

Setzè Congrès de Metges i Biòlegs de Llengua Catalana
Llibre de Ponències (2000), p. 33-40

DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTATORI D'ANEUPLOÏDIES I TRANSLOCACIONS

SANTIAGO MUNNÉ, MIREIA SANDALINAS, TOMAS ESCUDERO,
DAVID SABLE, JACQUES COHEN

1. DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTATORI D'ANEUPLOÏDIES

OBJECTIUS

La tècnica d'hibridació *in situ* de fluorescència (FISH) permet valorar la ploidia de blastòmers d'embrions humans mitjançant la combinació de sondes per autosomes i per cromosomes sexuals, en un interval de temps compatible amb el procés de fecundació *in vitro* (FIV) (MUNNÉ *et al.* 1993). Permet disminuir les possibilitats de tenir descendència trisòmica, augmentant la taxa d'embaràs en dones d'edat avançada i reduint la pèrdua embrionària durant l'embaràs.

OBJECTIU 1: REDUCCIÓ DE LA DESCENDÈNCIA TRISÒMICA

Les anomalies cromosòmiques numèriques són la major causa de malalties hereditàries, amb una incidència del 21% en avortaments espontanis (WARBURTON *et al.* 1986). D'aquestes, les trisomies degudes a gonosomes i cromosomes 21,18,16 i 13 representen el 50% dels avortaments cromosòmicament anormals. Contràriament als defectes d'un sol gen, les anomalies cromosòmiques s'originen *de novo*, i l'únic factor de risc conegut és l'edat materna, amb una freqüència incrementada de trisomies d'un 2% en embarassos de dones de 25 anys fins a un 19% en dones de 40 anys o més (WARBURTON *et al.* 1986). El diagnòstic d'aneuploidies en embrions humans pels cromosomes X,Y,18,13 i 21 mitjançant el mètode de FISH hauria de reduir significativament el risc de tenir descendència trisòmica en pacients de FIV d'edat avançada.

OBJECTIU 2: INCREMENT DE LES TAXES D'IMPLANTACIÓ

Les causes de la davallada del percentatge d'implantació observada amb l'increment de l'edat materna són objecte de discussió. Ara, però, l'elevada taxa d'implantació que s'obté en cicles de donació d'òcits, indica que el principal factor és l'edat materna (NAVOT *et al.* 1994). L'únic lligam clar entre edat materna i competència embrionària és l'aneuploidia. L'increment d'aneuploidia amb l'edat materna s'observa no únicament en avortaments espontanis i descendència viable, sinó també en embrions en estadi de cèl·lules (MUNNÉ *et al.* 1995a) i òcits no fecundats (DAILEY *et al.* 1996).

La taxa d'anomalies cromosòmiques observada en embrions és més elevada que la descrita en avortaments espontanis, fet que suggereix que una gran part dels embrions cromosòmicament anormals s'eliminen abans que el diagnòstic prenatal pugui ser practicat. Aquesta pèrdua embrionària podria influenciar la devallada implantatòria observada en edat materna avançada. Atesa la correlació entre aneuploidia i disminució del percentatge d'implantació amb l'edat materna es va hipotetitzar la possibilitat que una selecció negativa podia revertir aquesta tendència (MUNNÉ *et al.* 1993).

APLICACIÓ DE LA TÈCNICA DE FISH PER AL DGP DE L'ANEUPLOIDIA

Ara per ara, la selecció negativa dels embrions aneuploides només es pot realitzar mitjançant el diagnòstic genètic preimplantatori (DGP), ja sigui amb l'anàlisi del corpuscle polar de l'òcit o d'un blastòmer de l'embrió. La dificultat en l'obtenció de metafases, el fet que tan sols un 30% d'aquestes són cariotipables així com el requeriment de cultius llargs en antimitòtics (PLACHOT *et al.* 1987, PELLESTOR *et al.* 1994, SANTALO *et al.* 1995), fan que l'anàlisi per cariotipat sigui difícilment aplicable al DGP. El mètode d'hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) permet l'enumeració cromosòmica en nuclis interfàsics sense la necessitat de cultivar cèl·lules ni d'obtenir metafases.

