

Genética

Diagnóstico Genético Preimplantacional. ¿Cuándo está indicado?

Preimplantation Genetic Diagnosis. When is it indicated?

Alemañ M, López L, Cañadas M.C.

GINEFIV. Madrid.

Resumen

Las alteraciones genéticas tienen graves consecuencias en el desarrollo embrionario y fetal, siendo la principal causa conocida de aborto. Algunas de estas alteraciones son compatibles con el desarrollo a término concluyendo con el nacimiento de un niño afecto de un síndrome o enfermedad genética. La prevención de estos trastornos genéticos se puede abordar a distintos niveles. Se puede evitar la enfermedad, diagnosticándola en el feto, una vez conseguida la gestación o bien diagnosticándola en el embrión antes de su implantación, evitando el embarazo y la eugenesia. El Diagnóstico Genético Preimplantacional constituye pues una técnica de prevención primaria. Aquí se presenta una revisión de diversos trabajos que demuestran la utilidad de la aplicación clínica del DGP para mejorar los resultados de las técnicas de reproducción asistida.

Palabras clave: Aborto de repetición. Fallo de implantación. Diagnóstico preimplantacional humano.

Summary

The genetic alterations have serious consequences in fetal and embryonic development, being the main cause known for miscarriage.

Some of these alterations are compatible with the fetal development to term, concluding with the birth of a baby suffering a syndrome or genetic disease.

The prevention of these genetic disorders can be approached at different levels. The disease can be avoided, being diagnosed in the foetus, either once the gestation has been obtained or diagnosing it in the embryos before its implantation, avoiding in this way the pregnancy and the eugenesia. Therefore the Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) constitutes a primary prevention technic.

Hereunder it is introduced a review of several studies that demonstrates the usefulness of clinical application of PGD to improve the results of the assisted reproductive techniques.

Key words: Recurrent miscarriage. Implantation failure. Human preimplantation diagnosis.

Correspondencia: Dra. Dña. Mercedes Alemañ
GINEFIV
C/ José Silva, 9 B
28043 Madrid
e.mail: m.aleman@ginefiv.com

RIESGOS DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

Las alteraciones numéricas, o aneuploidías, dan como resultado malformaciones en el feto y son además causa de abortos. Tanto la gravedad de las alteraciones como el momento en el cual se produce el aborto están en función del cromosoma implicado y de si hay pérdida o ganancia.

Con la excepción del síndrome de Turner, todas las monosomías son letales. Los embriones que son portadores de monosomías autosómicas no se encuentran en embarazos clínicos, por lo que probablemente estos embriones detienen su desarrollo en etapas muy tempranas.

La mayoría de las trisomías también son letales, pero generalmente en estadios más avanzados. En abortos espontáneos se han visto trisomías para la mayoría de los cromosomas, pero en nacidos vivos solo se observan trisomías para los cromosomas X, Y, 13, 18, 21.

PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS

La prevención de las enfermedades genéticas se puede abordar a distintos niveles:

* prevención secundaria, evita el nacimiento de niños afectados, mediante el diagnóstico prenatal y la eugenesia. Este método diagnóstico se desarrolla gracias a la técnica de la amniocentesis, que empezó a realizarse en España a principios de los años 80 y tiene como principal objetivo la obtención del cariotipo fetal.

En 1989, un equipo de investigadores en Londres demostró que los trastornos genéticos se podían diagnosticar en embriones obtenidos por fertilización in vitro antes de su transferencia al útero. Esta técnica se denominó Diagnóstico Genético Preimplantacional y se usó con éxito para detectar enfermedades graves y para la prevención de enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X.

El diagnóstico genético preimplantacional se presenta como un tipo de prevención primaria que evita la aparición de la enfermedad antes incluso de que se produzca la gestación.

Esta técnica se ha desarrollado gracias a los avances que se han producido en las técnicas de reproducción asistida y el desarrollo de las técnicas de biología molecular y citogenética ya que son necesarios test altamente eficientes y rápidos que permitan la de-

tección de anomalías genéticas en una única célula que se obtiene mediante biopsia embrionaria, técnica que aunque invasiva no afecta negativamente al desarrollo posterior del embrión. El momento idóneo para realizarla es cuando el embrión tiene entre 6-8 células. La transferencia se realiza en día 4 o en estadio de blastocisto y son ya cientos de niños los nacidos sanos después de DGP (1).

