomes (Lejeune, 1963; Oliver-Bonet *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2011). No obstant això, en un treball recent on s'analitza la presència d'ICE en oòcits i embrions de portadors de reorganitzacions cromosòmiques s'ha apuntat l'existència d'un possible origen mitòtic de l'ICE en els portadors de translocacions Robertsonianes, de forma que aquest tipus de reorganització cromosòmica podria incrementar la inestabilitat cromosòmica dels embrions durant els primers estadis del desenvolupament (Alfarawati *et al.*, 2012). En general, l'ICE és molt més acusat en els casos de translocacions Robertsonianes (Gianaroli *et al.*, 2002; Rius *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012) que en els casos de translocacions recíproques (Benet *et al.*, 2005; Rius *et al.*, 2011b).

Pel que fa a les inversions cromosòmiques, són fruit del trencament d'un segment cromosòmic amb la posterior reparació d'aquest en el sentit invers, dins el mateix cromosoma. Les inversions poden ser pericèntriques, quan es produeix un trencament al braç "p" i un al braç "q", de manera que el centròmer queda inclòs en el segment invertit; o bé paracèntriques, quan ambdós trencaments tenen lloc al mateix braç cromosòmic i no impliquen una reorganització del centròmer. La inversió cromosòmica

més freqüent a la població és una inversió pericèntrica del cromosoma 9 (inv(9)(p11;q13)), present en aproximadament un 1% dels individus (Teo *et al.*, 1995). Les inversions cromosòmiques poden donar lloc a una disminució en la fertilitat de l'individu a causa de la generació de gàmetes recombinants amb guanys o pèrdues de fragments del cromosoma reorganitzat. Segons la longitud del segment cromosòmic invertit i la proporció cromosòmica reorganitzada, la generació de gàmetes recombinants és més o menys acusada. En inversions de menys de 100 pb o implicant menys del 30% del cromosoma, la implicació de la inversió en problemes d'infertilitat és mínima per la impossibilitat de generar-se gàmetes recombinants (Winsor *et al.*, 1978; Anton *et al.*, 2006). Pel que fa a l'ICE en espermatozoides de portadors d'inversions, aquest no ha estat observat de forma generalitzada, sinó més aviat s'ha descrit dependent del cromosoma implicat (Amiel *et al.*, 2001; Anton *et al.*, 2006). En els casos de PGS descrits fins al moment en portadors d'inversions cromosòmiques, no s'ha detectat una elevada freqüència d'embrions amb complements cromosòmics desequilibrats ni un evident ICE (Escudero *et al.*, 2001; Bernicot *et al.*, 2010; Alfarawati *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012).

1.5.2 Seminograma anòmal i aneuploïdies en espermatozoide

La majoria dels casos d'infertilitat masculina són causats per factors no citogenètics, sovint relacionats amb la qualitat de l'esperma. El grau de fertilitat o infertilitat masculina s'ha determinat tradicionalment mitjançant l'estudi del semen o seminograma i, en alguns casos, comparant la incidència d'aneuploïdies dels cromosomes 13, 18, 21, X i Y mitjançant la FISH en nuclis d'espermatozoide envers la incidència observada en individus fèrtils o control. En pacients control, la presència de disomies als espermatozoides és del 6,7% per qualsevol dels cromosomes (Egozcue *et al.*, 2003).

Els paràmetres analitzables en un seminograma inclouen el nombre d'espermatozoides i la seva mobilitat i morfologia, que es comparen amb els estàndards de normalitat fixats per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (WHO, 2010) (Taula 1). Aquests paràmetres són indicatius de l'estatus de fertilitat dels pacients però no aporten gaire informació sobre el pronòstic reproductiu en els cicles de FIV (Gianaroli *et al.*, 2005; Simon *et al.*, 2011).

Introducció

Taula 1. Valors mínims de referència per diferents paràmetres del seminograma, obtinguts en homes de fertilitat provada i recollits per l'OMS (WHO, 2010).

Paràmetre	Valors mínims
Volum	1,5 ml
Nombre d'espermatozoides per ejaculat	39×10^6
Concentració	$15 \times 10^6/\text{ml}$
Mobilitat total (progressiva i no progressiva)	40%
Mobilitat progressiva	32%
Vitalitat (% espermatozoides vius)	58%
Morfologia (% formes normals)	4%
pH	$\geq 7,2$

Ha estat àmpliament demostrat que la majoria d'aneuploïdies dels embrions provenen de la oogènesi femenina, excepte pels cromosomes sexuals, que principalment tenen un origen patern (Harton i Tempest, 2012). Alguns estudis han conclòs que una baixa qualitat espermàtica pot ser indicativa d'una major incidència d'aneuploïdia en els espermatozoides (Vegetti *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2001), mentre que la relació amb una aneuploïdia incrementada en els embrions generats tan sols s'ha observat en aquells casos d'infertilitat masculina més severa, com els casos de MESE/TESE (Gianaroli *et al.*, 2000; Gianaroli *et al.*, 2005). En la població general, la contribució de les anomalies cromosòmiques numèriques presents en els espermatozoides a les alteracions citogenètiques dels embrions ha estat considerada pràcticament negligible (Gianaroli *et al.*, 2000).

L'estudi de l'aneuploïdia en els espermatozoides ha permès determinar que el grau d'aneuploïdia en homes fèrtils és d'un 3-5%, mentre que en homes infèrtils aquests nivells es veuen incrementats fins a tres vegades (Shi i Martin, 2000; Shi i Martin, 2001; Tempest i Griffin, 2004). De totes maneres, avui dia encara no està clarament establert si un increment en l'aneuploïdia dels espermatozoides pot traduir-se realment en un risc més elevat de produir embrions amb aneuploïdies ni si, per tant, aquests pacients haurien de ser candidats a cicles de FIV-DGP (Harton i Tempest, 2012).

1.5.3 Fragmentació del DNA espermàtic

La fragmentació del DNA espermàtic (*sperm DNA fragmentation*, SDF) és deguda a trencaments del DNA, ja siguin de cadena senzilla (*single-strand DNA*, ssDNA) o de doble cadena (*double-strand DNA*, dsDNA). Diversos factors poden causar l'SDF, com l'apoptosi o pseudoapoptosi dels espermatozoides a causa de l'activació de nucleases (Sakkas *et al.*, 1999; Sakkas *et al.*, 2002) i una major susceptibilitat a l'estrès oxidatiu per un empaquetament deficient del DNA espermàtic (Agarwal i Saleh, 2002; Xu *et al.*, 2003). Factors externs com l'estil de vida o determinats factors ambientals també poden tenir un impacte negatiu sobre la integritat del DNA espermàtic (Fraga *et al.*, 1996; Kort *et al.*, 2006; Sepaniak *et al.*, 2006; Hauser *et al.*, 2007; Meeker *et al.*, 2008).

Recentment, s'ha determinat que l'SDF influeix negativament en la capacitat de fertilització i embaràs (Bellver *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2011), amb la qual cosa l'SDF resulta un bon bio-marcador de la qualitat de l'esperma que ens pot ajudar a pronosticar l'èxit dels cicles de FIV (Simon *et al.*, 2013). Diferents tècniques han estat emprades per l'estudi de l'SDF, entre elles, l'assaig TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*), l'SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), l'SCDt (*Sperm Chromatin Dispersion test*) o l'assaig *Comet* (Agarwal i Said, 2003). Recentment, a més, s'ha desenvolupat un assaig *Comet* de doble cua (*two-tailed Comet*) que permet analitzar simultàniament la fragmentació del DNA espermàtic de cadena senzilla (*single-strand SDF*, ssSDF) i doble (*double-strand SDF*, dsSDF), de manera que es pot valorar la rellevància d'ambdós tipus de trencaments del DNA espermàtic (Enciso *et al.*, 2009).

S'ha considerat que els valors d'SDF superiors al 22,5% mesurats amb l'SCDt no són compatibles amb l'assoliment de l'embaràs de forma natural, mentre que valors superiors al 18,5% correlacionarien amb una predisposició a patir avortaments espontanis (Fernandez *et al.*, 2005; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). Emprant l'assaig *Comet* alcalí, que permet determinar el grau de ssSDF, s'ha conclòs que un valor del 52% és el límit per la capacitat d'assolir l'embaràs de forma natural (Simon *et al.*, 2011; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b).

Treballs recents han descrit, mitjançant el *Comet* alcalí i el *Comet* neutre, patrons característics de ssSDF i dsSDF en diferents grups de pacients. Així, els individus

Introducció

control de fertilitat provada presenten valors de ssSDF inferiors al 52%, amb valors de dsSDF tant baixos (<77,5%) com elevats (>77,5%); aquests últims, però, amb majors probabilitats de patir avortaments (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). En canvi, aquells pacients amb els pitjors pronòstics reproductius (pacients amb oligoastenoteratozoospermia, astenozoospermia i astenozoospermia amb varicocele) mostren valors elevats tant de ssSDF (>52%) com de dsSDF (>77,5%) (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a). Pel que fa a individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques, mostren tant perfils d'elevada ssSDF i dsSDF; com de baixa ssSDF i elevada dsSDF (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a).

Tot i que alguns estudis apunten que la baixa qualitat de l'esperma i els danys en el DNA poden incrementar la incidència d'anomalies cromosòmiques en els espermatozoides (Vegetti *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2001) i en els embrions generats (Gianaroli *et al.*, 2005; Xanthopoulou *et al.*, 2012), en un treball recent en el qual es determina l'SDF mitjançant l'assaig TUNEL no s'ha evidenciat una correlació entre aquesta i la incidència d'aneuploïdia en els espermatozoides ni en els embrions generats (Bronet *et al.*, 2012). En tots aquests estudis, però, l'anàlisi de les aneuploïdies dels embrions s'ha realitzat mitjançant la FISH per a un cromosoma (Xanthopoulou *et al.*, 2012) o per a nou cromosomes (Gianaroli *et al.*, 2005; Bronet *et al.*, 2012). És de gran interès determinar l'existència d'una possible relació entre l'SDF i l'aneuploïdia i els desequilibris estructurals en embrions provinents de parelles amb un factor d'infertilitat exclusivament masculí, tot emprant metodologies d'anàlisi del complement cromosòmic complet com la CGH o els *arrays* de CGH.

Hipòtesi i objectius

2. Hipòtesi i objectius

2.1 Hipòtesi

L'estadi replicatiu del DNA pot afectar el diagnòstic citogenètic de cèl·lules aïllades quan s'apliquen tècniques d'anàlisi del genoma complet. L'estadi de replicació del DNA de la cèl·lula analitzada pot donar lloc a dificultats en la caracterització dels desequilibris segmentals, sobretot en emprar tècniques d'elevada resolució. Aquesta problemàtica és particularment interessant en els casos de DGP per factor masculí, ja que la presència d'anomalies estructurals en pronuclis masculins ha estat àmpliament descrita.

2.2 Objectius

1. Determinar si la replicació del DNA i el sistema de WGA emprat tenen algun efecte en la precisió de la CGH per detectar, a més de les aneuploïdies, els desequilibris segmentals de fibroblasts aïllats i blastòmers humans aïllats d'embrions criopreservats.
2. Valorar l'estat citogenètic d'embrions criopreservats potencialment transferibles, conservats en centres de reproducció assistida.
3. Aplicar l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic en cicles de FIV-DGP per infertilitat d'origen masculí i correlacionar-ne la citogenètica dels embrions i l'èxit reproductiu.
4. Posar a punt la tecnologia dels *arrays* de CGH d'oligonucleòtids per l'estudi citogenètic de cèl·lules aïllades i comparar-ne els resultats amb els obtinguts mitjançant els *arrays* de CGH de BACs i la CGH sobre metafases.
5. Aplicar la metodologia dels *arrays* de CGH per oligonucleòtids a parelles candidates al DGP. Comparar els resultats assolits amb aquesta metodologia amb els obtinguts amb la CGH sobre metafases.

Material i Mètodes

3. Material i mètodes

3.1 Estadi replicatiu de la cromatina i diagnòstic citogenètic de cèl·lula única

3.1.1 Obtenció del material biològic

Per a l'estudi de l'efecte de l'estadi del cycle cel·lular i del sistema de WGA emprat sobre la incidència de desequilibris segmentals detectats amb la CGH, s'han emprat fibroblasts d'una línia cel·lular de Coriell i blastòmers aïllats d'embrions criopreservats cedits a aquest projecte.

A més, en disposar d'uns embrions criopreservats que haurien pogut ser potencialment transferibles si les parelles no els haguessin donat a la ciència, s'ha analitzat a fons la citogenètica d'aquests embrions.

3.1.1.1 Cultiu cel·lular de fibroblasts, separació per citometria de flux i aïllament cel·lular

S'ha escollit per a aquest estudi la línia cel·lular de fibroblasts GM03184 (Coriell), de cariotip 47,XY,+15. El cultiu es duu a terme en un flascó de 75 cm² amb medi RPMI suplementat amb sèrum boví fetal al 15% i penicil·lina-estreptomicina al 2%, que es manté en un incubador a 37°C i 0,5% de CO₂. Per tal d'obtenir cèl·lules en tots els estadis del cycle cel·lular: G1, S, G2 i M, el cultiu adherent es deixa créixer sense arribar a la confluència durant uns tres dies. Si el cultiu arribés a la confluència, les cèl·lules quedarien aturades en G2.

Per a la recuperació de les cèl·lules, s'aspira el medi de cultiu i es fa un rentat amb 10 ml de tampó fosfat (*phosphate buffered saline*, PBS). S'elimina el PBS i s'afegeixen 3 ml de tripsina-EDTA (tripsina 0,25% i EDTA 0,022% en PBS, pH=7,2-7,3). S'incuba entre 1 i 3 minuts a 37°C per tal que la tripsina desuneixi les cèl·lules del flascó. L'acció de la tripsina es neutralitza afegint 6 ml de medi RPMI fresc, i es recupera el contingut del flascó en un tub de 10 ml. Se centrifuga durant 5 minuts a 1.200 rpm i es descarta el sobrenedant. Es fa un rentat del botó cel·lular resuspenent-lo en 1 ml de PBS i centrifugant el tub durant 5 minuts a 1.200 rpm. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular en 0,5 ml de PBS.

Material i mètodes

Per tal de tenyir el DNA cel·lular, en primer lloc, es fixa la cromatina tot afegint 0,5 ml d'etanol pur fred a la suspensió, gota a gota. El deixa actuar durant 20 minuts a 4°C. Posteriorment, se centrifuga durant 7 minuts a 1.000 rpm, es descarta el sobrenedant i finalment es tenyeix la cromatina afegint 0,5 ml d'una solució de iodur de propidi 50 mg/ml (Sigma) i RNAsa 120 mg/ml (Sigma). Després d'incubar la mostra un mínim de 20 minuts a temperatura ambient i protegida de la llum, es procedeix a realitzar la separació cel·lular en el citòmetre de flux BD FACS Aria II (Unitat de Citometria, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol).

Les cèl·lules se separen segons el contingut de DNA: 2n (fases G0 o G1), 4n (fases G2 o M) o dosis intermèdies (>2n i <4n) (fase S) (Figura 3), i es recullen en tres tubs Eppendorf que contenen PBS estèril suplementat amb 0,1% de *polivinil alcohol* (PVA, Invitrogen).

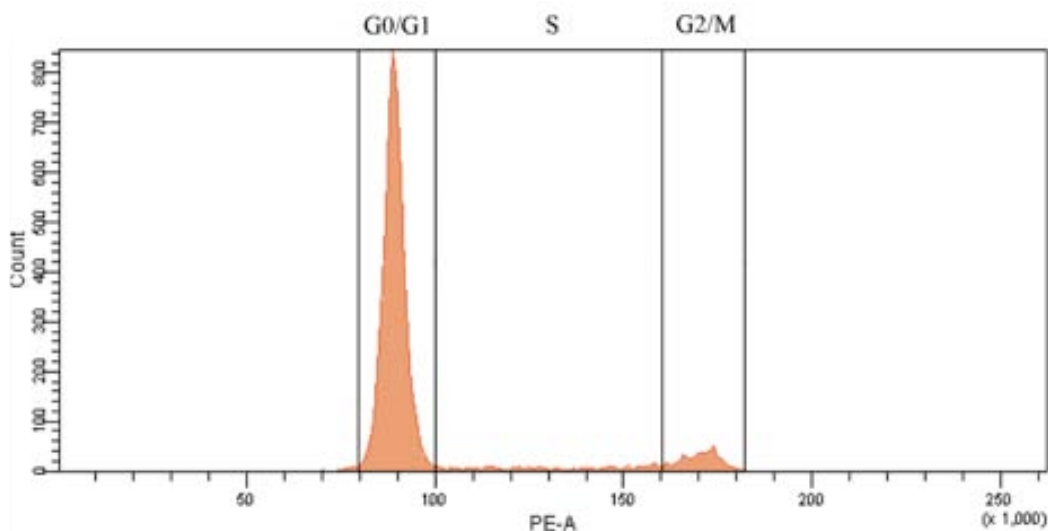


Figura 3. Histograma dels fibroblasts separats al citòmetre de flux BD FACS Aria II en funció de la quantitat de DNA de cada cèl·lula: 2n (fases G0 o G1), 4n (fases G2 o M) o dosis intermitges (fase S).

Els tubs es traslladen a temperatura ambient fins al laboratori, on dins una cabina estèril de flux laminar (Telstar) es procedeix a l'aïllament cel·lular. En tres plaques de Petri degudament marcades es dispensa una gota de cada suspensió cel·lular. Els fibroblasts individuals s'aïllen sota el microscopi estereoscòpic Leica Wild M8 (Leica) a 50 augments, emprant un capil·lar de plàstic de 170 µm (Cook). Cada cèl·lula aïllada es renta en 4 o 5 gotes de PBS-0,1%PVA i s'entuba en un tub de PCR de 0,2 ml degudament codificat per poder fer l'estudi a cegues, que s'emmagatzema a -80°C fins al seu ús.

3.1.1.2 Obtenció d'embrions humans criopreservats. Aïllament i classificació dels blastòmers

Per a la realització d'aquest estudi es va obtenir una autorització específica de la *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida* (CNRHA) espanyola, en col·laboració amb els equips d'embriologia de la Clínica Sagrada Família, la Fundació Puigvert i l'Institut Universitari Dexeus. Aquesta autorització va permetre disposar d'embrions humans criopreservats donats per famílies que no volien emprar-los per finalitats reproductives. Els Comitès d'Ètica dels centres de reproducció assistida van autoritzar el projecte i les famílies van donar el seu consentiment exprés mitjançant la signatura del consentiment informat corresponent.

Un total de 20 parelles de cariotip normal que s'havien sotmès a un cicle de FIV per diferents indicacions, van cedir embrions al present estudi (Taula 2). La seva edat materna ha estat compresa entre els 20 i 40 anys, amb una mitjana d'edat de 33,6 anys.

Taula 2. Parelles incloses en l'estudi d'embrions criopreservats, indicació per la reproducció assistida, edat materna o de la donant d'oòcits i nombre d'embrions processats de cada parella.

Parella	Indicació	Edat materna/ donant	Núm. Embrions
1	Oligoastenozoospermia/Edat maternal avançada	38	1
2	Oligozoospermia	33	2
3	Oligozoospermia	34	1
4	Oligozoospermia	28	1
5	Criptoospermia	32	1
6	Azoospermia obstructiva	34	1
7	Edat materna avançada	38	1
8	Oligozoospermia severa	34	3
9	Astenoospermia/ Edat materna avançada	40	1
10	Factor tubàric/ Edat materna avançada/Astenoospermia	40	1
11	Disovulació	36	1
12	Avortaments de repetició	37	2
13	Factor tubàric	36	1
14	Esterilitat idiopàtica	30	1
15	Oòcits de donant (Baixa resposta hormonal)	34	2
16	Oòcits de donant (Fallada ovàrica)	29	2
17	Oòcits de donant (Baixa resposta hormonal)/ Endometriosis/ Oligoastenozoospermia	32	2
18	Edat materna avançada	38	2
19	Oòcits de donant (Baix recompte fol·licular)	30	1
20	Oòcits de donant (Disovulació)/ Edat materna avançada	20	3

Material i mètodes

D'un total de 30 embrions criopreservats en estadi de Dia +2 o Dia +3 de desenvolupament, se n'han analitzat 85 blastòmers (2 a 5 blastòmers per embrió). Tots ells eren embrions que haurien estat potencialment transferibles, amb paràmetres de qualitat embrionària entre l'1 i el 3 sobre 4, essent 1 la qualitat embrionària òptima i 4 la qualificació més baixa.

Els embrions, mantinguts en bancs de nitrogen líquid, van ser descongelats als respectius centres de reproducció i es van mantenir en cultiu fins al Dia +3 en cas que s'haguessin criopreservat en Dia +2. Tan sols es van emprar per l'estudi aquells embrions que, en ser descongelats, van presentar una taxa de supervivència dels blastòmers igual o superior al 70%.

Per l'aïllament dels blastòmers de cada embrió, es prepara una placa amb diverses gotes de 20 µl de PBS-0,1%PVA i d'àcid de Tyrode. Per tal d'eliminar-ne la zona pel·lúcida, es col·loca cada embrió en una gota d'àcid de Tyrode en una placa de Petri. Una vegada visualitzem la disgregació de la zona pel·lúcida sota el microscopi estereoscòpic (Leica Wild M8) a 50 augments, es col·loca l'embrió en una gota de PBS-0,1%PVA emprant un capil·lar de plàstic de 170 µm (Cook). Amb un capil·lar de plàstic de 75 µm (EMB) s'aïlla cada blastòmer individualment.

Cada cèl·lula es renta en 4 o 5 gotes de PBS-0,1%PVA per tal d'eliminar les restes d'àcid de Tyrode i els possibles fragments de l'embrió, i es diposita en una placa preparada amb diverses gotes de PBS-0,1%PVA i coberta amb oli mineral (Sigma). Cada blastòmer s'ubica en una gota diferent i, mantenint les condicions estèrils, s'observa mitjançant un microscopi invertit Olympus IX70 per tal de determinar-ne l'estadi del cicle cel·lular: si es troba en interfase (fase S) o metafase (fase M). Els blastòmers en interfase contenen un nucli visible, mentre que els blastòmers en metafase no presenten embolcall nuclear i, per tant, el seu nucli no és visible (Figura 4).

Una vegada classificat cada blastòmer, s'entuba en un tub de PCR de 0,2 ml degudament codificat per poder fer l'estudi a cegues, i s'emmagatzema a -80°C fins al seu ús.

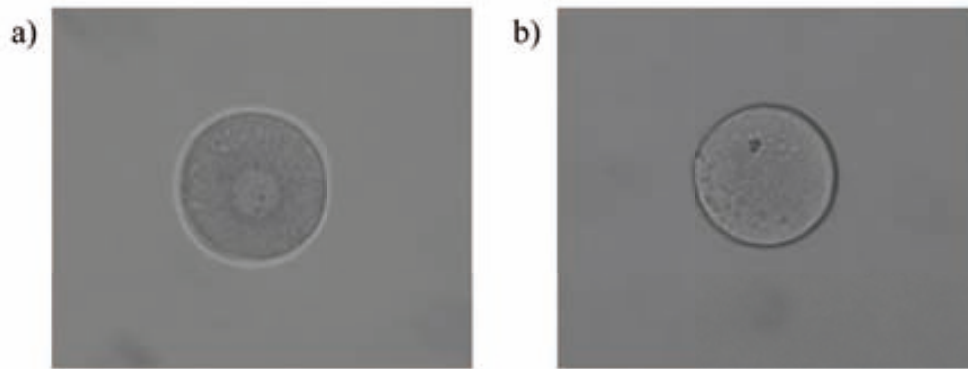


Figura 4. Aparença d'un blastòmer A) en estadi d'interfase, amb un nucli visible i B) en estadi de metafase, sense nucli visible. Ambdós blastòmers provenen del mateix embrió.

3.1.2 Lisi cel·lular i amplificació del genoma

3.1.2.1 Lisi enzimàtica i DOP-PCR

Les cèl·lules es lisen mitjançant l'addició a cada tub d'1 μl de dodecil sulfat de sodi (SDS) 17 μM (Sigma) i 2 μl de proteïnasa K 125 mg/ml (Roche). S'afegeix una gota d'oli mineral lleuger (Sigma) per cobrir cada mostra i així evitar-ne l'evaporació i la contaminació per DNA extern. En un termociclador TGradient (Biometra) s'incuben les mostres a 37°C durant 1 hora per tal que la proteïnasa K degradi les proteïnes cel·lulars alliberant-se el DNA, i a 95°C durant 10 minuts per inactivar l'enzim.

L'amplificació del DNA de cada cèl·lula individual s'ha dut a terme mitjançant la DOP-PCR seguint el protocol prèviament descrit (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b). Els reactius emprats per cada mostra són:

- 32 μl d'aigua estèril lliure de nucleases (Promega)
- 5 μl de *Long PCR buffer* 10X (-MgSO₄) (Ambion)
- 4 μl d'una mescla de dNTPs (1C:1G:1A:1T) (Ambion)
- 3,5 μl de MgSO₄ 25 mM (Ambion)
- 1 μl d'encebadors degenerats 100 μM (Biomers)
- 0,5 μl d'enzim *Super Taq Plus* (5U/ μl) (Ambion)

El protocol seguit al termociclador és de 5 minuts a 94°C, 1,5 minuts a 30°C i 30 minuts a 68°C, amb una rampa de 5°C/s des de la temperatura d'*annealing* fins a l'extensió; 40

Material i mètodes

cicles d'1 minut a 95°C, 1 minut a 56°C i 3 minuts a 68°C; i un pas final d'extensió de 8 minuts a 68°C. La durada d'aquest protocol és d'unes 5 hores.

S'han lisat i amplificat mitjançant aquest protocol un total de 90 fibroblasts: 30 fibroblasts en les fases G0 o G1, 30 en fase S i 30 en les fases G2 o M.

3.1.2.2 Lisi i amplificació amb *SurePlex DNA Amplification System*

El *SurePlex DNA Amplification System* (BlueGnome) és un kit comercial que inclou la lisi cel·lular i l'amplificació del DNA.

En el primer pas, de lisi cel·lular, s'afegeixen 2,5 µl d'*Extraction Buffer* a cada tub i se centrifuguen breument. Tot seguit, s'afegeixen 4,8 µl d'*Extraction Enzyme Dilution Buffer* i 0,2 µl de *Cell Extraction Enzyme* a cada tub. Se centrifuguen les mostres i es posen al termociclador durant 10 minuts a 75°C i 4 minuts a 95°C. Els tubs es mantenen a 20°C fins al següent pas.

En un segon pas, de preamplificació del DNA, s'afegeixen 4,8 µl de *Pre-Amplification Buffer* i 0,2 µl de *Pre-Amplification Enzyme*. Se centrifuguen dels tubs i es posen al termociclador durant 2 minuts a 95°C i posteriorment, es realitzen 12 cicles de 15s a 95°C, 50s a 15°C, 40s a 25°C, 30s a 35°C, 40s a 65°C i 40s a 75°C. Els tubs es mantenen a 4°C fins al següent pas.

En el darrer pas, d'amplificació del DNA, s'afegeixen 25 µl d'*Amplification Buffer*, 0,8 µl d'*Amplification Enzyme* i 34,2 µl d'aigua estèril lliure de nucleases. S'agita al vòrtex (VF2, Janke&Kunkel Ika Labortechnik) i se centrifuguen breument els tubs. Es posen al termociclador durant 2 minuts a 95°C i posteriorment, es realitzen 16 cicles de 15s a 95°C, 1 minut a 65°C i 1 minut a 75°C. Els tubs es mantenen a 4°C i es congelen a -20°C fins al seu ús.

Per a la realització dels passos descrits, es prepara per endavant la mescla de reactius necessaris pel nombre de mostres a processar més un marge d'error i, posteriorment, es reparteix el volum requerit als diversos tubs.

S'han lisat i amplificat mitjançant aquest protocol un total de 30 fibroblasts: 15 fibroblasts en les fases G0 o G1, 15 en fase S i 15 en les fases G2 o M; així com els blastòmers provinents d'embrions criopreservats.

3.1.2.3 Electroforesi en gel d'agarosa

Per tal de comprovar la correcta amplificació del DNA de cada mostra, es fa una electroforesi en un gel d'agarosa 1,5% (Biotools) en tampó TAE 1x (*Tris-acetate-EDTA*) (Qiagen).

Es carreguen 5µl de mostra juntament amb 1 µl de tampó de càrrega 10x (Invitrogen) i es carrega un marcador de pes molecular de 100 pb (Invitrogen) en un dels pouets.

L'electroforesi es realitza durant uns 30 minuts a 120V. El gel es tenyeix en una solució de bromur d'etidi (Sigma) durant uns 5 minuts i es visualitza la tinció del DNA en un transil·luminador de llum UV (Vilber Lourmat).

La correcta amplificació del DNA mitjançant la DOP-PCR es visualitza en forma de pinzellada de fragments de DNA entre les 200 i les 4.000 pb. En canvi, si l'amplificació del DNA s'ha fet amb *SurePlex*, veurem una pinzellada de fragments de DNA entre les 200 i les 1.500 pb (Figura 5).

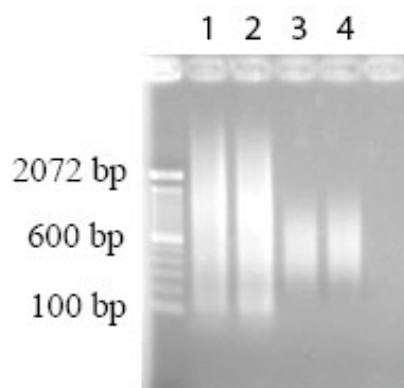


Figura 5. Pinzellades de DNA amplificat en un gel d'agarosa (1 i 2: Productes amplificats mitjançant la DOP-PCR, amb fragments de DNA de 200 a 4000pb; 3 i 4: Productes amplificats mitjançant el *SurePlex*, amb fragments de DNA de 200 a 1500pb).

3.1.3 Hibridació genòmica comparada

3.1.3.1 Marcatge fluorescent del DNA amb *Nick Translation*

Les mostres amb el DNA cel·lular correctament amplificat es marquen fluorescentment mitjançant la tècnica de la *Nick Translation* (Abbott) d'acord amb les instruccions del fabricant.

En emprar fluorocroms per marcar els DNAs, a partir d'aquest moment és convenient mantenir una llum tènue per tal que els fluorocroms no perdin intensitat. El DNA test es marca amb *Spectrum Red-dUTP* (Abbott) mentre que el DNA de referència es marca

Material i mètodes

amb *Spectrum Green-dUTP* (Abbott). La mescla de reactius per cada mostra consisteix en:

- 5 µl de *10X Nick Translation buffer*
- 2,5 µl de *Spectrum red-dUTP* (0,1mM) o bé *Spectrum green-dUTP* (0,2mM)
- 5 µl de dTTP (dilució 1/3)
- 10 µl de dNTPs mix (proporció 1A:1G:1C)
- 5 µl de *Nick Translation Enzyme* 5U/µl

Es reparteixen 27,5 µl de la mescla en tubs Eppendorf de 0,2 ml i s'afegeixen els 22,5 µl del DNA amplificat (test o referència). S'agita amb el vòrtex i es fa una breu centrifugació de les mostres. Al termociclador, les mostres segueixen un programa de 15°C durant 90 minuts i a 70°C durant 10 minuts.

El DNA control o de referència s'obté a partir de limfòcits 46,XY de la línia cel·lular GM07381 (Coriell) o bé d'amniòcits 47,XXY d'un cultiu sanguini cedit per la Dra. Maria Rosa Martorell, de la Clínica Girona. Les cèl·lules de referència es lisen i el seu DNA s'amplifica de forma idèntica a cèl·lules test. Es barreja DNA de referència d'un mínim de 10 cèl·lules amb la finalitat d'obtenir un DNA homogeni.

3.1.3.2 Precipitació de la sonda de DNA

Els DNAs test i referència marcats serviran per generar unes sondes de DNA que s'hibridaran en un portaobjectes amb una extensió de metafases de limfòcits 46,XY (Abbott Molecular). En cada portaobjectes s'hi poden hibridar fins a tres mostres diferents, ja que contenen tres zones d'extensió cel·lular diferenciables a contrallum que podem delimitar amb un llapis de diamant.

Per tal de preparar la sonda de DNA, es barregen els DNAs test i referència en proporció 1:1, mesclant els 50 µl de DNA test amb 50 µl de DNA de referència juntament amb 5 µl de Cot-1-DNA 1g/l (Abbott) per tal de bloquejar les regions repetitives del DNA presents en blocs heterocromàtics, centròmers i telòmers.

La precipitació del DNA es duu a terme utilitzant un 10% del volum d'acetat sòdic 3M pH=5,5 i 2,5 volums d'etanol al 100%, prenent com a punt de partida el volum inicial de DNA. Així, en el nostre cas, per un volum de 105 µl de DNA, s'afegeixen 10,5 µl d'acetat de sodi 3M i 262,5 µl d'etanol pur. Les mostres es mantenen a -80°C durant 1 hora i posteriorment, els tubs se centrifuguen a 14.500 rpm durant 30 minuts. Es

descarta el sobrenedant i els botons de DNA s'assequen curosament amb paper absorbent. Els tubs es mantenen a l'estufa a 37°C fins al moment del seu ús.

3.1.3.3 Hibridació competitiva

Primerament, es deshidraten els portaobjectes submergint-los durant 2 minuts en una sèrie d'etanols de concentració creixent: 70%, 85% i 100% i a continuació, es deixen assecar a temperatura ambient.

Un cop els portaobjectes estan secs, es desnatura el DNA de les metafases posant els portaobjectes durant 5 minuts en una solució de formamida al 70% mantinguda a 73°C dins un bany. La formamida al 70% en 2xSSC es prepara prèviament dins una cabina d'extracció de gasos (Cruma) barrejant 35 ml de formamida, 5 ml de 20xSSC (*standard saline citrate*) i 10 ml d'aigua desionitzada, ajustant el pH=7. Un cop finalitzats els 5 minuts de desnaturalització, els portaobjectes es deshidraten en una sèrie de banys d'etanols freds (4°C) de concentració creixent; 70%, 85% i 100% durant un minut cadascun i a continuació, es deixen assecar a l'aire.

Tot seguit, es prepara la sonda de DNA resuspenent el botó de DNA que hem assecat prèviament en 8 µl de solució d'hibridació que conté 50% de formamida desionitzada (Sigma) i 10% de dextrà sulfat (Sigma) en 2xSSC. Per resuspendre completament la sonda de DNA i així obtenir una hibridació de bona qualitat es requereix l'ús del vòrtex durant uns 3 o 4 minuts per mostra.

Les sondes es desnaturalitzen posant-les durant 10 minuts en un bany a 73°C. Transcorregut aquest temps, amb una micropipeta (Gilson), es diposita la totalitat de les sondes sobre cadascuna de les zones del portaobjectes prèviament marcades, que es cobreixen amb cobreobjectes tallats a mida. Se segella el contorn de cada cobreobjectes amb cola White Rubber (Best-Test).

A partir d'aquest moment els portaobjectes segueixen una variant del procediment de la CGH convencional (Rius *et al.*, 2010), en el qual es van introduir algunes modificacions per tal d'escurçar el temps d'hibridació de 72h a 12h, sense afectar-ne la qualitat. Els portaobjectes, que es posen sobre una cubeta amb aigua destil·lada per mantenir les condicions d'humitat ambiental, es tracten durant 30 minuts a 75W de potència amb un microones Optiquick Compact (Moulinex). Immediatament després, s'introdueixen en una cambra humida protegida de la llum que es manté a 37°C dins d'un incubador amb agitació rotatòria durant un mínim de 12 hores d'hibridació. Per això, cal col·locar la

Material i mètodes

cambrà humida sobre un agitador 1309-I CE (Lab-line Instruments) que girarà a 60 rpm dins de l'incubador.

Un cop acabada la hibridació es retira amb cura la cola i els cobreobjectes i es fan dos rentats successius dels portaobjectes durant 2 minuts, el primer en una solució de 0,4xSSC/0,3% de NP-40 a 73°C amb una agitació vigorosa, i el segon en una solució de 2xSSC/0,1% de NP-40 també en agitació. A continuació, es deshidraten els portaobjectes durant 2 minuts en una sèrie de banys d'etanols de concentració ascendent (70%, 85% i 100%) i es deixen assecar a l'aire. Un cop assecats, s'afegeixen 15 µl de DAPI (*4',6-diamino-2-phenylindole*) (Sigma) de concentració 125 ng/ml en Vectashield (Vector Labs) per evitar que la fluorescència s'esgoti ràpidament. Tot seguit, es protegeixen els portaobjectes amb un cobreobjectes de 60x20mm i després de deixar-los reposar uns minuts a 4°C, ja es pot procedir a la seva observació al microscopi de fluorescència.

3.1.3.4 Anàlisi de la hibridació genòmica comparada

Emprant un microscopi d'epifluorescència Nikon 90i es rastreja el portaobjectes amb l'objectiu de 60x per tal de localitzar metafases de bona qualitat. Les metafases han de tenir una bona intensitat de fluorescència tant verda com vermella, bona morfologia cromosòmica i de tinció de bandes reverses i, preferiblement, menys de dos entrecreuaments cromosòmics. Es capturen, emprant l'objectiu de 100x, un mínim de 12 metafases de cada mostra.

El programa de captura i anàlisi emprat és l'Isis CGH, de Metasystems. La captura de cada metafase consta de tres passos: primer es captura el senyal del DAPI; posteriorment, el senyal del fluorocrom verd, i per últim, el del fluorocrom vermell. Es fa el cariotip d'un mínim de 12 metafases per mostra mitjançant les bandes DAPI reverses (semblants a les bandes G).

Segons la ràtio entre la fluorescència verda i vermella de cada cromosoma, el programa informàtic genera el perfil de CGH per cadascun dels cromosomes autosòmics (1-22) i sexuals (X i Y). La ràtio entre la fluorescència vermella i verda és 1:1 quan hi ha la mateixa proporció de DNA test i referència, de manera que s'obté un perfil de CGH centrat i corresponent a una dotació euploide.

Pel que fa als desequilibris cromosòmics entre el DNA test i referència, segons el sistema d'amplificació del genoma emprat, s'empren uns criteris d'anàlisi diferents. Per a DNAs amplificats mitjançant la DOP-PCR, l'anàlisi dels perfils de CGH es realitza

tenint en compte la desviació estàndard de la fluorescència de cadascuna de les captures de cada mostra. D'aquesta manera, el programa estableix uns límits superior i inferior amb un interval de confiança del 99% resultants de sumar tres cops la desviació estàndard a la fluorescència mitjana de la mostra. Per a DNAs amplificats mitjançant *SurePlex*, es fixen uns límits de 0,8:1 per determinar pèrdues de material cromosòmic, i de 1,2:1 per determinar la presència de guanys cromosòmics.

En ambdós casos, però, quan la mitjana de fluorescència per a un cromosoma supera els límits de fluorescència descrits, apareix una barra de color vermell o verd al costat del perfil dels cromosomes corresponents, assenyalant que es tracta d'un guany o pèrdua cromosòmica, tal com es pot observar en la següent imatge (Figura 6).

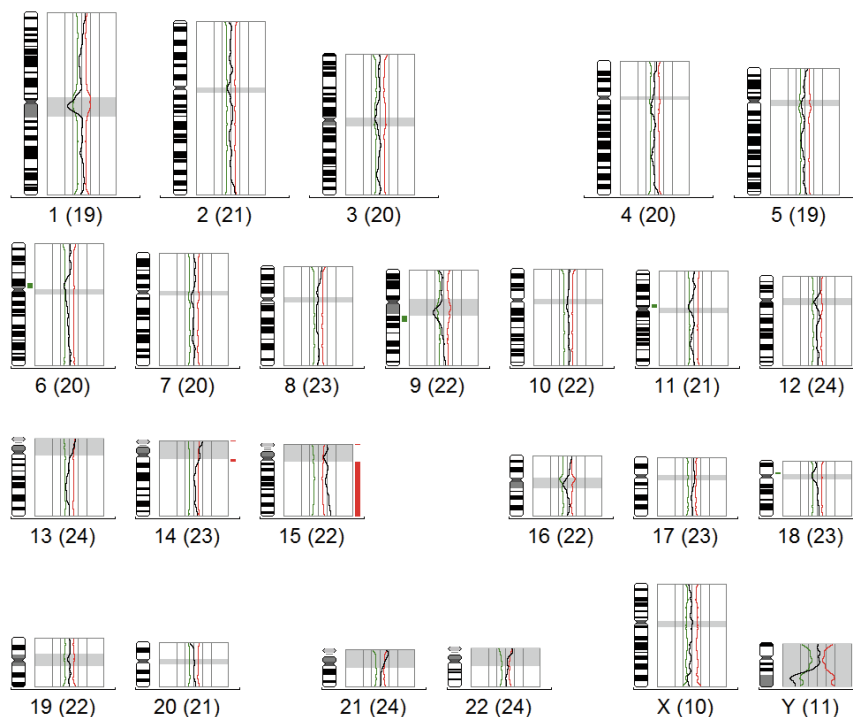


Figura 6. Perfils de CGH de cada cromosoma (1-22, X i Y) obtinguts en analitzar 12 metafases d'una mostra 47,XY,+15.

3.1.3.5 Criteris d'interpretació

En l'anàlisi de les alteracions segmentals no s'han considerat reals els desequilibris propers als telòmers o al voltant dels centròmers, per tractar-se de regions repetitives de DNA.

D'acord amb l'experiència del grup i, segons criteris força unànimes, s'han considerat artefactes el guany o la pèrdua conjunta dels cromosomes 17, 19 i 22, així com la desviació de la regió 1p33pter (Moore *et al.*, 1997; Wells i Delhanty, 2000; Voullaire *et al.*, 2002; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b; Rius *et al.*, 2010).

3.2 Diagnòstic genètic preimplantacional per factor masculí i estudi de la fragmentació del DNA espermàtic

3.2.1 Selecció de casos clínics

La realització de cicles de DGP per factor masculí s'ha fet en col·laboració amb tres centres de FIV de Barcelona: la Fundació Puigvert, la Clínica Eugén i l'Institut Universitari Dexeus. Les parelles van ser degudament informades tant pel que fa a l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic, com als procediments a aplicar en el DGP amb estudi complet del complement cromosòmic dels embrions produïts *in vitro*. Totes elles van signar els consentiments informats pertinents.

S'han realitzat nou cicles de DGP per esterilitat d'origen masculí de vuit parelles que presentaven diferents indicacions per Tècniques de Reproducció Assistida (TRA) (Taula 3). La parella A va seguir dos cicles de FIV i DGP en dos anys consecutius.

Taula 3. Indicacions per a la reproducció assistida en les parelles incloses en l'estudi. Cariotip en cas d'anomalia cromosòmica, seminograma i edats dels progenitors.

Parella	Indicació	Cariotip anòmal	Seminograma	Edat materna	Edat paterna
A	Translocació paterna	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	Oligoastenoteratozoospermia	33 - 34	39 - 40
B	Translocació paterna	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Oligozoospermia	31	39
C	Inversió paterna, RIF	46,XY,inv(2)(p11.2q13)	Oligoastenozoospermia	34	36
D	AMA, RM		Astenoteratozoospermia	37	43
E	RM, FISHa		Normozoospermia	34	36
F	RIF		Astenozoospermia	35	37
G	Esterilitat primària, FISHa		Normozoospermia	33	36
H	Globozoospermia, FISHa		Oligoastenoteratozoospermia severa	36	38

RIF: *repeated implantation failure*, AMA: *advanced maternal age*, RM: *recurrent miscarriages*, FISHa: aneuploidies incrementades en espermatozoides respecte a controls (detecció per FISH).

3.2.2 Estudi de la fragmentació del DNA espermàtic

L'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic s'ha realitzat en col·laboració amb el MSc. Jordi Ribas, la MSc. Alba Fernández i el Dr. Agustín García, de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, UAB.

Les mostres de semen s'han obtingut per masturbació després d'un mínim de 3 dies d'abstinència i s'han criopreservat en *Test-yolk buffer* (14% glicerol, 30% rovell d'ou, 1,98% glucosa i 1,72% citrat de sodi) en una proporció 1:1 i mantenint-les a -80°C, per posteriorment dur a terme l'anàlisi de l'*Sperm Chromatin Dispersion test* (SCDt) i els assaigs *Comet* neutre i alcalí (Garcia-Peiro *et al.*, 2011; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a).

3.2.2.1 *Sperm Chromatin Dispersion test* (SCDt)

Per l'SCDt s'ha emprat el kit comercial Halosperm (Halotech DNA SL). L'SCDt es basa en el principi que els espermatozoides amb el DNA no fragmentat en ser sotmesos a una desnaturalització a pH àcid i una desproteïnitització controlada, produeixen un halo de dispersió format per llaços de DNA, mentre que els espermatozoides amb el DNA fragmentat no formen aquests llaços.

La mostra de semen es descongela per immersió en un bany a 37°C durant uns 30 segons. Es renta dues vegades amb PBS tot centrifugant el tub durant 5 minuts a 700G i descartant el sobrenedant. Finalment, s'ajusta la concentració a $5 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml amb PBS.

S'afegeixen 25 µl de mostra en un tub Eppendorf amb agarosa de baix punt de fusió (Bio-Rad) (fosa prèviament en un bany a 90°C durant 5 minuts i equilibrant-la en aigua a 37°C durant 5 minuts més) i es barreja amb la pipeta.

Es dispensen dues gotes de 14-20 µl de la mescla sobre un portaobjectes prèviament tractat amb agarosa i es cobreixen amb dos cobreobjectes de 20x20 mm. Es posa el portaobjectes a la nevera (4°C) durant 5 minuts per tal que l'agarosa gelifiqui i posteriorment, es treu el cobreobjectes tot arrossegant-lo amb el dit. S'hauran format dos gels sobre el portaobjectes.

Se submergeix el portaobjectes durant 7 minuts en una solució desnaturalitzant (conté HCl) i es renta durant 5 minuts amb aigua destil·lada. S'incuba durant 25 minuts en 10 ml de solució de lisi (conté agents reductors i detergent DTT, que descompactaran el contingut del nucli dels espermatozoides). Es fa un rentat amb aigua destil·lada durant 5 minuts i es deshidrata el portaobjectes en una sèrie de banys d'etanols al 70%, 90% i

Material i mètodes

100%, per tal de fixar els espermatozoides. Es deixa assecar a l'aire i es tenyeix la mostra amb DAPI (2 µg/ml) (Roche) en Vectashield (Vector Laboratories).