En el DGP s'utilitzen els protocols de FISH que permeten la detecció simultània de múltiples cromosomes amb sondes específiques per cada un dels cromosomes. Aquests protocols es basen en la combinació de proporcions de fluorocroms i poden marcar cinc o més cromosomes amb tan sols tres fluorocroms (NEDERLOF *et al.* 1990, DAWERSE *et al.* 1992). Per estudis de blastòmers, els protocols inclouen X,Y,13,18,21,i 16 (MUNNÉ *et al.* 1993, MUNNÉ AND WEIER 1996, MUNNÉ *et al.* 1998). Per estudis de corpuscles polars s'han utilitzat sondes per als cromosomes X,13,18,i 21 (MUNNÉ *et al.* 1995, VERLINSKY *et al.* 1995, 1996).

Posterior a l'anàlisi d'un grup de cromosomes, els blastòmers poden reanalitzar-se amb una combinació de sondes diferent (BENADIVA *et al.* 1996). Això permet analitzar simultàniament deu o més cromosomes d'un sol nucli interfàsic, en un període de temps compatible amb un cicle de FIV. Actualment s'utilitzen de forma simultània sondes per als cromosomes X,Y,1,13,15,16,18,21 i 22, amb el potencial de diagnosticar un 70% de les aneuploidies detectades en avortaments espontanis.

LIMITACIONS DEL DGP PER A LA DETECCIÓ D'ANOMALIES CROMÒMIQUES NUMÈRIQUES

La sobreposició de senyals, el mosaïcisme embrionari i altres factors són fonts d'errors en la tècnica de FISH aplicada al DGP. Del total d'embrions analitzats per DGP, els resultats van ésser confirmats en el 91% dels embrions, un 1,1% es van classificar com a normals essent anormals i un 8% es van diagnosticar com a anormal essent normals (MUNNÉ AND WEIER 1996, MUNNÉ *et al.* 1998a).

MOSAICS

El mosaïcisme embrionari no es pot detectar de forma eficaç per DGP excepte quan totes les línies cel·lulars de l'embrió són anormals. Les fallides de diagnòstic degudes a mosaïcisme depenen del tipus de mosaic, i podem diferenciar-ne tres grups:

- a) Mosaics produïts per no-disjunció mitòtica o pèrdua en anafase (11% dels mosaics) d'un dels parells de cromosomes analitzats. Aquesta és la causa més freqüent d'errors. b) El segon grup són mosaics que impliquen dues línies cel·lulars, una diploide, i una haploide o bé poliploide (25% dels mosaics). Si la cèl·lula biopsiada és 4N, aquest tipus de mosaïcisme pot ser detectat amb poques sondes. No es considera excessivament perjudicial per l'embrió atès que les cèl·lules tetraploides normalment acaben formant el trofèctoderm (James and West 1994); així doncs, en el cas que la cèl·lula 4N no sigui detectada, l'error de diagnosi no és gens greu. c) Mosaics caòtics, en el quals la majoria dels cromosomes tenen un nombre anormal de còpies i en què la majoria de cèl·lules són anormals. No calen gaires sondes per diagnosticar aquest tipus de mosaics. Aproximadament un 8% de tots els mosaics són caòtics i amb totes les cèl·lules anormals, però un 9% tenen cèl·lules normals i per tant són font d'error de diagnosi. d) Altres mosaics són embrions que tenen cèl·lules normals i cèl·lules multinucleades. De la mateixa manera que els embrions amb cèl·lules normals/poliploides, aquests mosaics no són causa de fallida de diagnosi. e) Embrions que tenen diferents poliploïdies. Sigui quina sigui la cèl·lula biopsiada l'embrió serà classificat com a normal. Per tant, un 20% dels mosaics pot produir problemes de diagnosi (11% + 9% + 20%).