El DGP incluye una variedad de técnicas que se han desarrollado para evitar la transmisión de enfermedades genéticas o anomalías cromosómicas en la descendencia de pacientes portadores de mutaciones genéticas o reorganizaciones cromosómicas estructurales, o en pacientes con abortos de repetición. El procedimiento diagnóstico incluye diferentes modalidades de amplificación de genes, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el uso de técnicas citogenéticas como la hibridación in situ con sondas fluorescente (FISH)(2) de distintos tipos:

-**Secuencias centroméricas:** secuencias de ADN satélite (150-300pb) altamente repetitivas (miles de veces) y específicas, localizadas específicamente en el centrómero 18/X/Y.

-**Secuencias específicas de locus:** secuencias de ADN de copia única (200-400Kb) o con un número reducido de copias, específicas de genes o locigénicos 13/21.

-**Secuencias subteloméricas:** secuencias de ADN de copia única específicas y localizadas en los extremos terminales de cada cromosoma.

La eficiencia de la técnica es del 92% en las dos primeras rondas de hibridación y de un 80% en la tercera ronda y presenta un error de diagnóstico es del 8%.

La selección de embriones cromosómicamente normales para su transferencia permite (3):

- Un aumento de la tasa de implantación.
- Una reducción de la tasa de aborto espontáneo.
- Evita embarazos de embriones aneuploides.

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

El DGP se presenta como una técnica capaz de prevenir embarazos de embriones anómalos en parejas con alto riesgo reproductivo. Y dada la incidencia de los factores genéticos en los problemas de infertilidad esta técnica tiene cada vez más importancia. Además la selección de embriones euploides para su transferencia mejora enormemente la eficiencia de las Técnicas de Reproducción Asistida, ya que la aneuploidía es la principal causa de abortos de repetición y de fallos de implantación y se ha encontrado una ma-

yor incidencia de defectos cromosómicos en embriones procedentes de mujeres de edad avanzada (4). La transferencia de embriones sanos mejora por tanto la tasa de implantación y disminuye la incidencia del aborto espontáneo, constituyendo una parte integral de la FIV (5) que contribuye a la mejora de su eficiencia.

Aunque la principal aplicación del DGP fue prevenir la transmisión de enfermedades ligadas al cromosoma X, hoy en día se ha extendido su uso al estudio de las anomalías cromosómicas mejorando los resultados de FIV en pacientes de edad materna avanzada, abortadoras de repetición, fallos repetidos de FIV, factor masculino severo (6) y pacientes con cariotipo alterado (7) grupos en los cuales se ha encontrado una elevada incidencia de alteraciones cromosómicas.

Muchos estudios demuestran la utilidad del análisis de aneuploidías para mejorar el resultado de las Técnicas de Reproducción Asistida en pacientes de peor pronóstico como los grupos anteriormente citados (8, 9). En uno de ellos se incluye además un grupo de pacientes que presentan gametos con alteraciones morfológicas, tales como ovocitos con citoplasma granuloso o espermatozoides macrocéfalos en el que se encuentra una tasa de aneuploidías más elevada incluso que en el resto de grupos, proponiendo que se considere la anormalidad morfológica como una indicación más de DGP (10).

INDICACIONES DEL DGP

Aborto de Repetición

Según documento del grupo de aborto de repetición de la SEGO:

“El término de aborto de repetición se aplica en la actualidad para aquella situación en que se han producido al menos dos abortos consecutivos o más de dos alternos. Se acepta en general que afecta entre el 1 y el 5% de mujeres.

Respecto a la epidemiología hay que señalar que la incidencia del aborto clínico en la población general es del 10-15%.

En conjunto, se encuentran anomalías cromosómicas en alrededor de un 50% de los abortos espontáneos. Sin embargo en el período peri-implantatorio la incidencia de anomalías cromosómicas en los abortos es superior al 80%. Estas anomalías son básicamente trisomías, siendo las más frecuentes la trisomía 16 (31%), las trisomías 22 y 21 (10%), la trisomía 15 (7%) y las trisomías 14, 8, 18, 13, 7 y 2 (4%), seguidas de las triploidías”.

Las anomalías cromosómicas son causa importante de abortos espontáneos y de abortos de repetición. En abortadoras de repetición, se ha observado una tasa de anomalías cromosómicas en embriones obtenidos tras FIV más DGP del 53%, significativamente mayor que la frecuencia encontrada en el grupo control (constituido por parejas portadoras de enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales) con una tasa de 19,3% (11).