En un microscopi de fluorescència (Olympus AX70) s'analitzen, amb l'objectiu de 100x, 200-300 espermatozoides, tot classificant-los com a fragmentats, no fragmentats i degradats (Figura 7). El percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat s'indica com a SDF.

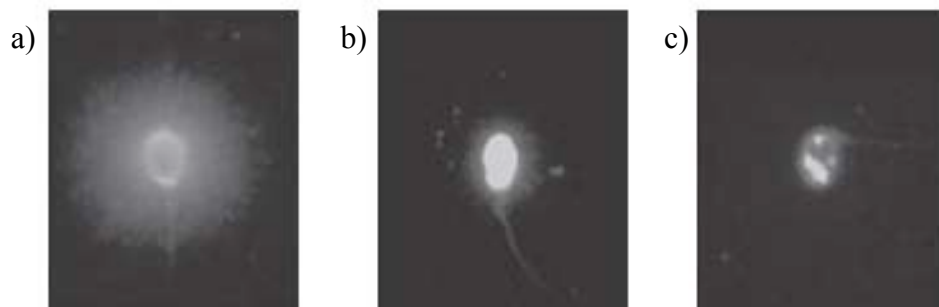


Figura 7. Caps d'espermatozoide tenyits amb iodur de propidi. a) Nucli sense fragmentació del DNA, b) Nucli amb fragmentació del DNA i c) Nucli amb el DNA degradat. Adaptat de Garcia-Peiró et al. (2011).

3.2.2.2 Assaig *Comet* neutre i alcalí

Els assaigs *Comet* neutre i *Comet* alcalí es duen a terme simultàniament en dos portaobjectes separats. La mostra de semen es descongela per immersió en un bany a 37°C durant 30 segons. Es renta tres vegades amb PBS tot centrifugant el tub durant 5 minuts a 700G i descartant el sobrenedant. Finalment, s'ajusta la concentració a $10 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml amb PBS. En un tub de 0,2 ml es mesclen 25 µl de mostra amb 50 µl d'agarosa de baix punt de fusió (Sigma) a l'1%. Es dispensen 15 µl de la mescla en dos portaobjectes pretractats per facilitar l'adhesió del gel amb agarosa al 1%. Es cobreixen les gotes amb cobreobjectes i es posen a la nevera (4°C) durant 5 minuts. Es retiren suaument els cobreobjectes i se submergeixen en les dues solucions de lisi subministrades pel fabricant (*Comet lysis solutions*, Halotech) durant 30 minuts cadascuna. Es renten els portaobjectes en tampó TBE (*Tris-borate-EDTA*) durant 10 minuts.

Pel *Comet* neutre es fa una electroforesi en tampó TBE a 20 volts (1 volt/cm) durant 12,5 minuts i posteriorment, es fa un rentat en NaCl al 0,9% durant 2 minuts.

Pel *Comet* alcalí s'incuba el portaobjectes en una solució alcalina desnaturalitzant (0,03 M NaOH i 1 M NaCl) durant 2,5 minuts a 4°C, i es fa l'electroforesi en tampó NaOH 0,03 M a 20 volts (1 volt/cm) durant 4 minuts.

Els dos portaobjectes s'incuben en una solució neutralitzant (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) durant 5 minuts, en TBE durant 2 minuts i, finalment, es deshidraten en una sèrie de banys d'etanols al 70%, 90% i 100%, durant 2 minuts cadascun, per tal de fixar la mostra. Les mostres es tenyeixen amb DAPI SlowFade Gold (Invitrogen) i s'avaluen en un microscopi de fluorescència (Olympus AX70), tot comptant amb l'objectiu de 100x, un mínim de 400 espermatozoides per mostra. Els espermatozoides es classifiquen com a fragmentats o no fragmentats segons el criteri mostrat a la Figura 8, i es dona el percentatge de ssSDF, mesurat amb el *Comet* neutre; i de dsSDF, mesurat amb el *Comet* alcalí.

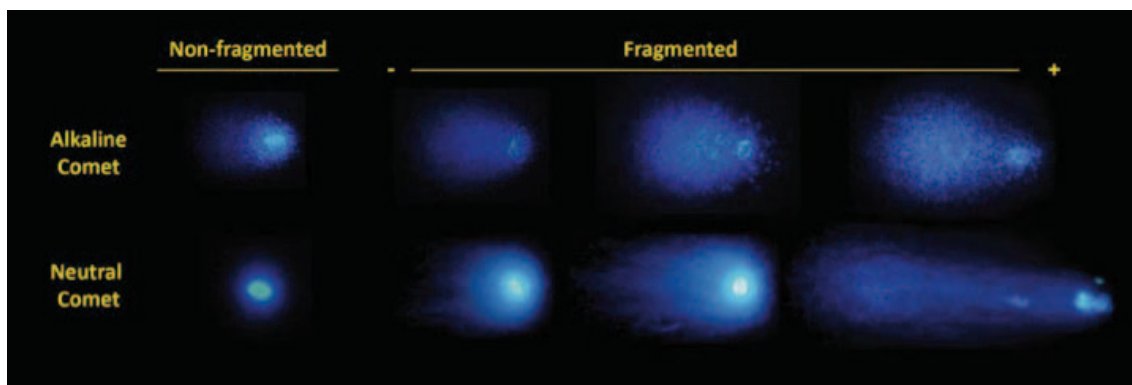


Figura 8. Nuclis d'espermatozoide tenyits amb DAPI no fragmentats i amb diferents graus de fragmentació obtinguts amb el *Comet* alcalí i neutre. Extret de Ribas-Maynou et al., 2012.

3.2.3 Aplicació del DGP

Els procediments d'estimulació hormonal de les pacients varia en funció de cada dona i del centre on es realitza el cicle de FIV, però en general consisteixen en una primera fase de dessensibilització hipotalàmica amb agonistes i/o antagonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH), i una segona fase d'estimulació ovàrica amb hormona luteïnitzant (LH) i hormona fol·liculoestimulant (FSH), que indueixen el creixement i maduració dels fol·licles. Al cap d'uns 10-12 dies, quan els fol·licles han assolit una grandària de 18-20 mm (mesurat per via ecogràfica), s'injecta gonadotropina coriònica humana (HCG) a la pacient, i al cap de 36 h es realitza l'aspiració dels fol·licles per tal de recuperar-ne els oòcits.

Material i mètodes

Els oòcits madurs (en estadi de Metafase II) són inseminats per *intracytoplasmatic sperm injection* (ICSI) el Dia 0, i durant els subseqüents dies, que anomenem Dia +1, +2 i +3 postinseminació, s'avalua el correcte desenvolupament dels embrions pel que fa al nombre de pronuclis, nombre de cèl·lules, morfologia, fragmentació, etc.

El Dia +3 al matí, al centre de reproducció corresponent, es realitza la biòpsia d'un blastòmer de cada embrió evolutiu que hagi assolit l'estadi de 6-8 cèl·lules. Segons l'equipament de cada centre, aquesta biòpsia es pot realitzar químicament, amb àcid de Tyrode; o físicament, mitjançant un làser; ambdós sistemes acoblats a un micromanipulador (Nickon eclipse TE200). En el mètode químic, s'empra àcid de Tyrode que s'aplica, mitjançant una pipeta (Cook o Humagen) acoblada al micromanipulador, a la regió de la zona pel·lúcida que es vol degradar. La biòpsia física, en canvi, es fa mitjançant un o dos polsos de làser (Saturn Laser R1) a la regió elegida de la zona pel·lúcida. A continuació, s'extreu el blastòmer escollit mitjançant una pipeta d'aspiració.

Treballant en una cabina de flux laminar i emprant un capil·lar de plàstic estèril de 170 µm (Cook), cada blastòmer es renta en diverses gotes de PBS/0,1% PVA i s'entuba en un tub Eppendorf de 0,2 ml. Per cada blastòmer s'agafa, com a control negatiu, un petit volum de la darrera gota de rentat que s'entuba per comprovar possibles contaminacions de les mostres. Les mostres es mantenen en gel durant el transport cap al laboratori de la UAB.

La lisi cel·lular i l'amplificació del DNA de cada blastòmer s'ha realitzat mitjançant un dels dos mètodes prèviament descrits: lisi enzimàtica i DOP-PCR (1r cicle A; D i E) o *SurePlex* (2n cicle A, B, C, F, G i H).

Per a l'anàlisi citogenètica completa s'ha dut a terme el protocol d'Hibridació Genòmica Comparada descrit a l'apartat 3.1.3, tot emprant DNA de referència 46,XY o 47,XXY.

3.2.4 Reanàlisi d'embrions descartats

Una vegada emès l'informe del DGP el Dia +4 i sempre que ha estat possible, s'han recollit els embrions descartats en Dia +5 per la seva reanàlisi mitjançant la CGH. Quan ha estat possible aïllar blastòmers individuals dels embrions, aquests s'han analitzat separatament.

En cas que els embrions estiguessin compactats o a l'estadi de blastocist, s'ha fet l'estudi de la citogenètica de tot l'embrió. En un dels casos (H: PGD per globozoospermia) es va analitzar un blastòmer per hibridació *in situ* fluorescent (FISH) d'alguns cromosomes (veure apartat següent).

3.2.4.1 Hibridació *in situ* fluorescent

La tècnica de FISH requereix la fixació del blastòmer a analitzar en un portaobjectes. Per fer-ho, es posa el blastòmer en una gota de medi hipotònic (KCl 55,92 mg/ml) en una placa sota una lupa i s'aspira amb un capil·lar. Es diposita sobre un portaobjectes, en una regió prèviament delimitada amb un llapis de diamant. Des d'una certa distància es deixa caure una gota de fixador Carnoy (metanol-acètic 3:1), podent-se repetir el procés fins que la cèl·lula quedi fixada i lliure de citoplasma. Sota el microscopi de contrast (Leitz Dialux 20 EB) i emprant l'objectiu de 40x, es confirma que la cèl·lula s'hagi fixat i es confirma la seva posició al portaobjectes.

Es dispensen 10 µl de la mescla de sondes de FISH (One Cell Systems, Inc.) sobre la mostra (en aquest cas, sondes centromèriques pels cromosomes 7, 8 i 10) i es cobreix amb un cobreobjectes de 22x22 mm.

Es posa el portaobjectes en un HYBrite (Vysis) programat a 85°C durant 5 minuts per desnaturalitzar el DNA i a 37°C durant 5 minuts per tal que es produeixi la hibridació de les sondes. Es fa un rentat de 10 minuts en agitació en 2xSSC per retirar el cobreobjectes. Es renta el portaobjectes en una solució de rentat (0,2xSSC, 0,1%SDS) a 50°C en agitació durant 2 minuts i en 2xSSC a temperatura ambient durant un minut. Es tenyeix el DNA amb DAPI (Sigma) a una concentració de 125ng/ml en Vectashield (Vector Labs). En un microscopi de fluorescència (Nikon 90i) es localitza el nucli del blastòmer i se n'observen els senyals de FISH amb l'objectiu de 100x. En cas d'euploïdia pels cromosomes analitzats, s'esperen dos senyals de cada *locus*.

3.3 Els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids en l'estudi de cèl·lula única

3.3.1 Obtenció del material biològic

3.3.1.1 Aïllament de fibroblasts i amplificació del DNA

Per a la posada a punt dels *arrays* de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent s'han emprat tres línies cel·lulars de fibroblasts (Coriell) amb alteracions cromosòmiques conegudes: la línia GM03184 (47,XY,+15), la línia GM03676 (48,XY,+2,+21) i la línia GM03330 (47,XY,+13).

Els cultius cel·lulars s'han dut a terme seguint les condicions descrites a l'apartat 3.1.1.1; en aquest cas, però, s'ha assolit l'estadi de confluència al cap d'uns quatre o cinc dies de cultiu per maximitzar el nombre de cèl·lules obtingudes i incrementar la proporció de cèl·lules en fase G2, més favorables per a l'anàlisi citogenètic de cèl·lula única a causa de la seva dotació genòmica 4n. L'aïllament de fibroblasts individuals es duu a terme en una cabina estèril de flux laminar (Telstar), tal com s'ha descrit prèviament.

El mètode d'amplificació del genoma emprat ha estat el de *SurePlex*, descrit a l'apartat 3.1.2.2. S'han analitzat set cèl·lules de la línia GM03184, tres de la línia GM03676 i dues de la línia GM03330, que havien sigut prèviament analitzades per CGH (veure apartat 3.1.3).

3.3.1.2 Reanàlisi de blastòmers d'embrions criopreservats

S'ha reanalitzat, mitjançant els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent, nou blastòmers de quatre embrions prèviament analitzats per CGH a l'apartat 3.1. El volum de DNA resultant de l'amplificació del DNA cel·lular amb *SurePlex* (uns 73 µl) és suficient per dur a terme ambdós anàlisis: la CGH sobre metafases i l'*array* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent).

3.3.1.3 Reanàlisi de blastòmers provinents de DGPs

S'ha dut a terme la reanàlisi, mitjançant els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent), del DNA amplificat amb *SurePlex* de blastòmers obtinguts en casos previs de DGP.

Per una banda, s'han reanalitzat nou blastòmers obtinguts en casos de DGP per factor masculí analitzats prèviament mitjançant la CGH (casos B i H; Taula 3, apartat 3.2).

Paral·lelament, s'han reanalitzat 16 blastòmers de DGPs per factor masculí o antecedents de fallades d'implantació realitzats a l'Institut Universitari Dexeus. Aquest segon grup de blastòmers havia estat analitzat dins el programa de DGP de l'Institut Universitari Dexeus, mitjançant els *arrays* de BACs *SurePlex 24sure V3* (BlueGnome), tot seguint les instruccions del fabricant.

3.3.2 Protocol d'Agilent per DNA genòmic aplicat a DNA amplificat de cèl·lula única

Els formats d'*arrays* de CGH d'Agilent existents són els següents:

- 1x1M: Té capacitat per una sola mostra i conté aproximadament un milió d'oligonucleòtids per mostra.
- 2x400K: Té capacitat per dues mostres i conté unes 240.000 sondes d'oligonucleòtids per mostra.
- 4x180K: Té capacitat per quatre mostres i conté unes 180.000 sondes d'oligonucleòtids per mostra.
- 8x60K: Té capacitat per vuit mostres i conté unes 60.000 sondes d'oligonucleòtids per mostra.

El protocol d'Agilent establert per a l'anàlisi de DNA genòmic s'ha aplicat a l'estudi citogenètic del DNA amplificat dels fibroblasts de l'apartat 3.3.1.1, els blastòmers de l'apartat 3.3.1.2 i els blastòmers dels casos B i H, descrits a l'apartat 3.3.1.3.

Els formats d'*array* aplicats a aquest protocol han estat els de 1x1M, 2x400K i 4x180K.

3.3.2.1 Purificació del DNA en columnes

El DNA amplificat es purifica mitjançant el kit de purificació en columnes *DNA Clean & Concentrator™-25* (Zymo Research) per tal d'eliminar els encebadors i nucleòtids sobrants de la reacció d'amplificació.

En un tub Eppendorf es barreja la mostra amb el doble de volum de *Binding Buffer* (per exemple, 30 µl de DNA amplificat + 60 µl de *Binding Buffer*). Es col·loca cada columna dins d'un tub subministrat pel mateix kit i s'hi transfereix la mescla. Se centrifuga 30s a 10.000 rpm. Es fan dos rentats de la columna de 200 µl cadascun amb *DNA Wash Buffer* i se centrifuga 30s a 10.000 rpm després de cada rentat. Es transfereix

Material i mètodes

la columna a un tub Eppendorf nou i s'elueix el DNA retingut a la columna amb 30 µl d'aigua lliure de nucleases (Promega) tot centrifugant els tubs 30s a 10.000 rpm.

Posteriorment, es mesura la concentració en un espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000 emprant 1,5 µl de mostra. Generalment, s'obté una concentració d'entre 100 i 200 ng/µl.

3.3.2.2 Digestió del DNA amb enzims de restricció

La quantitat de DNA inicial requerida pels tres formats d'*array* de CGH emprats (1x1M, 2x400K i 4x180K) és d'1 µg en 22,4 µl d'aigua lliure de nucleases (Promega). Per exemple, si una mostra té una concentració de 100 ng/µl, mesclarem en un tub Eppendorf de 0,2 ml, 10 µl de mostra amb 12,4 µl d'aigua.

En cas que no tinguem una mostra prou concentrada, es pot partir de 800 ng de DNA, però cal tenir en compte que tant el DNA test com el DNA de referència han d'estar sempre a la mateixa concentració.

El DNA es digereix amb els enzims de restricció *AluI* i *AfaI* (Invitrogen) per tal d'obtenir fragments d'entre 200 i 500 pb. La mescla de reactius per cada mostra consisteix en:

- 2,6 µl de *10xBuffer T*
- 0,2 µl de BSA 0,1%
- 0,3 µl d'*AluI* 10U/uL
- 0,5 µl d'*AfaI* 10U/uL

Es reparteixen 3,6 µl a cada tub, que conté els 22,4 µl de DNA diluït, se centrifuguen breument les mostres i es posen al termociclador amb un programa de 2h a 37°C i 20 minuts a 65°C. Els tubs es mantenen a 4°C fins al següent pas, o bé es congelen a -20°C.

3.3.2.3 Marcatge del DNA

S'utilitza el kit *SureTag DNA labeling kit* (Agilent). El DNA test es marca amb Cy5-dUTP i el DNA de referència amb Cy3-dUTP.

El DNA de referència s'obté a partir d'amniòcits 47,XXY lisats i amb el DNA amplificat per *SurePlex*, tot barrejant el DNA amplificat d'un mínim de 10 amniòcits amb la finalitat d'obtenir un DNA de referència homogeni.

S'afegeixen 5 µl de *Random primer* a cada tub i es posen al termociclador durant 3 minuts a 95°C. Es deixen refredar uns 3 minuts a 4°C.

Es preparen dues mescles de marcatge diferents, una pel DNA test i l'altra pel DNA referència, en tubs Eppendorfs *amber* de 1,5 ml per evitar que es degradi la fluorescència en contacte amb la llum. La mescla conté:

- 2 µl d'aigua estèril
- 10 µl de *5x Reaction Buffer*
- 5 µl de 10x dNTPs
- 3 µl de Cy3-dUTP o Cy5-dUTP
- 1 µl d'enzim Exo (-) Klenow

Es reparteixen 21 µl per tub, es barreja al vòrtex i se centrifuga. Es posen els tubs al termociclador amb un programa de 2 hores a 37°C i 10 minuts a 65°C i posteriorment, es mantenen a 4°C.

3.3.2.4 Purificació del DNA marcat

S'afegeixen 50 µl de TE 1x (10 mM Tris pH=8, 1 mM EDTA) a la mostra i 380 µl en un tub Eppendorf de 1,5 ml. Es transfereix tota la mostra al tub Eppendorf que conté TE 1x i es barreja amb el vòrtex.

Es transfereix el volum a una columna que haurem col·locat dins un tub Eppendorf subministrat pel kit. Se centrifuguen els tubs amb les columnes durant 14 minuts a 8.000G i es descarta l'elut. Es fa un rentat de cada columna amb 480 µl de TE 1x i se centrifuga durant 14 minuts a 8.000G. Es posa la columna cap per avall dins un tub Eppendorf nou subministrat pel kit i se centrifuga durant un minut a 8.000G.

En una centrífuga de buit miVAC DNA Concentrator (Genevac) es deshidrata el DNA marcat durant uns 10 minuts a 40°C fins que s'assequi el botó. Segons el format d'*array* de CGH escollit, s'afegeix un volum de TE 1x diferent: 80,5 µl pels *arrays* CGH de 1x1M, 41 µl pels *arrays* CGH de 2x400K i 21 µl pels *arrays* CGH de 4x180K.

3.3.2.5 Quantificació del DNA i del marcatge

La concentració del DNA i el grau d'incorporació de fluorocrom es mesuren amb un espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000 mitjançant el mode *Microarray* del programa informàtic. El blanc de l'aparell es fa amb TE 1x i s'empren 1,5 µl de cada mostra per a la mesura. La quantitat de DNA present a cada mostra es calcula en µg i l'activitat específica dels fluorocroms en pmol de Cy3 o Cy5 per µg, segons les fórmules següents:

Material i mètodes

$$\mu\text{g DNA} = \frac{\text{Concentració } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \cdot \text{Volum mostra } (\mu\text{l})}{1.000}$$

$$\text{Activitat específica (pmol}/\mu\text{g}) = \frac{\text{pmol Cy3 o Cy5 } /\mu\text{l}}{\text{Concentració (ng}/\mu\text{l})}$$

Els valors aproximats obtinguts amb el marcatge d'1 μg de DNA són els següents:

- $\mu\text{g DNA}$: 5-7
- $\text{pmol Cy3}/\mu\text{g}$: 25 – 40
- $\text{pmol Cy5}/\mu\text{g}$: 20 – 35

3.3.2.6 Hibridació competitiva

El DNAs test i referència marcats fluorescentment es mesclen en un tub Eppendorf *amber*. Segons el format de l'*array* de CGH, els volums de Cot-1-DNA, *Blocking Agent* i *Buffer* d'hibridació a afegir a cada mostra són els següents:

Component	Volum per mostra (μl)		
	1x1M	2x400K	4x180K
Cot-1-DNA (1mg/ml)	50	25	5
10X <i>aCGH Blocking Agent</i>	52	26	11
2X <i>HI-RPM Hybridization Buffer</i>	260	130	55
Mix d'hibridació	362	181	71

Se centrifuga breument i es posen les mostres en un bloc calent Termbloc (P selecta) a 95°C durant 3 minuts. Posteriorment, s'incuben les mostres en un incubador a 37°C durant 30 minuts i se centrifuguen durant un minut a màxima velocitat. Es pren nota de la posició que ocuparà cada mostra a l'*array* de CGH.

Els *arrays* de CGH es conserven meticulosament en un aparell de buit i deshumidificador (Labconco), ja que és important minimitzar el contacte, tant dels *arrays* com de les mostres, amb l'ozó. L'ozó degrada el fluorocrom Cy5, de manera que es pot perdre intensitat de senyal a l'*array* de CGH. En la manipulació de l'*array* a utilitzar cal tenir molta cura de no tocar la part impresa del vidre (a l'etiqueta de la cara impresa hi diu "Agilent", mentre que a la cara no impresa hi ha el codi de barres de l'*array*).

Es col·loca el cobreobjectes dins la cambra metàl·lica d'hibridació amb les gomes que delimitaran cada mostra cara amunt. Amb una micropipeta es dispensa tota la mostra

dins les regions delimitades pel cobreobjectes (490 µl als *arrays* de CGH 1x1M, 245 µl als *arrays* de CGH 2x400K o 100 µl als *arrays* de CGH 4x180K), amb especial cura de no crear bombolles. Finalment, es deposita l'*array* de CGH al damunt, amb la part impresa a la cara interior. Aleshores es procedeix al muntatge de la cambra metàl·lica, posant-li la tapa i enroscant el cargol de manera que quedi fortament tancada. S'ha de comprovar la presència d'una bombolla d'aire gran en cada mostra, que s'ha de moure adequadament en moure la cambra d'hibridació. S'insereix la cambra en el rotor del forn d'hibridació d'Agilent (Agilent G2545A), posant, si cal, una altra cambra metàl·lica buida com a contrapès. Es programa la hibridació a 65°C i 20 rpm de moviment rotatori, en un temps d'hibridació idoni: 40 hores en els *arrays* de CGH de 1x1M i 2x400K, i 24 hores en els *arrays* de CGH de 4x180K.

A continuació, es procedeix al rentat de l'*array* de CGH. Cal preparar dues cubetes de vidre (Sigma) amb *Buffer 1* a temperatura ambient. Se submergeix l'*array* de CGH a la primera cubeta tot subjectant-lo amb els dits, amb la part del cobreobjectes a la cara inferior. Fent palanca entre l'extrem del cobreobjectes i l'*array* de CGH amb unes pinces de plàstic es deixa caure el cobreobjectes al fons de la cubeta. Es passa l'*array* de CGH a la segona cubeta, on es deixa en un cistell per a portaobjectes (Sigma) durant 5 minuts amb agitació magnètica (Heidolph MR 2000).

En una tercera cubeta s'hi posa el *Buffer 2*, que ha d'estar a 37°C, en el qual s'hi fa un rentat d'un minut en agitació magnètica. En treure el portaobjectes lentament de la cubeta, aquest ha de sortir sec.

3.3.2.7 Anàlisi de l'*array* de CGH

Es col·loca l'*array* de CGH a l'adaptador de l'escàner, de forma que la cara hibridada en quedi a l'interior. S'encaixa al *DNA microarray Scanner* (Agilent) i es fa la captura de la imatge amb el protocol G3_CGH. Mitjançant el programa *Agilent Feature Extraction* es genera un fitxer de text (*.txt) per cada mostra que ens permetrà l'anàlisi dels resultats, i un fitxer *.pdf que indica els paràmetres de qualitat d'hibridació o *QCmetrics*.

Amb el programa *Workbench Standard Edition 5.0* d'Agilent, s'obren els fitxers de text i una vegada seleccionat el format d'*array* de CGH emprat, es pot obtenir el resultat citogenètic de cada mostra.

L'algoritme d'anàlisi utilitzat és l'ADM-2 i el límit de desviació estàndard emprat és de 10. El nombre d'oligonucleòtids mínim necessaris per indicar la presència d'una

Material i mètodes

alteració s'ha fixat en 10. De forma similar a la CGH sobre metafases, s'obtenen uns perfils centrats en cas d'euploidia, o bé, desplaçats cap al guany o la pèrdua cromosòmica en cas d'aneuploidia. Aleshores apareix una barra indicativa de guany o pèrdua, tal com es mostra a la Figura 9.

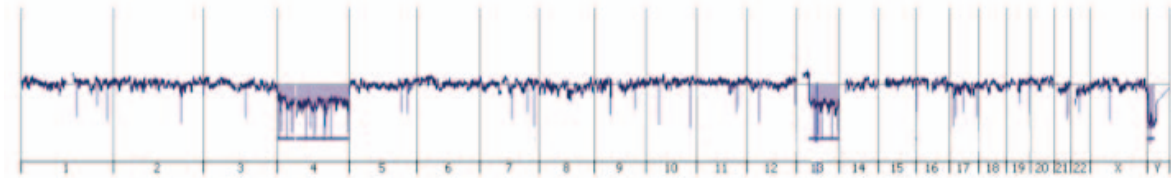


Figura 9. Perfils de cada cromosoma (1-22, X i Y) obtinguts amb l'array de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent en una mostra 44,XY,-4,-13.

3.3.2.8 Criteris d'interpretació

Segons el criteri adquirit pel nostre grup, en general, s'han considerat artefactes el guany o la pèrdua dels cromosomes 17, 19 i 22, així com la desviació de la regió 1p33pter, de la mateixa manera que ha estat descrit per la CGH (Moore *et al.*, 1997; Wells i Delhanty, 2000; Voullaire *et al.*, 2002; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b; Rius *et al.*, 2010).

3.3.3 Protocol d'Agilent per DNA amplificat de cèl·lula única

El protocol d'Agilent descrit per anàlisi de cèl·lula única parteix dels productes de DNA test i referència amplificats amb *SurePlex* (veure apartat 3.1.2.2).

Tot i que el format d'array de CGH recomanat per la casa comercial és el de 8x60K, també s'ha validat el procediment amb els arrays de CGH de 4x180K, tot adaptant els corresponents volums de marcatge i d'hibridació.

Per a l'estudi comparat dels arrays de CGH de BACs vs. els arrays d'oligonucleòtids s'ha usat el format d'array de CGH de 8x60K (veure apartat 3.3.1.3).

3.3.3.1 Marcatge del DNA

El DNA de referència s'obté a partir d'amniòcits 47,XXY lisats i amb el DNA amplificat per *SurePlex*. Es barreja el DNA amplificat d'un mínim de 10 amniòcits amb la finalitat d'obtenir un DNA de referència homogeni.

Per cada mostra a hibridar en els *arrays* de CGH de 4x180K es transfereixen 26 µl de DNA test i 26 µl de DNA de referència a dos tubs de 0,2 ml, mentre que pels *arrays* de CGH de 8x60K partirem de 13 µl de DNA test i 13 µl de DNA de referència.

Pel marcatge dels DNAs s'utilitza el kit *SureTag DNA labeling kit* (Agilent). De la mateixa manera que a l'apartat anterior, el DNA test es marca amb Cy5-dUTP i el DNA de referència amb Cy3-dUTP. Els volums de reactius necessaris segons el format d'*array* de CGH emprat són els següents:

Component	Volum per mostra (µl)	
	4x180K	8x60K
<i>Random primer</i>	5	2,5
<i>5x Reaction Buffer</i>	10	5
<i>10x dNTPs</i>	5	2,5
<i>Cy-dUTP o Cy5-dUTP</i>	3	1,5
<i>Exo (-) Klenow</i>	1	0,5
<i>Mix de marcatge</i>	19	9,5

S'afegeix el volum de *Random primer* indicat a cada tub i, tot seguit, es posen al termociclador durant 3 minuts a 95°C i 5 minuts a 4°C.

Es preparen les dues mescules de marcatge pel DNA test i el DNA referència, mesclant en dos tubs Eppendorf *amber* el volum necessari de *5x Reaction Buffer*, *10x dNTPs*, *Cy-dUTP o Cy5-dUTP* enzim *Exo (-) Klenow*, segons el nombre de mostres a hibridar i el tipus d'*array* de CGH que s'empri. Es reparteixen 9,5 µl per tub pels *arrays* de 4x180K i 19 µl per tub pels *arrays* de 8x60K, es barreja amb el vòrtex i se centrifuga.

Es posen els tubs al termociclador amb un programa de 2 hores a 37°C i 10 minuts a 65°C, i es mantenen a 4°C fins al següent pas.

3.3.3.2 Purificació del DNA marcat en columnes

El procediment de purificació del DNA marcat és el mateix descrit a l'apartat 3.3.2.5. Després d'evaporar tot el líquid de les mostres amb la centrífuga de buit (miVAC DNA Concentrator, Genevac) cal afegir 21 µl de TE 1x pels *arrays* de CGH de 4x180K i 9,5 µl de TE 1x pels *arrays* de CGH de 8x60K.

3.3.3.3 Quantificació del DNA i del marcatge

Seguint el mateix procediment de quantificació que a l'apartat 3.3.2.5, els valors esperats per a cada mostra són els següents:

Material i mètodes

- μg DNA: 9 - 14
- pmol Cy3/ μg : 20 – 30
- pmol Cy5/ μg : 15 – 25

En emprar els *arrays* de CGH de 4x180K s'obtenen mesures més elevades que emprant els *arrays* de CGH de 8x60K, ja que a l'hora de fer el marcatge, partim d'una quantitat doble de DNA.

3.3.3.4 Hibridació competitiva

Es mesclen el DNA mostra i el DNA referència marcats fluorescentment en un tub Eppendorf *amber*. Segons el format de l'*array* de CGH, els volums de Cot-1-DNA, *Blocking Agent* i *Buffer* d'hibridació a afegir a cada mostra són els següents:

Component	Volum per mostra (μl)	
	4x180K	8x60K
Cot-1-DNA (1mg/ml)	5	2
10X <i>aCGH Blocking Agent</i>	11	4,5
2X <i>HI-RPM Hybridization Buffer</i>	55	22,5
Mix d'hibridació	71	29

Es prepara la mescla d'hibridació segons el nombre de mostres a analitzar i el tipus d'*array* de CGH que fem. Es reparteixen 71 μl de la mescla per cada mostra en els *arrays* de CGH de 4x180K i 29 μl en els *arrays* de CGH de 8x60K.

Es dispensa tota la mostra (100 μl pels *arrays* de CGH de 4x180K i 40 μl pels de 8x60K) a la regió delimitada pel cobreobjectes, tot seguint el mateix procediment que a l'apartat 3.3.2.6.

El temps d'hibridació dins el forn d'hibridació d'Agilent serà de 16 hores a 65°C amb una velocitat de rotació de 20 rpm.

Els rentats amb *Buffer 1* i *Buffer 2* són equivalents als que s'han descrit anteriorment.

3.3.3.5 Anàlisi de l'*array* i criteris d'interpretació

L'anàlisi dels resultats es realitza de forma idèntica al que s'ha descrit a l'apartat 3.3.2.7. Els criteris d'interpretació són els mateixos que s'han detallat a l'apartat 3.3.2.8.

3.4 Els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids aplicats a un DGP per un portador equilibrat d'una translocació Robertsoniana

3.4.1 Història clínica dels pacients

La realització d'aquest cicle de DGP s'ha fet en col·laboració amb la Fundació Puigvert. La parella, un cop va ser degudament informada dels procediments a aplicar, va signar el corresponent consentiment informat.

El pacient, de 31 anys i amb cariotip 45,XY,der(13;14)(q10;q10), presentava teratozoospermia i un augment de la incidència, en espermatozoides, de disomies dels cromosomes sexuals i de disomies i nul·lisomies del cromosoma 13. Els valors de fragmentació del DNA espermàtic van ser de 29% mitjançant l'SCDt, 62,8% mitjançant el *Comet* neutre i 94% mitjançant el *Comet* alcalí. La seva parella, de 29 anys, tenia un cariotip normal 46,XX.

3.4.2 Aplicació del DGP

Els procediments clínics seguits són els mateixos descrits a l'apartat 3.2.3. La lisi cel·lular i amplificació del genoma d'un únic blastòmer biopsiat per embrió evolutiu s'ha realitzat mitjançant el *SurePlex*.

Per a l'anàlisi citogenètica s'han usat els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids de 8x60K (Agilent), seguint el protocol per DNA amplificat de cèl·lula única descrit a l'apartat 3.3.3.

El DNA amplificat va ser doblement reanalitzat mitjançant la CGH i els *arrays* de CGH de 4x180K (Agilent), seguint el protocol per DNA amplificat de cèl·lula única descrit a l'apartat 3.3.3.

3.4.3 Anàlisi d'embrions descartats

Una vegada emès el corresponent informe del DGP en Dia +4, s'han recuperat els embrions descartats el Dia +5 i s'han reanalitzat els blastocists sencers mitjançant la CGH.

Resultats

4. Resultats

4.1 Valoració de l'efecte de l'estadi replicatiu de la cromatina en el diagnòstic citogenètic de cèl·lula única

4.1.1 Estudi del complement cromosòmic complet de fibroblasts aïllats en els diferents estadis del cicle cel·lular

Els dos sistemes de WGA testats han estat altament fiables pel que fa a l'anàlisi del complement cromosòmic complet. No obstant això, l'alteració citogenètica coneguda present a la línia cel·lular emprada (guany del cromosoma 15) s'ha detectat amb major eficiència en els productes de DNA amplificat per *SurePlex* que en els productes amplificats mitjançant la DOP-PCR (100% vs. 91.1%).

Tan sols les cèl·lules que han mostrat un perfil de CGH guanyat pel cromosoma 15 s'han inclòs en l'estudi de la incidència tant d'aneuploïdies com de desequilibris segmentals addicionals. En les tres fases del cicle cel·lular i emprant ambdós tipus de sistemes de WGA, s'han detectat aneuploïdies i desequilibris segmentals de 10-20 Mb fins a braços cromosòmics sencers (Taula 4).

Resultats

Taula 4. Resultats citogenètics de fibroblasts aïllats de la línia cel·lular GM03184 (Coriell) (47,XY,+15) amb desequilibris cromosòmics addicionals.

WGA	C	Estadi cicle cel·lular	Aneuploidies addicionals	Desequilibris segmentals
DOP-PCR	1	G1/G0	-	+5p14pter
	2	G1/G0	-	+6q
	3	G1/G0	-	+4q,-17p
	4	G1/G0	+Y	-
	5	S	-	-18q12.1q12.3,+Xp21.3p22.1
	6	S	-	+8q22.1q24.1
	7	S	-	+7q11.2q21.1
	8	S	+13	-1q31q42.1,+4q13.1q21.1,+5p14p15.1,+5q11.2q23.3,-8q21.2q21.3,+9p21p23,+11q22.3q23.1,+21q11.2q22.1
	9	S	-	+Xq21.3
	10	S	-	-18q,+19p
	11	S	-	-2q21.3q22
	12	G2/M	-	+16p11.2p13.2,-16q,+19p
<i>SurePlex</i>	1	G1/G0	-	-6p
	2	S	-	+8p22pter
	3	S	-	+17q
	4	S	-	+1p35p36.1
	5	S	-	-5q21q22
	6	G2/M	-	+16p
	7	G2/M	-	+16p
	8	G2/M	-Y	+16p, +20q

C: cèl·lula.

No s'han evidenciat diferències significatives en la incidència d'aneuploidies addicionals entre els tres estadis del cicle cel·lular.

La incidència de desequilibris segmentals ha estat significativament superior a la fase S respecte a la resta de fases (G0/G1 i G2/M) en els productes de DNA amplificat mitjançant la DOP-PCR ($p < 0,05$, tests de Fisher i de Mann-Whitney). L'anàlisi de producte amplificat del DNA cel·lular amb *SurePlex*, en canvi, no ha presentat diferències significatives en la incidència de desequilibris segmentals entre els diferents estadis del cicle cel·lular (Taula 5).

Taula 5. Nombre de fibroblasts aïllats amplificats amb ambdós sistemes de WGA: DOP-PCR i *SurePlex*. Detecció de l'aneuploidia coneguda de la línia cel·lular, aneuploidies addicionals i desequilibris segmentals a cada estadi del cicle cel·lular.

WGA	DOP-PCR			<i>SurePlex</i>		
	Estadi del cicle cel·lular	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S
Cèl·lules analitzades	30	30	30	15	15	15
Detecció guany cromosoma 15 (%)	83,3	96,7	93,3	100	100	100
Aneuploidia addicional (%)	4,0	3,4	0	0	0	6,7
Desequilibris segmentals (%)	12,0	24,1 ^a	3,6	6,7	26,7	20,0
Esdeveniments segmentals totals	4	16 ^b	3	1	4	4

^a Test de Fisher ($p < 0,05$)

^b Test de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

En les cèl·lules en fase S amb el DNA amplificat mitjançant la DOP-PCR, s'han detectat 11 guanys de segments cromosòmics i cinc pèrdues segmentals. A causa de la resolució de la CGH de 10-20 Mb, en la majoria de casos, els desequilibris segmentals inclouen tant bandes clares, considerades regions de replicació primerenca, com bandes fosques, considerades regions de replicació tardana.

4.1.2 Estudi del complement cromosòmic complet de blastòmers aïllats en interfase i metafase

Un total de 85 dels 98 blastòmers processats (86,7%), provinents d'embrions criopreservats i cedits a aquest projecte, han estat correctament amplificats mitjançant el sistema de WGA *SurePlex* i, posteriorment, analitzats amb èxit. Una major proporció de blastòmers en interfase han presentat una correcta amplificació del DNA cel·lular en comparació amb els blastòmers metafàsics (95,5% vs. 79,6%). En ambdós casos, però, tan sols s'han analitzat mitjançant la CGH sobre metafases aquells blastòmers que han amplificat correctament el DNA cel·lular.

El 33,3% (14 de 42) de blastòmers en fase S i el 34,9% (15 de 43) de blastòmers en fase M han estat totalment euploides. La resta de blastòmers han presentat aneuploidies, desequilibris segmentals, o ambdós tipus d'anomalies (Taula 6). Tots els esdeveniments aneuploides i els desequilibris segmentals detectats en els blastòmers en les fases S i M es mostren a les Figures 10 i 11, respectivament.

Resultats

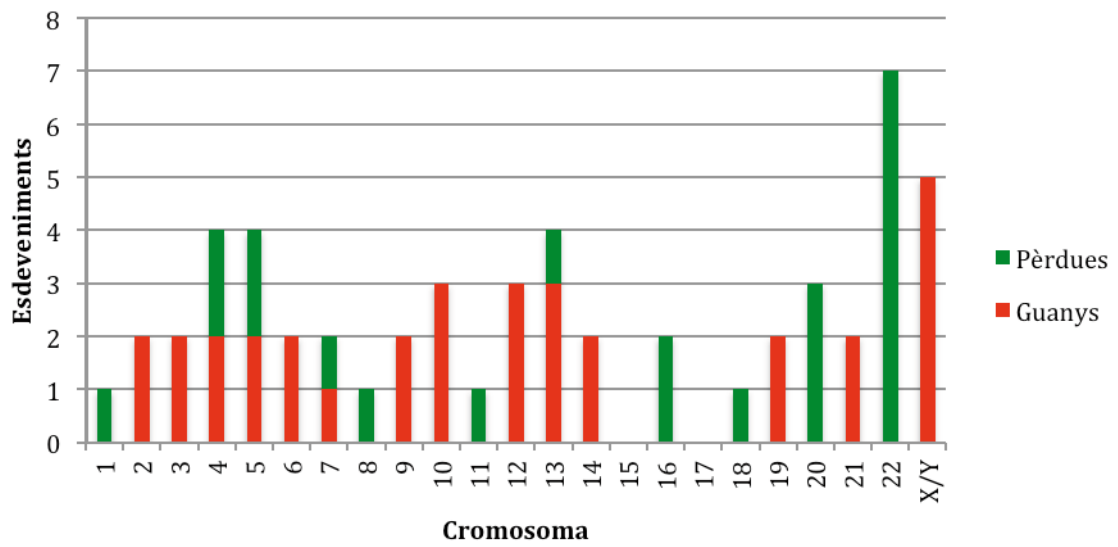
No s'han detectat diferències significatives en la incidència d'aneuploïdies i desequilibris segmentals entre els grup de blastòmers en interfase i metafase. Inclús en considerar tan sols aquells blastòmers sense cap aneuploïdia, no s'han observat diferències en la presència de desequilibris segmentals entre ambdós grups.

No obstant això, aquells blastòmers que contenen almenys un esdeveniment aneuploide han mostrat una incidència significativament superior de desequilibris segmentals en comparació amb els blastòmers sense cap aneuploïdia (61,5% i 37%, respectivament; $p < 0,05$, test de Fisher).

Taula 6. Resultats citogenètics obtinguts en blastòmers en interfase i metafase.

	Interfase	Metafase
Blastòmers processats	44	54
Blastòmers amb WGA correcta i resultat de CGH (%)	42 (95,5)	43 (79,6)
Blastòmers sense aneuploïdies ni desequilibris segmentals (%)	14 (33,3)	15 (34,9)
Blastòmers citogenèticament anòmals (%)	28 (66,7)	28 (65,1)
Blastòmers amb aneuploïdia (%)	16 (38,1)	23 (53,5)
Blastòmers amb desequilibris segmentals (%)	20 (47,6)	21 (48,8)
Esdeveniments segmentals (%)	49 (46,7)	56 (53,3)
Blastòmers sense aneuploïdies (%)	26 (61,9)	20 (46,5)
Esdeveniments segmentals en blastòmers sense aneuploïdies (%)	24 (68,6)	11 (31,4)
Blastòmers amb aneuploïdia i desequilibris segmentals (%)	8 (19,0)	16 (37,2)
Blastòmers amb aneuploïdies exclusivament (%)	8 (19,0)	7 (16,3)
Blastòmers amb desequilibris segmentals exclusivament (%)	12 (28,6)	5 (11,9)

a)



b)

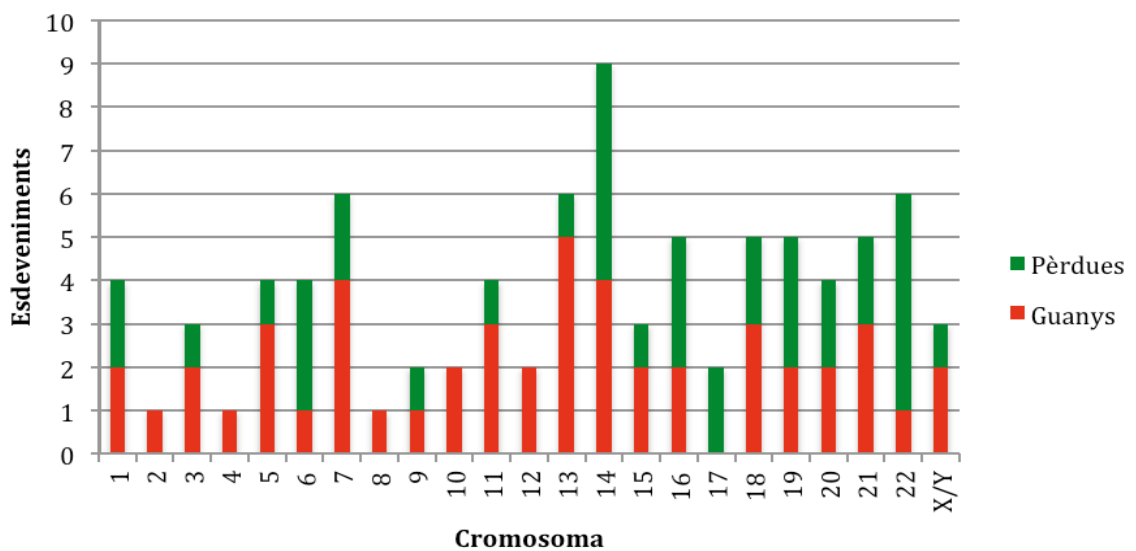


Figura 10. Nombre d'esdeveniments aneuploides detectats per cada cromosoma en a) blastòmers interfàsics i b) blastòmers metafàsics.