La importància del mosaïcisme disminueix si es considera el percentatge de blastòmers anormals per embrió mosaic, en lloc del nombre total d'embrions amb mosaïcisme. Els resultats en el nostre grup suggereixen que del total d'embrions que es desenvolupen normalment, fins a un 40% són mosaics, però un cop analitzats, tan sols un 13% presenta més de 3/8 cèl·lules anormals. Si ens basem en el 17% de mosaïcisme extensiu trobat en embrions no aturats (MUNNÉ *et al.* 1995b), i un 20% de mosaics que produeixen errors de diagnosi, s'estima que el mosaïcisme és font d'un 5% d'error de diagnosi.

ERROR PER FALSOS NEGATIUS DE FISH I SOBREPOSICIONS

La pèrdua de senyals pot indicar que es tracta d'una cèl·lula monosòmica o bé d'una fallida de la tècnica per mostrar els senyals. Les causes d'una reduïda eficiència d'hibridació es poden atribuir a pèrdua de DNA durant el procés de desnaturalització o fixació, poca penetració de la sonda, unió deficient dels agents de detecció (WEST *et al.* 1988, PIETERS *et al.* 1990), o sobreposició de senyals específics pel cromosoma quan es fan servir múltiples sondes (HANDYSIDE 1993). Hem observat que una mala extensió del nucli durant la fixació i el contingut de DNA per nucli, augmenten la sobreposició de senyals (MUNNÉ *et al.* 1993a, MUNNÉ *et al.* 1996). Quan dos senyals del mateix cromosoma es sobreposen, només s'observa un senyal i per tant, això porta a error de diagnòstic. A més extensió del nucli durant la fixació, menys sobreposició i pèrdua de senyals s'observa.

BLASTÒMERS MULTINUCLEATS

Els blastòmers multinucleats (MNB's) s'han descrit tant en embrions normals com anormals i s'observen en 1/3 dels casos (TESARIK *et al.* 1987, HARDY *et al.* 1989, WINSTON *et al.* 1991). Els nostres resultats previs han demostrat que els embrions multinucleats no són viables per diagnòstic genètic preimplantatori d'aneuploidia perquè el nombre de cromosomes de cada nucli varia massa (MUNNÉ AND COHEN 1993). De totes maneres, quan es tracta d'un blastòmer amb dos nuclis, i ambdós són cromosòmicament normals, la resta de l'embrió també és normal (MUNNÉ AND COHEN 1993).

PÈRDUA DE MICRONUCLIS DURANT LA FIXACIÓ

L'error de FISH és més elevat en blastòmers multinucleats (11,5%, 13/113), que en cèl·lules mononucleades (3,1%, 13/415) (MUNNÉ *et al.* 1994a,d). El fet que moltes de les cèl·lules multinucleades contenen micronuclis fa que durant el procés de fixació, aquests es puguin perdre més fàcilment que el nucli sencer, originant falsos negatius.

Els nostres resultats mostren una forta correlació entre els tipus de fixació i la pèrdua de cromosomes (MUNNÉ *et al.* 1998a). Durant la fixació amb àcid acètic i metanol, les gotes de fixador afegides abans que la cèl·lula es trenqui fan que el citoplasma s'expandeixi, més gotes, més expansió, mentre que les gotes postlisi netegen les fibres de citoplasma remanent, i probablement DNA anuclear. Per tant, és possible que hi hagi més pèrdua de DNA si s'afegeix una gota postlisi quan la cèl·lula està més estesa (dues gotes prelisi en lloc d'una), tal com es va demostrar en el nostre estudi. En general, recomanem dues gotes prelisi i cap gota postlisi, mètode que amb les condicions apropiades d'humitat (40%) permet una bona extensió nuclear, pocs remanents citoplasmàtics i una mínima pèrdua de DNA.