En un estudio realizado por el Instituto Valenciano de Infertilidad, en el que se analizan 71 parejas con aborto de repetición y 28 parejas que han realizado DGP por ser portadoras de una enfermedad ligada a cromosomas sexuales (grupo control), se obtuvieron los siguientes resultados: la tasa de implantación en el grupo de aborto de repetición fue de 28% y en el 13% de ellas se produjo aborto. La tasa de embriones aneuploides en abortadoras de repetición fue significativamente mayor que en el grupo control (70,7% frente a 45,1%). Hubo un 22,1% de ciclos sin transferencia embrionaria por ausencia de embriones normales, y en este grupo, sucesivos ciclos de DGP rindieron tasas de anormalidad similar en 14 de 19 parejas.

Las anomalías más frecuentes fueron las de los cromosomas 16 y 22 en los casos de aborto de repetición y alcanzaron el estadio de blastocisto un 24,9% de los embriones anormales. Por tanto la FIV más DGP resulta útil para el tratamiento de estas parejas (12).

En mujeres de 35 años o más con historia de aborto de repetición, el DGP tiene un efecto beneficioso sobre el resultado de la FIV, disminuyendo el riesgo de aborto al nivel del esperado en la población control. La pérdida de embarazo tras DGP se sitúa en un 12% frente al 44,5% esperado (13).

Edad materna avanzada

La edad tiene cada vez más importancia en las Técnicas de Reproducción Asistida debido al retraso de la maternidad de muchas mujeres. Se considera edad reproductiva avanzada a partir de los 37 años.

Mediante estudios de FISH, realizados en embriones obtenidos por FIV/ICSI se ha demostrado un aumento significativo en el número de anomalías cromosómicas, debido a la no disyunción meiótica en el ovocito, que se correlaciona con la edad y que puede explicarse por el largo período de detención en profase I meiótica, que afecta a las proteínas del huso, alterando su configuración. No ha sido posible correlacionar la ausencia de disyunción con ningún otro factor como niveles hormonales, tabaquismo, consumo de alcohol o radiaciones.

Esto puede explicar el descenso en la tasa de implantación embrionaria, que alcanza valores del 10% a partir de los 40 años.

La incidencia del aborto se correlaciona con la edad materna, la mayoría de las pérdidas fetales se asocian con anomalías cromosómicas. En un estudio controlado multicéntrico y retrospectivo se analizaron 2279 ciclos de DGP, comparándose la tasa de aborto espontáneo después de DGP con ciclos FIV sin DGP reportados en 2002 por la American Society for Reproductive Medicine-Society for Assisted Reproduction Technology. Se observó un descenso del riesgo de aborto espontáneo en mujeres que realizaron ciclos de FIV con DGP, particularmente en pacientes de más de 40 años, donde se redujo la tasa a un 22,2%, frente al 40,6% del grupo sin DGP (14).

Fallo de implantación

Son pacientes con fallo de implantación, aquellas mujeres menores de 37 años que han realizado 3 o más ciclos fallidos de FIV-ICSI, con transferencia de embriones de buena calidad. Se trata de un grupo muy heterogéneo en el que se incluyen pacientes con esterilidad sin diagnosticar y en el que podemos encontrar hasta un 60% de embriones con alteraciones cromosómicas (15).

Se cree que las anomalías cromosómicas son responsables del fallo de implantación, siendo la aneuploidía la alteración más frecuente. El análisis genético de los embriones permite la detección de las anomalías cromosómicas y la selección de embriones normales, por lo que aumentan las posibilidades de embarazo (16).

El análisis genético de los embriones antes de su transferencia, permite seleccionar embriones cromosómicamente normales, lo que beneficia a la mayoría de las parejas con fallo de implantación, como se deduce de un estudio de 121 ciclos de DGP con esta indicación, en el que se observa una tasa de aneuploidía del 48,3%, una tasa de implantación del 19,5% y se alcanza una tasa de niño nacido vivo por embrión transferido de 29,7% (17).

Factor masculino severo

Para evaluar si los parámetros espermáticos tienen efecto sobre la constitución cromosómica de los embriones, se realizó un estudio en pacientes menores de 36 años que presentaban mal pronóstico en cuanto a la consecución de embarazo a término. Se realizaron 136 ciclos con DGP. No se encontraron diferencias en el porcentaje de embriones aneuploidías, sin

embargo sí se observó una mayor incidencia de monosomías y trisomías en embriones procedentes de MESA o TESE, comparado con el grupo de pacientes normozoospermicos. Además parece existir una asociación entre la tasa de aneuploidías gonosómicas y la severidad del factor masculino. Además el factor masculino severo determina un aumento en la tasa de anomalías de novo en pacientes con cariotipos normales (18).