Resultats

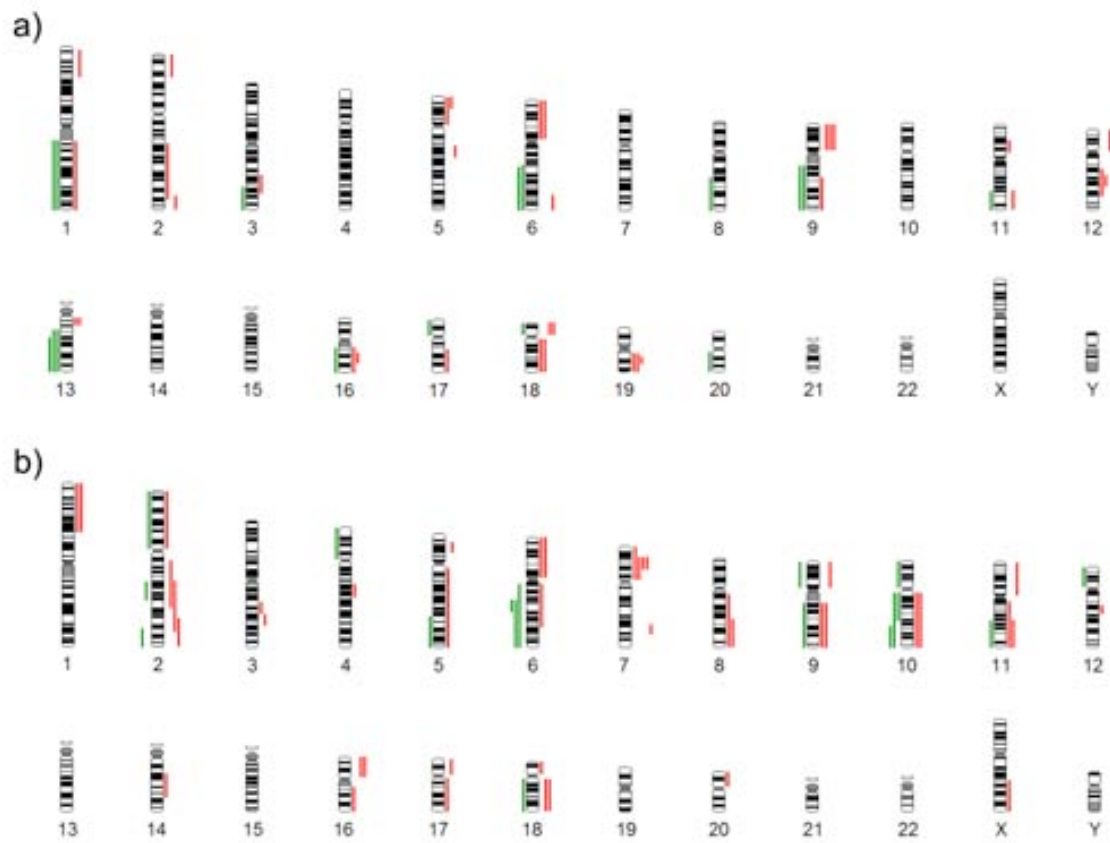


Figura 11. Desequilibris segmentals detectats per cada cromosoma en a) blastòmers interfàsics i b) blastòmers metafàsics.

Aquests resultats han estat inclosos a l'article "Does the S-phase have an impact on the accuracy of CGH profiles in single fibroblasts and human blastomeres?" actualment en procés de revisió en una revista indexada al JCR de l'àrea de la Biologia de la Reproducció (veure Annex 1).

4.2 Estudi citogenètic d'embrions humans criopreservats

Un total de 30 embrions provinents de 20 parelles diferents han estat emprats per la caracterització citogenètica dels embrions criopreservats. Tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1, els blastòmers aïllats d'aquests mateixos embrions havien estat prèviament analitzats per l'apartat 4.1.2.

Tan sols quatre de les 20 parelles (20%) han presentat algun embrió amb perfils de CGH euploides (sense aneuploïdies ni desequilibris segmentals) en tots els blastòmers analitzats. En el 80% de les famílies incloses (16 de 20) tots els embrions analitzats han presentat anomalies en almenys un dels blastòmers analitzats (Taula 7).

Un total de 63,3% (19 de 30) dels embrions han presentat almenys un blastòmer aneuploide. Els cromosomes implicats en les aneuploïdies detectades en aquests 19 embrions es mostren a la Figura 12.

Tan sols un dels embrions aneuploides (1 de 19) no era mosaic. Dels 18 embrions mosaics, cinc han estat caracteritzats com a caòtics, ja que almenys un dels blastòmers presentava una aneuploïdia extensiva i la majoria de blastòmers analitzats presentaven aneuploïdies per a cromosomes diferents.

En tres dels 18 embrions mosaics s'han detectat tant errors meiòtics com mitòtics. A més, el 73,3% dels embrions (22 de 30) han presentat desequilibris segmentals per un o més cromosomes en algun dels blastòmers analitzats. Un total de 87 dels 127 extrems dels desequilibris segmentals detectats estan situats prop de subbandes descrites com a llocs fràgils del genoma (Mrasek *et al.*, 2010). La caracterització citogenètica de cada embrió es pot observar a la Taula 7.

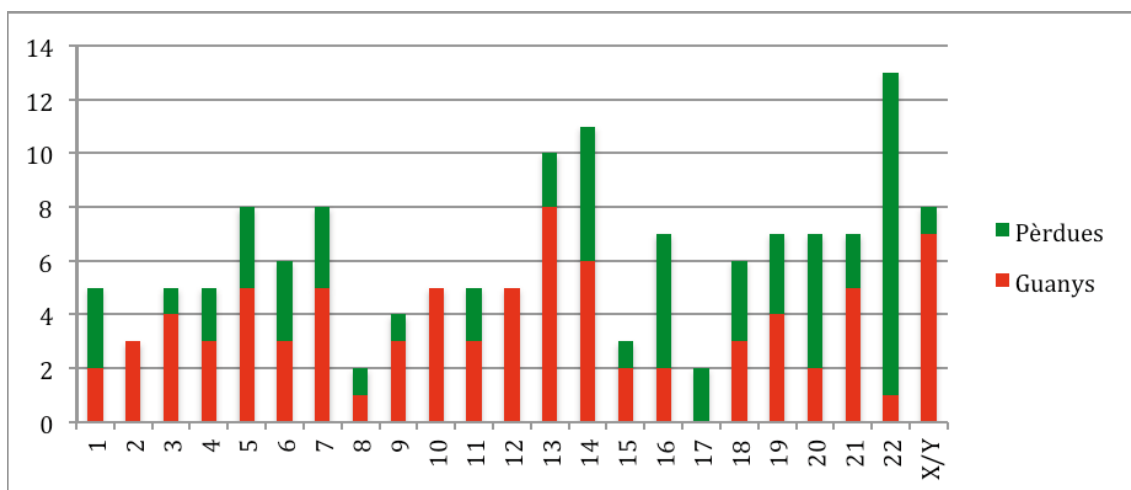


Figura 12. Guanys i pèrdues cromosòmiques detectades en els 85 blastòmers analitzats de 30 embrions criopreservats.

Resultats

Taula 7. Resultats citogenètics de blastòmers d'embrions humans criopreservats.

P	E. BI	Aneuploïdies	Desequilibris segmentals	Classificació de l'embrió
1	1.1	-	-9p,-10pterq23.1	Estructural
	1.2	-	-	
	1.3	-	+9p	
2	1.1	-	-	Estructural
	1.2	-	-18p	
	2.1	-	+14q21q31	Mosaic/ Estructural
	2.2	-	-	
	2.3	+14	+7p14p21	
	2.4	-	+19q	
	2.5	-	-	
3	1.1	-	-	Mosaic
	1.2	-	-	
	1.3	+19	-	
4	1.1	+1,+3,+6,+7,+10,+11,+12,-14,+16, -18,+19,-20,+21,+22,+X	-	Caòtic/ Estructural
	1.2	+X	+16q13q23	
	1.3	-6,-7,+8,-13,-14,+16,-17,-18, -20,+X	-10q23.3qter	
5	1.1	-	+9p,+18q	Estructural
	1.2	-	-	
	1.3	-	-	
	1.4	-	-	
	1.5	-	-	
6	1.1	-13	-	Mosaic
	1.2	+13	-	
7	1.1	-16,-22	+5p14p15.2,+7q31.3q33,+11p	Mosaic/ Estructural
	1.2	-16,-22	-	
	1.3	-16,-20,-22	+3q23q26.2,+9p,+12p,-17p	
8	1.1	+7,+10,+12,+14,-22	-	Caòtic
	1.2	+7,+10,+12,+14,-17,-21	-	
	1.3	-	-	
	2.1	-	-	Euploide
	2.2	-	-	
	3.1	-	-	Estructural
	3.2	-	-3q25.3qter	
9	1.1	-5,-11,-16,+18,-22	+7pcenp21	Mosaic/ Estructural
	1.2	-5,-11,-16,-22	-	
10	1.1	-	-	Mosaic/ Estructural
	1.2	+18,-19	-	

	1.3	-19	+18q	
	1.4	+13,-19,-22	+1p21p31.1,+Xq22.1qter	
11	1.1	-	-	Mosaic/ Estructural
	1.2	-14,-15	+1p21p31.1,+7p14p21,+9q	
12	1.1	-	-	Estructural
	1.2	-	-9q,-11q22.3qter	
	1.3	-	-	
	2.1	-	-	Mosaic
	2.2	+19	-	
	2.3	-22	-	
	2.4	-22	-	
13	1.1	-	-	Caòtic/ Estructural
	1.2	+4,+9,+11,-22	+8q21.3qter	
14	1.1	-	-	Euploide
	1.2	-	-	
15	1.1	+21	-	Mosaic/ Estructural
	1.2	+5	+2p21pter,+6q24qter, +11p11.2p14,+12q14q22	
	2.1	-	+18p,+19q13.1q13.3	Mosaic/ Estructural
	2.2	+13,+14,-21	+2q33qter	
16	1.1	+2,+3,+4,+6,+9,+10,+12,+13, +14,-20,+21,-22,XXXY	-	Caòtic/ Estructural
	1.2	+2,+3,+4,-5,+6,-7, -8,+9,+10,+12,+13, -18,-20,+21,-22,XXXY	+1p31.1pter,-1q	
	1.3	-1	-	
	1.4	-1,+13	+2q21.3q36,+5q14q21, +12q15q21.3,-20q	
	1.5	-3,+5,-6,+7,-9,+11,-14,+18,+21,X0	+2q13q24.1,+10q,+16p	
	2.1	-	+2q35qter,+9p	Estructural
	2.2	-	-4p,-2q35qter,-11q14qter,-12p	
17	1.1	-	-	Euploide
	1.2	-	-	
	1.3	-	-	
	2.1	+1,+2,+7,+14,+19	+5q,-6q,+9q,+10q,+17p,+18q	Caòtic/ Estructural
	2.2	-1,-7,+13,-14,+15,+20	-2p,+3q24q26.3,+4q23q28, -5q23.3qter,+6p,+6qcenq23.3, +8q,-9q,-10q,+11q,+16q,-18q	
	2.3	-	+11q22.2qter,+18q	
18	1.1	-	-1q,+5p,+6p,-6q16.2qter, +9q22.1qter,+16q	Mosaic/ Estructural
	1.2	+5,-6	+3q21q24,+16p	
	1.3	+5	+1q,+6p,-6q21qter,-9q,-16q	
	1.4	+5	-6q16.1qter,+17q	

Resultats

	2.1	-4	+13qcenq14.1,-13q14.1qter	Aneuploide/ Estructural
	2.2	-4	-8q21.3qter,+13qcenq14.1, -13q14.1qter	
19	1.1	-	-	Euploide
	1.2	-	-	
	1.3	-	-	
	1.4	-	-	
20	1.1	-	+5p14pter,+19q	Mosaic/ Estructural
	1.2	+3,+13,+15	+2p,+2q22q35,+7p,+12q14q24.1	
	2.1	-	+6p,+11q14.3qter,+20p	Estructural
	2.2	-	-13q21qter,+18p	
	3.1	-	+17q	Mosaic/ Estructural
	3.2	+20	-2q22q31,-6q16.1q22.1,+18p	

P: Parella, E.BI: Embrió.Blastòmer.

Aquests resultats han estat inclosos a l'article "Does the S-phase have an impact on the accuracy of CGH profiles in single fibroblasts and human blastomeres?" actualment en procés de revisió en una revista indexada al JCR de l'àrea de la Biologia de la Reproducció (veure Annex 1).

4.3 Resultats del diagnòstic genètic preimplantacional per factor masculí i de l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic

A continuació, es mostren els resultats de l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic i de la citogenètica dels embrions dels cicles de FIV-DGP descrits a la Taula 3 de l'apartat 3.2.1.

4.3.1 Resultats de l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic

Els valors de fragmentació global del DNA espermàtic, mesurada amb l'SCDt, i de fragmentació del ssDNA i dsDNA, mesurats amb els assaigs de *Comet* alcalí i neutre, es mostren a la Taula 8. No s'han obtingut resultats pel pacient H, a causa d'una oligozoospermia severa.

S'han definit quatre grups diferents d'acord amb els valors límit de fertilitat prèviament descrits pels assaigs *Comet* alcalí i neutre (ssSDF=52%; dsSDF=77,5%): Grup 1, amb baixa incidència de ssSDF i dsSDF; Grup 2, amb baixa incidència de ssSDF i elevada

incidència de dsSDF; Grup 3, amb elevada incidència de ssSDF i dsSDF; i Grup 4, amb elevada incidència de ssSDF i baixa incidència de dsSDF (Taula 8). Els Grups 1-3 havien estat prèviament descrits, a diferència del Grup 4, que ha estat descrit per primera vegada en el present treball (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b).

Taula 8. Valors d'SDF, ssSDF i dsSDF mesurats amb l'SCDt i els assaigs *Comet* alcalí i neutre, respectivament. Classificació de les parelles en funció dels resultats dels assaigs *Comet*.

Parella	SCDt (%)	<i>Comet</i> Alcalí (%)	<i>Comet</i> Neutre (%)	Grup
A	-	51	52	1
B	39	59	54	4
C	48,25	47	43	1
D	20	13	92	2
E	22	30,4	96,6	2
F	24	53	94,4	3
G	46	68	72	4

4.3.2 Resultats dels cicles de DGP per factor masculí

S'ha analitzat un blastòmer biopsiat de cadascun dels 56 embrions evolutius a l'estadi de 6-8 cèl·lules, obtenint-se resultats informatius en 51 d'ells (91,1%).

Un total de 14 dels 51 blastòmers han mostrat perfils de CGH sobre metafases totalment euploides (27,5%) (Taula 9). Els cromosomes involucrats en esdeveniments aneuploides en qualsevol dels cicles de DGP, que inclouen pràcticament tots els cromosomes del complement, es mostren a la Figura 13.

Setze dels 27 (59,3%) extrems dels desequilibris segmentals observats (Figura 14) es troben propers a subbandes descrites com a llocs fràgils del genoma (Mrasek *et al.*, 2010).

En cinc dels nou cicles de DGP realitzats s'han transferit un o dos embrions cromosòmicament normals, aconseguint l'embaràs i el naixement de nens sans en dos dels cicles (C i D) (Taula 9).

Resultats

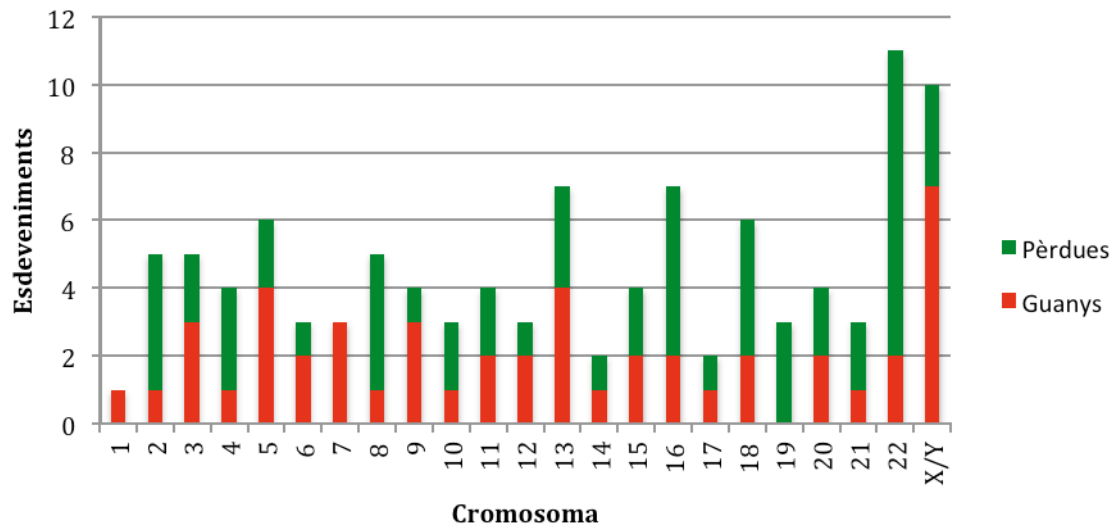


Figura 13. Esdeveniments aneuploides detectats en els nou cicles de DGP.



Figura 14. Desequilibris segmentals observats en els nou cicles de DGP.

Taula 9. Resultats citogenètics obtinguts en cada cicle de DGP.

Cicle	E.BI	Segregació meiótica	Aneuploïdies			Cr. Sexu-als	T/E/C
			Cr. de la reorganització	Altres cromosomes	Error estructural		
A-1	2	2:1 alt		-3,+4,+5,+7,-8,-10,+11,+12,+13,-16,+18,-22,+Y	-17q,+20q	XYY	
	3	2:1 alt		-22	-	XY	
	4	2:1 alt		-22,+Y	-1q,+4q22q27	XYY	
	5	2:1 alt		+2	-	XX	
A-2	1	3:0	+14, +21	-2,-6,-8,-11,-15,+5,+9,+13,+20,+22,+X/Y	-	XXY	
	3	2:1 adj	+14	+9,+22	+5q31.2qter,+13q14.1q21.1	XY	
	5	2:1 alt		-	-	XX	T
B	1	2:1 adj	+14	-	+9q	XX	
	2	2:1 alt		-18	-	XX	
	4	2:1 alt		-	-2q24.3qter	XX	
	6	2:1 adj	+13/-14	-	+20p	XY	
	7	2:1 alt		-15	-	XY	
C	1	No E		-22	-	XY	
	4	No E		-22,+X,+X/Y	-	XXX Y	
	5	No E		-13,-22	-	XX	
	8	No E		-5,-19	-	XY	
	9	No E		-3,-4,-9,-22,-X/Y	-	X	
	10	No E		-	-	XX	T/P
	11	No E		-X/Y	-	X	
	12			ND	ND		
	14	No E		-19,+21	-	XY	
	18			ND	ND		
D	2			-	-	XX	C
	5			+20	-	XX	
	7			-13	-	XX	
	8			+Y	-4q28qter	XYY	
	9			-4	-	XY	
	10			-	+9p11qter	XY	
	11			-	-	XX	T/P
	13			-	-	XX	T/P
	14			-	-	XX	C
E	1			+16,+19	-4q	XY	
	3			-	+18p	XX	

Resultats

	5			-	-	XY	NE
	7			-	-	XY	T
	12			-	-	XY	T
	13			-X	-	X	
	14			-	-	XX	T
	17			ND	ND		
F	1			-	-	XY	C/NE
	2			+18	-	XX	
	4			-	-18p	XX	
	5			-	-	XY	C/NE
	7			-	-7pcenp14, -17p,+18p	XY	
	8			-	-	XX	T
	9			-	-20q	XX	
	10			-	-	XX	T
	11			-18	-	XX	
G	1			C- cont.	C- cont.		
	3			+16	-	XY	
	206			NA	NA		
	207			+16	-	XY	
H	4			+1,-2,+3,- 4,+5,+6,+7, -8,+9,-10,+11,-12,- 13, -14,+15,-16,-17,-18, -20,-21,-22,+X	-	XXX	
	7			-2,+3,-5,+6,-8, - 11,+12,+14,+15,+16 +17,-18,-21,-22	-	XY	
	11			+10,+13	-2q21.3qter,+19q	XX	
	18			-2,+3,+5,+7,+8,+13, +16,-20	-1p21pter/ +1q21.3qter, +12pterq21.3/ -12q23qter, +19q	XY	

E.BI: Embrió.Blastòmer, Cr.: cromosomes, alt: alternant, adj: adjacent, N o E: Normal o Equilibrat, ND: No diagnosticat, NA: No amplificat, C- cont.: Contaminació del control negatiu, T/P/C: Transferència/Embaràs/Criopreservació, NE: No evolutiu.

4.3.2.1 Cicles de DGP per factor masculí a causa de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades

S'ha pogut inferir la segregació meiótica produïda en tots els embrions analitzats de les tres parelles portadores de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades (A, B i C). En els dos casos de translocacions Robertsonianes equilibrades (A i B), la segregació 2:1

alternant ha estat la més freqüentment produïda, present en vuit dels 12 embrions. En el cas de la inversió pericèntrica equilibrada del cromosoma 2 (C) no s'ha identificat cap complement cromosòmic recombinant d'aquest cromosoma, ja que tots els embrions presentaven complements normals o equilibrats (Taula 9).

La incidència d'aneuploïdia detectada en aquests tres cicles de DGP ha estat del 85% (17 de 20 embrions), mentre que la incidència de desequilibris segmentals ha estat del 30% (sis de 20 embrions) (Taula 9 i 10). La taxa d'aneuploïdia ha estat significativament superior en les tres parelles portadores de reorganitzacions cromosòmiques que a la resta de parelles, de cariotip normal ($p < 0,01$, test de Fisher).

Taula 10. Sistema de WGA emprat i taxes d'aneuploïdia i de desequilibris segmentals obtinguts en cada cicle de DGP.

Parella	WGA	Embrions euploides (%)	Embrions aneuploides (%)	Embrions amb anomalies estructurals (%)	Embrions transferits
A	A-1: DOP-PCR	0/4 (0)	4/4 (100)	2/4 (50)	0/4
	A-2: <i>SurePlex</i>	1/3 (33,3)	2/3 (66,7)	1/3 (33,3)	1/3
B	<i>SurePlex</i>	0/5 (0)	4/5 (80)	3/5 (60)	0/5
C	<i>SurePlex</i>	1/8 (12,5)	7/8 (87,5)	0/8 (0)	1/8*
D	DOP-PCR	4/9 (44,4)	4/9 (44,4)	2/9 (22,2)	2/4*
E	DOP-PCR	4/7 (57,1)	2/7 (28,6)	2/7 (28,6)	3/4
F	<i>SurePlex</i>	4/9 (44,4)	2/9 (22,2)	3/9 (33,3)	2/4
G	<i>SurePlex</i>	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2
H	<i>SurePlex</i>	0/4 (0)	4/4 (100)	2/4 (50)	0/4
Total		14/51(27,5)	31/51 (60,8)	15/51 (29,4)	9/51

*Embaràs i naixement de nens sans.

4.3.2.2 Cicles de DGP per factor masculí a causa d'un seminograma anòmal i/o una incidència incrementada d'espermatozoides amb aneuploïdies

En les cinc parelles amb cariotip normal (D-H), s'ha identificat la presència d'aneuploïdies en el 45,2% dels embrions (14 de 31) i de desequilibris segmentals en el 29% dels embrions (nou de 31) (Taula 9 i 10).

Els cicles de DGP amb una incidència incrementada d'aneuploïdia als espermatozoides (E, G, H) no han mostrat diferències significatives pel que fa a la incidència d'aneuploïdia o desequilibris segmentals als embrions, en ser comparats amb els casos D i F.

4.3.2.3 Reanàlisi dels embrions descartats

En 18 dels 29 embrions reanalitzats s'ha confirmat la presència d'anomalies cromosòmiques. Les segregacions meiótiques dels cicles de DGP per reorganitzacions cromosòmiques s'han confirmat en 13 de 15 embrions reanalitzats (86,7%) (Taula 11).

La FISH de tres cromosomes realitzada en un blastòmer de l'embrió H4 ha mostrat una trisomia pel cromosoma 7, una nul·lisomia pel cromosoma 8 i una disomia pel cromosoma 10.

Taula 11. Reanàlisi dels embrions descartats.

Parella-Cicle	E.BI	Segregació meiótica	Aneuploïdies	Error estructural	Cariotip
A-1	2.1	2:1 alt	-3,-8,-10,+11,+12,+13,-15,+18,-X	+1q,+4q,-5p/+5q,+6q12q24,-17p,-20p	45,Y,-3,-8,-10,+11,+12,+13,-15,+18,+1q,+4q,-5p/+5q,+6q12q24,-17p,-20p
	2.2	2:1 alt	-1,+3,-5,+6,+7,+9,-13,+15,+18,+X/Y	-2pterq21.3,+4q,-17q	50,XXY,-1,+3,-5,+6,+7,+9,-13,+15,+18,-2pterq21.3,+4q,-17q
	3.2	2:1 alt	-	-	46,XY
	4	2:1 alt	-1,+2,+5,-7,-8	-	45,XY,-1,+2,+5,-7,-8
	5	2:1 alt	+17	-1q,+16p,+19p	47,XX,+17,-1q,+16p,+19p
B	1	2:1 alt	-	-	46,XX
	2	2:1 alt	-18	-	45,XX,-18
	4	2:1 alt	-	-	46,XX
	6	2:1 alt	-	-	46,XY
	7.1	2:1 alt	-15,+16	+20q	46,XY,-15,+16,+20q
	7.2	2:1 alt	-	-	46,XY
	7.3	2:1 alt	-	-	46,XY
C	1.1	No E	-	-	46,XY
	1.2	No E	-	-	46,XY
	4	No E	-X/Y	+16p,+18p	45,X,+16p,+18p
	5.1	No E	-13	-	45,XX,-13
	8	No E	-5	+16p	45,XY,-5,+16p
	11.1	No E	-X	-Xq13q23	45,X,-Xq13q23
14	No E	-	-	46,XY	
E	1		-	-	46,XY
	3		+X	-	47,XXX
	13		-	-	46,XY
	17		NA	NA	NA
F	2.1		-	-	46,XX
	2.2		-	-	46,XX
	4.1		-	-	46,XX

Resultats

	4.2		-	-	46,XX
	4.3		-	-	46,XX
	7.1		-	-	46,XY
	7.2		-	-	46,XY
	9.1		-	+18p	46,XX,+18p
	9.2		-	-	46,XX
	9.3		-	-	46,XX
	11.1		-	-	46,XX
	11.2		-	+10p13pter	46,XX,+10p13pter
G	1.4		-	-	46,XX
	3.2		+16	-	47,XY,+16
	3.4		+16	-3q24qter	47,XY,+16,-3q24qter
	3.5		+16	-	47,XY,+16
	3.6		+16	-	47,XY,+16
	3.7		+16	-	47,XY,+16
	206.1		NA	NA	NA
	206.2		NA	NA	NA
	207.1		+16	-	47,XY,+16
	207.2		+16	-	47,XY,+16
	207.3		+16	-	47,XY,+16
	207.4		-9,+16	-	46,XY,-9,+16
	207.5		+16	-	47,XY,+16
H	4.1		+1,+3,+5,+6,+7, -8,+9,+11,+15, -18,+19,-22,+X	-	53,XXX,+1,+3,+5,+6,+7, -8,+9,+11,+15,-18,+19, -22
	4.2		+1,+2,-3,-4,+6,-7, -8,-9,-10,+11,+13, +14,+15,+16, -17,+18,+20,-21, -22,-X	+5q,+12q22qter	46,X,+1,+2,-3,-4,+6,-7, -8,-9,-10,+11,+13,+14, +15,+16,-17,+18,+20, -21,-22,+5q,+12q22qter
	7.1		-1,+2,+3,+5,+6,+7, -10,-12,+16,-17, -18,+19,+22	-	49,XX,-1,+2,+3,+5, +6,+7,-10,-12,+16, -17,-18,+19,+22
	7.2		+2,+3,-4,-7,-8,-9, -13,+14,-16,-18, -19,-20,+21,-XX	-	39,+2,+3,-4,-7,-8,-9, -13,+14,-16,-18,-19, -20,+21
	11.1		+2,+10,+13	-	49,XX,+2,+10,+13
	11.2		+10	+2q21.3qter	47,XX,+10,+2q21.3qter
	18.1		+22	-1p,-12q23qter	47,XY,+22,-1p, -12q23qter
	18.2		-	-1p,+12q22qter	46,XY,-1p,+12q22qter

E.BI: Embrió.Blastòmer, alt: alternant, N o E: Normal o Equilibrat, NA: No amplifcat.

4.3.3 Relació entre l'SDF i la citogenètica dels embrions

La fragmentació del DNA espermàtic global (SDF), mesurada amb l'SDCt, ha correlacionat amb taxes elevades d'aneuploïdia en els embrions dels cicles de FIV-DGP ($r=0,93$; $p<0,01$, test de Pearson). La fragmentació del DNA de doble cadena (dsSDF) ha correlacionat amb taxes baixes d'aneuploïdia als embrions ($r=-0,84$; $p<0,05$, test de Pearson). Cap paràmetre dels analitzats ha correlacionat amb la incidència de desequilibris segmentals als embrions.

Aquests resultats han estat recollits a l'article "Sperm DNA fragmentation analysis and comprehensive Preimplantation Genetic Diagnosis for male-factor infertility: preliminary results", que ha estat enviat a una revista de l'àrea de la Biologia de la Reproducció, indexada al JCR (veure Annex 2).

4.4 Posada a punt dels *arrays* de CGH d'oligonucleòtids per l'estudi de cèl·lula única i aplicació a un cas de DGP

4.4.1 Posada a punt de la metodologia i comparació de resultats amb la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH de BACs

El protocol d'*array* de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent per a l'anàlisi de DNA genòmic ha estat validat per a l'anàlisi de cèl·lules aïllades emprant el DNA amplificat de fibroblasts aïllats, i s'ha dut a terme la hibridació en tots els formats disponibles d'*array* d'oligonucleòtids d'Agilent (1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K). El protocol del fabricant per a l'anàlisi de cèl·lula única també ha estat validat amb el DNA amplificat de fibroblasts aïllats, en el format d'*array* de 8x60K. Les anomalies cromosòmiques conegudes de les línies cel·lulars emprades s'han detectat en el 100% de les cèl·lules analitzades (15 de 15).

La reanàlisi de 34 blastòmers prèviament analitzats amb la CGH sobre metafases o *arrays* de CGH de BACs ha donat lloc a perfils equivalents en tots els casos (Taules 12 i 13). La Figura 15 mostra uns perfils totalment coincidents obtinguts amb la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent) d'un dels blastòmers analitzats, tot emprant el mateix producte de DNA amplificat. A la Figura 16, en canvi, es mostra un exemple de perfils parcialment coincidents obtinguts amb la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH de BACs (BlueGnome).

Taula 12. Resultats citogenètics obtinguts en blastòmers individuals mitjançant la CGH sobre metafases (mCGH) i els *arrays* de CGH (aCGH) d'oligonucleòtids a partir d'aliquotes del mateix producte de DNA amplificat.

BL	mCGH			aCGH d'oligonucleòtids			Concordança
	SC	A	S	CS	A	S	
1	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
2	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
3	45,XX	-4	+13qcenq13 -13q13qter	45,XX	-4	+13qcenq13.2 -13q13.2qter	Completa Completa
4	45,XX	-4	-8q22.1qter +13qcenq13 -13q13qter	45,XX	-4	-8q21.2qter +13qcenq13.2 -13q13.2qter	Completa Completa Completa
5	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
6	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
7	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
8	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
9	46,XY	-	-2q35qter -4p -11p14pter -12p	44,XY	-11 -12	-4p -2q35qter	Divergència A/S
10	40,XXX	+1 -2 +3 -4 +5 +6 +7 -8 +9 -10 +11 -12 -13 -14 +15 -16 -17 -18 -20 -21 -22 +X	-	33,XX	-2 -4 -8 -10 -12 -13 -14 -16 -17 -18 -20 -21 -22		Parcial
11	46,XY	-2 +3 -5		39,XY	-2 -5 -8	+6q	Parcial

Resultats

		+6 -8 -11 +12 +14 +15 +16 +17 -18 -21 -22			-11 -18 -21 -22		Divergència A/S
12	48,XX	+10 +13	-2q21.3qter	48,XX	+10 +13	-2q21.3qter -5p15.2pter -18q12.2qter	S addicionals
13	50,XY	-2 +3 +5 +7 +8 +13 +16 -20	-1p21pter +1q21.3qter +12pterq21.3 -12q23qter +19q	41,XY	-2 +5 +7 -14 -15 -17 -20 -21 -22	-1p21.1pter -4q -9q -10q -12q23.1qter -18q	Parcial
14	47,XX	+14	+9q	47,XX	+14	-6p12.3p22.2 +9qcenq33.1	S addicionals
15	45,XX	-18		45,XX	-18	-5p15.1pter	S addicionals
16	46,XX		-2q24.3qter	46,XX		-2q24.1qter -15q21qter	S addicionals
17	46,XY	+13 -14	+20p	42,XY	-14 -15 -16 -17	-8p +13q21qter	Parcial Divergència A/S
18	45,XY	-15		45,XY	-15		Completa

BL: Blastòmer, CS: Cromosomes sexuals, A: Aneuploïdies, S: Desequilibris segmentals.

Taula 13. Resultats citogenètics obtinguts en blastòmers individuals mitjançant els *arrays* de CGH de BACs i els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids a partir d'alíquotes del mateix producte de DNA amplificat.

BL	aCGH de BACs			aCGH d'oligonucleòtids			Concordança
	SC	A	S	SC	A	S	
19	48,XY	+16 +17		48,XY	+16 +17		Completa
20	51,X	+1 -2 +6 +7 +8 -9 +11 +12 +14 +15 +16 +18 -20 -X/Y		49,X	+1 -2 +6 +8 -9 +11 +14 +16 +19 -20 -X/Y	+7pcentp15 +12q -13q14.12q33.3 +15qcentq25.2 -15q25.3qter +18q	Parcial Divergència A/S
21	45,XX	-16 +21 -22		45,XX	-16 +21 -22		Completa
22	47,XX	+15		47,XX	+15		Completa
23	46,XY	-	-6q	46,XY		-6q	Completa
24	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Completa
25	39,XY	-1 +3 -4 -6 -7 -8 -9 -13 -22		39,XY	-1 +3 -4 -6 -7 -8 -9 -13 -22		Completa
26	49,XX	+12 +13 +16		48,XX	+12 +13	+16p	Divergència A/S
27	45,XX	-10		45,XX	-10		Completa
28	49,XY	+1 +2 +3 -8 +10		49,XY	+1 +2 +3 -8 +10	-9q34.1qter	S addicionals

Resultats

29	47,XY	+22		47,XY	+22		Completa
30	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Completa
31	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Completa
32	49,XY	+1		49,XY	+1		Completa
		-2			-2		
		-4			-4		
		+11			+11		
		+13			+13		
		+17			+17		
		+18			+18		
33	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Completa
34	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Completa

BL: Blastòmer, CS: Cromosomes sexuals, A: Aneuploidies, S: Desequilibris segmentals.

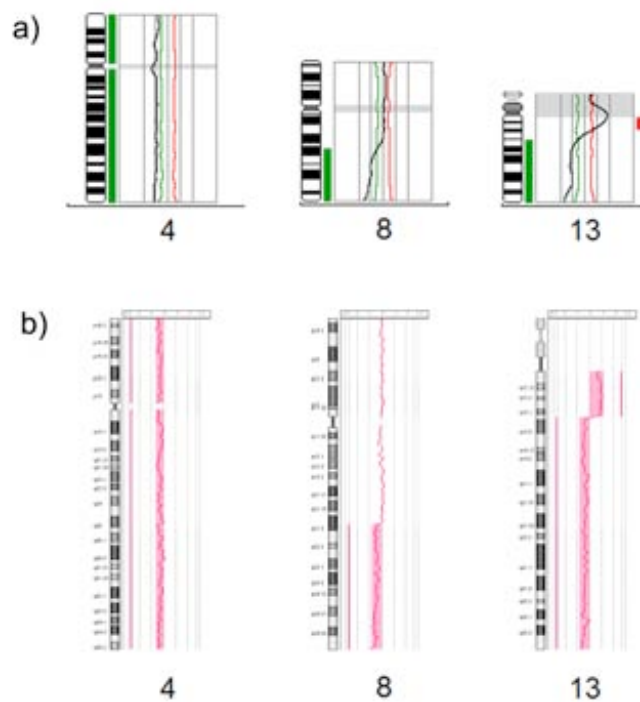


Figura 15. Perfils coincidents dels cromosomes 4, 8 i 13 del Blastòmer 4 (Taula 12) obtinguts amb a) la CGH sobre metafases, i b) l'*array* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent), obtinguts a partir d'aliquotes del mateix producte de DNA amplificat.

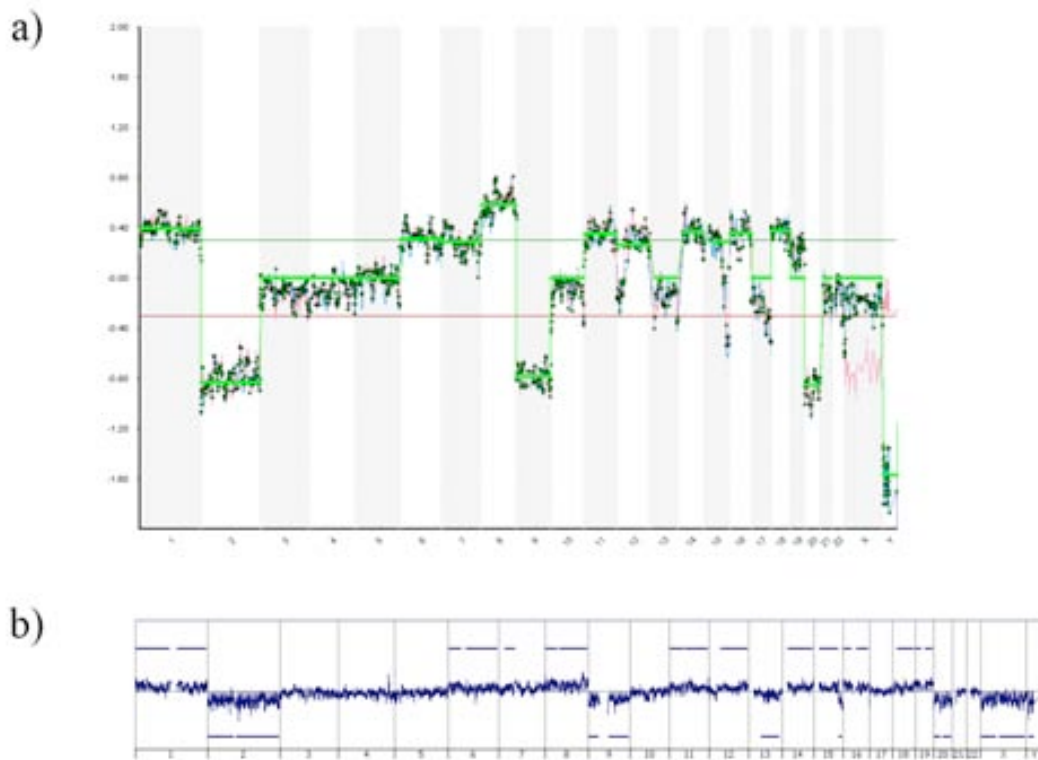


Figura 16. Perfils parcialment coincidents obtinguts pels cromosomes 1-22, X i Y del Blastòmer 20 (Taula 13) amb a) l'*array* de CGH de BACs (BlueGnome) i b) l'*array* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent), obtinguts a partir d'alíquotes del mateix producte de DNA amplificat.

4.4.2 Aplicació dels *arrays* de CGH d'oligonucleòtids a un DGP per un portador equilibrat d'una translocació Robertsoniana

Un blastòmer biopsiat de cadascun dels nou embrions evolutius, en estadi de 6-8 cèl·lules, s'ha analitzat seguint el protocol de l'*array* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent) per cèl·lula única amb el format 8x60K.

La segregació meiótica originada s'ha inferit en tots els embrions analitzats: vuit embrions eren normals o equilibrats pels cromosomes involucrats en la reorganització (segregació 2:1 alternant), mentre que un provenia d'una segregació 2:1 adjacent en la gametogènesi.

S'han detectat aneuploïdies no relacionades amb la reorganització i/o desequilibris segmentals en set dels nou embrions (77,7%) (Taula 14). Dos embrions citogenèticament normals (E7 i E9) han estat transferits a l'úter matern però no s'ha aconseguit l'embaràs desitjat.

La reanàlisi del mateix producte de DNA amplificat mitjançant la CGH sobre metafases i els *arrays* d'oligonucleòtids d'Agilent amb el format 4x180K ha produït perfils

Resultats

concordants amb els prèviament obtinguts en sis dels nou embrions. Sis dels embrions han mostrat perfils 100% coincidents amb les tres metodologies (tenint en compte la resolució de cada mètode), mentre que tres dels embrions han presentat diferents tipus de desequilibris, segmentals o de cromosomes sencers, pels cromosomes afectats, en funció del mètode usat (Taula 14).

La reanàlisi dels embrions descartats amb la CGH sobre metafases ha confirmat la segregació meiòtica de sis dels set embrions (Taula 15). La Figura 17 mostra els perfils divergents de CGH sobre metafases obtinguts per l'E6 a l'aplicació clínica del DGP i en la reanàlisi del blastocist sencer.

Taula 14. Resultats citogenètics obtinguts en el DGP per un portador d'una translocació Robertsoniana equilibrada 45,XY,der(13;14)(q10;q10) tot emprant els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids amb els formats 8x60K i 4x180K i la CGH sobre metafases.

E	Segr.	aCGH d'oligonucleòtids 8x60K			aCGH d'oligonucleòtids 4x180K			mCGH		
		CS	A	S	CS	A	S	CS	A	S
1	2:1 alt	46,XY	-	-4q24qter	46,XY	-	-4q24qter	46,XY	-	-4q25qter
2	2:1 alt	45,XX	-16	-12q	44,XX	-12 -16	-	44,XX	-12 -16	-
3	2:1 alt	46,XY	-	-1q +3q22.1qter +6q22.2qter	46,XY	-	-1q +3q22.1qter +6q22.2qter	46,XY	-	-1q +3q22qter +6q22qter
4	2:1 alt	45,XX	-6	-5q22qter -8q -10q	44,XX	-6 -10	-5q22qter -8q	45,XX	-6	-5q22qter -8q -10q
5	2:1 alt	45,XX	-4	-	45,XX	-4	-	45,XX	-4	-
6	2:1 alt	48,XXY	+22	+2p24.1pter +6q24.1qter +9p21.2pter +12q14.3qter +16q22.2qter +20q13.13qter	48,XXY	+22	+2p24.1pter, +6q24.1qter +9p21.2pter +12q14.3qter +16q22.2qter +20q13.13qter	48,XXY	+22	+2p21pter +6q22.3qter +9p +12q +16q +20q
7	2:1 alt	46,XY	-	-	46,XY	-	-	46,XY	-	-
8	2:1 adj	43,XY	-4 -8 -13	-12q14.3qter	43,XY	-4 -8 -13	-12q14.3qter	44,XY	-4 -13	-8q11q22.1 -12q14.3qter
9	2:1 alt	46,XY	-	-	46,XY	-	-	46,XY	-	-

E: Embrió, Segr.: segregació meiòtica, CS: cromosomes sexuals, A: Aneuploïdies, S: Desequilibris segmentals, alt: alternant, adj: adjacent. Els resultats totalment coincidents entre les tres metodologies es mostren amb un fons gris.

Taula 15. Resultats citogenètics dels embrions descartats del DGP, obtinguts amb la CGH sobre metafases.

Embrió	Segregació	Resultats citogenètics
1	2:1 alt	46,XY
2	2:1 alt	45,XX,-16
3	2:1 alt	46,XY
4	2:1 alt	46,XX,+15q23qter
5	2:1 alt	46,XX
6	2:1 adj	47,XY,+14
8	2:1 adj	46,XY,-13

alt: alternant, adj: adjacent

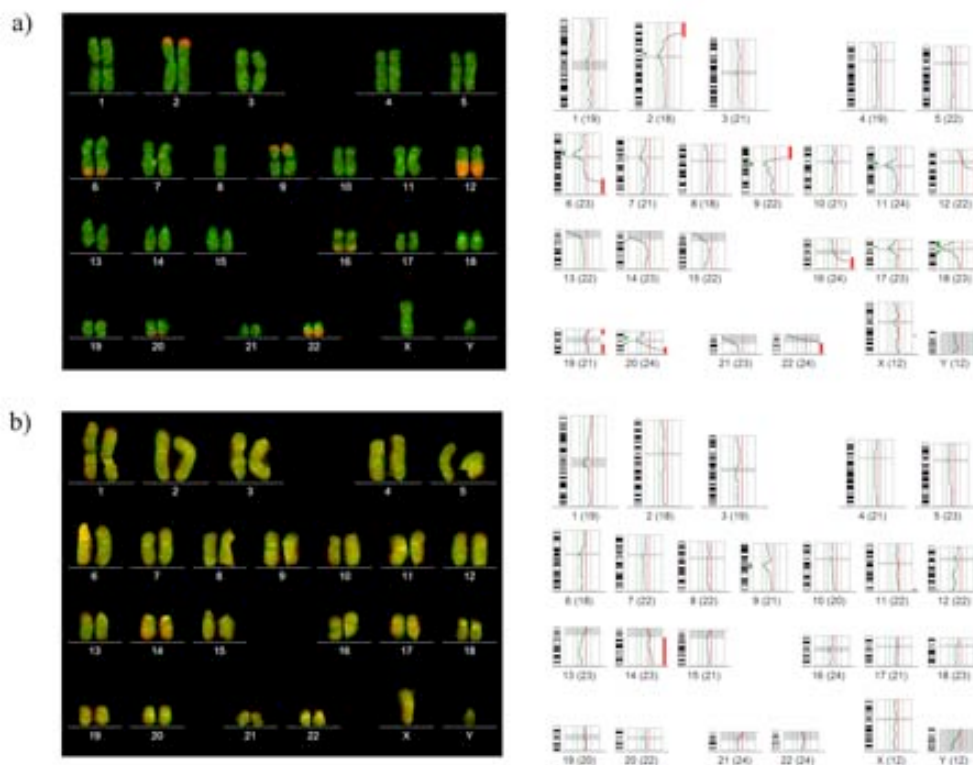


Figura 17. Intensitats d'hibridació i perfils de CGH discordants entre a) un blastòmer de l'E6 analitzat en el DGP i b) el blastocist sencer.

Aquests resultats han estat recollits a l'article “Oligonucleotide array-CGH vs. metaphase CGH and BAC array-CGH for single-cell analysis: Application in a Preimplantation Genetic Diagnosis for a balanced Robertsonian translocation”, que ha estat enviat a una revista de l'àrea de la Biologia de la Reproducció, indexada al JCR (veure Annex 3).