RESULTATS DEL DGP D'ANEUPLOÏDIA: DESCENDÈNCIA TRISÒMICA, AVORTAMENTS ESPONTANIS I PERCENTATGES D'IMPLANTACIÓ

REDUCCIÓ DE LA DESCENDÈNCIA TRISÒMICA

S'han realitzat més de mil casos de diagnòstic genètic preimplantacional d'aneuploïdia, ja sigui per mitjà de biòpsia de corpuscle polar de l'òcit o per biòpsia embrionària (MUNNÉ *et al.* 1993, 1995, 1999; VERLINSKY *et al.* 1995, 1996; VERLINSKY & KULIEV 1999; GIANAROLI *et al.* 1999). Ara, però, per tal de demostrar un decrement en la descendència trisòmica del 2,6% de trisomies 13,18 o 21 detectades en CVS en dones de 39 anys, fins a un 0,3% després de DGP (assumint un 10% d'error de la tècnica), l'estudi hauria d'incloure almenys 3000 nounats per tal de poder detectar un decrement estadísticament significatiu en la descendència trisòmica. Malauradament, els errors per diagnòstic han tingut lloc més freqüentment del que s'esperava (MUNNÉ *et al.* 1998e). Després del reanàlisi de les cèl·lules diagnosticades erròniament, es va concloure que els errors eren deguts al mosaicisme embrionari o per pèrdua de DNA. No obstant això, hem trobat un 1,3% de 152 fetus amb trisomia 21 respecte a una freqüència esperada del 2,7% en població de la mateixa edat (no publicat).

INCREMENT EN EL PERCENTATGE D'IMPLANTACIÓ I DECREMENT EN LA TAXA D'AVORTAMENTS ESPONTANIS

Per tal de comparar controls amb un grup estudi sotmès a biòpsia embrionària i diagnòstic genètic preimplantatori d'aneuploidia, vam dissenyar un estudi multicèntric de FIV. Els pacients s'aparellaren retrospectivament, a cegues, segons l'edat materna, el nombre previ de cicles de FIV, durada de l'estimulació, nivells d'estradiol en dia +1 i mitjana de fol·licles madurs. Tots aquests paràmetres eren similars entre el grup estudi i el control. Posterior al DGP només es van transferir els embrions diagnosticats com a normals pels cromosomes analitzats (MUNNÉ *et al.* 1999b). Els resultats demostren que els percentatges de batec fetal/embrí transferit entre el grup control i estudi eren similars, tot i que lleugerament elevats en el grup estudi. Contràriament, els avortaments espontanis, mesurats com a batec fetal avortat/batec fetal detectat disminuïen després de DGP ($p < 0,05$) i els embarassos en curs i nens nascuts incrementaven ($p < 0,05$) en el grup de pacients de DGP (MUNNÉ *et al.* 1999b). Amb la utilització de més sondes que en l'estudi de MUNNÉ *et al.* (1999), GIANAROLI *et al.* (1999) descriuen un increment significatiu del percentatge d'implantació.

DGP D'ANOMALIES ESTRUCTURALS

L'anàlisi cromosòmica amb el mètode de cariotipat convencional no és factible, ja que com a mitjana només un 25% dels nuclis de blastòmers mostren metafase després de tractament antimitòtic, i encara menys nuclis tenen la qualitat cromosòmica desitjable per bandejar (SANTALO *et al.* 1995). Tampoc és possible aplicar bandes G en cromosomes d'òcit o corpuscle polar per la poca qualitat dels cromosomes obtinguts (PELLESTOR 1991).