Discussió

5. Discussió

5.1 Efecte de l'estadi replicatiu de la cromatina en el diagnòstic citogenètic de cèl·lula única

5.1.1 Anàlisi del DNA amplificat de fibroblasts mitjançant dos sistemes de WGA

L'aplicació de la citometria de flux per a la separació de fibroblasts d'un cultiu no confluent de la línia cel·lular GM03184 (Coriell), en base a la quantitat de DNA cel·lular, ha permès identificar i separar eficientment fibroblasts en els tres estadis del cicle cel·lular: G0/G1, S i G2/M, tal com s'evidencia a la Figura 3 (apartat 3.1.1.1). En un estudi previ en el qual s'analitzaven limfoblasts individuals en diferents estadis del cicle cel·lular, també es va aplicar amb èxit aquest sistema de separació cel·lular (Van der Aa *et al.*, 2013).

Els sistemes de WGA usats en el present treball han estat: la DOP-PCR, àmpliament descrita com a sistema de WGA previ a la CGH sobre metafases de cèl·lula única (Voullaire *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b; Obradors *et al.*, 2010; Rius *et al.*, 2010; Rius *et al.*, 2011a); i el *SurePlex DNA Amplification System* (BlueGnome), darrerament aplicat a la tecnologia dels *arrays* de CGH (Fiorentino *et al.*, 2011; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2011; Colls *et al.*, 2012; Capalbo *et al.*, 2013; Mertzaniidou *et al.*, 2013a). L'estudi de fibroblasts de la línia cel·lular GM03184 de Coriell, amb una aneuploidia coneguda (guany del cromosoma 15), ha permès fer una valoració comparada d'ambdós sistemes de WGA. Tot i que ambdós sistemes presenten una gran eficiència d'amplificació del DNA cel·lular, el present estudi ha demostrat per primera vegada que el *SurePlex* és més eficient que la DOP-PCR en la detecció d'anomalies cromosòmiques conegudes, ja que ha permès detectar l'anomalia cromosòmica present a la línia cel·lular en una major proporció de cèl·lules (100% vs. 91,1%).

Pel que fa a l'anàlisi de l'efecte de l'estadi de replicació del DNA sobre la incidència d'aneuploidies i desequilibris segmentals en els perfils de CGH sobre metafases, s'ha evidenciat que el sistema de WGA emprat influeix molt significativament en els

resultats obtinguts. En emprar la DOP-PCR s'ha observat un augment significatiu dels desequilibris segmentals en la fase S respecte a la resta d'estadis cel·lulars, mentre que amb l'amplificació per *SurePlex* no s'han observat diferències entre les fases del cicle cel·lular.

Amb la DOP-PCR, els perfils de CGH sobre metafases han mostrat diferències significatives en la incidència de desequilibris segmentals entre la fase S i la resta d'estadis cel·lulars. Així, molts dels desequilibris segmentals observats a la fase S mitjançant aquest sistema de WGA són probablement deguts a la replicació del DNA i, per tant, transitoris. De forma similar, en un estudi previ mitjançant la FISH, es van detectar diferències significatives en la incidència de senyals dobles, considerades diploïdies, i senyals no dobles, considerades aneuploïdies, entre cèl·lules en fase G0 i cèl·lules d'un cultiu proliferant de limfòcits. Aquest estudi va evidenciar l'efecte de l'estadi replicatiu de la cromatina en la generació de falsos positius transitoris, afectant la fiabilitat del diagnòstic citogenètic (Pujol *et al.*, 2004).

En canvi, amb l'amplificació *SurePlex*, els perfils de CGH sobre metafases no han evidenciat desequilibris transitoris deguts a la replicació del DNA. La principal explicació d'aquest diferent comportament entre ambdós sistemes de WGA és atribuïble a les seves diferències metodològiques: la DOP-PCR utilitza uns oligonucleòtids degenerats que hibriden aleatòriament pel genoma, donant lloc a una sèrie d'amplicons de mida molt variable (200-4000 pb), mentre que el *SurePlex* genera uns amplicons més petits i homogenis (200-1500 pb) a causa d'un pas previ de fragmentació del DNA genòmic (Figura 5, apartat 3.1.2.3). Els fragments generats amb el *SurePlex* defineixen regions cromosòmiques menys aleatòries i possiblement menys actives durant la replicació primerenca o tardana de la cromatina, mentre que l'amplificació més aleatòria del genoma mitjançant la DOP-PCR aconsegueix representar en major grau la situació replicativa de la cromatina. Per aquest motiu, el *SurePlex* resulta especialment vàlid per a la seva aplicació en el DGP, ja que minimitza els falsos positius transitoris sense afectar la robustesa del diagnòstic.

En un treball recent, en el qual s'analitza el DNA de limfoblasts aïllats amplificat amb *SurePlex* emprant els *arrays* de CGH de BACs enlloc de la CGH sobre metafases, els autors han detectat els dominis de replicació primerenca i tardana del DNA (Van der Aa et al., 2013). En aquest treball però, s'analitza la intensitat de fluorescència obtinguda BAC per BAC i, després d'introduir unes correccions en els valors obtinguts, se'n comparen els resultats amb els dominis de replicació prèviament descrits per a aquest tipus cel·lular (Ryba et al., 2010). En emprar el *SurePlex* en *arrays* de CGH de BACs, l'exacta localització dels BACs en replicons prèviament descrits fa possible la detecció, tot aplicant les modificacions mencionades, de dominis de replicació primerencs i tardans de la fase S, possibilitant inclús la caracterització de les cèl·lules en funció del seu estadi de replicació inicial o tardà dins la fase S (Van der Aa et al., 2013).

En el present estudi, realitzat amb un cultiu de fibroblasts d'una línia cel·lular comercial (Coriell), la presència d'aneuploidies o desequilibris segmentals en les fases G0/G1 o G2/M, emprant qualsevol dels sistemes de WGA, s'explicaria per l'existència d'una certa inestabilitat cromosòmica deguda a l'estrès proliferatiu del propi cultiu, fenomen que ja ha estat prèviament descrit (Harvey et al., 1993; Iourov et al., 2010; Thompson i Compton, 2010).

Aquest treball també ha permès evidenciar, independentment del tipus de WGA usat (DOP-PCR o *SurePlex*), l'existència de perfils de CGH artefactuals. Aquests artefactes no són atribuïbles ni al WGA ni a la CGH en cèl·lula única, ja que també han estat descrits en la CGH sobre metafases de DNA genòmic no amplificat. Bàsicament, es tracta de guanys o pèrdues dels cromosomes 17, 19, 22 i del segment 1p33pter, a més de desequilibris en regions riques en seqüències repetitives, com les regions heterocromàtiques, centromèriques i telomèriques (Moore et al., 1997; Wells i Delhanty, 2000; Gutierrez-Mateo et al., 2004b). En qualsevol cas, els perfils artefactuals són conseqüentment exclosos de l'anàlisi citogenètica.

5.1.2 Validació del sistema de WGA *SurePlex* en blastòmers humans

Atès que el *SurePlex* minimitza la detecció de desequilibris segmentals causats per la replicació del DNA en els perfils de CGH i és, per tant, un bon sistema de WGA aplicable al DGP, s'ha usat en l'anàlisi de blastòmers humans provinents d'embrions

Discussió

criopreservats cedits a aquest projecte. Així, s'ha emulat el procediment que s'usaria en un DGP a l'estadi de 6-8 cèl·lules, on s'analitzaria un sol blastòmer biopsiat de cada embrió evolutiu.

La classificació dels blastòmers aïllats en l'estadi interfàsic (fase S) o metafàsic (fase M), en funció de la presència o absència de nucli visible, ha resultat un sistema molt vàlid, tal com s'havia demostrat prèviament (Tanaka *et al.*, 2004). En l'estudi de Tanaka *et al.* es biopsiaven els blastòmers immediatament després que el seu nucli deixés de ser visible, ja que a la prometafase l'embolcall nuclear es desorganitza. Posteriorment, es confirmava l'estadi metafàsic dels blastòmers mitjançant la seva fixació en un portaobjectes i l'observació al microscopi, aconseguint identificar els cromosomes de la corresponent placa metafàsica en el 89,5% dels blastòmers fixats.

La major proporció de fallades d'amplificació del DNA cel·lular detectades en el grup de blastòmers metafàsics respecte al grup de blastòmers interfàsics (20,4% vs. 4,5%) s'explica per d'inclusió errònia de blastòmers anucleats o fragments embrionaris en el grup de blastòmers metafàsics. Aquests, però, han estat degudament exclosos de l'estudi en detectar l'absència d'amplificació del DNA cel·lular, observada com a una absència de pinzellada de DNA amplificat en el gel d'agarosa.

Pel que fa a la incidència d'aneuploidies i desequilibris segmentals en l'estudi citogenètic de blastòmers en fase S i fase M amb el seu DNA amplificat amb *SurePlex*, la CGH sobre metafases no ha evidenciat diferències significatives entre ambdues fases. L'estudi citogenètic amb la CGH sobre metafases de blastòmers en fase S i fase M amplificats amb *SurePlex* no ha evidenciat diferències significatives entre ambdues fases pel que fa a la incidència d'aneuploidies i desequilibris segmentals. Aquest resultat, concordant amb els que s'han obtingut en fibroblasts aneuploides de la línia cel·lular de Coriell, reforça l'efecte esmentat del *SurePlex* en la minimització dels falsos positius transitoris lligats a la replicació del DNA. Aquest fet és summament interessant en el DGP, ja que es tracta d'un procediment d'amplificació del DNA cel·lular que freqüentment s'utilitza per a l'anàlisi citogenètica d'embrions tant a l'estadi de 6-8 cèl·lules com a l'estadi de blastocist (Fiorentino *et al.*, 2011; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2011; Daina *et al.*, 2012; Capalbo *et al.*, 2013). Emprant el

SurePlex, els desequilibris segmentals detectats en un DGP corresponen molt probablement a desequilibris estructurals presents a la cèl·lula i no a desequilibris transitoris deguts a la replicació de la cromatina; per tant, aquests desequilibris haurien de ser recollits en l'informe citogenètic corresponent. De fet, en quatre dels embrions s'ha observat que dos o més blastòmers diferents presentaven la mateixa alteració estructural.

5.2 Estudi citogenètic d'embrions humans criopreservats

Els embrions criopreservats i potencialment transferibles emprats en l'estudi de l'apartat anterior, constitueixen un material de gran valor, amb la qual cosa l'avaluació de l'estat citogenètic d'aquests embrions ha estat, per ella mateixa, de gran interès. Això ha estat possible gràcies a la col·laboració dels centres de FIV: Institut Universitari Dexeus, Clínica Sagrada Família i Fundació Puigvert, amb els quals es va tramitar la petició de l'autorització per part de la CNRHA, per a analitzar embrions criopreservats descartats per a finalitats reproductives i donats a aquest projecte.

Fins al moment, quatre estudis d'embrions cedits a la ciència i de bona qualitat s'havien realitzat mitjançant la CGH sobre metafases; en dos dels casos, combinant l'estudi amb la FISH (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Trussler *et al.*, 2004; Daphnis *et al.*, 2008) (Taula 16).

Tan sols el 13,3% dels embrions analitzats en el present estudi eren euploides, mentre que la resta (86,7%), presentaven aneuploïdies i/o desequilibris segmentals en algun dels blastòmers analitzats (2-5 per embrió). Aquesta freqüència és intermèdia entre les taxes d'euploïdia prèviament descrites (Taula 16). Cal tenir en compte, però, que si s'hagués fet l'anàlisi de tots els blastòmers de l'embrió, la taxa d'euploïdia probablement hauria estat menor.

La incidència d'errors meiòtics és, tant en el present treball com en els estudis previs, el mecanisme menys freqüentment implicat en la generació d'anomalies cromosòmiques als embrions (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Trussler *et al.*, 2004; Daphnis *et al.*, 2008). La majoria d'embrions eren mosaics o caòtics, fet també concordant amb la resta de treballs previs publicats (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Trussler *et al.*, 2004; Daphnis *et al.*, 2008) (Taula 16).

Discussió

Els cromosomes més freqüentment involucrats en aneuploïdies han estat el 13, 14 i 22 (Figura 12, apartat 4.2), tots cromosomes acrocèntrics de mida mitjana o petita. Freqüentment, s'ha trobat una major implicació dels cromosomes petits (del 13 en endavant) en les aneuploïdies presents en la gametogènesi (Daina *et al.*, 2013a) i en els embrions provinents de cicles de FIV (Jamieson *et al.*, 1994; Munne *et al.*, 2004; Mertzaniidou *et al.*, 2013b). Aquest fet s'ha explicat per la correlació existent entre la mida dels centròmers, més petits en els cromosomes de menor longitud, i la mida dels cinetocors (Cherry i Johnston, 1987; Martorell *et al.*, 2000). La presència d'uns cinetocors més petits explicaria una menor subjecció cromosòmica al fus meiótic o mitòtic de manera que, durant l'anafase, es generarien segregacions anòmales d'aquests cromosomes amb major freqüència que a la resta.

En la meitat dels embrions s'han detectat aneuploïdies de cromosomes grans, monosomies o aneuploïdies per múltiples cromosomes, fet coherent amb una possible no-implantació d'aquests embrions, ja que no s'han reportat casos de fetus avortats amb aquest tipus d'anomalies (Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000).

En aquest treball, la CGH sobre metafases també ha permès avaluar en profunditat la presència de desequilibris segmentals. El 73,3% dels embrions presentaven desequilibris segmentals en almenys un blastòmer i el 23,3% dels embrions presentaven exclusivament aquest tipus de desequilibris en els blastòmers analitzats. Les taxes de desequilibris segmentals reportades a la bibliografia emprant la CGH sobre metafases són molt variables (del 16,6% al 60%) (Taula 16). Aquesta variabilitat pot ser atribuïble al fet que alguns grups no refereixen la presència exclusiva de desequilibris segmentals com a indicatives d'embrions anòmals (Daphnis *et al.*, 2008). En aquest sentit, la implementació de la tecnologia dels *arrays* de CGH al DGP ha comportat que alguns grups descriguin la presència de desequilibris segmentals, no tan sols en l'estudi d'embrions a 6-8 cèl·lules (Vanneste *et al.*, 2012; Mertzaniidou *et al.*, 2013a; Mertzaniidou *et al.*, 2013b), sinó també en l'estudi citogenètic de l'estadi de blastocist (Johnson *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013).

Taula 16. Estudis d'embrions cedits a la ciència mitjançant la CGH sobre metafases i resultats citogenètics obtinguts.

Autors	WGA	N°E (N°P)	N° BL	Embrions normals (%)	Embrions anòmals			
					Aneuploidies			Desequilibris Segmentals (%)
					Aneuploidia uniforme (%)	Mosaics (%)	Caòtics (%)	
<i>Voullaire et al., 2000</i>	DOP	12 (8)	63	3 (25)	1 (8.3)	7 (58.3)	1 (8.3)	3 ^c (25)
<i>Wells i Delhanty, 2000</i>	DOP	12 (N.I)	64	3 (25)	1 (8.3)	6 (50)	2 (16.7)	2 ^c (16.6)
<i>Trussler et al., 2004</i>	DOP	40 (N.I)	99 ^a , 108 ^b	17 (42.5)	3 (7.5)	15(37.5)	3(7.5)	13 ^c (32.5) 5 ^d (12.5)
<i>Daphnis et al., 2008</i>	DOP	30 (13)	41 ^a , 333 ^b	3 (10)	-	23(76.7)	4(13.3)	18 ^c (60) 2 ^d (6.7)
Present treball	Sure-Plex	30 (20)	85	4 (13.3)	1 (5)	13 (43.3)	5 (16.7)	22 ^c (73.3) 7 ^d (23.3)

E: Embrions; P: Parelles; BL: Blastòmers.

^a Resultats de CGH; ^b Resultats de FISH; ^c Incidència d'embrions amb desequilibris segmentals llistats en taules; ^d Embrions amb desequilibris segmentals exclusivament.

En el present estudi, nou dels 13 embrions (69,2%) amb un blastòmer que presentava exclusivament desequilibris segmentals tenien alguna altra cèl·lula amb anomalies cromosòmiques. D'aquest fet se'n pot extreure que els desequilibris segmentals són indicatius d'aneuploidia a l'embrió en un 69,2% dels casos. La hipotètica transferència d'aquests embrions en un cicle de FIV-DGP tindria un cert risc de fallades d'implantació, avortaments o inclús de derivar en infants amb síndromes viables. Tot i això, diversos treballs han descrit una disminució de la incidència de desequilibris segmentals i aneuploidies a mesura que avança el desenvolupament embrionari (Li *et al.*, 2005; Munne *et al.*, 2005b; Fragouli *et al.*, 2008; Barbash-Hazan *et al.*, 2009; Northrop *et al.*, 2010; Dekel-Naftali *et al.*, 2013), fet sovint explicat per una autocorrecció embrionària (Wolstenholme, 1996; Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Ambartsumyan i Clark, 2008).

En el present treball, el 69% (87/127) dels extrems dels desequilibris segmentals identificats amb la CGH sobre metafases estan propers a subbandes prèviament descrites com a llocs fràgils del genoma (Mrasek *et al.*, 2010). La contínua activitat de proliferació cel·lular en aquesta etapa del desenvolupament embrionari i el conseqüent estrès replicatiu de la cromatina podrien explicar una predisposició a trencaments

Discussió

cromosòmics en llocs fràgils del genoma (Wells i Delhanty, 2000; Daphnis *et al.*, 2008). No obstant això, la resolució de la CGH sobre metafases (10-20 Mb) no permet determinar els punts exactes de trencament cromosòmic. L'ús de metodologies de més resolució, com els *arrays* de CGH, permetria identificar amb exactitud aquests punts de trencament i correlacionar-los amb més certesa amb els llocs fràgils del genoma. De fet, la implementació dels *arrays* de CGH al DGP s'està produint tant emprant els *arrays* de CGH de BACs com els d'oligonucleòtids (Hellani *et al.*, 2008; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011), però la implicació dels llocs fràgils del genoma en els desequilibris segmentals detectats amb aquestes metodologies no ha estat, encara, motiu d'anàlisi.

En el present treball, s'ha observat que els blastòmers aneuploides presenten un increment significatiu en la incidència de desequilibris segmentals. Aquest fet podria indicar que la inestabilitat cromosòmica present en els primers estadis del desenvolupament embrionari (Vanneste *et al.*, 2009) és responsable no tan sols d'errors en els mecanismes de segregació cromosòmica, generant aneuploïdies, sinó també de trencaments cromosòmics fortuïts i errors en la reparació cromosòmica, que causarien desequilibris de segments cromosòmics (Voet *et al.*, 2011a; Voet *et al.*, 2011b).

Els embrions criopreservats en Dia +2 o Dia +3 de desenvolupament estudiats presenten una baixa taxa d'euploïdia, de manera que la seva viabilitat per a fins reproductius pot no ser tant òptima com l'esperada (Laverge *et al.*, 1998; Daphnis *et al.*, 2008). El 46,1% dels embrions anòmals, però, presenten almenys un blastòmer euploide, fet que ha estat considerat un factor positiu pel que fa al desenvolupament de l'embrió. En aquest sentit, s'ha postulat que existeix una autocorrecció de l'embrió amb una selecció a favor de la proliferació de les cèl·lules euploides i en contra de les aneuploides (Wolstenholme, 1996; Voullaire *et al.*, 2000; Wells i Delhanty, 2000; Ambartsumyan i Clark, 2008). Concordant amb aquesta hipòtesi, diversos estudis han evidenciat unes taxes decreixents d'aneuploïdia a mesura que avança el desenvolupament embrionari fins a l'estadi de blastocist (Li *et al.*, 2005; Munne *et al.*, 2005b; Fragouli *et al.*, 2008; Barbash-Hazan *et al.*, 2009; Northrop *et al.*, 2010; Dekel-Naftali *et al.*, 2013).

Per tot això, l'anàlisi dels embrions a l'estadi de blastocist mitjançant una biòpsia de cèl·lules del trofèctoderma, apareix com una alternativa molt favorable per tal d'avaluar

l'estat citogenètic final de l'embrió. Si més no, en cas de detectar exclusivament desequilibris segmentals en embrions en Dia +3, podria recomanar-se la reanàlisi dels corresponents blastocists per confirmar la presència o absència d'alteracions cromosòmiques en aquest estadi.

5.3 El diagnòstic genètic preimplantacional per factor masculí

En el present estudi s'ha realitzat amb èxit l'estudi citogenètic dels embrions de vuit famílies amb infertilitat per factor masculí. Les parelles incloses en aquest treball són totes les que es van interessar a realitzar un DGP per risc citogenètic de factor masculí en els últims quatre anys, en tres centres de referència d'infertilitat masculina.

Les parelles presentaven reorganitzacions cromosòmiques masculines, una freqüència d'espermatozoides aneuploides incrementada respecte a controls i/o seminogrames anòmals, sense evidència d'un factor femení d'infertilitat (Taula 3, apartat 3.2.1). La darrera compilació de DGPs realitzats fins a l'any 2008 de la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), recull un total de 1732 cicles de PGS per factor masculí sever, 855 cicles per translocacions Robertsonianes masculines, 1301 cicles per translocacions recíproques masculines i 11 cicles d'inversions masculines, aquests darrers realitzats al llarg del 2008 (Goossens *et al.*, 2012). Aquesta compilació evidencia que pràcticament tots els casos de PGS realitzats fins a l'any 2008 van ser realitzats mitjançant la FISH per a alguns cromosomes.

L'anàlisi citogenètica dels embrions inclosos en el present treball es va dur a terme mitjançant l'anàlisi, amb la CGH sobre metafases, d'un blastòmer biopsiat de cada embrió evolutiu, obtinguts en un o dos cicles de FIV. Dels nou cicles DGP realitzats, en tres s'ha emprat la DOP-PCR com a sistema de WGA i en els sis restants s'ha usat el *SurePlex*. Ambdós sistemes han resultat molt adequats, ja que han permès obtenir resultats citogenètics satisfactoris en un elevat percentatge d'embrions (95,2% i 88,6%, respectivament). En els dos cicles de FIV-DGP realitzats a la parella A, el primer amb la DOP-PCR i el segon amb el *SurePlex*, l'eficiència diagnòstica obtinguda ha estat molt equivalent tot i la limitació del nombre d'embrions analitzats.

Discussió

En totes les parelles incloses en els FIV-DGP per factor masculí, excepte en una, s'ha caracteritzat el grau de fragmentació del DNA espermàtic global mitjançant l'SCDt i els trencaments de DNA de cadena senzilla (ssSDF) i de cadena doble (dsSDF) mitjançant l'assaig *Comet*. S'ha avaluat el grau de correlació d'aquests paràmetres amb el diagnòstic citogenètic dels embrions i l'èxit d'embaràs de les vuit parelles. Els resultats citogenètics obtinguts en els nou cicles de DGP segons el tipus d'indicació per factor masculí, així com la correlació entre aquests resultats i l'SDF, es discuteixen en els següents apartats.

5.3.1 DGP en casos de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades

S'han realitzat tres casos de DGP per factor masculí a causa de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades: dos homes eren portadors de translocacions Robertsonianes (A i B) i un era portador d'una inversió pericèntrica del cromosoma 2 (C) (Taula 3, apartat 3.2.1). En els dos casos de translocacions Robertsonianes, la segregació meiótica 2:1 alternant, que produeix gàmetes normals o amb complements cromosòmics equilibrats, ha estat la més comuna (vuit de 12 embrions; 66,7%), en coincidència amb el que s'ha trobat en diversos treballs (Alfarawati *et al.*, 2011b; Rius *et al.*, 2011b; Yilmaz *et al.*, 2012). Aquest fet també s'ha observat mitjançant l'estudi de la segregació dels cromosomes implicats en la reorganització en espermatozoides de portadors de translocacions Robertsonianes. En aquests casos, les freqüències de les segregacions 2:1 alternants, 2:1 adjacents i 3:1 detectades són del 60%-96,6%, 2,7%-36,6%, i 0,08%-8,97%, respectivament (Roux *et al.*, 2005). Una explicació d'aquesta distribució apunta a l'existència de punts de control a la meiosi capaços d'eliminar, per apoptosi, les cèl·lules aberrants, fet que causaria una disminució en el nombre de cèl·lules globals que finalitzen l'espermatogènesi i un augment en la proporció de gàmetes normals o equilibrats (Roeder i Bailis, 2000).

En el cas del portador equilibrat de la inversió pericèntrica del cromosoma 2 (C) no s'han observat complements cromosòmics recombinants per aquest cromosoma (+2p/-2q o bé, -2p/+2q), fet que suggereix que la figura meiótica més freqüentment produïda en aquest pacient és aquella en què no hi ha aparellament homòleg de la regió invertida. La curta longitud de la regió invertida (29 Mb) justificaria que siguin les regions no invertides del cromosoma les que, amb major probabilitat, s'aparellin durant

la meiosi (Figura 18b). En un estudi previ usant la FISH sobre espermatozoides d'un pacient portador de la mateixa inversió del cromosoma 2, tampoc es va trobar cap espermatozoide recombinant ($n=5.460$ cèl·lules) (Anton *et al.*, 2006).

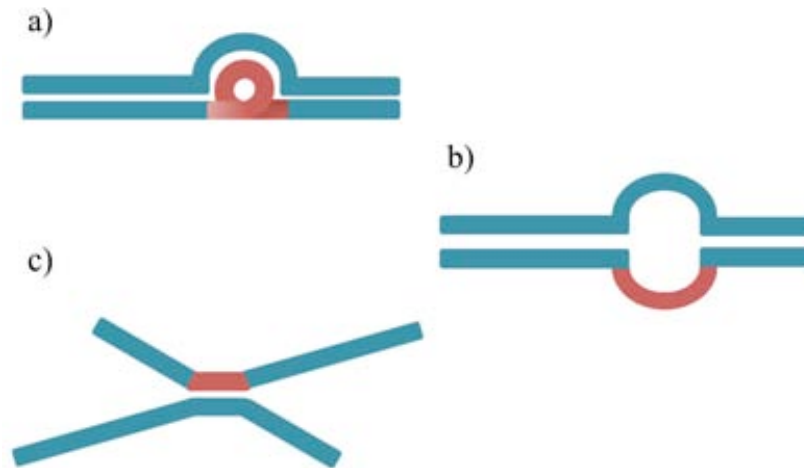


Figura 18. Possibles figures meiòtiques del cromosoma amb una inversió pericèntrica en un portador 46,XY,inv(2)(p11.2q13). a) Aparellament de tota la longitud cromosòmica, b) aparellament de les regions no implicades en la inversió i c) aparellament de la regió implicada en la inversió.

La longitud de la inversió és el factor que determina la proporció de gàmetes recombinants generats, havent-hi un baix risc de generar gàmetes anòmals en inversions <math><100\text{ Mb}</math> (Anton *et al.*, 2006). S'ha apuntat també que les inversions que afecten menys del 30% de la longitud del cromosoma no permeten la formació del llaç necessari per tal que es produeixi recombinació entre la regió invertida i la seva regió homòloga (Figura 18a), de manera que no es podrien formar gàmetes recombinants (Winsor *et al.*, 1978). De totes maneres, tot i que en diversos casos de DGP per homes portadors d'inversions prèviament publicats no s'han detectat complements recombinants del cromosoma implicat en la reorganització (Bernicot *et al.*, 2010; Alfarawati *et al.*, 2011b), en altres treballs s'han detectat figures recombinants amb una incidència inferior a la quarta part dels embrions analitzats (Escudero *et al.*, 2001). El comportament meiòtic esperable en cada cas depèn del cromosoma implicat en la inversió i la mida del segment invertit, així com de les circumstàncies particulars referents als llocs calents de recombinació que pugui contenir. La presència de llocs calents de recombinació va ser evidenciada fa anys, tot analitzant els quiasmes sobre diacinesis masculines (Laurie i Hulten, 1985) i més recentment, visualitzant, per immunodetecció de proteïnes MLH1, els punts de

Discussió

recombinació meiótica sobre els complexos sinaplinemals (Oliver-Bonet *et al.*, 2003; Codina-Pascual *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006).

En el present treball, la incidència d'aneuploidia dels cromosomes no implicats en les reorganitzacions és superior en els embrions produïts per les tres parelles portadores de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades (85%) que en les altres cinc parelles estudiades, de cariotip normal (45,2%). L'edat materna no era de risc en cap dels casos de reorganitzacions cromosòmiques, fet que fa suposar que aquesta major incidència d'aneuploidies és atribuïble a un efecte intercromosòmic (ICE). L'ICE és causat per una interferència de la reorganització cromosòmica en la segregació meiótica de la resta de cromosomes, provocant un increment de l'aneuploidia en els gàmetes (Lejeune, 1963). Aquests resultats són consistents amb els de treballs previs, en els quals s'han trobat taxes incrementades d'aneuploidia en espermatozoides de portadors de translocacions cromosòmiques en relació a les detectades en individus control (Oliver-Bonet *et al.*, 2002; Anton *et al.*, 2010). En embrions d'individus amb reorganitzacions cromosòmiques també s'ha observat aquest ICE, tot comparant les taxes d'aneuploidia detectades amb les descrites en individus de cariotip normal (Gianaroli *et al.*, 2002; Rius *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012).

En el cas del DGP pel portador d'una inversió pericèntrica (C), set dels vuit embrions presentaven aneuploidies (87,5%). La figura meiótica d'aparellament dels cromosomes implicats que suposadament s'ha produït més freqüentment (Figura 18b) estaria contribuint a una segregació meiótica alterada en la resta de bivalents, causant l'ICE anteriorment esmentat. L'ICE en portadors d'inversions sembla ésser un fenomen extremadament dependent del cromosoma afectat (Amiel *et al.*, 2001; Anton *et al.*, 2006). En un treball recentment publicat, en el qual s'analitzava el complement cromosòmic complet de cèl·lules del trofòderma de tres blastocists d'un portador d'una inversió pericèntrica del cromosoma 8, només un d'ells presentava aneuploidia de cromosomes no relatius a la reorganització (Alfarawati *et al.*, 2011b). En dos casos d'inversions masculines amb FISH addicional d'un i cinc cromosomes, la taxa d'aneuploidia tampoc es va veure incrementada en els embrions generats (Escudero *et al.*, 2001), mentre que en un estudi amb FISH del cromosoma 18, a més del cromosoma implicat a la inversió, es va detectar una taxa d'aneuploidia significativament superior a la descrita en parelles de cariotip normal (Bernicot *et al.*, 2010).

Pel que fa a estudis citogenètics en espermatozoides mitjançant la FISH, en un gran nombre de treballs no s'ha trobat cap indicatiu d'ICE en portadors d'inversions (Anton *et al.*, 2006), tot i que en algun cas concret s'ha detectat incidències incrementades d'aneuploïdia respecte a les observades en homes normals (Amiel *et al.*, 2001; Anton *et al.*, 2006). La realització d'estudis sinàptics en biòpsies testiculars i l'ampliació del nombre de casos de DGP per portadors d'inversions amb l'estudi complet del complement cromosòmic dels embrions permetria conèixer, en cada cas, la figura meiótica preferent i establir, si és el cas, una correlació tant amb l'existència de recombinació com amb la presència d'ICE, fet que aportaria un valuós coneixement de tipus bàsic.

L'estudi citogenètic complet ha permès detectar, a més de les segregacions meiótiques i les aneuploïdies dels embrions, la presència de desequilibris segmentals. En els dos casos de portadors de translocacions Robertsonianes equilibrades s'han observat desequilibris segmentals no relacionats amb els cromosomes reorganitzats, fet coincident amb el que s'ha descrit en treballs previs (Alfarawati *et al.*, 2011b; Rius *et al.*, 2011b). No ha estat així en el cas del portador de la inversió. La incidència de desequilibris segmentals detectada en els tres casos amb reorganitzacions cromosòmiques equilibrades no ha estat superior a la que s'ha observat en els cinc casos d'individus amb cariotip normal. Aquest fet, que caldria reconsiderar en un nombre superior d'individus d'ambdós grups, podria indicar que aquests desequilibris es produeixen de forma general, lligats a la inestabilitat cromosòmica de les primeres divisions dels embrions (Wells i Delhanty, 2000; Vanneste *et al.*, 2009), més que no pas com a conseqüència de la presència de reorganitzacions cromosòmiques.

Les alteracions estructurals, que poden ser detectades amb la CGH com a desequilibris segmentals, han estat descrits en estudis de pronuclis masculins emprant el test de fusió d'espermatozoides humans i oòcits de hámster (*Human-Hamster Test*) analitzant ejaculats d'individus control i de portadors equilibrats de reorganitzacions cromosòmiques. Aquestes anomalies estructurals s'observen en un 6,6% dels espermatozoides d'homes amb cariotip normal, incloent trencaments cromosòmics i *gaps*, fragments acèntrics i dicèntrics, cromosomes en anell, delecions, duplicacions, insercions, inversions i cromosomes marcador (Templado *et al.*, 2005). La incidència

d'aquestes anomalies estructurals s'incrementa fins al 12,1% en portadors de reorganitzacions cromosòmiques equilibrades (Estop *et al.*, 1995). Pel que fa als fragments acèntrics, en cas de formar part del pronucli masculí, probablement serien perduts en les subsegüents divisions cel·lulars de l'embrió. Per això, s'esperaria que els desequilibris segmentals observats als embrions fossin segments guanyats o perduts integrats en cromosomes amb centròmer actiu. Aquests desequilibris s'haurien originat probablement com a conseqüència de la inestabilitat cromosòmica de les primeres divisions embrionàries, mecanisme que ja ha estat descrit prèviament (Vanneste *et al.*, 2009). S'ha de contemplar, però, el possible origen d'aquests desequilibris cromosòmics durant l'espermatogènesi, etapa en la qual també hi ha una proliferació mitòtica molt activa, susceptible d'una considerable inestabilitat cromosòmica.

5.3.2 DGP en casos de seminograma anòmal i/o increment d'aneuploidies en espermatozoide

En els cinc casos de DGP per infertilitat de factor masculí en pacients de cariotip normal es va detectar una taxa d'aneuploidia del 45,2%, que és la meitat de la que es va observar en els portadors de reorganitzacions cromosòmiques (85%). Un major nombre de casos estudiats permetria donar un valor estadístic a aquests percentatges.

Els pacients E, G i H (Taula 3, apartat 3.2.1) presentaven una indicació pel DGP deguda a una incidència incrementada de diploidies i disomies pels cromosomes 18, 21 i sexuals als espermatozoides. Tot i això, no s'han evidenciat aneuploidies per a aquests cromosomes en els embrions d'aquest grup de pacients. La limitació en el nombre d'embrions estudiats en aquests tres casos, però, no permet descartar categòricament la correspondència entre una major freqüència d'espermatozoides aneuploides i l'augment d'embrions aneuploides pels cromosomes implicats.

Segons el nostre coneixement, aquesta és la primera vegada que s'ha realitzat un DGP amb estudi cromosòmic complet per un pacient afectat de globozoospermia. Fins al moment, l'única opció terapèutica aplicada havia estat la selecció d'espermatozoides no globozoospermics per l'ICSI (Heindryckx *et al.*, 2005), tot i que s'ha descrit un elevat risc d'aneuploidies en els embrions generats (Moretti *et al.*, 2005). Els quatre embrions de la parella H van presentar aneuploidies, havent-hi un mínim de dos i fins a 22

cromosomes implicats (Taula 9, apartat 4.3.2). En dos dels embrions també es van evidenciar desequilibris segmentals. La reanàlisi dels embrions, una vegada descartats per la seva transferència, va confirmar que tres eren caòtics i un era mosaic. El mecanisme responsable de les aneuploïdies observades és d'origen mitòtic en el cas de l'embrió mosaic, mentre que en els embrions caòtics s'haurien produït tant errors meiótics com mitòtics. L'anàlisi d'un blastòmer d'un embrió caòtic mitjançant la FISH ha demostrat que els diversos desequilibris cromosòmics no són compatibles amb una herència poliploide d'origen patern, possibilitat que ha estat descrita en alguns pacients globozoospermics (Perrin *et al.*, 2013). El fet que l'embrió mosaic, amb exclusivament errors mitòtics, ha mostrat una major incidència de desequilibris segmentals, fa pensar que la presència d'alteracions meiótiques no és un prerrequisit per tal que es produeixi una inestabilitat cromosòmica en les primeres divisions embrionàries.

Prop del 60% dels extrems dels desequilibris segmentals observats en els embrions de les vuit parelles amb infertilitat per factor masculí són propers a punts del genoma prèviament descrits com a llocs fràgils (Mrasek *et al.*, 2010). Aquesta circumstància suggereix que els trencaments cromosòmics podrien haver-se generat com a conseqüència d'un estrès proliferatiu, tal com s'ha trobat en altres estadis d'elevada activitat de divisió cel·lular. Tal és el cas, per exemple, de l'evidència de desequilibris segmentals produïts en l'etapa de proliferació mitòtica de línia germinal femenina, també afectada d'una certa inestabilitat cromosòmica (Daina *et al.*, 2013a).

5.3.3 Fragmentació del DNA espermàtic, citogenètica dels embrions i potencial reproductiu

La fragmentació del DNA espermàtic ha estat caracteritzada amb èxit en tots els pacients inclosos en aquest treball, excepte pel pacient afectat de globozoospermia, ja que presentava una oligozoospermia severa que no va permetre dur a terme l'anàlisi de SCDt ni l'assaig *Comet*.

Els patrons de fragmentació espermàtica del DNA de cadena senzilla (ssSDF) i de cadena doble (dsSDF) de cinc dels pacients (A, C, D, E i F) són similars als perfils prèviament establerts mitjançant l'assaig *Comet* en 15 individus control i 58 individus subfèrtils o infèrtils (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a). En aquest estudi previ, es va determinar que els individus fèrtils presenten tant una fragmentació del DNA

Discussió

espermàtic de cadena senzilla (ssSDF) i doble (dsSDF) baixa, com una ssSDF baixa i una dsSDF elevada. Pacients amb avortaments de repetició i portadors de translocacions, però, també van mostrar una ssSDF baixa i una dsSDF elevada (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a). Els individus amb els pitjors pronòstics reproductius (amb oligoastenoteratozoospermia i astenoteratozoospermia amb i sense varicocele), en canvi, van presentar perfils de ssSDF i dsSDF elevades (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b).

El perfil de ssSDF elevada i dsSDF baixa, observat en els dos pacients (B i G), ha estat descrit per primera vegada en aquest treball. Donada l'elevada ssSDF detectada, s'esperaria un pronòstic reproductiu negatiu d'acord amb el prèviament descrit (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b).

Els individus portadors de reorganitzacions cromosòmiques (A, B i C) han presentat valors elevats d'SCDt i un nivell baix de fragmentació del DNA de cadena doble (dsSDF), essent el grau de fragmentació del DNA de cadena senzilla (ssSDF) variable. Aquests resultats són concordants amb els valors obtinguts en un estudi de fragmentació del DNA d'espermatozoides de portadors de reorganitzacions, en el qual s'evidenciava una gran variabilitat pel que fa als valors d'SCDt, assaig TUNEL i SCSA entre els individus estudiats (Garcia-Peiro *et al.*, 2011).

Diversos estudis han associat l'SDF a un baix èxit dels cicles de FIV per fallades d'implantació (Benchaib *et al.*, 2003; Tesarik *et al.*, 2004; Benchaib *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2013). Aquesta, però, és la primera vegada que es correlaciona l'SDF i el seu èxit reproductiu en cicles de FIV amb la dotació citogenètica completa d'embrions de pacients amb infertilitat per factor masculí.

En el present treball, la fragmentació global del DNA espermàtic (SDF), mesurada amb l'SCDt, ha correlacionat amb una elevada taxa d'aneuploidia en els embrions generats, fet atribuïble a l'ICE present als embrions dels tres portadors de reorganitzacions cromosòmiques inclosos en l'estudi, els quals presentaven una elevada SDF global. Un estudi previ de 154 embrions mitjançant la FISH de 9 cromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y) no va evidenciar cap correlació entre l'SDF mesurada pel mètode TUNEL i la taxa d'aneuploidia dels embrions (Bronet *et al.*, 2012). Pel que fa a l'efecte

de l'SDF en la fertilitat, s'ha proposat que pot tenir un efecte negatiu més tardà a l'embrió, afectant el desenvolupament del blastocist o inclús en etapes posteriors a la implantació a l'úter matern, més que no pas als estadis primerencs del zigot o de l'embrió a 6-8 cèl·lules (Tesarik *et al.*, 2004).

També, la correlació observada en aquest treball entre la fragmentació del DNA espermàtic de doble cadena (dsSDF) i unes baixes taxes d'aneuploidia als embrions generats, és atribuïble a la baixa incidència de dsSDF en els espermatozoides dels tres portadors de reorganitzacions cromosòmiques i a l'ICE detectat en els seus embrions.

No s'ha diagnosticat cap embrió citogenèticament normal i, per tant, transferible en els cicles de DGP realitzats per les parelles B i G (Taula 9, apartat 4.3.2). Aquests casos, tal com s'ha indicat anteriorment, presenten un perfil d'SDF descrit per primera vegada en aquest treball, amb una elevada ssSDF i una baixa dsSDF. En els set embrions analitzats s'han evidenciat tant d'aneuploidies com desequilibris segmentals. Tot i que el present treball recull tots els casos de FIV-DGP per infertilitat masculina en centres de FIV de referència de Barcelona, generats en un període de temps de quatre anys, caldria ampliar el nombre de casos amb resultats d'estudis d'SDF per poder establir una correlació més fiable entre aquest nou tipus de perfil i un increment de les anomalies citogenètiques i, en conseqüència, un mal pronòstic reproductiu.

En aquest treball s'ha aconseguit l'embaràs en dos dels cinc casos de FIV-DGP en els que hi ha hagut transferència embrionària. La parella C, amb una baixa incidència de ssSDF i dsSDF, ha aconseguit l'embaràs dels dos embrions transferits; i la parella D, amb baixa incidència de ssSDF i elevada incidència de dsSDF, ha aconseguit l'embaràs de l'únic embrió transferit. En els dos casos l'embaràs ha arribat a terme i ha tingut lloc el naixement de nens sans. En treballs previs ja esmentats, s'ha postulat que els trencaments de dsDNA a l'espermatozoide són més fàcilment reparables, ja que en homes de fertilitat provada s'han observat tant perfils amb dsSDF baixa com elevada (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). Recentment, s'ha pogut demostrar que aquests trencaments de doble cadena del DNA no estan en cap cas relacionats amb l'estatus reproductiu dels pacients (Ribas-Maynou *et al.*, 2013).

Atès que només s'ha aconseguit l'embaràs en parelles amb els valors de ssSDF més baixos, el present treball és consistent amb el fet que mentre una incidència elevada de dsSDF pot ser reparada per l'òocit i té un bon pronòstic reproductiu, la presència de

ssSDF és més difícilment reparable i és, conseqüentment, un factor limitant per aconseguir l'embaràs. Recentment, s'ha demostrat que l'assaig *Comet* alcalí, que informa de l'existència de ssSDF, és la metodologia que aconsegueix predir el grau d'infertilitat masculina d'una forma més precisa entre l'assaig TUNEL, l'SCSA, l'SCDt i els assaigs *Comet* neutre i alcalí (Ribas-Maynou *et al.*, 2013).

En resum, dels paràmetres d'SDF analitzats en aquest treball, la incidència de ssSDF ha estat el paràmetre amb més valor predictiu de l'èxit reproductiu en cicles de FIV-DGP, amb la qual cosa un baix nivell de ssSDF comportaria un bon pronòstic per aconseguir l'embaràs. Per altra banda, s'ha constatat que una elevada dsSDF no és determinant ni compromet la possibilitat d'aconseguir embaràs i un correcte desenvolupament embrionari. Ha estat postulat que els trencaments de ssDNA als espermatozoides es produeixen de forma extensiva a causa, principalment, de l'estrès oxidatiu, mentre que els trencaments de dsDNA són produïts a causa d'una activitat nucleasa en les regions MAR, unes seqüències situades entre els toroides o unitats de compactació del DNA espermàtic (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). Els trencaments de dsDNA serien molt menys extensius i, per tant, més fàcilment reparables pels mecanismes de l'oòcit (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b).

Pel que fa a la FIV-DGP per factor masculí, en aquest treball, s'ha valorat molt favorablement la caracterització simultània de l'SDF i la citogenètica dels embrions generats. L'establiment del grau de correlació entre l'SDF i l'èxit reproductiu dels embrions citogenèticament normals després d'un DGP complet requereix, òbviament, d'una mostra més àmplia.

5.4 Els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids aplicats al DGP

En aquest treball, s'ha posat a punt amb èxit una metodologia d'*arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent) amb la col·laboració de Qgenòmic i el Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) i s'ha evidenciat que aquesta metodologia és vàlida per a l'anàlisi citogenètic de cèl·lula única, aplicable a diversos camps de la recerca i el diagnòstic clínic.

S'ha aconseguit demostrar que els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent) són altament fiables pel diagnòstic citogenètic de cèl·lula única, tant en fibroblasts aïllats de

línies cel·lulars amb aneuploïdies conegudes, com en blastòmers aïllats d'embrions humans, ja que s'ha observat un elevat grau de concordança amb els resultats citogenètics prèviament obtinguts mitjançant la CGH sobre metafases (apartat 5.4.1.) i amb els *arrays* de CGH de BACs (BlueGnome) (apartat 5.4.2); aquests últims, realitzats a l'Institut Dexeus en cicles de DGP previs.

Finalment, la metodologia desenvolupada d'*arrays* de CGH d'oligonucleotids (Agilent) per cèl·lula única ha estat aplicada amb èxit en un cas de DGP per un portador d'una translocació Robertsoniana (apartat 5.4.3).

5.4.1 Comparació entre els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids i la CGH sobre metafases

En el present treball, s'ha realitzat per primera vegada un estudi comparatiu entre diverses metodologies d'anàlisi citogenètica completa emprant diferents tipologies cel·lulars. L'estudi comparatiu entre la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent) amb DNA amplificat de fibroblasts amb aneuploïdies conegudes ha evidenciat perfils totalment equivalents en el 100% dels casos (15 de 15). En la reanàlisi de blastòmers prèviament analitzats amb la CGH sobre metafases, mitjançant els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids, s'han evidenciat resultats totalment equivalents en vuit dels 18 blastòmers (50%) i s'han obtingut, en la resta de casos, resultats concordants amb certes divergències comentades a continuació:

En tres blastòmers d'embrions diferents (16,7%), tot i presentar desequilibris en els mateixos cromosomes, mentre un dels procediments indicava l'aneuploïdia completa del cromosoma, l'altra indicava guany o pèrdua parcial del mateix cromosoma. En quatre blastòmers d'embrions diferents (22,2%), tot i presentar aneuploïdies extensives mitjançant les dues tècniques diagnòstiques, diferents cromosomes semblaven estar-hi implicats. Aquest tipus de divergències s'expliquen pel fet que cada programa d'anàlisi específic té els seus propis límits fixats per indicar els guanys o les pèrdues cromosòmiques. En aquest sentit, el criteri del citogenetista especialitzat és el que ha de prevaldre a l'hora de valorar els perfils, en base a l'experiència i als criteris interns prèviament establerts. En cap cas, però, un blastòmer diagnosticat com a euploide amb la CGH sobre metafases ha resultat aneuploide amb l'*array* de CGH d'oligonucleòtids o *viceversa*.

Discussió

En quatre blastòmers d'embrions diferents (22,2%) s'han detectat desequilibris segmentals addicionals en emprar els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids. Això és atribuïble a la seva major capacitat de resolució, de l'ordre de les 20 kb. La resolució de 10-20 Mb de la CGH sobre metafases no permet detectar guanys o pèrdues inferiors a aquesta longitud ni permet indicar amb exactitud els punts de trencament cromosòmic implicats en les duplicacions i delecions segmentàries detectades, repte que és assumible amb l'ús dels *arrays* de CGH.

5.4.2 Comparació entre els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids i els *arrays* de CGH de BACs

En la reanàlisi de blastòmers mitjançant els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent), els quals havien estat prèviament analitzats a l'Institut Universitari Dexeus amb els *arrays* de CGH de BACs (24sure V3, BlueGnome), s'han obtingut resultats totalment equivalents en 13 dels 16 blastòmers (81,2%), obtenint-se, en la resta de casos, resultats concordants amb les divergències que es comenten a continuació:

En dos blastòmers d'embrions diferents (12,5%) l'alteració citogenètica detectada per una metodologia era d'un cromosoma sencer mentre que, amb l'altra metodologia, era de tan sols un braç del mateix cromosoma. A més, un blastòmer (6,25%) que presentava una aneuploidia extensiva va mostrar diferents cromosomes afectats amb les dues tècniques emprades. Aquestes diferències s'expliquen per l'establiment de criteris d'anàlisi lleugerament diferents en els programes informàtics d'anàlisi emprats en cadascun dels sistemes.

Un dels blastòmers (6,25%) va mostrar un desequilibri segmental addicional (-9q34.1qter), tan sols detectat amb els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids, probablement a causa del seu major poder de resolució (≈ 20 kb) respecte al dels *arrays* de CGH de BACs (5-10 Mb). El menor desequilibri segmental detectat ha estat precisament aquest desequilibri terminal en el cromosoma 9, d'11 Mpb.

Tant els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids com els *arrays* de CGH de BACs permeten determinar el punt exacte del trencament cromosòmic que genera un desequilibri segmental, fet que possibilita referir-los amb precisió i incloure'ls en l'informe citogenètic, si és el cas. Tal com s'ha mencionat prèviament, no és així en el cas de la CGH sobre metafases. El programa informàtic d'anàlisi de la CGH (Metasystems)

integra sobre cromosomes virtuals les intensitats d'hibridació sobre un mínim de 12 metafases de morfologies cromosòmiques variables, fet que limita enormement la seva capacitat de resolució al nivell de banda i subbanda. Tot i així, en l'anàlisi citogenètica de cèl·lula única, mentre que amb la CGH sobre metafases actualment s'informa dels desequilibris segmentals al límit de la seva resolució (Daphnis *et al.*, 2008; Rius *et al.*, 2011b), en els treballs amb *arrays* de CGH no es detallen desequilibris segmentals propers al límit de resolució de la tècnica (Hellani *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2011). Probablement, encara cal establir criteris universals d'avaluació dels resultats que permetin descartar eficientment els perfils anòmals artefactuals en procediments de tan elevada resolució.

5.4.3 Aplicació dels *arrays* de CGH d'oligonucleòtids en un cas de DGP per un portador equilibrat d'una translocació Robertsoniana

Aquest treball inclou un cas de un FIV-DGP realitzat amb èxit a una parella en la qual l'home era portador de la translocació Robertsoniana equilibrada 45,XY,der(13;14)(q10;q10). Un sol blastòmer biopsiat de cada embrió evolutiu ha estat processat d'acord les indicacions del fabricant, usant el format de 8x60K dels *arrays* de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent. S'ha emprat el DNA amplificat de cada blastòmer amb el sistema *SurePlex*. Posteriorment, l'anàlisi dels resultats s'ha efectuat amb el programa informàtic disponible per a l'anàlisi de les imatges obtingudes a l'*array*, aconseguint així el diagnòstic corresponent a cada embrió.

Mitjançant la reanàlisi del mateix producte de DNA amplificat, s'han validat per primera vegada els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids (Agilent) amb el format de 4x180K per a l'anàlisi de DNA amplificat de cèl·lula única, tot adaptant-ne els volums de marcatge i hibridació. Aquest format, que ha estat optimitzat per l'ús en cèl·lula única per primera vegada en el present treball, permet analitzar les mostres amb una major resolució, fet que podria ser d'interès en reorganitzacions que comportin l'intercanvi de fragments molt petits.

En tots els embrions analitzats s'ha identificat amb èxit la segregació meiótica, essent la 2:1 alternant la més freqüent, fet coincident amb el que s'ha observat en altres casos inclosos en treballs publicats anteriorment (Alfarawati *et al.*, 2011b; Rius *et al.*, 2011b;

Discussió

Yilmaz *et al.*, 2012). No obstant això, la reanàlisi en Dia +5 dels embrions descartats va revelar que un dels embrions, diagnosticat com a 2:1 alternant en el DGP, havia estat, de fet, generat per un gàmeta amb segregació 2:1 adjacent. Aquest resultat, totalment discordant, es pot explicar pel fet que el blastòmer analitzat durant el DGP presentava, diversos segments cromosòmics altament desequilibrats (Figura 17a, apartat 4.4.2). Aquesta situació va impedir que els programes d'anàlisi, tant de l'*array* de CGH d'oligonucleòtids com de la CGH sobre metafases, poguessin determinar el guany del cromosoma 14, indicatiu d'una segregació 2:1 adjacent. L'absència d'aquests grans desequilibris en l'anàlisi del blastocist sencer va permetre la detecció del guany del cromosoma 14 (Figura 17b, apartat 4.4.2).

El DGP amb *arrays* de CGH d'oligonucleòtids ha evidenciat que set dels nou embrions analitzats (77,8%) presentaven aneuploïdies i desequilibris segmentals no relacionats amb els cromosomes reorganitzats. El fet que l'edat materna no fos de risc pel que fa a un increment d'aneuploïdies, fa pensar que l'elevada taxa d'aneuploïdia és atribuïble a l'ICE, d'acord també amb el que s'ha descrit àmpliament en DGPs per translocacions Robertsonianes (Gianaroli *et al.*, 2002; Rius *et al.*, 2011b; Alfarawati *et al.*, 2012).

Pel que fa als desequilibris segmentals observats, 13 dels 15 extrems implicats (86,7%) comporten trencaments cromosòmics en punts del genoma prèviament descrits com a llocs fràgils (Mrasek *et al.*, 2010). Aquesta elevada coincidència fa pensar que la majoria dels trencaments cromosòmics generats durant les primers divisions embrionàries tenen el seu origen en una inestabilitat cromosòmica relativa a les successives divisions cel·lulars d'aquesta etapa (Wells i Delhanty, 2000; Daphnis *et al.*, 2008; Vanneste *et al.*, 2009).

La reanàlisi en Dia +5 dels embrions descartats sencers va revelar que tres dels set embrions descartats per una dotació cromosòmica no equilibrada o la presència d'aneuploïdies en un blastòmer, presentaven una citogenètica euploide. Això s'explicaria pel fet que els desequilibris cromosòmics complementaris entre cèl·lules, per exemple causats per no-disjuncions mitòtiques, es compensen, de forma que no poden ser detectats en l'estudi citogenètic de múltiples cèl·lules. Aquest fet, però, també podria explicar-se per l'existència d'una autocorrecció de les cèl·lules de l'embrió, tal

com s'ha evidenciat en múltiples estudis, en els quals s'ha observat un increment en les taxes d'euploidia a l'estadi de blastocist respecte a estadis més inicials de l'embrió (Barbash-Hazan *et al.*, 2009; Northrop *et al.*, 2010; Dekel-Naftali *et al.*, 2013).

Els dos embrions citogenèticament normals transferits a l'úter matern, desafortunadament no van donar lloc a l'embaràs desitjat. Si bé es tracta d'un sol cas, atès que el pacient presentava un perfil de fragmentació del DNA espermàtic amb elevada incidència de fragmentació del DNA espermàtic de cadena senzilla (ssDNA) i doble (dsDNA), aquest resultat és consistent amb el baix potencial reproductiu d'aquest tipus de pacients (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). Caldria ampliar el nombre de casos de FIV-DGP amb aquest perfil d'SDF per poder establir una correlació més fiable entre l'SDF i l'èxit reproductiu dels embrions produïts.

5.4.4 Metodologies d'anàlisi citogenètica completa i futur del DGP

Actualment és de gran interès, tant per les famílies candidates al DGP com pels propis centres de diagnòstic, poder valorar els avantatges i inconvenients de les diverses tècniques d'anàlisi citogenètic complet disponibles (Handyside, 2013), principalment pel que fa a la seva resolució, el temps requerit per l'estudi i el cost econòmic (Taula 17).

En el present treball no s'han trobat grans divergències entre la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH de BACs i d'oligonucleòtids pel que fa als resultats citogenètics: les tres metodologies han mostrat una gran sensibilitat en la detecció tant d'aneuploidies com de desequilibris segmentals. La major resolució teòrica proporcionada per les metodologies d'*arrays* de CGH pot no sempre aportar un gran avantatge en l'anàlisi de DNA amplificat mitjançant sistemes de WGA ja que, fins al moment, no s'han reportat segments desequilibrats inferiors a 5-10 Mb (Hellani *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011; Traversa *et al.*, 2011).

Tant el protocol de la CGH sobre metafases com el dels *arrays* de CGH (Figura 19) poden ser duts a terme per tècnics instruïts i tenen una durada molt equivalent (entre 7,5 i 9h). El temps d'anàlisi, però, és substancialment més curt en les metodologies d'*arrays* de CGH gràcies a la captura automatitzada de les intensitats de fluorescència i

Discussió

als sistemes d'anàlisi emprats. Així, l'anàlisi d'una mostra amb la CGH sobre metafases pot requerir aproximadament una hora, incloent el rastreig del portaobjectes per localitzar-ne les metafases, la captura de les 12 metafases al microscopi de fluorescència, el seu cariotipat i l'anàlisi dels perfils generats. En canvi, amb els *arrays* de CGH, una vegada capturada i integrada la imatge de tot el portaobjectes (30-40 minuts), l'anàlisi automatitzada de cada mostra es pot dur a terme en pocs minuts (Taula 17).

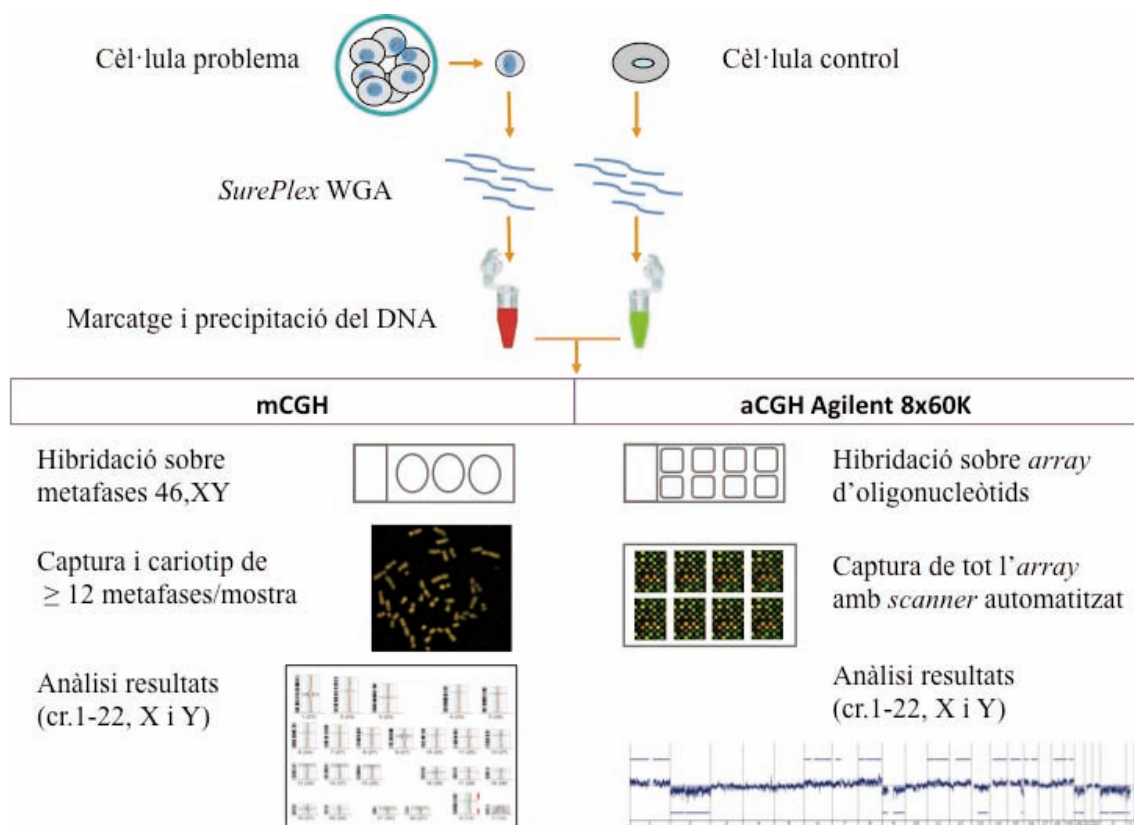


Figura 19. Protocol de la CGH sobre metafases (mCGH) i dels *arrays* de CGH (aCGH) d'oligonucleòtids d'Agilent.

Pel que fa a la generació de perfils cromosòmics artefactuals, en les tres metodologies testades poden aparèixer guanys o pèrdues dels cromosomes 17, 19 i 22 o del segment 1p33pter, tal com s'havia descrit prèviament en la CGH (Moore *et al.*, 1997; Wells i Delhanty, 2000; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2004b). En les tres metodologies es requereix un citogenetista experimentat per a la valoració final dels perfils obtinguts i la corresponent redacció de l'informe de resultats.

El diagnòstic citogenètic pot ser emès el Dia +4 emprant qualsevol de les metodologies descrites, tot permetent la transferència embrionària dins el mateix cicle de FIV i evitant la congelació embrionària (Hellani *et al.*, 2008; Rius *et al.*, 2010; Fiorentino *et al.*, 2011; Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011).

La valoració econòmica de les tres tècniques és també un aspecte important a tenir en compte (Taula 17). Considerant el cost del material requerit tant per l'amplificació del DNA de cèl·lula única com per la metodologia d'hibridació emprada, el cost per mostra en els *arrays* de CGH de BACs és d'unes dues vegades el cost per mostra en la CGH sobre metafases ($\approx 132\text{€}$ vs. 64€), mentre que l'increment de cost és d'unes 7,5 vegades en els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids amb el format de 8x60k ($\approx 480\text{€}$). La simplificació de l'anàlisi i la major resolució obtinguda, però, podrien fer decantar la tria cap a les metodologies d'*arrays* de CGH.

Taula 17. Resolució, durada del procediment i costos de la CGH sobre metafases, els *arrays* d'oligonucleòtids d'Agilent (formats 4x180K i 8x60K) i els *arrays* de CGH de BACs 24 sure (BlueGnome).

	mCGH	aCGH Agilent 8x60K	Agilent aCGH 4x180K	24 sure V3 BAC aCGH
Resolució (Mb)	10-20	≈ 0.02	≈ 0.02	5-10
Cost per mostra (€)	64	480	815	132
Protocol (h)	9	8.5	8.5	7.5
Temps d'hibridació (h)	12	16	16	12
Temps d'anàlisi/mostra (min)*	60	10	10	10

* Anàlisi dut a terme per una sola persona.

Un cop validats els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids pel seu ús en l'anàlisi citogenètica de cèl·lula única i aplicats amb èxit en un DGP, la comparació de tres de les metodologies d'anàlisi citogenètica completa actualment disponibles en el nostre laboratori, ha aportat dades d'interès per al seu ús general en el DGP en un futur immediat.

També, les metodologies com els *arrays* de SNP o la seqüenciació massiva (*massively parallel sequencing*, MPS), que inclouen diferents estratègies que possibiliten l'anàlisi de múltiples seqüències del genoma, es plantegen com a candidates a l'anàlisi genètica de poques cèl·lules d'embrions evolutius. Aquestes tècniques permeten l'anàlisi citogenètica de tot el complement cromosòmic a un nivell de resolució de 7,7kb en els

Discussió

cas dels *arrays* de SNP i d'un sol parell de bases en el cas de la MPS. No obstant això, la implementació al DGP suposa un repte a més llarg termini pel que fa a l'aplicació rutinària. Així com el nombre de casos de DGP realitzats fins al moment mitjançant la CGH sobre metafases i els *arrays* de CGH són molt extensos, tant analitzant els corpuscles polars com blastòmers individuals o cèl·lules del trofotoderma, els *arrays* de SNP i la MPS encara no han estat tan àmpliament aplicats (Taula 18).

Taula 18. Recull de treballs amb casos de DGP emprant les diverses metodologies d'anàlisi citogenètica completa disponibles.

CGH	Wilton <i>et al.</i> , 2001; Voullaire <i>et al.</i> , 2002; Wells <i>et al.</i> , 2002; Wilton <i>et al.</i> , 2003; Obradors <i>et al.</i> , 2008; Obradors <i>et al.</i> , 2009; Fishel <i>et al.</i> , 2010; Fragouli <i>et al.</i> , 2010; Rius <i>et al.</i> , 2010; Schoolcraft <i>et al.</i> , 2010; Alfarawati <i>et al.</i> , 2011a; Alfarawati <i>et al.</i> , 2011b; Rius <i>et al.</i> , 2011a; Rius <i>et al.</i> , 2011b; Daina <i>et al.</i> , 2012
Array de CGH de BACs	Fiorentino <i>et al.</i> , 2011; Gutierrez-Mateo <i>et al.</i> , 2011; Vanneste <i>et al.</i> , 2011; Colls <i>et al.</i> , 2012; Capalbo <i>et al.</i> , 2013
Array de CGH d'oligonucleòtids	Hellani <i>et al.</i> , 2008; Traversa <i>et al.</i> , 2011
Array de SNP	Handyside <i>et al.</i> , 2010; Schoolcraft <i>et al.</i> , 2011; Treff <i>et al.</i> , 2011
MPS	Treff <i>et al.</i> , 2013

Els *arrays* de SNP permeten determinar l'haplotip dels embrions a partir de l'anàlisi de centenars de milers de nucleòtids polimòrfics del genoma permetent, no només la caracterització del nombre de còpies de cada locus analitzat (Treff *et al.*, 2010), sinó també el diagnòstic de malalties d'herència mendeliana (Handyside *et al.*, 2010). Tot i que aquesta metodologia ha estat aplicada amb èxit en el DGP amb cèl·lules del trofotoderma (Handyside *et al.*, 2010; Schoolcraft *et al.*, 2011; Treff *et al.*, 2011), presenta una elevada complexitat d'anàlisi dels resultats i no està mancada de les problemàtiques associades als sistemes de WGA. Així, poden dificultar l'anàlisi dels resultats l'elevada taxa de fallades d'amplificació, la no amplificació d'un dels dos al·lels d'un *locus* concret (*allele drop-out*, ADO) o l'amplificació preferencial d'un dels al·lels d'un *locus* concret (*preferential amplification*, PA) (Iwamoto *et al.*, 2007; Munne, 2012). Cal tenir en compte que per tal d'assignar l'haplotip corresponent a cada embrió es requereix una posada a punt específica per cada parella on es determinin els haplotips paternals, suposant un cost addicional.

La seqüenciació massiva o MPS, darrerament utilitzada en aplicacions clíniques com el diagnòstic prenatal (Dan *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2012), el diagnòstic de mutacions causants de malalties mendelianes (Wei *et al.*, 2011) i la caracterització citogenètica de mostres tumorals (Navin *et al.*, 2011), és una aposta de futur en el DGP que ofereix una gran cobertura del genoma amb avantatges addicionals com un cost assumible (30,3 € per a l'anàlisi d'1 Gb) i la possibilitat d'anàlisi de múltiples mostres en paral·lel (Yin *et al.*, 2013). En un estudi comparatiu entre els *arrays* de SNP i la MPS amb cèl·lules del trofocoderm d'embrions donats per parelles portadores de translocacions recíproques i Robertsonianes, es van requerir entre set i deu dies per dur a terme aquesta anàlisi, amb la qual cosa si s'apliqués a la clínica es requeriria la criopreservació dels embrions (Yin *et al.*, 2013). Recentment, la MPS s'ha aplicat al diagnòstic de malalties monogèniques, obtenint-se resultats concordants amb metodologies de DGP convencionals en menys de 24 hores, però requerint també la criopreservació dels embrions (Treff *et al.*, 2013). Si la transferència embrionària en fresc és un objectiu a assolir, caldrà posar a punt aquesta tècnica en blastòmers individuals d'embrions en Dia +3 de desenvolupament i assolir el diagnòstic en un període de 24-48 hores.

El DGP actualment requereix l'ús de metodologies d'anàlisi del complement cromosòmic complet, essent els *arrays* de CGH la metodologia d'elecció pel que fa a la senzillesa del procediment, la rapidesa de l'anàlisi dels resultats i el seu nivell de resolució. En un futur pròxim, però, el DGP probablement emprará tecnologies encara més resolutives com ara els *arrays* de SNP i la MPS, que actualment requereixen un desenvolupament a l'alçada dels reptes actuals: l'obtenció d'informació d'interès per a cada família a un cost assumible. També, pel que fa a l'estadi de desenvolupament embrionari òptim per a l'anàlisi en el DGP, si les tècniques de cultiu fins a l'estadi de blastocist i la criopreservació dels embrions en aquest estadi resulten adequades, l'anàlisi de cèl·lules del trofocoderm serà probablement l'aproximació òptima a la citogenètica real de l'embrió: es disposarà d'una quantitat de DNA inicial superior, es minimitzarà l'efecte del mosaïcisme tot indicant les aneuploïdies majoritàries de l'embrió i s'evitarà descartar embrions en base a una informació citogenètica que, en fer l'anàlisi en Dia +3, reporta errors potencialment corregibles en estadis més avançats de desenvolupament.

Conclusions

6. Conclusions

1. El sistema d'amplificació del genoma complet de cèl·lules aïllades que s'empra per a la CGH sobre metafases pot afectar la fiabilitat de detecció dels desequilibris segmentals. Mentre la DOP-PCR és capaç d'incloure desequilibris segmentals atribuïbles a la replicació del DNA dels fibroblasts i, per tant, falsos positius transitoris, el *SurePlex* no, fet que comporta un diagnòstic citogenètic més acurat en cèl·lules proliferants.

2. El *SurePlex* resulta òptim per a l'aplicació del PGS amb la CGH sobre metafases, tant pel fet que presenta una major eficiència que la DOP-PCR en la detecció d'aneuploïdies conegudes, com per mostrar una menor interferència del procés replicatiu del DNA cel·lular en el diagnòstic citogenètic.

3. Els embrions criopreservats estudiats, de bona qualitat i potencialment transferibles, presenten una taxa d'aneuploïdia i de desequilibris segmentals molt elevada (>80%), de forma que la seva viabilitat en cicles de FIV pot veure's compromesa.

4. La incidència de desequilibris segmentals és significativament superior en blastòmers que presenten aneuploïdies, fet que suggereix que la inestabilitat cromosòmica dels embrions a 6-8 cèl·lules comporta tant errors en la segregació cromosòmica com trencaments cromosòmics i errors en els mecanismes de control de la reparació del DNA.

5. El diagnòstic citogenètic complet d'embrions obtinguts en cicles de DGP per infertilitat masculina combinat amb la caracterització de la fragmentació del DNA espermàtic de cadena senzilla (ssSDF) resulta una bona estratègia per conèixer el pronòstic reproductiu de la parella i optimitzar-ne les possibilitats d'assolir l'embaràs.

6. S'ha observat una correlació directa entre la fragmentació del DNA espermàtic global i la presència d'aneuploïdies als embrions, i una correlació inversa entre la fragmentació del DNA de cadena doble (dsDNA) i l'aneuploïdia, fet probablement causat per les característiques dels portadors de reorganitzacions inclosos en l'estudi.

Conclusions

7. Així com els trencaments de DNA de cadena senzilla identificats amb l'assaig *Comet* alcalí són indicatius d'un mal pronòstic reproductiu en els cicles de FIV-DGP, la presència d'una elevada fragmentació del DNA de doble cadena (dsSDF) identificada amb l'assaig *Comet* neutre no sembla afectar la viabilitat reproductiva de les parelles, bàsicament a causa de l'activitat de reparació d'aquest tipus de trencaments per part dels oòcits.

8. S'ha evidenciat per primera vegada un possible efecte intercromosòmic (ICE) en els embrions provinents d'una parella amb un home portador d'una inversió pericèntrica del cromosoma 2.

9. S'ha realitzat per primera vegada un cas de DGP mitjançant la CGH sobre metafases per un pacient amb globozoospermia, de manera que s'ha confirmat l'elevada incidència d'aneuploidia tant d'origen meiótic com mitòtic en els embrions. Els desequilibris segmentals detectats no són dependents de la presència d'errors meiótics a l'embrió, sinó de la inestabilitat cromosòmica característica d'aquest estadi.

10. Els *arrays* de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent optimitzats rendeixen resultats citogenètics concordants amb els obtinguts amb la CGH sobre metafases i amb els *arrays* de CGH de BACs en analitzar el mateix producte de DNA amplificat de fibroblasts i blastòmers aïllats.

11. Ambdós formats d'*arrays* de CGH d'oligonucleòtids d'Agilent, 8x60K i 4x180K, amb resolucions teòriques superiors a les 20 kb, són vàlids per a la seva aplicació en el DGP tot seguint un protocol que permet obtenir el diagnòstic citogenètic i la transferència embrionària dins el mateix cicle de FIV i, consegüentment, evitar-ne la criopreservació.

Bibliografia

7. Bibliografia

A

- Agarwal A i Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9:331-345.
- Agarwal A i Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29:817-827.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG i Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011a; 95:520-524.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P i Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011b; 26:1560-1574.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P i Wells D. Embryos of robertsonian translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development. *PLoS Genet* 2012; 8:e1003025.
- Ambartsumyan G i Clark AT. Aneuploidy and early human embryo development. *Hum Mol Genet* 2008; 17:R10-15.
- Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R i Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 2001; 46:245-250.
- Anton E, Blanco J i Vidal F. Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *J Hum Genet* 2010; 55:541-545.
- Anton E, Vidal F i Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med* 2011; 57:268-278.
- Anton E, Vidal F, Egozcue J i Blanco J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006; 85:661-666.

B

- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC i Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21:223-233.
- Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, Amit A i Ben-Yosef D. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril* 2009; 92:890-896.
- Bellver J, Meseguer M, Muriel L, Garcia-Herrero S, Barreto MA, Garda AL, Remohi J, Pellicer A i Garrido N. Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Hum Reprod* 2010; 25:1713-1721.

Bibliografia

- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H i Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18:1023-1028.
- Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B i Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007; 87:93-100.
- Benet J, Oliver-Bonet M, Cifuentes P, Templado C i Navarro J. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:281-290.
- Benn P, Cuckle H i Pergament E. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy: current status and future prospects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42:15-33.
- Bernicot I, Dechanet C, Mace A, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F i Anahory T. Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Hum Reprod* 2010; 25:1818-1823.
- Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, Martin G, Garmendia C i Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 1989; 264:8935-8940.
- Bronet F, Martinez E, Gaytan M, Linan A, Cernuda D, Ariza M, Nogales M, Pacheco A, San Celestino M i Garcia-Velasco JA. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod* 2012; 27:1922-1929.

C

- Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, Ubaldi FM, Rienzi L i Fiorentino F. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013; 28:509-518.
- Cheng J, Vanneste E, Konings P, Voet T, Vermeesch JR i Moreau Y. Single-cell copy number variation detection. *Genome Biol* 2011; 12:R80.
- Cherry LM i Johnston DA. Size variation in kinetochores of human chromosomes. *Hum Genet* 1987; 75:155-158.
- Clouston HJ, Fenwick J, Webb AL, Herbert M, Murdoch A i Wolstenholme J. Detection of mosaic and non-mosaic chromosome abnormalities in 6- to 8-day old human blastocysts. *Hum Genet* 1997; 101:30-36.
- Codina-Pascual M, Kraus J, Speicher MR, Oliver-Bonet M, Murcia V, Sarquella J, Egozcue J, Navarro J i Benet J. Characterization of all human male synaptonemal complexes by subtelomere multiplex-FISH. *Cytogenet Genome Res* 2004; 107:18-21.
- Colls P, Escudero T, Fischer J, Cekleniak NA, Ben-Ozer S, Meyer B, Damien M, Grifo JA, Hershlag A i Munne S. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod Biomed Online* 2012; 24:621-629.
- Corrales I, Catarino S, Ayats J, Arteta D, Altisent C, Parra R i Vidal F. High-throughput molecular diagnosis of von Willebrand disease by next generation sequencing methods. *Haematologica* 2012; 97:1003-1007.

D

- Daina G, Ramos L, Obradors A, Rius M, Martinez-Pasarell O, Polo A, Del Rey J, Obradors J, Benet J i Navarro J. First successful double-factor PGD for Lynch syndrome: monogenic analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Clin Genet* 2012.
- Daina G, Ramos L, Rius M, Obradors A, Del Rey J, Giralt M, Campillo M, Velilla E, Pujol A, Martinez-Pasarell O, et al. Non-meiotic chromosome instability in human immature oocytes. *Eur J Hum Genet* 2013a.
- Daina G, Ramos L, Rius M, Obradors A, Del Rey J, Martinez-Pasarell O, Pujol A, Benet J i Navarro J. Applicability of two double-factor PGD approaches in cleavage-stage embryos: preliminary results. 2013b (Under review).
- Dan S, Chen F, Choy KW, Jiang F, Lin J, Xuan Z, Wang W, Chen S, Li X, Jiang H, et al. Prenatal detection of aneuploidy and imbalanced chromosomal arrangements by massively parallel sequencing. *PLoS One* 2012; 7:e27835.
- Daphnis DD, Fragouli E, Economou K, Jerkovic S, Craft IL, Delhanty JD i Harper JC. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:117-125.
- de Kretser DM. Male infertility. *Lancet* 1997; 349:787-790.
- Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, Meuleman C, Frijns JP, Vermeesch JR i D'Hooghe TM. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2010; 93:364-373.
- Dekel-Naftali M, Aviram-Goldring A, Litmanovitch T, Shamash J, Yonath H, Hourvitz A, Yung Y, Brengauz M, Schiff E i Rienstein S. Chromosomal integrity of human preimplantation embryos at different days post fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2013.
- Derhaag JG, Coonen E, Bras M, Bergers Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen R, Geraedts JP, Evers JL i Dumoulin JC. Chromosomally abnormal cells are not selected for the extra-embryonic compartment of the human preimplantation embryo at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2003; 18:2565-2574.

E

- Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z i Vidal F. Genetic analysis of sperm and implications of severe male infertility--a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl B:S62-65.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F i Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000; 6:93-105.
- Enciso M, Sarasa J, Agarwal A, Fernandez JL i Gosalvez J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009; 18:609-616.
- Escudero T, Lee M, Stevens J, Sandalinas M i Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* 2001; 21:760-766.

Bibliografia

- Estop AM, Marquez C, Munne S, Navarro J, Cieply K, Van Kirk V, Martorell MR, Benet J i Templado C. An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 1995; 56:452-460.
- Evsikov S i Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13:3151-3155.

F

- Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M i De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84:833-842.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36:361-374.
- Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP i Speicher MR. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:e15.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, Ubaldi FM, Iammarrone E, Gordon A i Pantos K. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011; 26:1925-1935.
- Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril* 2010; 93:1006 e1007-1006 e1010.
- Fleming S, Green S i Hall J. Analysis and alleviation of male infertility. *Microsc Microanal* 1995; 35:37-39.
- Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM i Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 351:199-203.
- Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, Gordon A i Wells D. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011; 26:480-490.
- Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, Tormasi S, Gutierrez-Mateo C, Prates R, Schoolcraft WB, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2010; 94:875-887.
- Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB i Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod* 2008; 23:2596-2608.

G

- Garcia-Peiro A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, Gosalvez J i Benet J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* 2011; 34:e546-553.
- Geigl JB, Obenauf AC, Waldispuehl-Geigl J, Hoffmann EM, Auer M, Hormann M, Fischer M, Trajanoski Z, Schenk MA, Baumbusch LO, et al. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:e105.
- Gianaroli L, Magli MC i Ferraretti AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:261-267.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP i Iammarrone E. Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J Endocrinol Invest* 2000; 23:711-716.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP i Munne S. 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* 1999; 72:837-844.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S, Balicchia B, Escudero T i Crippa A. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 2002; 17:3201-3207.
- Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, Baldi M i Ferraretti AP. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta* 2003; 24 Suppl B:S77-83.
- Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, De Rycke M, Moutou C, Pehlivan T, Derks-Smeets IA i Harton G. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod* 2012; 27:1887-1911.
- Gutierrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermudez MG, Sanchez-Garcia JF, Egozcue J, Navarro J i Munne S. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* 2004a; 19:2859-2868.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D i Munne S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011; 95:953-958.
- Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I, Egozcue J, Munne S i Navarro J. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004b; 19:2118-2125.

H

- Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013; 100:595-602.

Bibliografia

- Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA i Griffin DK. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010; 47:651-658.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K i Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344:768-770.
- Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM i Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 327:905-909.
- Handyside AH, Montag M, Magli MC, Repping S, Harper J, Schmutzler A, Vesela K, Gianaroli L i Geraedts J. Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *Eur J Hum Genet* 2012; 20:742-747.
- Harper JC i Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12:67-72.
- Harper JC i Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet* 2012; 131:175-186.
- Harrison RH, Kuo HC, Scriven PN, Handyside AH i Ogilvie CM. Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal mosaicism analysed by sequential multicolour FISH. *Zygote* 2000; 8:217-224.
- Harton GL i Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl* 2012; 14:32-39.
- Harvey M, Sands AT, Weiss RS, Hegi ME, Wiseman RW, Pantazis P, Giovanella BC, Tainsky MA, Bradley A i Donehower LA. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 1993; 8:2457-2467.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA i Jacobs PA. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980; 44:151-178.
- Hassold T, Hall H i Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No. 2:R203-208.
- Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S i Calafat AM. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod* 2007; 22:688-695.
- Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P i Dhont M. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20:2237-2241.
- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J i El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:841-847.
- Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM i Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291:1693-1697.

I

- Iourov IY, Vorsanova SG i Yurov YB. Somatic genome variations in health and disease. *Curr Genomics* 2010; 11:387-396.
- Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Nakano Y, Ukai W, Hashimoto E, Saito T i Kato T. Detection of chromosomal structural alterations in single cells by SNP arrays: a systematic survey of amplification bias and optimized workflow. *PLoS One* 2007; 2:e1306.

J

- Jacobs PA i Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 1995; 33:101-133.
- Jamieson ME, Coutts JR i Connor JM. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9:709-715.
- Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, Filby A, Gemelos G, Hill M, Ryan A, Smotrich D, Rabinowitz M i Murray MJ. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophoctoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod* 2010; 16:944-949.

K

- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA i Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006; 27:450-452.
- Ku PY, Lee RK, Lin SY, Lin MH i Hwu YM. Comparison of the clinical outcomes between fresh blastocyst and vitrified-thawed blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:1353-1356.
- Kuliev A, Cieslak J i Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:193-198.

L

- Lau TK, Chen F, Pan X, Pooh RK, Jiang F, Li Y, Jiang H, Li X, Chen S i Zhang X. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:1370-1374.
- Laurie DA i Hulten MA. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 1985; 49:189-201.
- Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Verschraegen-Spae MR, De Paepe A i Dhont M. Fluorescent in-situ hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing. *Hum Reprod* 1998; 13:425-429.
- Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S, Staessen C, Moreau Y, Fryns JP, Van Steirteghem A, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:e68.
- Lejeune J. Autosomal Disorders. *Pediatrics* 1963; 32:326-337.

Bibliografia

- Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod* 2004; 19:1548-1553.
- Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A i Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril* 2005; 84:1395-1400.
- Liang L, Wang CT, Sun X, Liu L, Li M, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, Haddad G, et al. Identification of chromosomal errors in human preimplantation embryos with oligonucleotide DNA microarray. *PLoS One* 2013; 8:e61838.
- Liu J, Wang W, Sun X, Liu L, Jin H, Li M, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, et al. DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploid and mosaic. *Biol Reprod* 2012; 87:148.

M

- Martorell MR, Benet J, Marquez C, Egozcue J i Navarro J. Correlation between centromere and chromosome length in human male pronuclear chromosomes: ultrastructural analysis. *Zygote* 2000; 8:79-85.
- Meeker JD, Barr DB i Hauser R. Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Hum Reprod* 2008; 23:1932-1940.
- Mertzanidou A, Spits C, Nguyen HT, Van de Velde H i Sermon K. Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development. *Hum Reprod* 2013a; 28:1716-1724.
- Mertzanidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, Vermeesch JR i Sermon K. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013b; 28:256-264.
- Miller E i Therman E. *Human chromosomes*. Springer-Verlag, New York. 4th edn, 2001.
- Moore DH, 2nd, Pallavicini M, Cher ML i Gray JW. A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997; 28:183-190.
- Moretti E, Collodel G, Scapigliati G, Cosci I, Sartini B i Baccetti B. 'Round head' sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2005; 37:297-303.
- Mrasek K, Schoder C, Teichmann AC, Behr K, Franze B, Wilhelm K, Blaurock N, Claussen U, Liehr T i Weise A. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int J Oncol* 2010; 36:929-940.
- Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. *Curr Genomics* 2012; 13:463-470.
- Munne S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Velilla E, Colls P, Oter M, Alikani M i Cohen J. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:81-90.

- Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:628-634.
- Munne S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005a; 84:331-335.
- Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Marquez C, Sable D, Ferraretti AP, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999; 14:2191-2199.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J i Sable D. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:91-97.
- Munne S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J i Rosenwaks Z. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:1191-1199; discussion 1199-1201.
- Munne S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, Garrisi J i Cohen J. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril* 2005b; 84:1328-1334.
- Munne S i Weier HU. Simultaneous enumeration of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y in interphase cells for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 75:263-270.

N

- Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011; 472:90-94.
- Northrop LE, Treff NR, Levy B i Scott RT, Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010; 16:590-600.

O

- Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D, Benet J i Navarro J. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod* 2008; 23:1949-1956.
- Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J i Navarro J. Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2009; 91:933 e931-937.

Bibliografia

- Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutierrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Marquez C, Benet J i Navarro J. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril* 2010; 93:675-679.
- Oliver-Bonet M, Liehr T, Nietzel A, Heller A, Starke H, Claussen U, Codina-Pascual M, Pujol A, Abad C, Egozcue J, et al. Karyotyping of human synaptonemal complexes by cenM-FISH. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:879-883.
- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J i Benet J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:958-963.

P

- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Minguez Y, Gimenez C, Egozcue J, Remohi J i Simon C. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999; 71:1033-1039.
- Perrin A, Coat C, Nguyen MH, Talagas M, Morel F, Amice J i De Braekeleer M. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *Andrologia* 2013; 45:1-9.
- Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I i Devroey P. Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 2004; 19:1570-1574.
- Pujol A, Benet J, Campillo M, Codina-Pascual M, Egozcue J i Navarro J. The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD. *Cytogenet Genome Res* 2004; 105:29-35.
- Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M, Egozcue J i Navarro J. Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:325-336.

R

- Rechitsky S, Verlinsky O i Kuliev A. PGD for cystic fibrosis patients and couples at risk of an additional genetic disorder combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 2013; 26:420-430.
- Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J i Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012a; 27:652-658.
- Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J i Benet J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013.
- Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortes P, Navarro J i Benet J. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012b; 7:e44679.

- Rius M, Daina G, Obradors A, Ramos L, Velilla E, Fernandez S, Martinez-Passarell O, Benet J i Navarro J. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011a; 95:413-416.
- Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marques L, Calderon G, Velilla E, Martinez-Passarell O, Oliver-Bonet M, Benet J, et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010; 25:1824-1835.
- Rius M, Obradors A, Daina G, Ramos L, Pujol A, Martinez-Passarell O, Marques L, Oliver-Bonet M, Benet J i Navarro J. Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011b; 96:134-142.
- Roeder GS i Bailis JM. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 2000; 16:395-403.
- Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC i Bresson JL. Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:291-296.
- Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J i Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16:2084-2092.
- Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J i Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18:182-188.
- Ryba T, Hiratani I, Lu J, Itoh M, Kulik M, Zhang J, Schulz TC, Robins AJ, Dalton S i Gilbert DM. Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res* 2010; 20:761-770.

S

- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG i Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4:31-37.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N i Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66:1061-1067.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J i Munne S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001; 16:1954-1958.
- Saunders RD, Glover DM, Ashburner M, Siden-Kiamos I, Louis C, Monastirioti M, Savakis C i Kafatos F. PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:9027-9037.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG i Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010; 94:1700-1706.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M i Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2009; 92:157-162.

Bibliografia

- Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M i Scott RT, Jr. Live birth outcome with trophoctoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril* 2011; 96:638-640.
- Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC i Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology* 2006; 223:54-60.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H, Garner FC, Aguirre M i Hudson C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 2013; 99:389-392.
- Shi Q i Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 90:219-226.
- Shi Q i Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; 121:655-666.
- Short RV. When a conception fails to become a pregnancy. *Ciba Found Symp* 1978:377-394.
- Simon L, Lutton D, McManus J i Lewis SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011; 95:652-657.
- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D i Lewis SE. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013; 26:68-78.
- Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, DiSepio D i Hughes MR. Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:6181-6185.
- Spandorfer SD, Davis OK, Barmat LI, Chung PH i Rosenwaks Z. Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil Steril* 2004; 81:1265-1269.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I i Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004; 19:2849-2858.
- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L i Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* 1999; 14:2097-2101.
- Sun F, Oliver-Bonet M, Liehr T, Starke H, Turek P, Ko E, Rademaker A i Martin RH. Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2376-2391.

T

- Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Mawatari Y, Tanaka I i Kusunoki H. Preimplantation diagnosis of repeated miscarriage due to chromosomal translocations using metaphase chromosomes of a blastomere biopsied from 4- to 6-cell-stage embryos. *Fertil Steril* 2004; 81:30-34.

- Tempest HG i Griffin DK. The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet Genome Res* 2004; 107:83-94.
- Templado C, Benet J, Genesca A, Navarro J, Caballin MR, Miro R i Egozcue J. Human sperm chromosomes. *Hum Reprod* 1988; 3:133-138.
- Templado C, Bosch M i Benet J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:199-205.
- Teo SH, Tan M, Knight L, Yeo SH i Ng I. Pericentric inversion 9--incidence and clinical significance. *Ann Acad Med Singapore* 1995; 24:302-304.
- Tesarik J, Greco E i Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004; 19:611-615.
- Thompson SL i Compton DA. Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 2010; 188:369-381.
- Traversa MV, Marshall J, McArthur S i Leigh D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. *Reprod Biol* 2011; 11 Suppl 3:51-60.
- Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D i Scott RT, Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 2013; 99:1377-1384 e1376.
- Treff NR, Northrop LE, Kasabwala K, Su J, Levy B i Scott RT, Jr. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. *Fertil Steril* 2011; 95:1606-1612 e1601-1602.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B i Scott RT, Jr. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril* 2010; 94:2017-2021.
- Trussler JL, Pickering SJ i Ogilvie CM. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:701-711.
- Twisk M, Mastenbroek S, Hoek A, Heineman MJ, van der Veen F, Bossuyt PM, Repping S i Korevaar JC. No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy. *Hum Reprod* 2008; 23:2813-2817.

V

- Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, Lissens W, Vandervorst M, Van Ranst H, Liebaers I, et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20:1030-1037.
- Van der Aa N, Cheng J, Mateiu L, Esteki MZ, Kumar P, Dimitriadou E, Vanneste E, Moreau Y, Vermeesch JR i Voet T. Genome-wide copy number profiling of single cells in S-phase reveals DNA-replication domains. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:e66.
- Van Landuyt L, Van de Velde H, De Vos A, Haentjens P, Blockeel C, Tournaye H i Verheyen G. Influence of cell loss after vitrification or slow-freezing on further in vitro development and implantation of human Day 3 embryos. *Hum Reprod* 2013.

Bibliografia

- Vanneste E, Bittman L, Van der Aa N, Voet T i Vermeesch JR. New array approaches to explore single cells genomes. *Front Genet* 2012; 3:44.
- Vanneste E, Melotte C, Voet T, Robberecht C, Debrock S, Pexsters A, Staessen C, Tomassetti C, Legius E, D'Hooghe T, et al. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011; 26:941-949.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009; 15:577-583.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I i Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000; 15:351-365.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, et al. Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183 Suppl 1:S47-49.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, Strom C i Kuliev A. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group. *Fertil Steril* 1996; 66:126-129.
- Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J i Strom CM. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1992; 12:103-110.
- Voet T, Vanneste E, Van der Aa N, Melotte C, Jackmaert S, Vandendael T, Declercq M, Debrock S, Fryns JP, Moreau Y, et al. Breakage-fusion-bridge cycles leading to inv dup del occur in human cleavage stage embryos. *Hum Mutat* 2011a; 32:783-793.
- Voet T, Vanneste E i Vermeesch JR. The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 2011b; 133:160-168.
- Voullaire L, Slater H, Williamson R i Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000; 106:210-217.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T i Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:1035-1041.
- Voullaire L, Wilton L, Slater H i Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1999; 19:846-851.

W

- Wei X, Jin F, Ye Y, Xu C, Qu N, Ju X i Yi X. A novel mutation of IDS gene in a Chinese patient with mucopolysaccharidosis II by next-generation sequencing. *Clin Chim Acta* 2011; 412:2340-2342.
- Wells D i Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:1055-1062.

- Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD i Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002; 78:543-549.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH i Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:1214-1218.
- Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Mareello E, Hill D i Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003; 80:467-468.
- WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th edn. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press. 2010.
- Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD i Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 2009; 24:1221-1228.
- Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R i McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 2003; 80:860-868.
- Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D i Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. *N Engl J Med* 2001; 345:1537-1541.
- Winsor EJ, Palmer CG, Ellis PM, Hunter JL i Ferguson-Smith MA. Meiotic analysis of a pericentric inversion, inv(7) (p22q32), in the father of a child with a duplication-deletion of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20:169-184.
- Wolstenholme J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn* 1996; 16:511-524.