Atesa la dificultat, s'han proposat quatre metodologies alternatives, basades en la tecnologia de FISH:

TINCIÓ CROMOSÒMICA (PAINTING) DE CORPUSCLES POLARS

Aquest mètode es va proposar després d'observar que al voltant del 90% dels primers corpuscles polars que es fixen en menys de sis hores després de la punció fol·licular estan en estadi de metafase, i per tant, la translocació es pot identificar fent servir sondes de *painting* pels dos cromosomes involucrats en la translocació (MUNNÉ *et al.* 1998a). Més tard, la metodologia es va millorar amb l'ús de sondes telomèriques que cobreixen les regions no cobertes per les sondes de *painting*, i l'ús de sondes o marcadors centromèrics, desitjablement en un tercer color, per tal de diferenciar cromàtides i evitar la confusió entre cromàtides úniques i cromosomes sencers (MUNNÉ *et al.* 1998b). Les cromàtides úniques es troben sovint en corpuscles polars degenerats (MUNNÉ *et al.* 1995). Amb la introducció d'aquestes modificacions s'observà que la freqüència d'avortaments espontanis per embrió en el grup amb embaràs, era significativament menor ($p < 0,001$, F test), des d'un 95% (18/19) en cicles naturals fins a un 12,5% (1/8) després de DGP. L'avortament espontani en el grup de DGP prové d'un embrió suposadament balancejat segons els resultats del DGP. De forma similar, la taxa d'embaràs va ser molt elevada, amb un percentatge d'implantació del 50, percentatge esperat si tenim en compte que moltes de les translocacions d'origen matern no produeixen esterilitat ans avortaments espontanis.

Un problema associat a aquesta tècnica és el fenomen de creuament (*crossing-over*) i predivisió de cromàtides. En qualsevol cas, el resultat de la segona divisió meiótica no és gens clar i requereix l'anàlisi del segon corpuscle polar.

L'altre problema associat és l'existència de creuament intersticial amb la subseqüent segregació de grups de cromosomes equilibrats o no equilibrats durant la segona divisió meiótica. Fins ara, hem detectat un d'aquests fenòmens.

La tècnica anomenada *Spectral Imaging* s'ha utilitzat per tal d'analitzar anomalies cromosòmiques numèriques en corpuscles polars (MÁRQUEZ *et al.* 1998) i pot permetre diagnosticar alhora translocacions i aneuploidia.

SONDES SUBTELOMÈRIQUES I DE BREAKPOINT-SPANNING

El diagnòstic de translocacions d'origen patern tan sols és possible amb l'ús de FISH en blastòmers en interfase. S'han desenvolupat sondes específiques per cada tipus de translocació i que cobreixen els punts de trencament (*Breakpoint-Spanning*) (MUNNÉ *et al.* 1998c, 1998d, 2000) permetent la diferenciació entre embrions equilibrats, no equilibrats i normals. Ara bé, la fabricació d'aquestes sondes és molt costosa. Una alternativa ha estat la utilització de sondes distals als punts de trencament quan és possible (PIERCE *et al.* 1998) o

recentment, l'ús de sondes subtelomèriques (MUNNÉ *et al.* 2000). Les sondes subtelomèriques tenen l'avantatge d'estar comercialitzades i, combinades amb sondes centromèriques marcades en un tercer color, poden identificar qualsevol embrió no equilibrat. No permeten, però, la diferenciació entre normal i equilibrat.

L'excepció és la translocació Robertsoniana, en la qual es poden fer servir les sondes ?-satèlit o sondes locus específiques per tal de detectar embrions aneuploides (CONN *et al.* 1998). Tampoc en aquest cas les sondes locus específiques permeten diferenciar entre normal i equilibrat. És aconsellable no transferir els embrions equilibrats, sempre que es disposi d'un nombre suficient d'embrions normals, per tal d'evitar la perpetuació de la malaltia genètica en la família.

Les sondes subtelomèriques i del tipus *Breakpoint-Spanning* també es poden utilitzar per altres anomalies estructurals com les inversions, demostrat per CASSEL *et al.* (1997), els quals van desenvolupar sondes que abastaven el punt de trencament en una inversió en el braç curt del cromosoma sis.

S'han trobat correlacions interessants en factors com el tipus de biòpsia, sexe, la presència de punts de trencament terminals, si les translocacions són de tipus robertsoniana o recíproca, i el nombre d'embrions cromosòmicament normals per transferir, que poden afectar les possibilitats d'embaràs.