X

- Xanthopoulou L, Ghevaria H, Mantzouratou A, Serhal P, Doshi A i Delhanty JD. Chromosome breakage in human preimplantation embryos from carriers of structural chromosomal abnormalities in relation to fragile sites, maternal age, and poor sperm factors. *Cytogenet Genome Res* 2012; 136:21-29.
- Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE i Ong CN. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 2003; 534:155-163.

Y

- Yilmaz A, Zhang XY, Chung JT, Tan SL, Holzer H i Ao A. Chromosome segregation analysis in human embryos obtained from couples involving male carriers of reciprocal or Robertsonian translocation. *PLoS One* 2012; 7:e46046.
- Yin X, Tan K, Vajta G, Jiang H, Tan Y, Zhang C, Chen F, Chen S, Zhang C, Pan X, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod* 2013; 88:69.

Z

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W i Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89:5847-5851.

Annexos

Annex 1

Article “Does the S-phase have an impact on the accuracy of CGH profiles in single fibroblasts and human blastomeres?”

Title: Does the S-phase have an impact on the accuracy of CGH profiles in single fibroblasts and human blastomeres?

Running title: Cell-cycle effect on CGH profiles

Laia Ramos Masdeu M.D,¹ Javier Del Rey Azpiri PhD,¹ Gemma Daina Noves PhD,¹
Olga Martinez-Passarell PhD,² Mariona Rius Mas PhD,³ Dolores Tuñón Lorente M.D,⁴
Jordi Benet Català PhD,¹ Joaquina Navarro Ferretè PhD^{1*}

1. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.
2. Fundació Puigvert. Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, 08025 Barcelona, Spain.
3. Clínica Sagrada Família, 08022 Barcelona, Spain.
4. Institut Universitari Dexeus, 08028 Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Joaquina Navarro Ferretè

E-mail: Joaquina.Navarro@uab.cat

Phone: +34 93 581 1724

Fax: +34 93 581 1025

Capsule

Depending on the WGA used, the cell-cycle stage influences the accuracy of the CGH from single-cells, as transitory gains and losses related to DNA replication are detected like segmental imbalances.

Abstract

OBJECTIVE: To investigate if there is an association between the single-cells replicative stage and the segmental chromosome imbalances detected by CGH.

DESIGN: Firstly, 135 fibroblasts from cell-line GM03184 (Coriell) at the three cell stages (G0/G1, S and G2/M) were amplified by DOP-PCR or SurePlex, and blindly analysed by CGH. Secondly, 85 human blastomeres at the interphase and the metaphase stages, from 30 donated human cryopreserved embryos, were amplified by SurePlex and analysed by CGH.

SETTING: Academic centre for reproductive medicine.

PATIENTS: None.

INTERVENTIONS: None.

MAIN OUTCOME MEASURE(S): Incidence of aneuploidy and segmental imbalances detected at the different cell stages.

RESULT(S): In DOP-PCR amplifications of fibroblasts, an increased incidence of segmental abnormalities was detected in the S-phase. In SurePlex amplifications of fibroblasts and blastomeres, no differences were detected between the different cell stages. A significantly increased incidence of structural abnormalities was seen in the aneuploid blastomeres. A P-value of <0.05 was chosen to determine if the differences observed were statistically significant.

CONCLUSION(S): The segmental imbalances detected after SurePlex amplification in 73.3% of the cryopreserved embryos analysed are mainly non-transitory. They correspond to segmental imbalances present in the cells due to chromosome instability, rather than to replicative DNA segments.

Financial support: This work was funded by the *Fondo de Investigaciones Sanitarias*, *Instituto Carlos III* (PI 08/0012, PI 11/00625) and *Grup de Suport a la Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107). The first author had a pre-doctoral grant from the *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Key words

Cell cycle, CGH, aneuploidy, segmental imbalances, human cryopreserved embryos.

Introduction

Single-cell genetic analysis is necessary for clinical purposes such as Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD), where cytogenetic or molecular analyses are mostly performed on cleavage-stage embryos after the biopsy of one or two cells (1). Preimplantation Genetic Screening (PGS) may be recommended in couples with advanced maternal age, balanced chromosomal abnormalities, repetitive implantation failure, recurrent miscarriage or even male factor infertility, and techniques such as FISH, CGH or, more recently, array-based techniques can be used for embryo cytogenetic diagnosis (2-8).

Analysis of the whole chromosomal complement of embryonic single cells with DNA arrays has demonstrated the presence of mosaicism for chromosomal aneuploidies and uniparental disomies, but also deletions and duplications of DNA segments, and reciprocal amplifications in sister blastomeres, explained by high chromosome instability (9). Partial chromosome gains, partial losses and partial mitotic non-disjunctions have been explained by breakpoints in chromosomal fragile sites under certain culture conditions (10,11). Segmental chromosome imbalances, defined as partial chromosome gains and losses, have been previously observed in Day 3 or Day 4 embryos (8-15) and at the blastocyst stage (16,17), involving a large variety of sizes and locations.

Early blastomeres basically go through two cellular stages: interphase and mitosis, with the typical G1 and G2 cell-cycle checkpoints not being active (18). Interphase, or S phase, where DNA replication occurs, is an approximately 11 to 16 hour process and in mitosis, or M phase, blastomeres divide during a process of approximately one hour of duration. When analysing a single blastomere for a PGD application, the cellular stage of the cell may possibly play a role in the cytogenetic embryo diagnosis. Considering

that each chromosomal region has its specific moment of replication (initial or late during the S phase) depending on how progressed the DNA replication of a cell is, DNA doses for each chromosomal *locus* may be different, varying from two (non-replicated *loci*) to four copies (*loci* replicated in both chromosomes). In the M phase, as all of the genome is already replicated, all *loci* are expected to have four copies. In the analysis of a few trophectoderm cells at the blastocyst stage, this DNA replication effect would not be detected by cytogenetic analysis techniques due to an expected compensatory effect among the analysed cells.

In a previous study with FISH, it was revealed that the replicative state of cells could lead to misinterpretation, detecting chromosomal aberrations when, in fact, the locus analysed could be located in regions with different replicative stages (19). DNA replication can lead to a wrong diagnosis in 7% of proliferating cells, as was described in the previous work. This kind of interpretation error may possibly increase when the cytogenetic analysis of embryos is performed with higher resolution techniques such as CGH and DNA arrays. A recent work has demonstrated that it is possible to detect the DNA-replication domains in S-phase single lymphoblastoid cells using CGH arrays (aCGH) (20). Therefore, it is interesting to analyse if the cell-cycle stage and the whole genome amplification (WGA) system used for CGH may have some effect on the cytogenetic results.

The aim of this work is, after evaluating the efficiency of two available WGA systems, to focus on the cytogenetics of the different replicative cell-stages, in order to determine whether there is evidence that DNA replication affects the cytogenetic diagnosis. Two different types of cells are analysed: human fibroblasts as a cell model and isolated human blastomeres from donated cryopreserved embryos. Cell sorting is performed to separate fibroblasts into G0/G1 phases, the S phase and G2/M phases. The interphase

human blastomeres are characterised with the visualisation of its nucleus under the microscope, while the metaphase ones are identified due to the absence of their nuclear envelope.

Materials and methods

Comprehensive chromosome analysis from isolated fibroblasts

Cell culture, cell sorting and single-cell isolation

Fibroblasts 47,XY,+15 from cell-line GM03184 (Coriell, New Jersey) were grown to a non-confluent state. The culture was treated with trypsin and cells were recovered in 0.5 mL of phosphate-buffered saline solution (PBS). 0.5 mL of cold pure ethanol was added and after 20 min at 4°C, the tube was centrifuged 7 min at 1,000 rpm. Staining of cellular DNA was performed by the addition of 0.5 mL of propidium iodide 50 µg/mL (Sigma, St. Louis, Missouri) and RNase 120 µg/mL (Sigma). Cell sorting was carried out in a BD FACS Aria II in the FACS Facility of the *Hospital Universitari Germans Trias i Pujol*. Cells were separated according to their DNA content: 2n (G0/G1 phases), 4n (G2/M phases) or intermediate states (S phase) and were collected in three different Eppendorf tubes containing sterile PBS/0.1% polyvinyl alcohol (PBS/0.1%PVA). A drop of each cell suspension was placed onto a plate under a stereoscopic microscope Leica Wild M8 (Leica Geosystems, Heerbrugg, Switzerland), and single fibroblasts were isolated using a 170-µm denuding pipette (Cook Ireland Ltd, Limerick, Ireland). Individual cells were kept in properly coded 0.2-mL PCR tubes and stored at -80°C. Two different procedures of lysis and WGA were followed:

Enzymatic cell lysis and DOP-PCR DNA amplification

Single cells were lysed and its DNA was amplified by DOP-PCR as previously described (21). A total of 30 isolated fibroblasts of each group: G0/G1 phases, S phase and G2/M phases, were amplified following the protocol described.

Cell lysis and SurePlex DNA amplification

Single-cell DNA was amplified using the SurePlex DNA Amplification System (BlueGnome, Cambridge, UK), which already contains a lysis step, according to the manufacturer's instructions. A total of 15 isolated fibroblasts of each group: G0/G1 phases, S phase and G2/M phases, were amplified following the protocol described.

Comparative Genome Hybridisation (CGH)

Electrophoresis on a 1.5% agarose gel was used to evaluate the correct DNA amplification of each sample: DOP-PCR gave smears between 200bp and 4000bp, and SurePlex, between 200bp and 1500bp (Supplemental Figure 1). Reference DNA of 46,XY lymphocytes from cell-line GM07381 (Coriell) was obtained by enzymatic lysis and DOP-PCR or SurePlex amplification. Labelling and precipitation of the DNAs, and CGH protocol was performed as previously described (22). CGH analysis was performed capturing 12 metaphases per sample with a Nikon 90i epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Evaluation of the hybridisation was made using the Isis CGH software (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

Interpretation criteria

The ratio between red and green fluorescence is 1:1 when there is the same proportion of DNA reference and DNA test, giving a euploid CGH profile. To diagnose chromosome imbalances (losses and gains), the thresholds used in DOP-PCR amplifications were determined with the standard deviation of the red:green fluorescence ratio, while in SurePlex, thresholds were fixed at 0.8 and 1.2, respectively.

Chromosome 17, 19 and 22 aneuploidies have been considered as being technical artifacts when all three chromosomes were simultaneously gained or lost in the same cell; otherwise, they were considered as being real aneuploidies (11,21-23). Deviation of 1p33pter was also considered to be artifactual, as it had been previously described (11,21,23).

Comprehensive chromosome analysis from isolated human blastomeres

Authorisation from the *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida* (CNRHA) in Spain was specifically obtained to process cryopreserved embryos from families that discarded to use them for reproductive purposes. The Institutional Review Boards from all the centres involved approved the present study. All the families that participated in this study signed an authorised informed consent to donate their IVF cryopreserved embryos to this project. The families were from three IVF laboratories in Barcelona, Spain: *Fundació Puigvert*, *Clínica Sagrada Família* and *Institut Dexeus* and had been included in ART programs due to different indications: male factor (6), oocyte donation for low follicle count or ovarian failure (5), male factor and advanced maternal age (3), advanced maternal age (2), disovulation (1), recurrent miscarriage (1), tubal factor (1), and idiopathic sterility (1). They followed ICSI except for one case, which followed IVF insemination. Thirty embryos from 20 different couples (maternal age between 20 and 40 years, average of 33.6 years) were included in this study. All of them were potentially transferable embryos with quality parameters from 1-3 over 4, being “1” the best embryonic quality and “4” the poorest. Embryos were cultured until Day 2 or Day 3 after fertilisation in G-1TM media (Vitrolife, Göteborg, Sweden) and they were frozen following standard procedures: in half of the couples by slow programmable freezing, and by vitrification in the remaining couples. They were thawed at the respective IVF centres and kept in G-2TM media (Vitrolife) for morphological

assessment. Only embryos with a blastomere survival rate $\geq 70\%$ were used. A total of 85 blastomeres (two to five blastomeres per embryo) were analysed.

The *zona pellucida* of the embryos was removed with Tyrode's acid (Sigma). Each blastomere was separated using a 170- μm denuding pipette (Cook Ireland Ltd) and blastomeres that remained together were isolated with pronase (3mg/mL) (Roche, Basel, Switzerland). Blastomeres were washed in PBS/0.1%PVA and kept on a plate in 20- μL drops of the same buffer. They were observed with an Olympus IX70 inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) in order to determine whether they contained a visible nucleus (blastomeres at the interphase stage) or not (blastomeres at the metaphase stage) (Figure 1). Immediately afterwards, and re-assessing the presence or absence of the nucleus under the stereoscopic microscope (Leica Wild M8), each blastomere was put into properly coded 0.2-mL PCR tubes and stored at -80°C . Only embryos containing blastomeres at the interphase and metaphase stages were selected for the CGH analysis, rejecting those embryos having interphase cells exclusively. Forty-two blastomeres at the interphase stage and 43 blastomeres at the metaphase stage have been included in this work.

Cell lysis and DNA amplification was performed with SurePlex DNA Amplification System (BlueGnome) following the manufacturer's instructions. Reference DNA was obtained from 47,XXY amniocytes in order to detect X-trisomy dotation which, using an XY reference, would not be clearly detected. CGH procedure, results analysis and interpretation criteria were the same as those followed in the fibroblasts study.

Results

Comprehensive chromosome analysis from isolated fibroblasts

The two WGA approaches tested were highly reliable for the comprehensive chromosome analysis performed, but the detection of the cell-line alteration (gained chromosome 15) was more efficient when SurePlex DNA amplification product was used (100% vs. 91.1%). Only cells displaying the cell-line chromosome gain were considered for further analysis. Additional aneuploidies and segmental imbalances, from 10Mb-20Mb to whole-arm imbalances, were seen in the three cell phases with both WGA systems (Supplemental Table 1).

No significant differences in the incidence of additional aneuploidy were found between the three groups. However, the incidence of segmental imbalances significantly increased ($p < 0.05$) in S phase vs. G0/G1 and G2/M phases when DOP-PCR was used, but no significant differences were found when SurePlex DNA amplification was performed (Table 1).

In the S-phase cells with their DNA amplified by DOP-PCR, 11 segmental gains and five segmental losses were detected (Table 1). Due to the resolution of CGH, in most of the cases, the segmental gains and losses included both light and dark chromosome bands, which are mostly considered early- and late-replicating domains, respectively.

Comprehensive chromosome analysis from isolated human blastomeres

A total of 85 out of 98 blastomeres (86.7%) from 30 different embryos were successfully analysed. Only four out of 20 (20%) couples had one embryo displaying CGH profiles without either whole chromosome aneuploidy or segmental imbalances in any of the blastomeres analysed. In the remaining 80% of the couples (16 out of 20), all of their embryos were abnormal due to at least one cytogenetically abnormal blastomere (Table 2).

A total of 63.3% (19/30) of the embryos had at least one aneuploid blastomere. Only one of the aneuploid embryos (1/19) was non-mosaic. Of the 18 mosaic embryos, five were characterised to be chaotic (at least one of the blastomeres displayed extensive aneuploidy and most of them contained different aneuploidies). In three out of the 18 mosaic embryos, both meiotic and mitotic abnormalities were found. Moreover, 73.3% (22/30) of the embryos displayed segmental imbalances for one or more chromosomes in at least one of the blastomeres analysed. A total of 87 out of 127 ends of the segmental imbalances found are located in sub-bands close to previously described fragile sites of the genome (24). Each embryo's cytogenetic characterisation is shown in Table 2.

Cytogenetic analysis of blastomeres at interphase and metaphase stages

A higher percentage of blastomeres at the interphase stage, as compared to the metaphase stage, gave good DNA amplifications (95.5% vs. 79.6%). In both cases, blastomeres without a correct DNA amplification were not included in the study. Of the 85 blastomeres, 33.3% (14/42) of the interphase-stage blastomeres and 34.9% (15/43) of the metaphase-stage blastomeres were totally euploid. The remaining blastomeres were abnormal due to aneuploidies, segmental imbalances or both (Table 3). All specific aneuploid events detected in the interphase and metaphase blastomeres are represented in Supplemental Figure 2.

No significant differences were observed in the incidence of either whole-chromosome aneuploidies or segmental imbalances, when comparing blastomeres in the interphase stage and metaphase stage. Even considering only the euploid blastomeres, no significant differences were found in the incidence of segmental events between both groups. However, blastomeres containing at least one aneuploid event showed a

significantly increased incidence of segmental events when compared to the euploid ones (61.5% and 37% respectively, Fisher's exact test $p < 0.05$).

Discussion

Both WGA systems used for the cytogenetic study of isolated fibroblasts from a cell line (47,XY,+15) were quite equivalent in the detection of the known aneuploidy. However, using the SurePlex DNA amplification system, the cell-line aneuploidy was slightly more efficiently detected (100% vs. 91.1%). In addition, only when the DOP-PCR method was used, but not with SurePlex DNA products, segmental imbalances significantly increased at the interphase stage (S phase). Moreover than replicative DNA segments, aneuploidies and segmental imbalances have appeared in cells with their DNA amplified by DOP-PCR and Sureplex (Supplemental Table 1), being attributable to a cell culture stress, in agreement with previously published data (25-27). In a previous study using FISH on lymphocytes from a non-synchronised culture, with cells at G1, S and G2 stages, and Sertoli cells at the G0 stage, it was found that the replicative state led to a significantly increased incidence of non-diploid FISH signals against three chromosomes analysed (19). This work suggested an increased risk of misinterpretation in PGD with a single-blastomere analysis, where some of the chromosomal aberrations detected could, in fact, be transitory due to corresponding to different replicative situations among the chromosome regions.

We expected that performing a comprehensive chromosome analysis such as metaphase-CGH (mCGH), the incidence of this kind of misdiagnosis would be increased, independently of the WGA system used. But, in the present work, this happened when DOP-PCR DNA products were used but not with SurePlex DNA

products, even though this is a powerful WGA system, which enables not only mCGH but also aCGH based on BACs or oligonucleotides (3,28-30).

In SurePlex WGA products, even trying to quantify the implications of light and dark bands in the segmental imbalances found in the three cell-cycle stages (Supplemental Table 1), no increased incidence due to DNA replicative activity was seen. Using DOP-PCR, most of the segmental abnormalities found in the S-phase are probably transitory and linked to the DNA replication process. These transitory imbalances would be detected depending on the WGA method used, as well as their being detected by FISH (19). Using SurePlex WGA, any apparent segmental imbalance detected by CGH would have to be considered as not being related to a transitory imbalance, mainly when no general artifactual regions are involved.

DOP-PCR, which uses degenerated oligonucleotides that hybridise randomly on the genome, results in DNA fragments of a large variety of sizes. On the contrary, SurePlex generates smaller DNA fragments due to an initial fragmentation step and gives more homogeneous fragment sizes for different DNA regions, less randomly than the DOP-PCR procedure (Supplemental Figure 1). We hypothesize that DOP-PCR amplifications would more widely represent the genomic replicative situation.

Recently published results using SurePlex WGA of single lymphoblasts, and performing 24sure aCGH (BlueGnome) with an analysis of each BAC after a fluorescent data correction, allowed for the detection of DNA replicons in the S-phase (20). In the aCGH, each single BAC (with its replicas or copies) can be clearly located in a specific chromosome band and even in a specific position of a band, while in mCGH, segmental imbalances cannot be assigned with certainty to an exclusive chromosome band or group of bands. This difference makes fluorescence correction

feasible and powerful in the BAC aCGH, enabling the detection of previously described replication domains (31).

The embryos analysed in the present work, since they were potentially transferable embryos, represent high-quality material to evaluate their state of aneuploidy and segmental imbalances. In this study, blastomeres were successfully characterised as interphase or metaphase cells using an inverted microscope (interphase blastomeres show an apparent nucleus while metaphase blastomeres do not have an intact nuclear envelope). In fact, *Tanaka et al.* (32) selected for blastomere fixation those blastomeres that reached a metaphase stage, biopsying them just after the nuclear envelope disappearance, and achieved metaphase spreads in 89.5% of the embryos. It must be said that blastomeres at the M-phase stage were easily distinguished from a-nucleated blastomeres or big fragments and discarded from the study according to the control of their WGA in the agarose gel. A-nucleated cells erroneously classified as metaphase cells caused an increased rate of non-amplification for that group, however, only blastomeres rendering good DNA smears were selected for the CGH analysis.

In this work, 13.3% of the potentially transferable embryos were found to be euploid. This incidence is intermediate among previously published rates (10,11,33,34). Aneuploidy for large chromosomes, monosomy, or aneuploidy for multiple chromosomes has been detected in half of the embryos, a fact that has been assumed to be lethal in the first trimester of pregnancy (11,33).

The structural chromosome imbalances have been evaluated in-depth: In 73.3% of the embryos, structural abnormalities were present in at least one blastomere, and in 23.3% of the embryos only structural abnormalities were found. Structural imbalances in donated embryos for research have also been previously reported using CGH, with greatly variable incidences (10,11,33,34). aCGH methodologies have also reported the

presence of segmental imbalances in cleavage-stage embryos (12-14) and at the blastocyst stage (16,17). Specific embryo classification criteria would explain the differences among the euploidy rates found, as most of the teams do not report aneuploid embryos with structural abnormalities only. Using SurePlex WGA, the segmental imbalances detected, not involving artifactual regions, would have to be considered real and stated in the PGD reports, as they can have an impact on embryo viability or even clinical consequences.

A total of 69% of the segmental imbalances involved regions with described fragile sites. Moreover, there was a significantly higher incidence of segmental abnormalities in the aneuploid blastomeres. These results indicate that in the first embryo divisions, a situation of stress is present, predisposing errors in both mechanisms of chromosome break repair and control of chromatid segregation (35,36).

In the present work, 30.8% (4 out of 13) of the embryos with a blastomere having only structural abnormalities had the rest of the analysed blastomeres totally euploid. Consequently, embryos from PGD, which analysed blastomeres containing only structural abnormalities, have a 69.2% of risk of being abnormal in more cells and having the consequences of not implanting, miscarrying or even deriving in viable syndromes.

The present work shows that embryos suitable for transfer, cryopreserved at Day 2 or Day 3 without a previous cytogenetic analysis, have a low euploidy rate, with their viability for reproductive purposes sometimes being overestimated. Freezing-thawing process may contribute to compromise them (10,37). However, 12 out of 26 abnormal embryos (46.1%) had at least one euploid blastomere, which can be considered a positive factor for the evolution of these embryos, as various authors have suggested the existence of a self-correction capacity (11,18,33,38). Performing embryos' cytogenetic

analysis at the blastocyst stage, this self-correction hypothesis might be confirmed by detecting lower aneuploidy rates and, therefore, obtaining an increase in the accuracy of comprehensive cytogenetic analysis (39). Moreover, the potential false-positive errors related to DNA replication would be avoided due to compensation among the analysed trophoctoderm cells.

In conclusion, the analysis of single blastomeres using SurePlex WGA demonstrates that, in PGD cycles, it is a very appropriate approach when mCGH is performed, due to minimising transitory false-positive segmental imbalances. Structural abnormalities, detected in three-quarters of the cryopreserved embryos, should be stated in the PGD reports, since they may correspond to imbalances not related to DNA replication. Since exclusively structural abnormalities were detected in a quarter of the embryos, a re-analysis at the blastocyst stage should be suggested in these cases, in order to determine if the particular structural imbalances have remained through the subsequent cell divisions.

Acknowledgements

We wish to thank the couples that decided to participate in this study. We also would like to thank Montserrat Boada PhD (Institut Universitari Dexeus), Laura Marquès PhD (Clínica Sagrada Família) and Olga Martínez-Passarell PhD (Fundació Puigvert) for their support in the obtaining of the authorisation from the *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida* in Spain for the use of donated cryopreserved human embryos in the present study. We would like to thank Albert Obradors PhD for his contribution in the study design, Magdalena Giralt PhD for her assistance in the CGH analysis, Mercedes Campillo PhD for performing the statistical analyses and Maria Rosa Martorell PhD for supplying the Reference cells used.

References

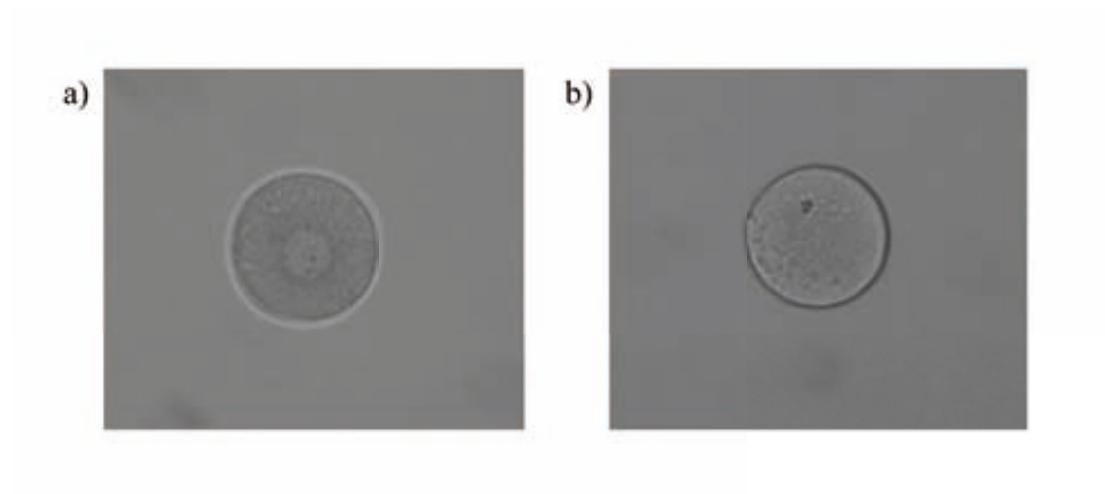
1. Harper, JC, Sengupta, SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the art 2011. *Hum Genet* 2012;131:175-86.
2. Capalbo, A, Bono, S, Spizzichino, L, Biricik, A, Baldi, M, Colamaria, S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013;28:509-18.
3. Fiorentino, F, Spizzichino, L, Bono, S, Biricik, A, Kokkali, G, Rienzi, L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:1925-35.
4. Fragouli, E, Alfarawati, S, Daphnis, DD, Goodall, NN, Mania, A, Griffiths, T, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011;26:480-90.
5. Munne, S, Sultan, KM, Weier, HU, Grifo, JA, Cohen, J, Rosenwaks, Z. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1191-9; discussion 9-201.
6. Rius, M, Daina, G, Obradors, A, Ramos, L, Velilla, E, Fernandez, S, et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;95:413-6.
7. Rubio, C, Rodrigo, L, Mir, P, Mateu, E, Peinado, V, Milan, M, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013;99:1044-8.
8. Wilton, L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update* 2005;11:33-41.
9. Vanneste, E, Voet, T, Le Caignec, C, Ampe, M, Konings, P, Melotte, C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577-83.
10. Daphnis, DD, Fragouli, E, Economou, K, Jerkovic, S, Craft, IL, Delhanty, JD, et al. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:117-25.
11. Wells, D, Delhanty, JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1055-62.
12. Mertzaniidou, A, Spits, C, Nguyen, HT, Van de Velde, H, Sermon, K. Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development. *Hum Reprod* 2013;28:1716-24.
13. Mertzaniidou, A, Wilton, L, Cheng, J, Spits, C, Vanneste, E, Moreau, Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013;28:256-64.
14. Vanneste, E, Bittman, L, Van der Aa, N, Voet, T, Vermeesch, JR. New array approaches to explore single cells genomes. *Front Genet* 2012;3:44.

15. Voullaire, L, Wilton, L, McBain, J, Callaghan, T, Williamson, R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1035-41.
16. Johnson, DS, Cinnioglu, C, Ross, R, Filby, A, Gemelos, G, Hill, M, et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod* 2010;16:944-9.
17. Liang, L, Wang, CT, Sun, X, Liu, L, Li, M, Witz, C, et al. Identification of chromosomal errors in human preimplantation embryos with oligonucleotide DNA microarray. *PLoS One* 2013;8:e61838.
18. Ambartsumyan, G, Clark, AT. Aneuploidy and early human embryo development. *Hum Mol Genet* 2008;17:R10-5.
19. Pujol, A, Benet, J, Campillo, M, Codina-Pascual, M, Egozcue, J, Navarro, J. The use of a cell-cycle phase-marker may decrease the percentage of errors when using FISH in PGD. *Cytogenet Genome Res* 2004;105:29-35.
20. Van der Aa, N, Cheng, J, Mateiu, L, Esteki, MZ, Kumar, P, Dimitriadou, E, et al. Genome-wide copy number profiling of single cells in S-phase reveals DNA-replication domains. *Nucleic Acids Res* 2013;41:e66.
21. Gutierrez-Mateo, C, Wells, D, Benet, J, Sanchez-Garcia, JF, Bermudez, MG, Belil, I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:2118-25.
22. Rius, M, Obradors, A, Daina, G, Cuzzi, J, Marques, L, Calderon, G, et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010;25:1824-35.
23. Moore, DH, 2nd, Pallavicini, M, Cher, ML, Gray, JW. A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997;28:183-90.
24. Mrasek, K, Schoder, C, Teichmann, AC, Behr, K, Franze, B, Wilhelm, K, et al. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int J Oncol* 2010;36:929-40.
25. Harvey, M, Sands, AT, Weiss, RS, Hegi, ME, Wiseman, RW, Pantazis, P, et al. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 1993;8:2457-67.
26. Iourov, IY, Vorsanova, SG, Yurov, YB. Somatic genome variations in health and disease. *Curr Genomics* 2010;11:387-96.
27. Thompson, SL, Compton, DA. Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 2010;188:369-81.
28. Colls, P, Escudero, T, Fischer, J, Cekleniak, NA, Ben-Ozer, S, Meyer, B, et al. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod Biomed Online* 2012;24:621-9.
29. Gutierrez-Mateo, C, Colls, P, Sanchez-Garcia, J, Escudero, T, Prates, R, Ketterson, K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;95:953-8.

30. Traversa, MV, Marshall, J, McArthur, S, Leigh, D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. *Reprod Biol* 2011;11 Suppl 3:51-60.
31. Ryba, T, Hiratani, I, Lu, J, Itoh, M, Kulik, M, Zhang, J, et al. Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Res* 2010;20:761-70.
32. Tanaka, A, Nagayoshi, M, Awata, S, Mawatari, Y, Tanaka, I, Kusunoki, H. Preimplantation diagnosis of repeated miscarriage due to chromosomal translocations using metaphase chromosomes of a blastomere biopsied from 4- to 6-cell-stage embryos. *Fertil Steril* 2004;81:30-4.
33. Voullaire, L, Slater, H, Williamson, R, Wilton, L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106:210-7.
34. Trussler, JL, Pickering, SJ, Ogilvie, CM. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online* 2004;8:701-11.
35. Voet, T, Vanneste, E, Van der Aa, N, Melotte, C, Jackmaert, S, Vandendael, T, et al. Breakage-fusion-bridge cycles leading to inv dup del occur in human cleavage stage embryos. *Hum Mutat* 2011;32:783-93.
36. Voet, T, Vanneste, E, Vermeesch, JR. The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 2011;133:160-8.
37. Laverge, H, Van der Elst, J, De Sutter, P, Verschraegen-Spae, MR, De Paepe, A, Dhont, M. Fluorescent in-situ hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing. *Hum Reprod* 1998;13:425-9.
38. Wolstenholme, J. Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization. *Prenat Diagn* 1996;16:511-24.
39. Northrop, LE, Treff, NR, Levy, B, Scott, RT, Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010;16:590-600.

Figure Legends

Figure 1. Appearance of A) an interphase blastomere containing a visible nucleus and B) a metaphase blastomere without a visible nucleus, both from the same embryo.



Tables

Table 1. Single fibroblasts amplified by each WGA method: DOP-PCR and SurePlex. Detection of the cell-line alteration, additional aneuploidies and segmental imbalances in each cellular stage.

WGA	DOP-PCR			SurePlex		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
Cellular stage						
Total analysed cells	30	30	30	15	15	15
Cell-line abnormality detection (%)	83.3	96.7	93.3	100	100	100
Additional aneuploidy (%)	4.0	3.4	0	0	0	6.7
Segmental imbalances (%)	12.0	24.1 ^a	3.6	6.7	26.7	20.0
Total segmental events	4	16 ^b	3	1	4	4

^a Fisher's exact test (p<0.05)

^b Mann-Whitney test (p<0.05)

Table 2. CGH results from human blastomeres.

C	E.BI	I/M	Aneuploidies	Segmental imbalances	Embryo classification
1	1.1	M	-	-9p,-10pterq23.1	Structural
	1.2	I	-	-	
	1.3	M	-	+9p	
2	1.1	M	-	-	Structural
	1.2	I	-	-18p	
	2.1	M	-	+14q21q31	Mosaic/Structural
	2.2	I	-	-	
	2.3	M	+14	+7p14p21	
	2.4	I	-	+19q	
2.5	M	-	-		
3	1.1	M	-	-	Mosaic
	1.2	M	-	-	
	1.3	I	+19	-	

4	1.1	M	+1,+3,+6,+7,+10,+11,+12,-14,+16, -18, +19,-20,+21,+22,+X	-	Chaotic/Structural
	1.2	I	+X	+16q13q23	
	1.3	M	-6,-7,+8,-13,-14,+16,-17,-18,-20,+X	-10q23.3qter	
5	1.1	I	-	+9p,+18q	Structural
	1.2	I	-	-	
	1.3	M	-	-	
	1.4	I	-	-	
	1.5	M	-	-	
6	1.1	I	-13	-	Mosaic
	1.2	M	+13	-	
7	1.1	M	-16,-22	+5p14p15.2,+7q31.3q33,+11p	Mosaic/Structural
	1.2	M	-16,-22	-	
	1.3	I	-16,-20,-22	+3q23q26.2,+9p,+12p,-17p	
8	1.1	I	+7,+10,+12,+14,-22	-	Chaotic
	1.2	M	+7,+10,+12,+14,-17,-21	-	
	1.3	M	-	-	
	2.1	M	-	-	Euploid
	2.2	I	-	-	
	3.1	M	-	-	Structural
	3.2	I	-	-3q25.3qter	
9	1.1	M	-5,-11,-16,+18,-22	+7pcenp21	Mosaic/Structural
	1.2	I	-5,-11,-16,-22	-	
10	1.1	I	-	-	Mosaic/Structural
	1.2	M	+18,-19	-	
	1.3	M	-19	+18q	
	1.4	M	+13,-19,-22	+1p21p31.1,+Xq22.1qter	
11	1.1	I	-	-	Mosaic/Structural
	1.2	M	-14,-15	+1p21p31.1,+7p14p21,+9q	
12	1.1	M	-	-	Structural
	1.2	I	-	-9q,-11q22.3qter	
	1.3	I	-	-	
	2.1	M	-	-	Mosaic
	2.2	I	+19	-	
	2.3	I	-22	-	
	2.4	I	-22	-	
13	1.1	I	-	-	Chaotic/Structural
	1.2	M	+4,+9,+11,-22	+8q21.3qter	
14	1.1	I	-	-	Euploid

	1.2	M	-	-	
15	1.1	M	+21	-	Mosaic/Structural
	1.2	I	+5	+2p21pter,+6q24qter, +11p11.2p14,+12q14q22	
	2.1	I	-	+18p,+19q13.1q13.3	Mosaic/Structural
	2.2	M	+13,+14,-21	+2q33qter	
16	1.1	I	+2,+3,+4,+6,+9,+10,+12,+13, +14,-20,+21,-22,XXXY	-	Chaotic/Structural
	1.2	I	+2,+3,+4,-5,+6,-7,-8,+9,+10,+12,+13, -18,-20,+21,-22,XXXY	+1p31.1pter,-1q	
	1.3	M	-1	-	
	1.4	I	-1,+13	+2q21.3q36,+5q14q21, +12q15q21.3,-20q	
	1.5	M	-3,+5,-6,+7,-9,+11,-14,+18,+21,X0	+2q13q24.1,+10q,+16p	
	2.1	I	-	+2q35qter,+9p	Structural
	2.2	M	-	-4p,-2q35qter,-11q14qter,-12p	
17	1.1	I	-	-	Euploid
	1.2	M	-	-	
	1.3	M	-	-	
	2.1	M	+1,+2,+7,+14,+19	+5q,-6q,+9q,+10q,+17p,+18q	Chaotic/Structural
	2.2	M	-1,-7,+13,-14,+15,+20	-2p,+3q24q26.3,+4q23q28, -5q23.3qter,+6p,+6qcenq23.3, +8q,-9q,-10q,+11q,+16q,-18q	
	2.3	I	-	+11q22.2qter,+18q	
18	1.1	I	-	-1q,+5p,+6p,-6q16.2qter, +9q22.1qter,+16q	Mosaic/Structural
	1.2	M	+5,-6	+3q21q24,+16p	
	1.3	I	+5	+1q,+6p,-6q21qter,-9q,-16q	
	1.4	M	+5	-6q16.1qter,+17q	
	2.1	I	-4	+13qcenq14.1,-13q14.1qter	Aneuploid/Structural
	2.2	I	-4	-8q21.3qter,+13qcenq14.1, -13q14.1qter	
19	1.1	I	-	-	Euploid
	1.2	M	-	-	
	1.3	I	-	-	
	1.4	I	-	-	
20	1.1	I	-	+5p14pter,+19q	Mosaic/Structural
	1.2	M	+3,+13,+15	+2p,+2q22q35,+7p,+12q14q24.1	
	2.1	M	-	+6p,+11q14.3qter,+20p	Structural

	2.2	I	-	-13q21qter,+18p	
	3.1	I	-	+17q	Mosaic/Structural
	3.2	M	+20	-2q22q31,-6q16.1q22.1,+18p	

C: Couple, E.BI: Embryo.Blastomere, I/M: Interphase/Metaphase.

Table 3. Cytogenetic results from human blastomeres in interphase and metaphase stages.

	Interphase	Metaphase
Processed Blastomeres	44	54
Blastomeres with amplified DNA and CGH result (%)	42 (95.5)	43 (79.6)
Totally euploid blastomeres (%)	14 (33.3)	15 (34.9)
Cytogenetically abnormal blastomeres (%)	28 (66.7)	28 (65.1)
Blastomeres with aneuploidy (%)	16 (38.1)	23 (53.5)
Blastomeres with segmental imbalances (%)	20 (47.6)	21 (48.8)
N° segmental events (%)	49 (46.7)	56 (53.3)
Euploid blastomeres (%)	26 (61.9)	20 (46.5)
N° segmental events in euploid blastomeres (%)	24 (68.6)	11 (31.4)
Blastomeres with aneuploidy and segmental imbalances (%)	8 (19.0)	16 (37.2)
Blastomeres with aneuploidy only (%)	8 (19.0)	7 (16.3)
Blastomeres with segmental imbalances only (%)	12 (28.6)	5 (11.9)

Supplemental Figure Legends

Figure 1. DNA smears from WGA DNA products in an agarose gel (1 and 2: DOP-PCR amplifications, DNA fragments from 200bp to 4000bp; 3 and 4: SurePlex amplifications, DNA fragments from 200bp to 1500bp).

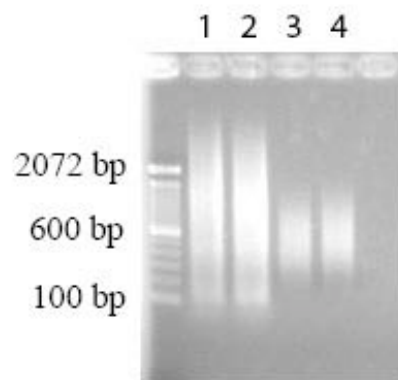
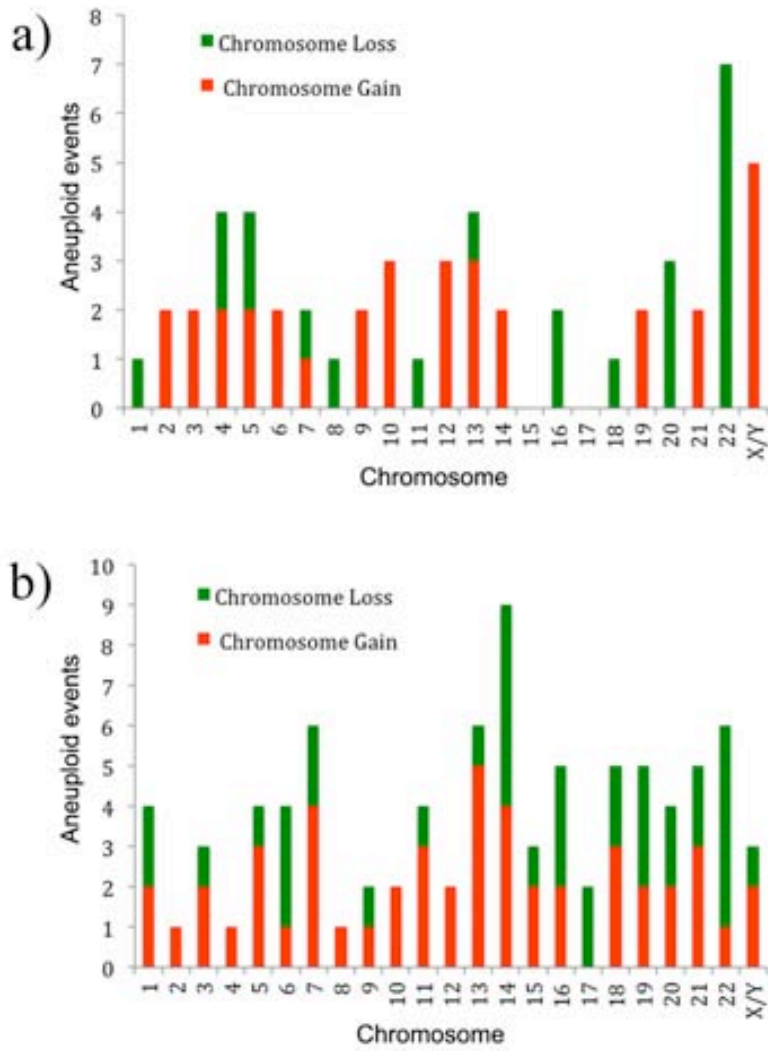


Figure 2. Number of aneuploid events for each chromosome in: A) interphase blastomeres and B) metaphase blastomeres.



Supplemental Tables

Table 1. CGH results from single fibroblasts (47,XY,+15) showing additional abnormalities.

WGA	Cell	Cell stage	Extra aneuploidies	Segmental imbalances
DOP-PCR	1	G1/G0	-	+5p14pter
	2	G1/G0	-	+6q
	3	G1/G0	-	+4q, -17p
	4	G1/G0	+Y	-
	5	S	-	-18q12.1q12.3, +Xp21.3p22.1
	6	S	-	+8q22.1q24.1
	7	S	-	+7q11.2q21.1
	8	S	+13	-1q31q42.1, +4q13.1q21.1, +5p14p15.1, +5q11.2q23.3, -8q21.2q21.3, +9p21p23, +11q22.3q23.1, +21q11.2q22.1
	9	S	-	+Xq21.3
	10	S	-	-18q, +19p
	11	S	-	-2q21.3q22
	12	G2/M	-	+16p11.2p13.2, -16q, +19p
SurePlex	1	G1/G0	-	-6p
	2	S	-	+8p22pter
	3	S	-	+17q
	4	S	-	+1p35p36.1
	5	S	-	-5q21q22
	6	G2/M	-	+16p
	7	G2/M	-	+16p
	8	G2/M	-Y	+16p, +20q

Annex 2

Article “Sperm DNA fragmentation analysis and comprehensive Preimplantation Genetic Diagnosis for male-factor infertility: preliminary results”

Title: Sperm DNA fragmentation analysis and comprehensive Preimplantation Genetic Diagnosis for male-factor infertility: preliminary results

Running title: Sperm DNA fragmentation and PGD

Laia Ramos,¹ Gemma Daina,¹ Javier Del Rey,¹ Mariona Rius,² Jordi Ribas-Maynou,¹
Alba Fernández-Encinas,¹ Olga Martínez-Passarell,³ Montserrat Boada,⁴ Albert
Obradors,⁵ Jordi Benet,¹ Joaquina Navarro¹

1. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina.
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat
Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
2. Clínica Sagrada Família, Barcelona.
3. Fundació Puigvert. Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, Barcelona.
4. Institut Universitari Dexeus, Barcelona.
5. Clínica Eugin, Barcelona.

Corresponding author:

Joaquina Navarro Ferretè (Joaquina.Navarro@uab.cat)

Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina.

Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra, Spain

Phone 0034 93 581 1724

Fax 0034 93 581 1025

Abstract

Study question: Does sperm DNA fragmentation (SDF) have an effect on embryo cytogenetics and IVF outcome?

Summary answer: Preliminary results show that in IVF cycles for male-factor infertility, global SDF correlates with the incidence of aneuploidy in the embryos, while double-strand SDF (dsSDF) correlates with lower aneuploidy rates. This is concordant with the fact that balanced reorganisation carriers, showing high SCD and low dsSDF values, generate embryos with higher aneuploidy rates. High dsSDF rates have been shown to not prevent the couples from achieving pregnancy in IVF cycles.

What is known already: SDF has a predictive value for the IVF outcome. Different single-strand SDF (ssSDF) and double-strand SDF (dsSDF) profiles have been associated with various clinical groups, determining the chance of achieving pregnancy and miscarriage predisposition.

Study design, size, duration: Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) was performed on single blastomeres from cleavage-stage embryos in order to assess the presence of aneuploidy and segmental imbalances. Global SDF, ssSDF and dsSDF were determined for eight couples that participated in this study. Nine PGD cases for male-factor sterility were collected from January 2010 to March 2013, in collaboration with three IVF centres: *Fundació Puigvert*, *Institut Dexeus* and *Clinica Eugin*.

Participants/materials, setting, methods: Fifty-six blastomeres from cleavage-stage embryos were obtained for the PGD-mCGH application in a total of nine IVF cycles. DOP-PCR or SurePlex was used for Whole-Genome Amplification and CGH was used for the cytogenetic analysis. Global SDF was measured with the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. The ssSDF and dsSDF were measured with the alkaline and neutral Comet assays, respectively.

Main results and the role of chance: The SCD value correlates with the aneuploidy rate in the IVF embryos ($r=0.93$; $p<0.01$), while the dsSDF correlates with lower incidences of aneuploidy in the embryos obtained ($r=-0.84$; $p<0.05$) as a consequence of the SDF profiles from the balanced reorganisation carriers included in the study (high SCD and low dsSDF) and the widely described ICE present in their embryos. Two pregnancies were achieved in couples with low ssSDF: one showing a low dsSDF and the other, a high dsSDF.

Limitations, reasons for caution: The present study shows preliminary results obtained from the consecutive cases collected. It provides guidelines for other centres that may expand these results.

Wider implications of the findings: There were no previous data about the relationship between SDF and the incidence of aneuploidy and segmental imbalances in IVF embryos using a whole-chromosome complement analysis method. The SCD value has been shown to positively correlate with the aneuploidy rate in the embryos. From the three SDF parameters analysed, ssSDF is the most useful biomarker for predicting the IVF outcome, as pregnancies were only achieved in cases with low ssSDF. In contrast, the dsDNA breaks present in the spermatozoa seem to be easily repaired by the oocyte.

Study funding/competing interest(s): This work was funded by the *Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto Carlos III* (PI 08/0012, PI 11/00625) and *Grup de Suport a la Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107). The authors declare no conflict of interest.

Key words

Sperm DNA fragmentation, PGD, mCGH, aneuploidy, segmental imbalances

Introduction

It has been estimated that 15% of the couples wishing to have an offspring will suffer from infertility, defined as the failure to conceive after one year of unprotected sexual intercourse (1). Both males and females can be affected by infertility: In many situations its origin is clearly defined while sometimes it remains idiopathic. Male infertility is present in approximately 40% of the cases (2), and it is caused by karyotype abnormalities in 2%-14% of them (3). These karyotype abnormalities include chromosomal translocations (Robertsonian and reciprocal), inversions, Y chromosome micro-deletions and sex chromosome aneuploidies (4). However, the vast majority of male infertility cases are not related to karyotype abnormalities but rather to other factors.

Male fertility has been traditionally assessed by seminogram study and sometimes by FISH analysis on spermatozoa. These parameters are informative concerning the infertility status of the patient, but they have not provided much information about the *in vitro* fertilisation (IVF) outcome (5,6).

Recently, sperm DNA fragmentation (SDF) has been suggested as a logical biomarker of sperm quality that may predict IVF success (7). Different techniques such as the Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling (TUNEL) assay, *in situ* nick translation, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test or Comet assay have been used to determine SDF (8). Recently, a two-tailed Comet assay was developed for the simultaneous evaluation of single-strand SDF (ssSDF) and double-strand SDF (dsSDF) in human spermatozoa (9).

Using the SCD test, SDF above 22.5% has been considered the limit for naturally achieving pregnancy, and values above 18.5% would correlate with miscarriage

predisposition (10,11). Using the alkaline Comet assay, a ssSDF of 52% has also been considered the limit for achieving pregnancy (6,11).

In recent works, characteristic alkaline and neutral Comet assay patterns were described in different clinical groups: Comet profiles with low ssSDF (<52%) and low dsSDF (<77.5%) were indicative of the best prognosis for achieving pregnancy, while high ssSDF (>52%) and high dsSDF (>77.5%) correlated with the worst prognosis (patients with oligoasthenoteratozoospermia, asthenozoospermia and asthenozoospermia with varicocele) (12). Comet profiles with low ssSDF and high dsSDF would not prevent achieving pregnancy but rather would correlate with miscarriage predisposition (11).

Regarding embryo cytogenetics, more than 50% on the *in vitro* fertilised embryos are aneuploid in young women (13-15) and up to 80% in older women (16,17).

Segmental chromosome imbalances have been reported in Day 3 or Day 4 embryos with variable incidences (13,14,18,19) with similar values between younger and older women (17,20). These segmental imbalances may be produced by breaks in chromosome fragile sites (13,19) and they have been shown to mainly be not related to a replicative cell-stage (Ramos et al., submitted).

There is a consensus that most aneuploidies are derived from female non-disjunctions in oogenesis, except for the sex chromosome aneuploidies, which mainly have a paternal origin (4). Some studies have concluded that sperm with poor-quality parameters and damaged DNA can lead to an increased incidence of chromosomal abnormalities in the embryos (5,21), which is consistent with the findings that poor-quality sperm samples have an increased aneuploidy rate in spermatozoa (22,23). In fact, ESHRE compilations have summarised 1732 PGDs performed with FISH analysis for couples ascertained from male severe factor (24).

However, a recent study using the TUNEL assay showed that SDF does not correlate with the aneuploidy rate either in spermatozoa or in IVF embryos (25). In all of these works, embryo aneuploidy screening was performed by FISH analysis of one (21) or nine chromosomes (5,25).

The aim of the present study is to assess if there is an association between SDF and the incidence of cytogenetic abnormalities in the embryos produced by couples undergoing IVF for male infertility, and their IVF outcome. SDF will be characterised by the SCD test and the alkaline and neutral Comet assays, and a comprehensive analysis of all of the chromosomes will be performed by Comparative Genome Hybridisation (CGH) in the Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) application.

Materials and methods

Patients

A total of nine PGDs for male-factor sterility, from eight couples with different indications for Assisted Reproduction Techniques (ART), were consecutively performed in the last four years in collaboration with three IVF centres in Barcelona, Spain: *Fundació Puigvert*, *Institut Universitari Dexeus* and *Clínica Eugén* (Table I). The corresponding informed consent was signed by all of the couples that were included in this study.

Sperm DNA Fragmentation analysis

Semen samples were obtained by masturbation after a minimum of three days of abstinence. Seminograms were performed according to the World Health Organisation 2010 criteria (26) with a fraction of the sample. The rest of the sample was cryopreserved in 1:1 proportion with Test-yolk buffer (14% glycerol, 30% egg yolk, 1.98% glucose and 1.72% sodium citrate) for the Sperm DNA Fragmentation analysis

(SDF). The Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test was performed with the Halosperm kit (Halotech DNA, Madrid, Spain), following the manufacturer's instructions as previously stated (27). The neutral and alkaline Comet assays were performed following the procedure previously described (12). All SCD test and Comet assay samples were stained with DAPI SlowFade Gold antifade (Invitrogen, Carlsbad, California) and were evaluated using an Olympus AX70 fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan), counting at least 400 spermatozoa per sample. The percentage of sperm with fragmented DNA was referred to as SDF for the SCD test, ssSDF for the alkaline Comet assay and dsSDF for the neutral Comet assay. Sperm samples were classified as having low DNA fragmentation (SDF>22.5%, ssSDF>52%, dsSDF>77.5%) or high DNA fragmentation (SDF<22.5%, ssSDF<52%, dsSDF<77.5%) (10,12).

In vitro fertilisation and embryo biopsy

The patients underwent routine superovulation procedures. Embryos were normally fertilised on Day 0 by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In Case H, a calcium ionophore was used to promote oocyte activation due to the male globozoospermia (28). On Day 3 after fertilisation, one blastomere from each embryo that had reached the 6-8-cell stage was biopsied using Tyrode's acid or laser, depending on the IVF centre.

PGD procedure

Cell lysis and WGA of each blastomere was performed by one of the two following procedures: Enzymatic cell lysis and DOP-PCR, in Cycles A-1, D and E, as previously described (29), or SurePlex DNA Amplification System (BlueGnome, Cambridge, UK), in Cycles A-2, B, C, F, G and H, following the manufacturer's instructions. The correct DNA amplification was assessed in a 1.5% agarose gel: DOP-PCR gave smears between 200pb and 4000pb, while SurePlex produced smears between 200pb and 1500pb.

The CGH approach was performed on each DNA product as previously described (30), using either XY or XXY reference DNA, amplified by the same WGA system as the test DNA.

Re-analysis of the discarded embryos

The available embryos discarded due to the presence of cytogenetic abnormalities after PGD were analysed using the CGH procedure. When possible, isolated blastomeres were disaggregated and processed separately, but, in some cases, they were entirely processed because embryos were compacted or at the blastocyst stage.

Moreover, in the H4 discarded embryo, one blastomere was analysed with FISH for chromosomes 7, 8 and 10, which were found to be abnormal in the CGH, using oligonucleotide probes (One Cell Systems, Cambridge, UK), following the manufacturer's instructions.

Cytogenetic analysis criteria

The ratio between red and green fluorescence is 1:1 when there is the same proportion of reference and test DNA, giving a euploid CGH profile. The thresholds used to diagnose losses and gains were determined with the standard deviation of the red:green fluorescence ratio in DOP-PCR amplifications, while in SurePlex, thresholds were fixed at 0.8 and 1.2, respectively, as previously defined (unpublished data).

The heterochromatic, centromeric and telomeric regions were not evaluated due to being repetitive DNA often generating artifactual CGH profiles. Chromosome 17, 19 and 22 aneuploidies were considered as being technical artifacts when all three chromosomes were simultaneously gained or lost in the same cell; otherwise, they were considered as being real aneuploidies. Deviation of 1p33pter was also considered to be artifactual, as it had been previously described (19,29,31).

Statistical Analyses

The correlation between the SDF parameters (SCD value, ssSDF and dsSDF) and the aneuploidy and segmental imbalances rates was performed using the Pearson test. Fisher's exact test and the Mann-Whitney test were used to analyse whether differences between each established group of patients had statistical relevance.

Ethical Approval

All of the families involved signed an authorised informed consent, and PGDs were approved by each clinic's Ethics Committee and the *Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III* (FIS-ISCIII: PI 080012 and PI 1100625).

Results

Sperm DNA fragmentation analysis

The SCD, ssSDF and dsSDF values from each patient are shown in Table II. No results could be obtained from Couple H due to severe oligozoospermia.

Four different patient groups were defined according to the Comet assay thresholds previously defined (ssSDF=52%; dsSDF=77.5%): Group 1, with low ssSDF and dsSDF values; Group 2, with low ssSDF and high dsSDF; Group 3, with high values of both ssSDF and dsSDF, and Group 4, with high ssSDF and low dsSDF (Table II). Groups 1-3 had been previously described (11,12), but not Group 4.

PGD results

In each PGD application, the evolving embryos at Day 3 were biopsied for their whole-chromosome complement analysis. One blastomere from each of the 56 embryos at the 6-8-cell stage was biopsied, and informative CGH results were obtained in 51 of them (91.1%). A total of 14 out of the 51 blastomeres displayed totally euploid CGH profiles (27.5%) (Table III). The chromosomes involved in aneuploid events, in all of the cases,

are shown in Figure 1. A total of 16 out of the 27 (59.3%) ends of the segmental imbalances found (Figure 2) were located in sub-bands close to previously described fragile sites of the genome (32).

Transfer of chromosomally normal embryos was performed in five out of the nine cycles. Pregnancies were achieved in two of the cycles (C and D), and normal children were born (Table III).

Male factor with abnormal karyotype

In the three couples carrying chromosomal reorganisations (A-C), the meiotic segregation could be inferred in all of the embryos analysed. In the two cases of paternal balanced Robertsonian translocations (A and B), the 2:1 alternate segregation has been the most common (8/12). In the case of a balanced pericentric inversion of chromosome 2 (C), no recombinant chromosome complements were generated, since all of the embryos were normal or balanced (Table III).

The aneuploidy rate found in these cases was of 85% (17/20) and the incidence of segmental imbalances was of 30% (6/20) (Tables III and IV). The aneuploidy rate was significantly higher than the one obtained in the couples with normal karyotypes ($p < 0.01$).

Male factor with normal karyotype

In the five couples with normal karyotypes (D-H), aneuploidies were present in 45.2% of the embryos (14/31) and segmental imbalances were detected in 29% of the embryos (9/31) (Tables III and IV).

Cases with an increase of FISH abnormal spermatozoa (E, G, H) did not show significant differences in the incidence of aneuploidy or structural imbalances, when compared to cases D and F.

Re-analysis of the discarded embryos

Eighteen out of 29 (62.1%) re-analysed embryos were confirmed to be abnormal and meiotic segregations from the reorganisation cycles were confirmed in 86.7% (13/15) of the discarded embryos (Appendix 1).

FISH of three chromosomes in one blastomere from embryo H4 showed a trisomy for chromosome 7, nullisomy for chromosome 8 and disomy for chromosome 10.

SDF and embryo cytogenetics

The global SDF measured with the SCD test correlated with higher aneuploidy rates in the IVF embryos ($r=0.93$; $p<0.01$). High dsSDF, however, correlated with lower incidences of aneuploidy in the embryos obtained ($r=-0.84$; $p<0.05$). No SDF parameter correlated with the incidence of segmental imbalances in the embryos.

Discussion

In the present work, nine consecutive PGD cycles for eight families with male-factor infertility due to balanced chromosome reorganisations, sperm abnormal FISH or abnormal seminograms, in which the SDF was also characterised, have been performed in the last four years.

For the CGH analysis of each single biopsied blastomere per evolved embryo, two alternative WGA systems have been used. In the first three PGD cycles performed (A-1, D and E), DOP-PCR was used, since it had been established to be an appropriated WGA system widely used in conventional CGH to analyse a great variety of single cells, such as PBs, MII oocytes or blastomeres (29,30,33-36). The SurePlex WGA system was applied in the following six PGD cycles (A-2, B, C, F, G and H), since a previous study showed that it had a higher accuracy in detecting known aneuploidies

from single cells (100% in SurePlex, 91.1% in DOP-PCR) and it better minimised false positive segmental imbalances due to the replicative cell-stage (unpublished data).

Successful comprehensive cytogenetic diagnosis was achieved with both WGA systems (20 out of 21 and 31 out of 35 embryos analysed with DOP-PCR and SurePlex, respectively), allowing not only for the segregation analysis in the reorganisation PGD cases, but also the comprehensive study of aneuploidies and segmental imbalances. In agreement with that, similar efficiency was observed in the two cycles of PGD performed on Couple A with either DOP-PCR or SurePlex (Table III). Both WGA systems showed equivalent technical artifactuality in referring to chromosomes 17, 19 and 22 and 1p33pter abnormal profiles.

In the two cases of balanced Robertsonian translocations, the 2:1 alternate segregation, which produces normal or balanced chromosome complements, has been the most common, in agreement with previously reported works (37,38).

In the case of a balanced pericentric inversion of chromosome 2 (C), no recombinant chromosome complements (+2p/-2q or -2p/+2q) were generated, indicating that the bivalent figure in which no pairing between the normal and the inverted segment is produced is the most feasible figure obtained in spermatogenesis (Figure 3). No recombinant chromosome complements have been reported in other PGD cycles for male carrying pericentric inversions (37,39). In a patient with the same chromosome 2 inversion, *Anton et al.* did not find any recombinant spermatozoa performing sperm FISH analysis (n=5,460 cells), a fact that is explained by the small size of the inverted fragment (29Mbp) (40). The inversion size has been described as being the factor determining the proportion of recombinant gametes, with a low genetic reproductive risk for inversions comprising <100Mb (40).

A significantly higher incidence of aneuploidy was present in the three PGD cases for male balanced rearrangements (85%), when compared to the cases with normal karyotype (45.2%). Since the maternal age was not a risk factor, this result could be attributable to an inter-chromosomal effect (ICE). ICE is caused by an interference of the chromosome rearrangement in the meiotic segregation of the rest of structurally normal chromosomes, causing an increase of aneuploidy in the gametes (41). These results are consistent with previously published results in which increased aneuploidy rates have been found in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers (42,43) and in the embryos produced (44,45).

In the present case of a balanced pericentric inversion (C), seven out of the eight embryos showed aneuploidies, a fact not attributable to maternal age (34 y.o.). The bivalent figure supposed to be the most feasible to obtain, which avoids recombination of the inverted region, would have produced a considerably unstable segregation in the rest of bivalents, with the consequence of the previously mentioned ICE. However, in a previous work performing comprehensive cytogenetic analysis of trophectoderm cells from three blastocysts from a male carrier of a pericentric inversion of chromosome 8, only one of them showed an aneuploidy (37). In two other PGD cases for male inversion carriers performed by FISH, no ICE was detected (46). ICE has been considered to be extremely case-dependent in inversion carriers. While in sperm FISH analysis some authors detected increased aneuploidy rates in spermatozoa (40,47), a large number of works did not find an ICE (40,48,49). To confirm the type of bivalent figure formed and to correlate it with the production of recombinant complements and ICE, synaptic analysis of testicular samples and larger series of comprehensive cytogenetic analyses in embryos from inversion carriers would be very helpful.

In the remaining five cycles for male-factor sterility with normal karyotypes, the comprehensive chromosome analysis showed half the aneuploidy rate than it did in reorganisation carriers. Patients with abnormal FISH sperm samples (E, G, H) had increased diploidies and disomies for chromosomes 18, 21 and sex chromosomes in spermatozoa; however, an increased presence of trisomies for those chromosomes has not been seen in the embryos from this sub-group. An obvious limitation of cells analysed due to the number of embryos generated in an IVF cycle prevents us from taking this as conclusive.

Comprehensive cytogenetic analysis also allowed for the detection of segmental imbalances. While in both translocation cases, segmental imbalances unrelated to the rearranged chromosomes were seen, similarly to previous works (37,38); nevertheless, this was not the case of the embryos from the inversion carrier.

Segmental imbalances have been widely studied in spermatozoa using the human-hamster system in control patients and carriers of chromosome rearrangements. An average of 6.6% of normal-karyotype male spermatozoa carry structural aberrations, including breaks and gaps, acentric and dicentric fragments, ring chromosomes, deletions, duplications, translocations, inversions, insertions and marker chromosomes (50). An increased number of structural abnormalities has been observed in balanced reorganisation carriers (51). The segmental imbalances detected in the embryos might be gained or lost segments integrated into chromosomes with active centromeres, which were probably originated as a consequence of a chromosome instability in the first embryo divisions (52), rather than having a paternal origin, as all DNA imbalances not integrated into chromosomes with active centromeres would have been lost through the embryo divisions.

The fact that no increased incidence of segmental imbalances has been observed in embryos from couples carrying chromosome rearrangements or sperm abnormal FISH also suggests that these imbalances are a general phenomenon linked to the early embryo divisions, as previously described in normal karyotype patients (19,52).

This is the first time that, to our knowledge, a comprehensive chromosome analysis has been performed in PGD for a patient with globozoospermia. Until now, ICSI had been the only therapeutic option applied (28), however, a high aneuploidy risk in the embryos has been described (53). The four embryos analysed from Couple H displayed cytogenetic abnormalities, with 2-22 aneuploid events and segmental imbalances being present in two of them. Reanalysis of the discarded embryos confirmed, in isolated blastomeres, that three embryos were chaotic and one was mosaic. The mechanism involved in aneuploidy generation was mitotic in the mosaic embryo, while in the chaotic embryos meiotic segregation errors were additionally observed. FISH results of one blastomere from embryo H4 were consistent with the CGH results and indicated that the corresponding sperm was not polyploid, as it had been suggested to be a possible origin of aneuploidy in some globozoospermic patients (54). The fact that an embryo containing exclusively mitotic errors showed the most relevant presence of segmental imbalances has led us to infer that meiotic abnormalities are not compulsory to trigger chromosome instability during the first embryo divisions.

As nearly 60% of the segmental imbalances detected in this work are located close to previously described fragile sites of the genome (32), it can be inferred that chromosome breaks have been generated due to the chromosome instability present in the first embryo divisions (52), as a consequence of an active proliferation stage, as found in other proliferative cell-stages (33). According to this, chromosomal instability

has also been detected previous to embryo formation, in female germ-line proliferative cells (33).

The SDF was successfully characterised for all patients except for Patient H, due to a severe oligozoospermia. The ssSDF and dsSDF patterns of five of the patients (A, C, D, E and F) were concordant with previously defined patient groups (11,12), while two patients (B and G) showed a SDF behaviour (high ssSDF and low dsSDF) described here for the first time. Patients carrying chromosome reorganisations showed variable Comet classifications (Table II), in agreement with previously published results, which describe a high variability between reorganisation carriers (27), however, they showed high SCD values and low dsSDFs.

Several studies have associated SDF with low IVF success for repeated implantation failure (7,55-57), nevertheless, this is the first time that a comprehensive cytogenetic analysis has been performed in evolved IVF embryos from patients undergoing PGD, with characterised SDF. The global SDF measured with the SCD test has been found to correlate with higher aneuploidy rates in the IVF embryos, but this could be attributable to the ICE detected in the balanced chromosome rearrangement carriers included, which showed high SCDt values. A previous study of 154 embryos with FISH of nine chromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y) showed no correlation between the SDF measured with the TUNEL assay and the embryo aneuploidy rate (25). Moreover, in the present work, high dsSDF values correlated with lower aneuploidy rates in the embryos generated, a fact also attributable to the low dsSDF and the high ICE found in cases with reorganised male karyotypes.

No embryo transfer was performed in couples from the created Group 4 (high ssSDF and low dsSDF) due to the presence of both aneuploidies and segmental imbalances in all of the embryos, however, more comprehensive PGD analysis combined with Comet

analysis would be desirable to better establish a hypothetical negative fertility correlation to this SDF profile.

Pregnancies were achieved in two out of the five cases where embryo transfer was performed: Couple C, with low ssSDF and low dsSDF, delivered both transferred embryos, and Couple D, with low ssSDF and high dsSDF, delivered the only embryo transferred. It had previously been postulated that dsSDF might be easier to get repaired, as males with proven fertility showed either low or high dsSDF (11). Recently, the neutral Comet assay, measuring these dsDNA breaks, has been shown to not be informing of the fertility status of the patients (58).

The present results are consistent with the fact that ssSDF is the limiting factor for achieving pregnancy, as pregnancies have only been achieved in couples showing the lowest ssSDF values (Tables II and IV). No correlation was found between ssSDF and embryo aneuploidy rates, however, this SDF may have a later negative effect, not present at the zygote- or the cleavage-stage embryos, but rather in the blastocyst stage or even after embryo implantation (57). The alkaline Comet assay, measuring ssSDF, has been shown to be the most accurate method for predicting male infertility (58).

In conclusion, among those studied, the ssSDF is the most useful predictive parameter for the IVF outcome, as low ssSDF seems to indicate a good prognosis for pregnancy achievement. In contrast, the present work confirms that high dsSDF does not prevent a couple from achieving pregnancy and correct embryo development. SDF characterisation and comprehensive chromosome analysis in PGD have been demonstrated to be highly appropriate in IVF cycles for male-factor infertility. SDF and, specifically, ssSDF, is a useful fertility biomarker that should be more extensively used in IVF cycles to enable a stronger correlation between SDF and parameters such as embryo quality, embryo cytogenetics and IVF success.

Acknowledgements

We wish to thank the couples that decided to participate in this study.

Funding

This study was funded by the *Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto Carlos III* (PI 080012, PI 1100625) and *Grup de Suport a la Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107). The first author had a pre-doctoral grant from the *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. de Kretser, DM. Male infertility. *Lancet* 1997;349:787-90.
2. Fleming, S, Green, S, Hall, J. Analysis and alleviation of male infertility. *Microsc Microanal* 1995;35:37-9.
3. Shi, Q, Martin, RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90:219-26.
4. Harton, GL, Tempest, HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl* 2012;14:32-9.
5. Gianaroli, L, Magli, MC, Ferraretti, AP. Sperm and blastomere aneuploidy detection in reproductive genetics and medicine. *J Histochem Cytochem* 2005;53:261-7.
6. Simon, L, Lutton, D, McManus, J, Lewis, SE. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011;95:652-7.
7. Simon, L, Proutski, I, Stevenson, M, Jennings, D, McManus, J, Lutton, D, et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;26:68-78.
8. Agarwal, A, Said, TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331-45.
9. Enciso, M, Sarasa, J, Agarwal, A, Fernandez, JL, Gosalvez, J. A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009;18:609-16.
10. Fernandez, JL, Muriel, L, Goyanes, V, Segrelles, E, Gosalvez, J, Enciso, M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833-42.
11. Ribas-Maynou, J, Garcia-Peiro, A, Fernandez-Encinas, A, Amengual, MJ, Prada, E, Cortes, P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012;7:e44679.
12. Ribas-Maynou, J, Garcia-Peiro, A, Abad, C, Amengual, MJ, Navarro, J, Benet, J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012;27:652-8.
13. Daphnis, DD, Fragouli, E, Economou, K, Jerkovic, S, Craft, IL, Delhanty, JD, et al. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:117-25.
14. Mertzaniidou, A, Spits, C, Nguyen, HT, Van de Velde, H, Sermon, K. Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development. *Hum Reprod* 2013;28:1716-24.
15. Mertzaniidou, A, Wilton, L, Cheng, J, Spits, C, Vanneste, E, Moreau, Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013;28:256-64.
16. Munne, S, Chen, S, Colls, P, Garrisi, J, Zheng, X, Cekleniak, N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007;14:628-34.
17. Rius, M, Daina, G, Obradors, A, Ramos, L, Velilla, E, Fernandez, S, et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related

- aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;95:413-6.
18. Voullaire, L, Wilton, L, McBain, J, Callaghan, T, Williamson, R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1035-41.
 19. Wells, D, Delhanty, JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1055-62.
 20. Rabinowitz, M, Ryan, A, Gemelos, G, Hill, M, Baner, J, Cinnioglu, C, et al. Origins and rates of aneuploidy in human blastomeres. *Fertil Steril* 2012;97:395-401.
 21. Xanthopoulou, L, Ghevaria, H, Mantzouratou, A, Serhal, P, Doshi, A, Delhanty, JD. Chromosome breakage in human preimplantation embryos from carriers of structural chromosomal abnormalities in relation to fragile sites, maternal age, and poor sperm factors. *Cytogenet Genome Res* 2012;136:21-9.
 22. Rubio, C, Gil-Salom, M, Simon, C, Vidal, F, Rodrigo, L, Minguez, Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084-92.
 23. Vegetti, W, Van Assche, E, Frias, A, Verheyen, G, Bianchi, MM, Bonduelle, M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
 24. Goossens, V, Traeger-Synodinos, J, Coonen, E, De Rycke, M, Moutou, C, Pehlivan, T, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. *Hum Reprod* 2012;27:1887-911.
 25. Bronet, F, Martinez, E, Gaytan, M, Linan, A, Cernuda, D, Ariza, M, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Hum Reprod* 2012;27:1922-9.
 26. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th edn. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press. 2010.
 27. Garcia-Peiro, A, Oliver-Bonet, M, Navarro, J, Abad, C, Guitart, M, Amengual, MJ, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl* 2011;34:e546-53.
 28. Heindryckx, B, Van der Elst, J, De Sutter, P, Dhont, M. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod* 2005;20:2237-41.
 29. Gutierrez-Mateo, C, Wells, D, Benet, J, Sanchez-Garcia, JF, Bermudez, MG, Belil, I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:2118-25.
 30. Rius, M, Obradors, A, Daina, G, Cuzzi, J, Marques, L, Calderon, G, et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010;25:1824-35.

31. Moore, DH, 2nd, Pallavicini, M, Cher, ML, Gray, JW. A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997;28:183-90.
32. Mrasek, K, Schoder, C, Teichmann, AC, Behr, K, Franze, B, Wilhelm, K, et al. Global screening and extended nomenclature for 230 aphidicolin-inducible fragile sites, including 61 yet unreported ones. *Int J Oncol* 2010;36:929-40.
33. Daina, G, Ramos, L, Rius, M, Obradors, A, Del Rey, J, Giralt, M, et al. Non-meiotic chromosome instability in human immature oocytes. *Eur J Hum Genet* 2013.
34. Fragouli, E, Alfarawati, S, Daphnis, DD, Goodall, NN, Mania, A, Griffiths, T, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011;26:480-90.
35. Fragouli, E, Wells, D, Thornhill, A, Serhal, P, Faed, MJ, Harper, JC, et al. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Hum Reprod* 2006;21:2319-28.
36. Wells, D, Escudero, T, Levy, B, Hirschhorn, K, Delhanty, JD, Munne, S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78:543-9.
37. Alfarawati, S, Fragouli, E, Colls, P, Wells, D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011;26:1560-74.
38. Rius, M, Obradors, A, Daina, G, Ramos, L, Pujol, A, Martinez-Passarell, O, et al. Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;96:134-42.
39. Bernicot, I, Dechanet, C, Mace, A, Hedon, B, Hamamah, S, Pellestor, F, et al. Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Hum Reprod* 2010;25:1818-23.
40. Anton, E, Vidal, F, Egozcue, J, Blanco, J. Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil Steril* 2006;85:661-6.
41. Lejeune, J. Autosomal Disorders. *Pediatrics* 1963;32:326-37.
42. Anton, E, Blanco, J, Vidal, F. Meiotic behavior of three D;G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *J Hum Genet* 2010;55:541-5.
43. Oliver-Bonet, M, Navarro, J, Carrera, M, Egozcue, J, Benet, J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod* 2002;8:958-63.
44. Alfarawati, S, Fragouli, E, Colls, P, Wells, D. Embryos of robertsonian translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development. *PLoS Genet* 2012;8:e1003025.
45. Gianaroli, L, Magli, MC, Ferraretti, AP, Munne, S, Balicchia, B, Escudero, T, et al. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 2002;17:3201-7.

46. Escudero, T, Lee, M, Stevens, J, Sandalinas, M, Munne, S. Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* 2001;21:760-6.
47. Amiel, A, Sardos-Albertini, F, Fejgin, MD, Sharony, R, Diukman, R, Bartoov, B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet* 2001;46:245-50.
48. Martin, RH. Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 14 (q24.1q32.1). *Am J Hum Genet* 1999;64:1480-4.
49. Mikhaail-Philips, MM, Ko, E, Chernos, J, Greene, C, Rademaker, A, Martin, RH. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A* 2004;127A:139-43.
50. Templado, C, Bosch, M, Benet, J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:199-205.
51. Estop, AM, Marquez, C, Munne, S, Navarro, J, Cieply, K, Van Kirk, V, et al. An analysis of human sperm chromosome breakpoints. *Am J Hum Genet* 1995;56:452-60.
52. Vanneste, E, Voet, T, Le Caignec, C, Ampe, M, Konings, P, Melotte, C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577-83.
53. Moretti, E, Collodel, G, Scapigliati, G, Cosci, I, Sartini, B, Baccetti, B. 'Round head' sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2005;37:297-303.
54. Perrin, A, Coat, C, Nguyen, MH, Talagas, M, Morel, F, Amice, J, et al. Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *Andrologia* 2013;45:1-9.
55. Benchaib, M, Braun, V, Lornage, J, Hadj, S, Salle, B, Lejeune, H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023-8.
56. Benchaib, M, Lornage, J, Mazoyer, C, Lejeune, H, Salle, B, Francois Guerin, J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007;87:93-100.
57. Tesarik, J, Greco, E, Mendoza, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004;19:611-5.
58. Ribas-Maynou, J, Garcia-Peiro, A, Fernandez-Encinas, A, Abad, C, Amengual, MJ, Prada, E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology* 2013.

Figure legends

Figure 1. Aneuploid events detected in the PGD applications.

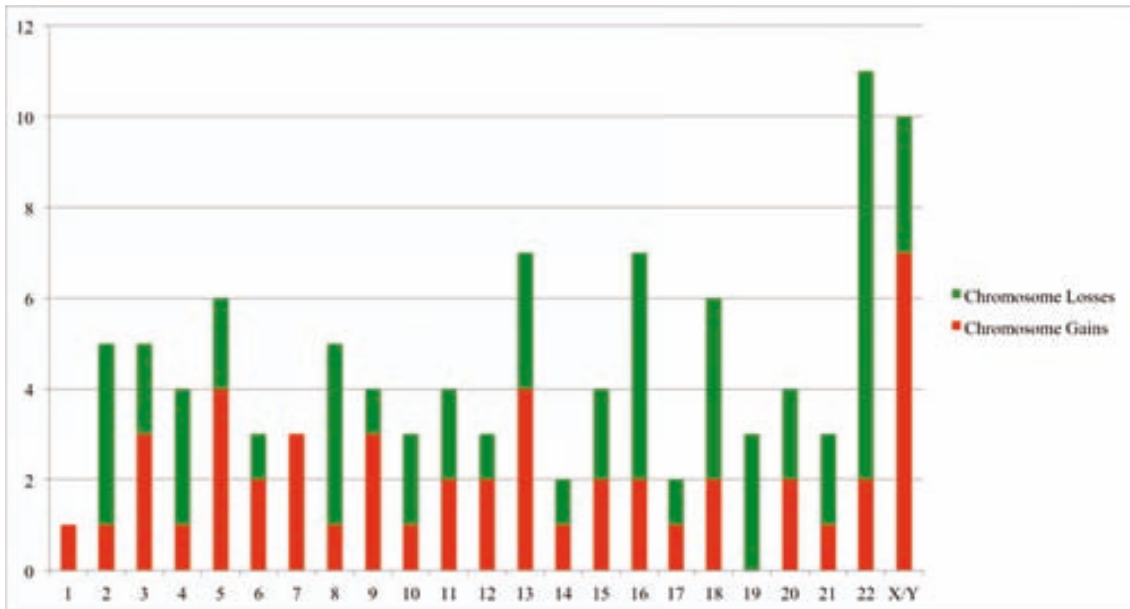
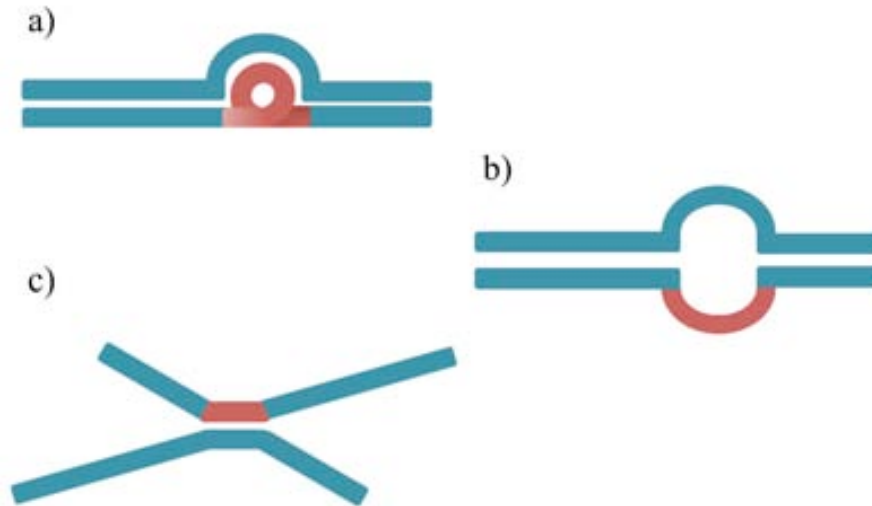


Figure 2. Segmental imbalances detected in the PGD applications.



Figure 3. Possible meiotic figures produced in spermatogenesis from male 46,XY,inv(2)(p11.2q13). a) Inverted and non-inverted regions pairing, b) non-inverted regions pairing, and c) inverted region pairing.



Tables

Table I. ART indications from the couples included in the study. Description of the abnormal karyotypes, seminogram classification and progenitor ages.

C	Indication	Abnormal karyotype	Seminogram	Maternal age	Paternal age
A	Paternal translocation	45,XY,der(14;21)(q10;q10)	Oligoasthenoteratozoospermia	33 - 34 (1 st - 2 nd cycle)	39 – 40 (1 st - 2 nd cycle)
B	Paternal translocation	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Oligozoospermia	31	39
C	Paternal inversion, RIF	46,XY,inv(2)(p11.2q13)	Oligoasthenozoospermia	34	36
D	AMA, RM		Asthenoteratozoospermia	37	43
E	RM, sperm abnormal FISH		Normozoospermia	34	36
F	RIF		Asthenozoospermia	35	37
G	Primary sterility, sperm abnormal FISH		Normozoospermia	33	36
H	Globozoospermia, sperm abnormal FISH		Severe oligoasthenoteratozoospermia	36	38

C: Couple, AMA: Advanced Maternal Age, RM: Recurrent Miscarriage, RIF: Repeated Implantation Failure.

Table II. SDF values obtained by the SCD test and alkaline and neutral Comet assays.

Group classification of each couple depending on the Comet assay results.

Couple	SCD (%)	Alkaline Comet (%)	Neutral Comet (%)	Group
A	-	51	52	1
B	39	59	54	4
C	48.25	47	43	1
D	20	13	92	2
E	22	30.4	96.6	2
F	24	53	94.4	3
G	46	68	72	4

Table III. Cytogenetic results from each PGD cycle.

Patient-Cycle	E.BI	Meiotic segr.	Aneuploidies			Sexual chr.	T/P/C
			Related to reorganisation	Other chromosomes	Structural errors		
A-1	2	2:1 alt		-3,+4,+5,+7,-8,-10,+11,+12,+13,-16,+18,-22,+Y	-17q,+20q	XYY	
	3	2:1 alt		-22	-	XY	
	4	2:1 alt		-22,+Y	-1q,+4q22q27	XYY	
	5	2:1 alt		+2	-	XX	
A-2	1	3:0	+14, +21	-2,-6,-8,-11,-15,+5,+9,+13,+20,+22,+X/Y	-	XXY	
	3	2:1 adj	+14	+9,+22	+5q31.2qter,+13q14.1q21.1	XY	
	5	2:1 alt		-	-	XX	T
B	1	2:1 adj	+14	-	+9q	XX	
	2	2:1 alt		-18	-	XX	
	4	2:1 alt		-	-2q24.3qter	XX	
	6	2:1 adj	+13/-14	-	+20p	XY	
	7	2:1 alt		-15	-	XY	
C	1	N or B		-22	-	XY	
	4	N or B		-22,+X,+X/Y	-	XXXXY	
	5	N or B		-13,-22	-	XX	
	8	N or B		-5,-19	-	XY	
	9	N or B		-3,-4,-9,-22,-X/Y	-	X	
	10	N or B		-	-	XX	T/P
	11	N or B		-X/Y	-	X	
	12			ND	ND		
	14	N or B		-19,+21	-	XY	
	18			ND	ND		
D	2			-	-	XX	C
	5			+20	-	XX	
	7			-13	-	XX	
	8			+Y	-4q28qter	XYY	
	9			-4	-	XY	
	10			-	+9p11qter	XY	
	11			-	-	XX	T/P
	13			-	-	XX	T/P
	14			-	-	XX	C
E	1			+16,+19	-4q	XY	
	3			-	+18p	XX	
	5			-	-	XY	NE

	7			-	-	XY	T
	12			-	-	XY	T
	13			-X	-	X	
	14			-	-	XX	T
	17			ND	ND		
F	1			-	-	XY	C/NE
	2			+18	-	XX	
	4			-	-18p	XX	
	5			-	-	XY	C/NE
	7			-	-7pcent14, -17p,+18p	XY	
	8			-	-	XX	T
	9			-	-20q	XX	
	10			-	-	XX	T
	11			-18	-	XX	
G	1			C- cont.	C- cont.		
	3			+16	-	XY	
	206			NA	NA		
	207			+16	-	XY	
H	4			+1,-2,+3,-4,+5,+6,+7, -8,+9,-10,+11,-12,-13, -14,+15,-16,-17,-18, -20,-21,-22,+X	-	XXX	
	7			-2,+3,-5,+6,-8, -11,+12,+14,+15,+16, +17,-18,-21,-22	-	XY	
	11			+10,+13	-2q21.3qter,+19q	XX	
	18			-2,+3,+5,+7,+8,+13, +16,-20	-1p21pter/ +1q21.3qter, +12pterq21.3/ -12q23qter, +19q	XY	

E.B1: Embryo.Blastomere, segr.: Segregation, chr.: Chromosome, N or B: Normal or Balanced, ND: Non-diagnosed, NA: Non-amplified, C- cont.: Contamination of the blastomere's negative control, T/P/C: Transferred/Pregnancy/Cryopreserved, NE: Non-evolving.

Table IV. WGA system used, rates of euploidy, aneuploidy and structural abnormalities obtained in the each PGD cycle.

Couple	WGA	Euploid embryos (%)	Aneuploid embryos (%)	Embryos with structural abnormalities (%)	Transferred embryos
A	A-1: DOP-PCR	0/4 (0)	4/4 (100)	2/4 (50)	0/4
	A-2: SurePlex	1/3 (33.3)	2/3 (66.7)	1/3 (33.3)	1/3
B	SurePlex	0/5 (0)	4/5 (80)	3/5 (60)	0/5
C	SurePlex	1/8 (12.5)	7/8 (87.5)	0/8 (0)	1/8*
D	DOP-PCR	4/9 (44.4)	4/9 (44.4)	2/9 (22.2)	2/4*
E	DOP-PCR	4/7 (57.1)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)	3/4
F	SurePlex	4/9 (44.4)	2/9 (22.2)	3/9 (33.3)	2/4
G	SurePlex	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2
H	SurePlex	0/4 (0)	4/4 (100)	2/4 (50)	0/4
Total		14/51(27.5)	31/51 (60.8)	15/51 (29.4)	9/51

*Pregnancy and normally born children.

Appendix 1.

Re-analysis from discarded embryos.

Patient-Cycle	E.BI	Meiotic segregation	Aneuploidies	Structural errors	Karyotype
A-1	2.1	2:1 alt	-3,-8,-10,+11,+12,+13,-15,+18,-X	+1q,+4q,-5p/+5q,+6q12q24,-17p,-20p	45,Y,-3,-8,-10,+11,+12,+13,-15,+18,+1q,+4q,-5p/+5q,+6q12q24,-17p,-20p
	2.2	2:1 alt	-1,+3,-5,+6,+7,+9,-13,+15,+18,+X/Y	-2pterq21.3,+4q,-17q	50,XXY,-1,+3,-5,+6,+7,+9,-13,+15,+18,-2pterq21.3,+4q,-17q
	3.2	2:1 alt	-	-	46,XY
	4	2:1 alt	-1,+2,+5,-7,-8	-	45,XY,-1,+2,+5,-7,-8
	5	2:1 alt	+17	-1q,+16p,+19p	47,XX,+17,-1q,+16p,+19p
B	1	2:1 alt	-	-	46,XX
	2	2:1 alt	-18	-	45,XX,-18
	4	2:1 alt	-	-	46,XX
	6	2:1 alt	-	-	46,XY
	7.1	2:1 alt	-15,+16	+20q	46,XY,-15,+16,+20q
	7.2	2:1 alt	-	-	46,XY
	7.3	2:1 alt	-	-	46,XY
C	1.1	N or B	-	-	46,XY
	1.2	N or B	-	-	46,XY
	4	N or B	-X/Y	+16p,+18p	45,X,+16p,+18p
	5.1	N or B	-13	-	45,XX,-13
	8	N or B	-5	+16p	45,XY,-5,+16p
	11.1	N or B	-X	-Xq13q23	45,X,-Xq13q23
	14	N or B	-	-	46,XY
E	1		-	-	46,XY
	3		+X	-	47,XXX
	13		-	-	46,XY
	17		NA	NA	NA
F	2.1		-	-	46,XX
	2.2		-	-	46,XX
	4.1		-	-	46,XX
	4.2		-	-	46,XX
	4.3		-	-	46,XX
	7.1		-	-	46,XY
	7.2		-	-	46,XY
	9.1		-	+18p	46,XX,+18p
	9.2		-	-	46,XX

	9.3		-	-	46,XX
	11.1		-	-	46,XX
	11.2		-	+10p13pter	46,XX,+10p13pter
G	1.4		-	-	46,XX
	3.2		+16	-	47,XY,+16
	3.4		+16	-3q24qter	47,XY,+16,-3q24qter
	3.5		+16	-	47,XY,+16
	3.6		+16	-	47,XY,+16
	3.7		+16	-	47,XY,+16
	206.1		NA	NA	NA
	206.2		NA	NA	NA
	207.1		+16	-	47,XY,+16
	207.2		+16	-	47,XY,+16
	207.3		+16	-	47,XY,+16
	207.4		-9,+16	-	46,XY,-9,+16
	207.5		+16	-	47,XY,+16
H	4.1		+1,+3,+5,+6,+7, -8,+9,+11,+15, -18,+19,-22,+X	-	53,XXX,+1,+3,+5, +6,+7,-8,+9,+11, +15,-18,+19,-22
	4.2		+1,+2,-3,-4,+6,-7, -8,-9,-10,+11,+13, +14,+15,+16, -17,+18,+20,-21, -22,-X	+5q,+12q22qter	46,X,+1,+2,-3, -4,+6,-7,-8,-9, -10,+11,+13,+14, +15,+16,-17, +18,+20,-21, -22,+5q,+12q22qter
	7.1		-1,+2,+3,+5,+6,+7, -10,-12,+16,-17, -18,+19,+22	-	49,XX,-1,+2,+3,+5, +6,+7,-10,-12,+16, -17,-18,+19,+22
	7.2		+2,+3,-4,-7,-8,-9, -13,+14,-16,-18,- 19,-20,+21,-XX	-	39,+2,+3,-4,-7,-8, -9,-13,+14,-16,-18, -19,-20,+21
	11.1		+2,+10,+13	-	49,XX,+2,+10,+13
	11.2		+10	+2q21.3qter	47,XX,+10, +2q21.3qter
	18.1		+22	-1p,-12q23qter	47,XY,+22,-1p, -12q23qter
	18.2		-	-1p,+12q22qter	46,XY, -1p,+12q22qter

E.BI: Embryo.Blastomere, N or B: Normal or Balanced, NA: Non-amplified.

Annex 3

Article “Oligonucleotide array-CGH vs. metaphase CGH and BAC array-CGH for single-cell analysis: Application in a Preimplantation Genetic Diagnosis for a balanced Robertsonian translocation”

Title: Oligonucleotide array-CGH vs. metaphase CGH and BAC array-CGH for single-cell analysis: Application in a Preimplantation Genetic Diagnosis for a balanced Robertsonian translocation

Running title: mCGH and aCGH in Preimplantation Genetic Diagnosis

L. Ramos,¹ G. Daina,¹ J. Del Rey,¹ A. Fernandez-Encinas,¹ O. Martinez-Passarell,² M. García-Aragonés,³ L. Armengol,³ M. Parriego,⁴ M. Boada,⁴ M.R. Martorell,⁵ O. Casagran,⁶ J. Benet,¹ J. Navarro^{1*}

1. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.
2. Fundació Puigvert. Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu, 08025 Barcelona, Spain.
3. qGenomics Laboratory, 08003 Barcelona, Spain
4. Institut Universitari Dexeus, 08028 Barcelona, Spain.
5. Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic. Clínica Girona, 17002 Girona, Spain.
6. Genomic Service. Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), 08193 Bellaterra, Spain.