CORRELACIÓ ENTRE >50% EMBRIONS NORMALS I EMBARÀS

Quan el nombre d'òcits o embrions anormals és superior al 50% s'aconsegueixen pocs embarassos, en canvi quan el nombre és inferior al 50% la taxa d'embaràs és notablement més elevada (MUNNÉ *et al.*, 2000). Això és degut al fet que la majoria de les dones portadores de malalties genètiques són fèrtils i per tant, si es disposa d'embrions normals, s'embarassen fàcilment. D'acord amb les nostres observacions, altres publicacions sobre DGP de translocacions mostren elevades porporcions d'embrions anormals, que no resulten en embaràs en cap dels casos realitzats (CONN *et al.* 1998; VAN ASSCHE *et al.* 1999).

REDUCCIÓ DELS AVORTAMENTS ESPONTANIS

La pràctica de DGP en casos de translocacions augmenta substancialment les possibilitats que un embaràs arribi a terme en una parella afecta. En un estudi recent de trenta-cinc casos de DGP en pacients amb translocacions, hem demostrat un decrement significatiu en els avortaments espontanis ($p < 0,001$): des d'un 92% en embarassos en cicles naturals a un 12,5% en cicles de DGP (MUNNÉ *et al.* 2000). Els avortaments de repetició en els pacients portadors de translocació són la causa més freqüent per sotmetre's a un cicle de FIV-DGP. En molts casos, els productes no equilibrats de la translocació són sempre letals i per tant el risc és l'avortament. D'aquí que la idea de seleccionar embrions no equilibrats a través d'un cultiu llarg fins a l'estadi de blastocist com ha estat proposat (MENEZO *et al.* 1997), no sigui aplicable. Molts dels embrions no equilibrats implanten i s'avorten espontàniament. La finalitat dels pacients portadors de translocacions és evitar els avortaments de repetició i aconseguir un embaràs que arribi a terme.

BIBLIOGRAFIA

- ANGEL, R. R. (1991) *Human Genet.*, 86: 383-387.
- BENADIVA, C. A.; I. KLIGMAN; S. MUNNÉ (1996) *Fertil. Steril.*, 66: 248-255.
- CASSEL *et al.* (1997) *Human Reprod.*, 12: 2019-2027.
- COHEN, J. *et al.* (1990) *Human Reprod.*, 5: 7-13.
- CONN *et al.* (1998) *Human Genet.*, 102:
- DAILEY *et al.* (1996) *Am. J. Human Genet.*, 59: 176-184.
- DAUWERSE *et al.* (1992) *Human Molec. Genet.*, 1: 593-598.
- DRURY *et al.* (1997) *J. Assisted Reprod. Genet.*, 14: 436-437 (Abs.20).
- DURM *et al.* (1997) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 15-23.
- HANDYSIDE, A. H. (1993). *REPROD. MED. REV.*, 2: 51-61.
- HARDY *et al.* (1990) *HUMAN REPROD.*, 5-6: 708-714.
- HARPER, J. C. ; A. H. HANDYSIDE (1994) *Current Obstetrics and Gynecology*, 4: 143-149.
- HASSOLD, T. J. *et al.* (1987) *J. Med. Genet.*, 24: 725-732.
- HASSOLD T. J.; N. TAKAESU (1989) IN HASSOLD, T. J.; C. J. EPSTEIN (EDS), *Molecular and cytogenetic studies of nondisjunction*. Alan Liss Inc. New York p. 115-134.
- HASSOLD, T. J. *et al.* (1991a) *J. Med. Genet.* 28:159-162.
- JAMES, R. M.; WEST, J. D. (1994) *Human Genet.* 93: 603-604.
- JANNY, L.; Y. J. R. MENEZO (1996) *Molec. Reprod. Devel.*, 45: 31-37.
- KALLIONIEMI *et al.* (1992) *Science*, 258: 818-821.
- KAMIGUCHI *et al.* (1993) *Human Genet.*, 90: 533-541.
- KEEFE *et al.* (1995) *Fertil. Steril.*, 64: 577-583.
- LEE *et al.* (1997) *Human Genet.*, 99: 364-367.
- LICHTER *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9664-9668.
- MAGNUSON *et al.* (1985) *J. Exp.Zool.* 236: 353-360.
- MÁRQUEZ, C.; J. COHEN; S. MUNNÉ (1998) *Cytogenet. Cell Genet.*, (en premsa)
- MAY, P. *et al.* (1990) *Am.J. Human Genet.* 46:754-761.
- MONTAG *et al.* (1998) *Fertil. Steril.*, 69: 539-542.
- MUNNÉ, S.; J. COHEN (1993) *Human Reprod.* 8: 1120-1125.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1993a) *J. Assisted Reprod. Genet.*, 10: 82-90.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1994a) *Am. J. Human Genet.*, 55: 150-159.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1994d) *Human Reprod.*, 9: 506-510.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1994e) *J. Assisted Reprod. Genet.*, 10: 276-279.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1995a) *Am. J. Obs. Gyn.*, 172: 1191-1201.