Corresponding author:

Joaquima Navarro Ferretè

E-mail: Joaquina.Navarro@uab.cat

Phone: +34 93 581 1724

Fax: +34 93 581 1025

Abstract

Study question: Do metaphase-CGH (mCGH), bacterial artificial chromosome array-CGH (BAC a-CGH) and oligonucleotide aCGH give equivalent cytogenetic profiles in single-cell analysis? Are they comparable in terms of diagnostic accuracy, time consumption and costs?

Summary answer: mCGH, BAC aCGH and oligonucleotide aCGH have provided highly comparable cytogenetic profiles. The use of aCGH techniques, however, has given an increased resolution and an optimisation of the cytogenetic analysis. Oligonucleotide aCGH provides, with the highest cost of materials, a higher diagnostic resolution, allowing for embryo transfer without the need of cryopreservation when following the Agilent single-cell approach.

What is known already: There is a high incidence of aneuploidy and segmental imbalances in early human embryos. Preimplantation Genetic Screening (PGS) is used to select, for transfer, only euploid embryos in order to increase the pregnancy rates in *in vitro* fertilisation (IVF) cycles. Comprehensive chromosome analysis techniques such as mCGH and aCGH are available for the whole-chromosome complement analysis, being able to detect both aneuploidies and segmental imbalances.

Study design, size, duration: A comparison between mCGH and oligonucleotide aCGH approaches analysing single fibroblasts from known aneuploid cell-lines and single blastomeres from human cleavage-stage embryos is performed. Afterwards, the cytogenetic results obtained from single blastomeres using BAC aCGH are compared with their oligonucleotide aCGH re-analysis.

The oligonucleotide aCGH methodology was applied in a PGD for a Robertsonian translocation carrier 45,XY,der(13;14)(q10;q10) with two available array formats from

Agilent (4x180K and 8x60K). Results were also compared to those obtained with mCGH. The study was performed between March 2012 and May 2013.

Participants/materials, setting, methods: For the set-up of oligonucleotide aCGH, 15 fibroblasts from cell-lines GM03184, GM03676 and GM03330 (Coriell), previously analysed by mCGH, were used. A total of 34 blastomeres from a previous investigation project on cryopreserved human embryos and PGD cases previously performed with mCGH or BAC aCGH were re-analysed by oligonucleotide aCGH. In the PGS application for a male carrying a balanced Robertsonian translocation, single-biopsied blastomeres from nine cleavage-stage embryos were analysed.

Main results and the role of chance: All three comprehensive analysis techniques provide highly equivalent cytogenetic profiles. When comparing cytogenetic results from two techniques (oligonucleotide aCGH vs. mCGH or BAC aCGH), divergences between the detection of segmental imbalances or whole-chromosome aneuploidies for a given chromosome, and the detection of some different chromosomes involved in extensive aneuploidies, have been observed. aCGH techniques have shown an increased resolution and an optimisation of the analysis, however, the mCGH resolution of 10Mb-20Mb is not a limiting factor to report structural imbalances in PGD.

Limitations, reasons for caution: Extensive comparative studies may be performed to support the present conclusions.

Wider implications of the findings: A comparison between three techniques available for the comprehensive chromosome analysis in PGD has been performed, reporting the cytogenetic results obtained and discussing the main points of interest when deciding the methodology of choice: resolution, time consumption and cost. Validity of the less commonly used aCGH methodology (oligonucleotide aCGH) has been confirmed after

being successfully used in an IVF-PGD application for a male carrying a balanced Robertsonian translocation.

Study funding/competing interest(s): This work was funded by the *Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto Carlos III* (PI 08/0012, PI 11/00625) and *Grup de Suport a la Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107). The first author had a pre-doctoral grant from the *Universitat Autònoma de Barcelona*. The authors declare no conflict of interest.

Key words

Oligonucleotide aCGH, BAC aCGH, mCGH, PGD

Introduction

In vitro fertilised (IVF) embryos have a high aneuploidy rate, ranging from 30% to 65% when assessed by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) in blastomeres from cleavage-stage embryos (1,2). Since the use of comprehensive analysis techniques, it has been found that the true level of aneuploidy at this stage is even higher (3-7). Aneuploidy is a major issue in advanced-maternal-age (AMA) patients and balanced translocation carriers (8-11), however, it should not be underestimated in embryos from young couples with repeated implantation failures (12), recurrent miscarriages (13) or idiopathic sterility (14). Aneuploidy has also been observed in oocytes from donors (15,16) and in polar bodies and embryos from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) for monogenic diseases (17-19). Preimplantation Genetic Screening (PGS) is a variant of PGD, whose aim is to select for transfer those embryos with no chromosome abnormalities, being an option for increasing the pregnancy rate in couples with the above-mentioned indications (20,21). Comprehensive cytogenetic analysis techniques,

such as metaphase comparative genomic hybridisation (mCGH), array-CGH (aCGH) or single-nucleotide polymorphism arrays (SNP-arrays), allow for the detection of not only aneuploidies, but also of segmental imbalances in cleavage-stage embryos (9,10,22-25) and blastocysts (Liang et al., 2013). Until the application of mCGH, it had not been possible to analyse all of the chromosome complement in a single hybridisation step nor to analyse all chromosome length with a resolution of 10Mb-20Mb (26). The implementation of aCGH and SNP-arrays increased this resolution, allowing for the detection of smaller segmental imbalances (27). Partial chromosome gains and losses have been explained by breakpoints in chromosomal fragile sites (3,7).

Comprehensive analysis techniques require cellular DNA amplification due to the cells' low initial content and, in this sense, a variety of whole-genome amplification (WGA) techniques have been validated (28-31). Depending on the WGA system used (DOP-PCR or SurePlex), the comprehensive cytogenetic analysis performed (mCGH or BAC array-CGH) and the type of data correction applied, variable correlations between the incidence of segmental imbalances and the blastomeres' replicative cell-stage have been detected (Ramos et al., unpublished data; Van der Aa et al., 2013). Array-CGH is presently a methodology of choice for many PGS applications, with the 24Sure BAC array (BlueGnome, Cambridge, UK) being the most widely used platform in polar bodies, single blastomeres and trophectoderm cells (11,33). This type of array contains 3,000 bacterial artificial chromosome (BAC) probes covering $\approx 25\%$ of the genome, with a resolution of 5Mb-10Mb. Given the possibility of detecting small structural imbalances, this methodology has already been applied in PGS for translocation carriers (34). Other BAC aCGH platforms have also been successfully used for single-cell analysis (25,35,36).

Array-CGH based on oligonucleotide probes (SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, Agilent Technologies) gives a higher resolution and coverage of the genome due to the higher amount of DNA probes (from 80,000 to 1M), which are smaller in length. They have been successfully used for single-cell analysis (37,38) and PGD of single blastomeres (39) and trophectoderm cells (40).

In the present work, after the set-up of an oligonucleotide-based aCGH methodology (Agilent) in isolated fibroblasts from cell-lines with known aneuploidies, its efficiency in detecting not only aneuploidies but also segmental imbalances has been evaluated by comparing the cytogenetic results obtained from single blastomeres previously analysed by mCGH or BAC aCGH (BlueGnome). The incidental detection of artifactual profiles in mCGH and both types of aCGH mentioned was also an interesting issue to be evaluated. Moreover, the successful application of the oligonucleotide-based aCGH approach (Agilent) in a PGD cycle for a male carrying a Robertsonian translocation was also a challenge from this work

Materials and methods

Samples for the set-up of the Agilent Oligonucleotide CGH arrays

Fifteen single fibroblasts from different cell-lines (Coriell, New Jersey), previously validated by CGH, were analysed using Agilent Oligonucleotide aCGH: eight 47,XY,+15 fibroblasts from cell-line GM03184, four 48,XY,+2,+21 fibroblasts from cell-line GM03676 and three 47,XY,+13 fibroblasts from cell-line GM03330.

Thirty-four blastomeres from human embryos previously analysed by mCGH (18) or BlueGnome BAC aCGH (16) were analysed with the Agilent oligonucleotide aCGH. Blastomeres were obtained from cryopreserved embryos donated to a previous study (1-9) (unpublished data), PGDs previously performed in collaboration with *Fundació*

Puigvert (10-13: PGD for a globozoospermia, 14-18: PGD for a male carrier of a Robertsonian translocation, 45,XY,der(13;14)(q10;q10)) and PGDs previously performed in the *Institut Universitari Dexeus* (19-34: PGDs for six different couples with either male factor or repeated implantation failures) (Tables I and II).

PGD for a Robertsonian translocation

A PGD cycle for a Robertsonian translocation was performed in collaboration with the *Fundació Puigvert*, in Barcelona (Spain). The family signed the corresponding informed consent. The male karyotype was 45,XY,der(13;14)(q10;q10) and the female, 29 y.o., had a normal karyotype (46,XX). The seminogram showed a severe *teratozoospermia* and the sperm DNA fragmentation was 29%, measured by the SCD test as previously described (41). Neutral and alkaline Comet assays showed high single-strand SDF (62.8%) and high double-strand SDF (94%) (42). Increased disomies and nullisomies for chromosome 13 and the sexual chromosomes were detected with FISH analysis of chromosomes 13, 18, 21, X and Y of a semen sample.

The female underwent a routine superovulation procedure and embryos were fertilised on Day 0 by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). On day 3 after fertilisation, one blastomere from nine evolved embryos that had reached the 6-8-cell stage was biopsied using Tyrode's acid. The comprehensive cytogenetic analysis was performed with Agilent oligonucleotide aCGH and a re-analysis was performed by CGH. The discarded embryos on Day 5 were analysed as a whole by CGH.

Cell lysis and DNA amplification

All single cells were lysed and their DNA was amplified following the SurePlex DNA Amplification System (BlueGnome, Cambridge, UK), according to the manufacturer's instructions. Electrophoresis on a 1.5% agarose gel was used to evaluate the correct DNA amplification of each sample (smears between 200pb and 1500pb).

Oligonucleotide aCGH

The SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California) was used following the manufacturer's instructions. Set-up of the methodology was performed with the Agilent protocol for genomic DNA (array formats 1x1M, 2x400K, 4x180K and 8x60K) and the protocol for single-cell analysis (array format 8x60K).

The PGD application was performed with Agilent single-cell methodology using 13 µl of SurePlex amplification in 8x60K arrays with 16-hour hybridisation, following the manufacturer's instructions. Hybridisation of the same DNA amplification product was also performed on 4x180K arrays to set up the Agilent single-cell protocol in this array format. A volume of 26 µl from each DNA amplification product was labelled by adding 5 µl of *Random primer* to each tube and incubating this 3 min at 95°C and 5 min at 4°C; 10 µl of 5x *Reaction buffer*, 5 µl of 10x *dNTPs*, 3 µl of *Cy5-dUTP* and 1 µl of *Klenow* enzyme were added, and incubation for 2h at 37°C and 10min at 65°C was performed. The same procedure was followed for the reference DNA. After purification of the labelled samples, test and reference DNA were mixed (1:1) with 5 µl *Cot-DNA* (Roche), 11 µl of *Blocking agent* and 55 µl of 2x *HI-RPM Hybridisation Buffer*. A total of 100 µl from each sample were hybridised. Sixteen-hour hybridisation was performed at 65°C and 20 rpm in the Agilent Hybridisation Oven.

Workbench Standard Edition software (Agilent) was used for the cytogenetic analysis. The ADM-2 algorithm was applied for analysis and a threshold of 10 was used for determining cytogenetic abnormalities. A minimum of 10 consecutive gained or lost probes was required to describe an unbalanced region.

BAC aCGH

SurePlex 24sure V3 CGH arrays (BlueGnome) were used following the manufacturer's instructions. BlueFuse Multi software (BlueGnome) was used for the cytogenetic analysis.

mCGH

The CGH procedure was performed as previously described (43). Analysis was performed capturing 12 metaphases per sample with a Nikon 90i epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Evaluation of the hybridisation was made using the Isis CGH software (MetaSystems, Altussheim, Germany). To diagnose chromosome gains and losses, thresholds were fixed at 0.8 and 1.2, respectively.

Interpretation criteria

Chromosome 17, 19 and 22 aneuploidies have been considered as being technical artifacts when all three chromosomes were simultaneously gained or lost in the same cell; otherwise, they were considered as being real aneuploidies. Deviation of 1p33pter was also considered to be artifactual, as previously described (7,44,45).

Ethical Approval

Authorisation from the *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida* (CNRHA) in Spain was specifically obtained to process cryopreserved embryos from families that discarded using them for reproductive purposes. All of the families involved in this project signed an authorised informed consent. IVF-PGD cycles were approved by each centre's Ethics Committee and the families involved signed the corresponding informed consent.

Results

Set-up of the Agilent Oligonucleotide aCGH

Agilent protocol for genomic DNA analysis was validated for single-cell analysis using amplified DNA product from single fibroblasts with all available slide formats (1x1M, 2x400K, 4x180K, 8x60K). The Agilent single-cell protocol was validated with 8x60K arrays. The cell-lines' known abnormalities were detected in both mCGH and Agilent aCGH in 100% (15/15) of the cells analysed (data not shown).

Re-analysis of 34 blastomeres previously analysed by mCGH or BAC aCGH gave an equivalent cytogenetic diagnosis using Agilent aCGH in all of the cases (Tables I and II).

Of the 18 blastomeres previously analysed by mCGH, nine showed completely coincident cytogenetic results when analysed by Agilent aCGH; four showed extra segmental imbalances; four were partially coincident as, although showing extensive aneuploidies, different chromosomes were involved depending on the method used; and three showed aneuploidies for chromosomes that, using mCGH, showed segmental imbalances, or *vice versa* (Table I). Coincident profiles between mCGH and Agilent aCGH are shown in Figure 1.

Of the 16 blastomeres previously analysed by BAC aCGH, 13 showed totally coincident cytogenetic results when analysed by Agilent aCGH; one showed extra segmental imbalances; one was partially coincident as, although showing extensive aneuploidies, different chromosomes were involved depending on the method used; and two showed segmental imbalances with Agilent aCGH that were detected as aneuploidies with BAC aCGH (Table II). An example of partially coincident profiles between BAC aCGH and Agilent aCGH, with differences in the aneuploidies detected

and discrepancies between segmental imbalances and whole-chromosome aneuploidies, is shown in Figure 2.

PGD for a Robertsonian translocation

Single blastomeres biopsied from nine evolved embryos that had reached the 6-8-cell stage were analysed following the Agilent single-cell protocol in 8x60K arrays.

The meiotic segregation could be inferred in all of the embryos: 8/9 were normal or balanced for the chromosomes involved in the reorganisation (2:1 alternate segregation) and 1/9 resulted from an abnormal segregation (2:1 adjacent segregation). Aneuploidies not related to the reorganised chromosomes and/or segmental imbalances were detected in 7/9 embryos (77.7%) (Table III). Transfer of the two cytogenetically normal embryos was performed (E7 and E9), but pregnancy was not achieved.

Re-analysis of the same amplified DNA by mCGH and by the Agilent single-cell protocol applied to 4x180K arrays were totally coincident with the results previously obtained with 8x60K arrays in 6/9 embryos. In three of them (E2, E4 and E8), different types of abnormality, i.e., segmental imbalance or whole-chromosome aneuploidy, were detected for a particular chromosome, depending on the method used (Table III).

Analysis of the discarded embryos as a whole, by mCGH, confirmed the meiotic segregation in 6/7 embryos (Table IV). Divergent profiles from the single blastomere from E6, analysed in the PGD application, and the whole discarded embryo are shown in Figure 3.

Discussion

In the present work, an oligonucleotide-based aCGH methodology has been set up for single-cell cytogenetic analysis. Agilent aCGH has been shown to be a highly reliable technique for single fibroblast and blastomere analysis, providing cytogenetic results

comparable to those obtained with mCGH and BAC aCGH (SurePlex 24sure V3, BlueGnome).

When compared to mCGH, Agilent aCGH showed totally equivalent profiles for all of the fibroblasts analysed (15 out of 15) and nine out of 18 blastomeres (50%), while BAC aCGH and Agilent aCGH methodologies gave totally equivalent profiles in 13 out of 16 blastomeres (81.2%). Although showing abnormalities for the same chromosomes, divergences between the type of abnormality detected (segmental imbalance or whole-chromosome aneuploidy) were found between mCGH and Agilent aCGH in three blastomeres (16.7%), and between BAC aCGH and Agilent aCGH in two blastomeres (12.5%) (Tables I and II). It can be seen in Figure 1a how, i.e., chromosome 12 is given as a whole chromosome gain with the BAC aCGH analysis software, when it can be clearly seen that the gained region is limited to the q-arm. In this sense, it is important to establish more universal cytogenetic criteria to achieve totally concordant embryo diagnosis.

Four blastomeres analysed by mCGH (22.2%) and one blastomere analysed by BAC aCGH (6.25%) showed extensive aneuploidies with different chromosomes seeming to be involved when analysed by Agilent aCGH. These kinds of discrepancies between techniques are due to the fact that each analysis software has its own thresholds to determine gains and losses, which might be slightly different (Tables I and II). It can be seen in Figure 1a that the chromosome 19 profile is situated at the limit for chromosome gain, however the BAC aCGH analysis does not indicate this aneuploidy. With Agilent aCGH (Figure 1b), this chromosome is considered as being gained. Again, in this kind of interpretation, the specialised cytogeneticist should make the final decision.

Equivalent cytogenetic profiles with additional segmental imbalances were detected by Agilent aCGH in four blastomeres when compared with mCGH profiles (22.2%) and in

one blastomere when compared to BAC aCGH (6.25%). This fact could be due to an increased analysis resolution of the oligonucleotide-based aCGH when compared to the other techniques. The smallest unbalanced segment detected with Agilent aCGH comprised 11Mbp (Blastomere 28, Table II), the described theoretical resolution being of ≈ 20 kb (Table V). Both aCGH methodologies, but not mCGH, are able to determine the exact chromosome break-points generating the segmental imbalances found, Agilent aCGH being the most specific technique. These break-points found in human blastomeres have been described to correspond to fragile sites (3,7).

Regarding the generation of artifactual abnormal profiles, they have been detected with the three techniques regarding chromosomes 17, 19 and 22 and the segment 1p33pter, as previously reported (7,44,45).

Successful cytogenetic diagnosis was obtained for all embryos in the PGD application using oligonucleotide aCGH for the couple with a male carrier of a balanced Robertsonian translocation. The meiotic segregation pattern was identified in all of the embryos, showing that the 2:1 alternate segregation was the most frequently produced, in agreement with previously reported works (Table III) (10,46). However, re-analysis of the discarded embryos revealed that E6 was, in fact, originated by a 2:1 adjacent segregation gamete misdiagnosed in PGD. The presence of other highly amplified chromosome segments in this particular biopsied blastomere for PGD made it very difficult to detect a single-copy chromosome gain (+14) by both mCGH and aCGH analysis software (Figure 3).

In the PGD application, use of oligonucleotide aCGH showed that three-quarters of the embryos analysed showed aneuploidies and segmental imbalances not related to the reorganised chromosomes (Table III). Since the maternal age was not a risk factor, the high aneuploidy rate found in the PGD application could be attributable to an inter-

chromosomal effect (ICE), which has been widely described in previously published results of PGD for balanced Robertsonian translocation carriers (8,10,47). The segmental imbalances limits involved common fragile sites in 13 out of 15 of the cases (86.7%), so it could be inferred that most of the chromosome breaks generated during the early embryo divisions may occur in these fragile sites as a consequence of chromosome instability (3,5,7).

Only two of the re-analysed embryos on Day 5 showed cytogenetic abnormalities not related to segregation, while two had non-balanced chromosome complements and three were totally euploid (Table IV). This can be explained by the fact that only principal abnormalities present in the blastocyst can be detected, since complementary abnormalities would be compensated among cells. This is in agreement with an increased euploidy rate previously detected in embryos reanalysis at the blastocyst stage (48-50).

In the IVF-PGD case reported here, after the transfer of two cytogenetically euploid embryos, no pregnancy was achieved. The male showed a sperm DNA fragmentation pattern with high single- and double-strand DNA breaks, consistent with a bad prognosis for the IVF outcome as previously described (42,51), a fact that could explain this non-success in the embryo implantation.

It would be of interest for PGS candidate families to have the information related to each comprehensive chromosome analysis technique available; mainly, their resolution, time consumption and cost (Table V). No strong differences in the cytogenetic results are present between mCGH and aCGHs, as all of them have shown a high degree of accuracy in detecting not only aneuploidies, but also segmental imbalances. The higher resolution theoretically given by oligonucleotide aCGH might not always provide a

great advantage in WGA DNA products, as segmental imbalances of less than 5Mb-10Mb have not been reported (38-40).

Metaphase-CGH and both aCGH procedures described can be performed by instructed technicians and have equivalent duration. Time of analysis, however, is greatly shortened with the automatised scanning of array platforms and the analysis software used (Table V), nevertheless in the three methods described, a molecular cytogenetic specialist must be in charge for the embryos' final diagnosis. In the three methodologies described, cytogenetic results can be obtained on Day 4, enabling embryo transfer in the same IVF cycle (33,34,39,43).

Regarding the cost of each methodology, array methodologies have higher material costs, however, optimisation of the cytogenetic analysis procedure and the higher resolution obtained may influence couples and PGD centres to opt for aCGH methodologies (Table V).

In conclusion, SurePrint G3 Human aCGH has been validated for single-cell cytogenetic analysis, being successfully applied in one IVF-PGD for a Robertsonian translocation carrier. Advantages and limitations of comprehensive chromosome analysis techniques such as mCGH, BAC aCGH and oligonucleotide aCGH have been discussed in order to focus on the cytogenetic methodologies currently available for PGD.

Acknowledgements

We wish to thank the couples that decided to participate in this study.

Funding

This study was funded by the *Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto Carlos III* (PI 08/0012, PI 11/00625) and *Grup de Suport a la Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* (2009SGR1107). The first author had a pre-doctoral grant from the *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Iwarsson, E, Lundqvist, M, Inzunza, J, Ahrlund-Richter, L, Sjoblom, P, Lundkvist, O, et al. A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Hum Genet* 1999;104:376-82.
2. Munne, S, Weier, HU, Grifo, J, Cohen, J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994;51:373-9.
3. Daphnis, DD, Fragouli, E, Economou, K, Jerkovic, S, Craft, IL, Delhanty, JD, et al. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:117-25.
4. Trussler, JL, Pickering, SJ, Ogilvie, CM. Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization. *Reprod Biomed Online* 2004;8:701-11.
5. Vanneste, E, Voet, T, Le Caignec, C, Ampe, M, Konings, P, Melotte, C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577-83.
6. Voullaire, L, Slater, H, Williamson, R, Wilton, L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2000;106:210-7.
7. Wells, D, Delhanty, JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1055-62.
8. Alfarawati, S, Fragouli, E, Colls, P, Wells, D. Embryos of robertsonian translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development. *PLoS Genet* 2012;8:e1003025.
9. Rius, M, Daina, G, Obradors, A, Ramos, L, Velilla, E, Fernandez, S, et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;95:413-6.
10. Rius, M, Obradors, A, Daina, G, Ramos, L, Pujol, A, Martinez-Passarell, O, et al. Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril* 2011;96:134-42.
11. Capalbo, A, Bono, S, Spizzichino, L, Biricik, A, Baldi, M, Colamaria, S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013;28:509-18.
12. Fragouli, E, Katz-Jaffe, M, Alfarawati, S, Stevens, J, Colls, P, Goodall, NN, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2010;94:875-87.
13. Rubio, C, Simon, C, Vidal, F, Rodrigo, L, Pehlivan, T, Remohi, J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003;18:182-8.
14. Baart, EB, Martini, E, van den Berg, I, Macklon, NS, Galjaard, RJ, Fauser, BC, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy

- and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006;21:223-33.
15. Daina, G, Ramos, L, Rius, M, Obradors, A, Del Rey, J, Giralt, M, et al. Non-meiotic chromosome instability in human immature oocytes. *Eur J Hum Genet* 2013.
 16. Obradors, A, Rius, M, Cuzzi, J, Daina, G, Gutierrez-Mateo, C, Pujol, A, et al. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril* 2010;93:675-9.
 17. Daina, G, Ramos, L, Obradors, A, Rius, M, Martinez-Pasarell, O, Polo, A, et al. First successful double-factor PGD for Lynch syndrome: monogenic analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Clin Genet* 2012.
 18. Obradors, A, Fernandez, E, Oliver-Bonet, M, Rius, M, de la Fuente, A, Wells, D, et al. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. *Hum Reprod* 2008;23:1949-56.
 19. Rechitsky, S, Verlinsky, O, Kuliev, A. PGD for cystic fibrosis patients and couples at risk of an additional genetic disorder combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* 2013;26:420-30.
 20. Gianaroli, L, Magli, MC, Fiorentino, F, Baldi, M, Ferraretti, AP. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta* 2003;24 Suppl B:S77-83.
 21. Munne, S, Sandalinas, M, Escudero, T, Velilla, E, Walmsley, R, Sadowy, S, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-7.
 22. Handyside, AH, Harton, GL, Mariani, B, Thornhill, AR, Affara, N, Shaw, MA, et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. *J Med Genet* 2010;47:651-8.
 23. Mertzaniidou, A, Wilton, L, Cheng, J, Spits, C, Vanneste, E, Moreau, Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013;28:256-64.
 24. Treff, NR, Northrop, LE, Kasabwala, K, Su, J, Levy, B, Scott, RT, Jr. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. *Fertil Steril* 2011;95:1606-12 e1-2.
 25. Vanneste, E, Melotte, C, Voet, T, Robberecht, C, Debrock, S, Pexsters, A, et al. PGD for a complex chromosomal rearrangement by array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:941-9.
 26. Wells, D, Sherlock, JK, Handyside, AH, Delhanty, JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1214-8.
 27. Geigl, JB, Obenauf, AC, Waldispuehl-Geigl, J, Hoffmann, EM, Auer, M, Hormann, M, et al. Identification of small gains and losses in single cells after whole genome amplification on tiling oligo arrays. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e105.

28. Blanco, L, Bernad, A, Lazaro, JM, Martin, G, Garmendia, C, Salas, M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 1989;264:8935-40.
29. Fiegler, H, Carr, P, Douglas, EJ, Burford, DC, Hunt, S, Scott, CE, et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:361-74.
30. Saunders, RD, Glover, DM, Ashburner, M, Siden-Kiamos, I, Louis, C, Monastirioti, M, et al. PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Res* 1989;17:9027-37.
31. Zhang, L, Cui, X, Schmitt, K, Hubert, R, Navidi, W, Arnheim, N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5847-51.
32. Van der Aa, N, Cheng, J, Mateiu, L, Esteki, MZ, Kumar, P, Dimitriadou, E, et al. Genome-wide copy number profiling of single cells in S-phase reveals DNA-replication domains. *Nucleic Acids Res* 2013;41:e66.
33. Gutierrez-Mateo, C, Colls, P, Sanchez-Garcia, J, Escudero, T, Prates, R, Ketterson, K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;95:953-8.
34. Fiorentino, F, Spizzichino, L, Bono, S, Biricik, A, Kokkali, G, Rienzi, L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011;26:1925-35.
35. Fiegler, H, Geigl, JB, Langer, S, Rigler, D, Porter, K, Unger, K, et al. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res* 2007;35:e15.
36. Le Caignec, C, Spits, C, Sermon, K, De Rycke, M, Thienpont, B, Debrock, S, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e68.
37. Bi, W, Breman, A, Shaw, CA, Stankiewicz, P, Gambin, T, Lu, X, et al. Detection of ≥ 1 Mb microdeletions and microduplications in a single cell using custom oligonucleotide arrays. *Prenat Diagn* 2012;32:10-20.
38. Cheng, J, Vanneste, E, Konings, P, Voet, T, Vermeesch, JR, Moreau, Y. Single-cell copy number variation detection. *Genome Biol* 2011;12:R80.
39. Hellani, A, Abu-Amero, K, Azouri, J, El-Akoum, S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008;17:841-7.
40. Traversa, MV, Marshall, J, McArthur, S, Leigh, D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. *Reprod Biol* 2011;11 Suppl 3:51-60.
41. Garcia-Peiro, A, Oliver-Bonet, M, Navarro, J, Abad, C, Guitart, M, Amengual, MJ, et al. Sperm DNA integrity and meiotic behavior assessment in an infertile male carrier of a 9qh+++ polymorphism. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:730847.
42. Ribas-Maynou, J, Garcia-Peiro, A, Abad, C, Amengual, MJ, Navarro, J, Benet, J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 2012;27:652-8.

43. Rius, M, Obradors, A, Daina, G, Cuzzi, J, Marques, L, Calderon, G, et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. *Hum Reprod* 2010;25:1824-35.
44. Gutierrez-Mateo, C, Wells, D, Benet, J, Sanchez-Garcia, JF, Bermudez, MG, Belil, I, et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:2118-25.
45. Moore, DH, 2nd, Pallavicini, M, Cher, ML, Gray, JW. A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry* 1997;28:183-90.
46. Alfarawati, S, Fragouli, E, Colls, P, Wells, D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011;26:1560-74.
47. Gianaroli, L, Magli, MC, Ferraretti, AP, Munne, S, Balicchia, B, Escudero, T, et al. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 2002;17:3201-7.
48. Barbash-Hazan, S, Frumkin, T, Malcov, M, Yaron, Y, Cohen, T, Azem, F, et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril* 2009;92:890-6.
49. Dekel-Naftali, M, Aviram-Goldring, A, Litmanovitch, T, Shamash, J, Yonath, H, Hourvitz, A, et al. Chromosomal integrity of human preimplantation embryos at different days post fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2013.
50. Northrop, LE, Treff, NR, Levy, B, Scott, RT, Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010;16:590-600.
51. Ribas-Maynou, J, Garcia-Peiro, A, Fernandez-Encinas, A, Amengual, MJ, Prada, E, Cortes, P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One* 2012;7:e44679.

Figure legends

Figure 1. Comparative profiles for chromosomes 4, 8 and 13 obtained from Blastomere 4 with a) mCGH and b) Agilent aCGH.

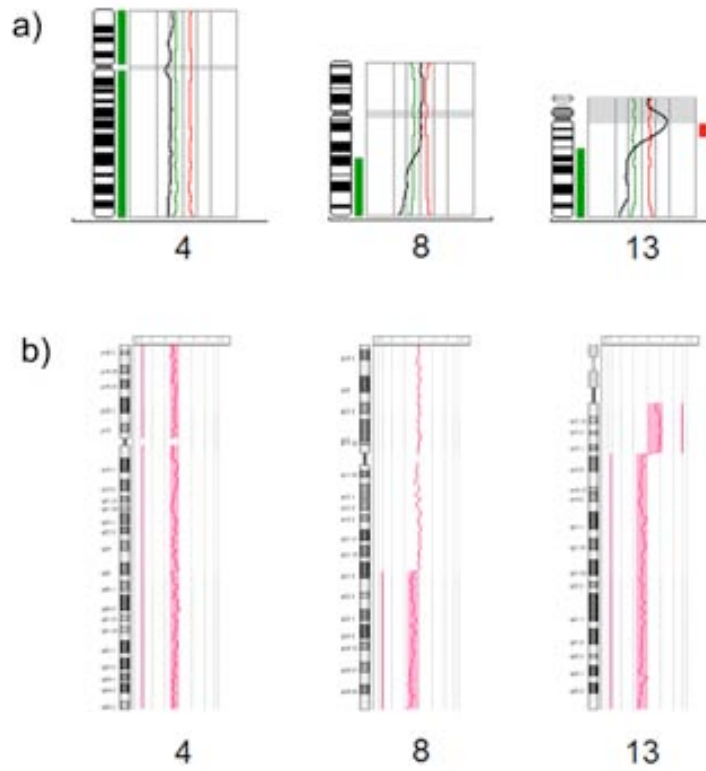


Figure 2. Comparative profiles of chromosomes 1-22, X and Y obtained from Blastomere 20 with a) SurePlex 24 sure V3 aCGH and b) Agilent aCGH.

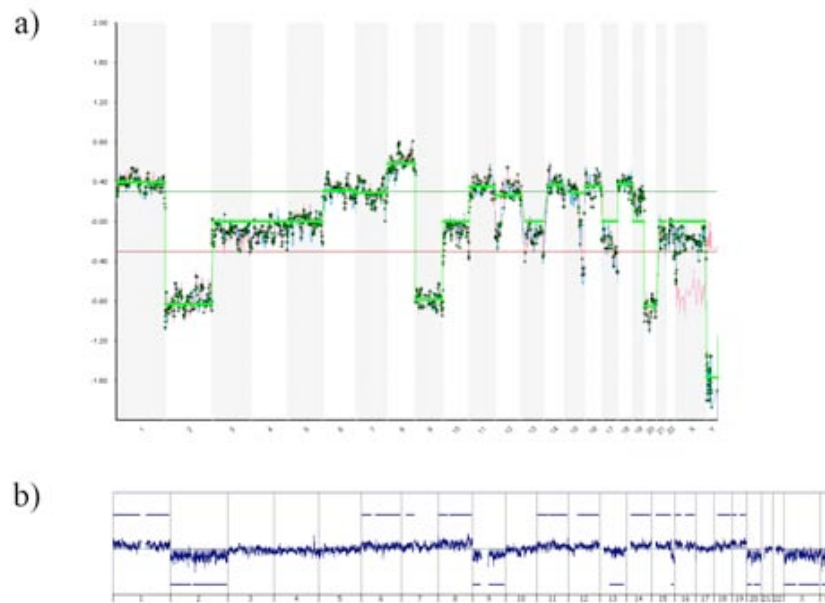
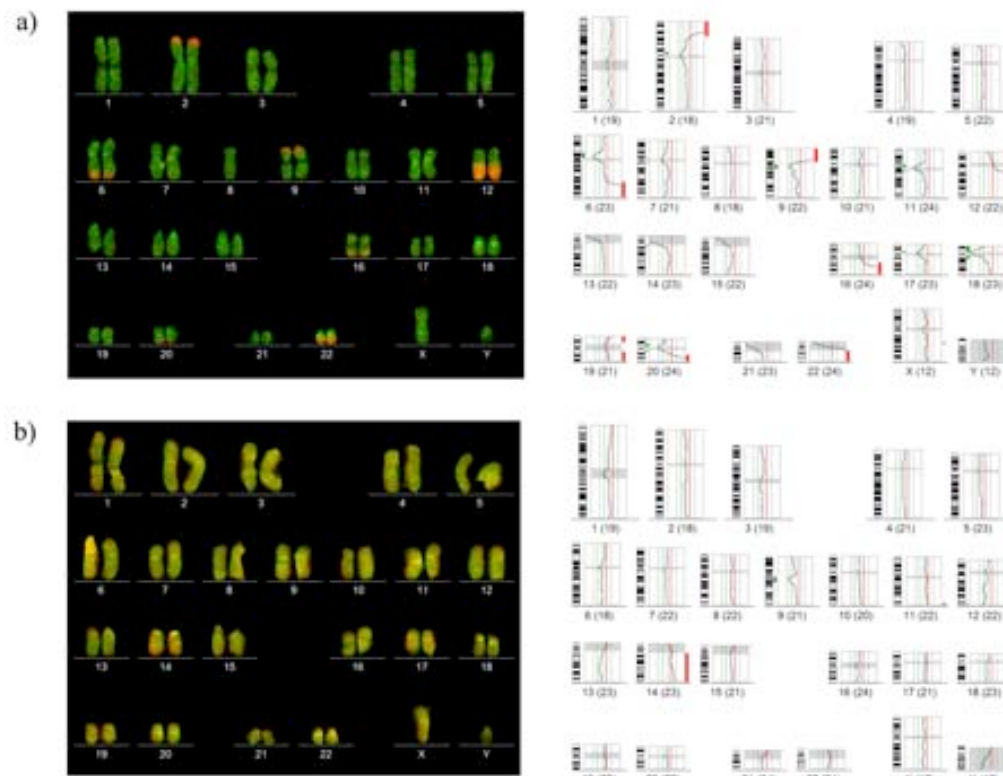


Figure 3. mCGH profiles obtained for E6 in a) one blastomere, and b) the whole, discarded embryo.



TABLES

Table I. Cytogenetic results obtained from human single blastomeres analysed by mCGH and Oligonucleotide aCGH.

BL	mCGH			Oligonucleotide aCGH			Concordance
	SC	A	S	SC	A	S	
1	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
2	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
3	45,XX	-4	+13qcenq13 -13q13qter	45,XX	-4	+13qcenq13.2 -13q13.2qter	Complete
4	45,XX	-4	-8q22.1qter +13qcenq13 -13q13qter	45,XX	-4	-8q21.2qter +13qcenq13.2 -13q13.2qter	Complete
5	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
6	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
7	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
8	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
9	46,XY	-	-2q35qter -4p -11p14pter -12p	44,XY	-11 -12	-4p -2q35qter	A/S divergence
10	40,XXX	+1 -2 +3 -4 +5 +6 +7 -8 +9 -10 +11 -12 -13 -14 +15 -16 -17 -18 -20 -21 -22	-	33,XX	-2 -4 -8 -10 -12 -13 -14 -16 -17 -18 -20 -21 -22		Partial

		+X					
11	46,XY	-2 +3 -5 +6 -8 -11 +12 +14 +15 +16 +17 -18 -21 -22		39,XY	-2 -5 -8 -11 -18 -21 -22	+6q	Partial A/S divergence
12	48,XX	+10 +13	-2q21.3qter	48,XX	+10 +13	-2q21.3qter -5p15.2pter -18q12.2qter	Extra segments
13	50,XY	-2 +3 +5 +7 +8 +13 +16 -20	-1p21pter +1q21.3qter +12pterq21.3 -12q23qter +19q	41,XY	-2 +5 +7 -14 -15 -17 -20 -21 -22	-1p21.1pter -4q -9q -10q -12q23.1qter -18q	Partial
14	47,XX	+14	+9q	47,XX	+14	-6p12.3p22.2 +9qcenq33.1	Extra segments
15	45,XX	-18		45,XX	-18	-5p15.1pter	Extra segments
16	46,XX		-2q24.3qter	46,XX		-2q24.1qter -15q21qter	Extra segments
17	46,XY	+13 -14	+20p	42,XY	-14 -15 -16 -17	-8p +13q21qter	Partial A/S divergence
18	45,XY	-15		45,XY	-15		Complete

BL: Blastomere; SC: Sexual chromosomes, A: Aneuploidies; S: Segmental imbalances.

Table II. Cytogenetic results obtained from human single blastomeres analysed by BAC aCGH and Oligonucleotide aCGH.

BL	BAC aCGH			Oligonucleotide aCGH			Concordance
	SC	A	S	SC	A	S	
19	48,XY	+16 +17		48,XY	+16 +17		Complete
20	51,X	+1 -2 +6 +7 +8 -9 +11 +12 +14 +15 +16 +18 -20 -X/Y		49,X	+1 -2 +6 +8 -9 +11 +14 +16 +19 -20 -X/Y	+7pcenp15 +12q - 13q14.12q33.3 +15qcenq25.2 -15q25.3qter +18q	Partial A/S divergence
21	45,XX	-16 +21 -22		45,XX	-16 +21 -22		Complete
22	47,XX	+15		47,XX	+15		Complete
23	46,XY	-	-6q	46,XY		-6q	Complete
24	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Complete
25	39,XY	-1 +3 -4 -6 -7 -8 -9 -13 -22		39,XY	-1 +3 -4 -6 -7 -8 -9 -13 -22		Complete
26	49,XX	+12 +13 +16		48,XX	+12 +13	+16p	A/S divergence
27	45,XX	-10		45,XX	-10		Complete
28	49,XY	+1 +2 +3 -8		49,XY	+1 +2 +3 -8	-9q34.1qter	Extra segments

		+10			+10		
29	47,XY	+22		47,XY	+22		Complete
30	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Complete
31	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Complete
32	49,XY	+1 -2 -4 +11 +13 +17 +18		49,XY	+1 -2 -4 +11 +13 +17 +18		Complete
33	46,XY	-	-	46,XY	-	-	Complete
34	46,XX	-	-	46,XX	-	-	Complete

BL: Blastomere; SC: Sexual chromosomes, A: Aneuploidies; S: Segmental imbalances.

Table III. Cytogenetic results obtained in a PGD for a 45,XY,der(13;14)(q10;q10) Robertsonian translocation.

E	Segr.	Agilent aCGH 8x60K			Agilent aCGH 4x180K			mCGH		
		SC	A	S	SC	A	S	SC	A	S
1	Alt 2:1	46,XY	-	-4q24qter	46,XY	-	-4q24qter	46,XY	-	-4q25qter
2	Alt 2:1	45,XX	-16	-12q	44,XX	-12 -16	-	44,XX	-12 -16	-
3	Alt 2:1	46,XY	-	-1q +3q22.1qter +6q22.2qter	46,XY	-	-1q +3q22.1qter +6q22.2qter	46,XY	-	-1q +3q22qter +6q22qter
4	Alt 2:1	45,XX	-6	-5q22qter -8q -10q	44,XX	-6 -10	-5q22qter -8q	45,XX	-6	-5q22qter -8q -10q
5	Alt 2:1	45,XX	-4	-	45,XX	-4	-	45,XX	-4	-
6	Alt 2:1	48,XXY	+22	+2p24.1pter +6q24.1qter +9p21.2pter +12q14.3qter +16q22.2qter +20q13.13qter	48,XXY	+22	+2p24.1pter, +6q24.1qter +9p21.2pter +12q14.3qter +16q22.2qter +20q13.13qter	48,XXY	+22	+2p21pter +6q22.3qter +9p +12q +16q +20q
7	Alt 2:1	46,XY	-	-	46,XY	-	-	46,XY	-	-
8	Adj 2:1	43,XY	-4 -8 -13	-12q14.3qter	43,XY	-4 -8 -13	-12q14.3qter	44,XY	-4 -13	-8q11q22.1 -12q14.3qter
9	Alt 2:1	46,XY	-	-	46,XY	-	-	46,XY	-	-

E: Embryo, Segr.: Meiotic segregation, SC: Sexual chromosomes, A: Aneuploidies, S: Segmental imbalances.

Table VI. Cytogenetic results obtained by mCGH from the discarded embryos of the PGD for a 45,XY,der(13;14)(q10;q10) Robertsonian translocation carrier.

Embryo	Segregation	Cytogenetic results
1	Alt 2:1	46,XY
2	Alt 2:1	45,XX,-16
3	Alt 2:1	46,XY
4	Alt 2:1	46,XX,+15q23qter
5	Alt 2:1	46,XX
6	Adj 2:1	47,XY,+14
8	Adj 2:1	46,XY,-13

Table V. Resolution, procedure duration and costs of mCGH, 24sure V3 BAC aCGH and Agilent aCGH (4x180K and 80x60K formats).

	mCGH	Agilent aCGH 8x	Agilent aCGH 4x	24 sure V3 BAC aCGH
Resolution (Mb)	10-20	≈0.02	≈0.02	5-10
Cost per sample (€)	64	480	815	132
Protocol (h)	9	8.5	8.5	7.5
Hybridisation step (h)	12	16	16	12
Analysis/sample (min)*	60	10	10	10

* One person performing analysis.

Agraïments

Voldria agrair als meus directors de tesi, la Dra. Joaquina Navarro i el Dr. Jordi Benet, el haver-me donat la oportunitat de treballar en un equip fabulós durant els darrers quatre anys. Gràcies Joaquina per haver-me transmès tants coneixements al llarg de les nostres reunions.

Gràcies al meu director de tesi, el Dr. Albert Obradors, per haver-me instruït en el món del DGP i pel teu optimisme contagiós. Moltes gràcies per la teva aportació al manuscrit de la tesi i els teus comentaris d'elogi!

Aquesta tesi no hauria estat possible sense els meus companys d'equip: la Dra. Gemma Daina, la Dra. Mariona Rius i el Dr. Javier del Rey. Gràcies Gemma, per ser la millor companya i amiga que hauria pogut imaginar. Gràcies Mariona, per l'amistat que ens uneix i per haver-te implicat en la meva tesi des de fora del laboratori. Gracias Javi, por los buenos momentos y por tu inestimable ayuda con el Photoshop y la estadística.

A totes les persones de la Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica: Rita, Alba, Kristín, Magda, Maria José, Iris, Paula, Marta, Keyvan, Jordi, Agustín, Imma, Maria Àngels, Fernanda, Ana, Àngels, Vicenç, Maria, Esther, Gemma M., Laia U. i Raquel, gràcies per haver sigut la millor companyia durant els darrers cinc anys, pels dinars que allargàvem al màxim i pels riures en general. Rita, Jordi, Alba, Keyvan i Marta, molta sort i ànims amb les vostres respectives tesis! Gràcies Jordi i Alba per la vostra col·laboració directa amb aquest treball. Gràcies també a la Rosa i a l'Imma, per haver-me acollit i guiat durant el meu primer any a la Unitat.

Al Manel García de qGenomics, gràcies per haver-me instruït en el meravellós món dels *arrays*! També a totes les persones que, des de la Fundació Puigvert, la Clínica Sagrada Família, l'Institut Universitari Dexeus i la Clínica Eugén, han fet possible aquesta tesi i, molt especialment, a l'Olga, la Loli, la Mònica i la Mariona, per haver-s'hi implicat tant. Gràcies als pacients i donants que han volgut participar en aquest estudi i l'han fet possible.

Gràcies a l'Edmon pel disseny de la portada, ets un crack!

Als meus amics Jara, Ugutz, Cris, Cati i Anna, per tot el que hem compartit i per seguir junts 10 anys després de conèixer-nos. Sou molt macos!

A la meva família, per ser-hi sempre i per interessar-se per la meva feina. Gràcies mama, per ser-hi quan em cal i per ajudar-me a no enfonsar-me quan les coses es torcen una mica. Gràcies iaia, pels dinars dels divendres i pels ànims que em dones. Al Francesc i l'Helena, pel seu interès i per la seva empenta. A les meves cosines Mimi, Angi i Xènia, i al meu germà Joan, senzillament per ser-hi. Angi, has aconseguit que l'escriptura de la tesi sigui una època genial. Gràcies també al Bruno per haver estat un company fidel al llarg de l'escriptura de la tesi.

Al meu pare, per haver-me ensenyat que el coneixement t'omple i que mai s'és massa gran per aprendre coses noves. Aquesta tesi és dels dos.

A l'Ivó, per il·lusionar-me i fer-me feliç. Per la teva immensa paciència i per la confiança infinita. Gràcies per tots els bons moments que hem passat i els que segur que vindran d'ara en endavant. Formem un gran equip.