- MUNNÉ, S. *et al.* (1995b) *Fertil. Steril.*, 64: 382-391.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1995c) *Human Reprod.*, 10:1015-1021.
- MUNNÉ, S.; U. WEIER (1996) *Cytogenet. Cell. Genet.*, 75: 263-270.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1996b) *J. Assisted Reprod. Genet.*, 13: 149-156.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1998a) *Molecular Human Reprod.*, 4: 863-870.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1998b) *Fertil. Steril.*, 69: 675-681.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1998b). *JARG*, 15: 290-296.
- MUNNÉ, S. *et al.* (1998d) *Hum. Genet.*, 102: 663-674.
- MUNNÉ, S. *et al.* (2000) *Fertil. Steril.*, 74
- NAVOT *et al.* (1994) *Fertil. Steril.*, 61: 97-101.
- NEDERLOF *et al.* (1990) *Cytometry* 11: 126-131.
- PELLESTOR, F. (1991) *Human Genet.*, 86: 283-288.
- PELLESTOR, F. *et al.* (1994) *Molec. Reprod. Devel.*, 39: 141-146.
- PIERCE *et al.* (1998) *Molec Human Reprod.*, 4: 167-172.
- PIETERS *et al.* (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 15-19.
- PINKEL *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9138-9142.
- PLACHOT *et al.* (1987) *Human Reprod.* 1: 29-35.
- SANTALÓ *et al.* (1995) *Fertil. steril.* 64: 44-50.
- TESARIK *et al.* (1987) *Human Reprod.* 2: 127-136.
- TULLY, G.; K. M. SULLIVAN; P. GILL (1993) *Human Genet.* 92: 554-562.
- VERLINSKY, Y.; D. DOZORTZEV; S. EVSIKOV (1994) *J. Assist. Reprod. Genet.*, 11: 123-131.
- VERLINSKY, Y. *et al.* (1990) *Human Reprod.* 5: 826-829.
- VERLINSKY, Y. *et al.* (1995) *Human Reprod.* 10: 1923-1927.
- VERLINSKY, Y.; A. KULIEV (1996) *Human Reprod.*, 11: 2076-2077.
- VON EGGELING *et al.* (1993) *Human Genet.*, 91: 567-570.
- WARBURTON *et al.* (1986) *Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions*. In: Porter, I. H.; Willey, A. (eds.) *Perinatal genetics: diagnosis and treatment*. New York: Academic Press, 1986, p. 133-148.
- WEIER, U. *et al.* (1994) *Genomics* 24:641-644.
- WEIER, U. *et al.* (1995) *Genomics*, 26:390-393.
- WEST *et al.* (1987). *Lancet*, 330: 1345-1347