Cuando existe patología asociada al espermatozoide, el porcentaje de embriones aneuploides puede llegar a ser del 74% como es el caso de las oligoastenozoospermias comparado con el 7,7% al que pueden llegar muestras con parámetros seminales normales.

Cuando se trata de anomalías meióticas el riesgo es mayor, esperándose una tasa de alteración del 80-85%. Y presentando además un riesgo elevado de mosaicismo embrionario.

La incidencia de las anomalías meióticas según últimos datos de SEF 2005 es:

1-Seminograma alterado:

Azoospermias no obstructivas	30%	meiosis patológica
OTA severa	25,5%	meiosis patológica
Astenozoospermias	18%	meiosis patológica
Azoospermia obstructivas	17%	meiosis patológica

2. Normozoospermia, con abortos recurrentes y fallos de FIV 45% meiosis patológica.

La tasa de gestación (19) de este grupo tras FIV/ICSI más DGP es del 45%.

Portadores de alteraciones en el cariotipo

Un tipo de alteración frecuente en el cariotipo es el mosaicismo, que consiste en la existencia, dentro de un tejido, de al menos dos líneas celulares diferentes en su cariotipo derivadas de un solo cigoto. Para evaluar la condición cromosómica de los embriones generados por pacientes con alteración en el cariotipo debido a mosaicismo en los cromosomas sexuales, se realizó un estudio en 36 pacientes con edades comprendidas entre 31 y 38 años, en los que se realizaron 54 ciclos y fueron diagnosticados 295 embriones mediante FISH, encontrándose un 66% de embriones con alteraciones cromosómicas. De estas un 36,1% fueron monosomías y trisomías en los autosomas y un 5,9% fueron aneuploidías en los cromosomas sexuales. En el reanálisis de los embriones no transferidos se encontró una tasa de mosaicismo del 36%, que es más alta de lo esperado si se compara con pacientes de la misma edad que realizaron DGP y se aseme-

ja a la tasa encontrada en pacientes con edad materna avanzada. De este estudio se deduce que los portadores de mosaicismo en los cromosomas sexuales tienen predisposición a generar embriones con mosaicismo en autosomas, debido probablemente a errores en la división celular, y el riesgo es mayor en mujeres portadoras que en hombres (20).

Además de la pérdida o ganancia de cromosomas completos, durante la formación de los gametos se pueden perder o duplicar partes de los cromosomas, alterándose la disposición de las regiones. Cuando esta reorganización es balanceada (no hay ganancia ni pérdida) no tiene consecuencias importantes en los portadores, salvo en el momento de la formación de los gametos, que pueden no ser equilibrados, produciendo embriones con ganancia o pérdida de alguna región cromosómica, dando lugar a enfermedad grave.

En el 10% de los casos, los abortos recurrentes son debidos a alteraciones cromosómicas de los padres. Tras el diagnóstico preimplantacional (21), las interrupciones del embarazo espontáneas descienden de un 90% a un 5% o un 10%.

En pacientes portadores de translocaciones se ha demostrado que el DGP es capaz de reducir significativamente el riesgo de aborto de repetición y aumentar el número de embarazos viables, alcanzándose una tasa de aborto de tan solo el 5,3% comparado con el 100% antes de DGP, en pacientes portadores de translocaciones con historia de dos o más abortos consecutivos (22).

Es importante analizar no solo los cromosomas implicados en la translocación sino también el resto de cromosomas, ya que en portadores de translocaciones la presencia de aneuploidías en cromosomas no implicados en la reorganización, puede conducir a un riesgo adicional de fallos de implantación y embarazos aneuploides (23).

Además, parece que el resultado de un primer ciclo de DGP puede predecir el resultado de un segundo ciclo, y la posibilidad de embarazo se relaciona con el número de embriones euploides que se obtengan en el ciclo (24).

Enfermedades monogénicas

El Diagnóstico Genético Preimplantacional es una forma temprana de Diagnóstico Prenatal, donde los embriones obtenidos mediante FIV se analizan para detectar la presencia de determinadas, de esta manera los pacientes con riesgo de tener un hijo enfermo pueden evitar el diagnóstico prenatal y la posibilidad de recurrir al aborto terapéutico (25).

El análisis directo de mutaciones, se lleva a cabo mediante protocolos de PCR para una única célula. Opcionalmente, cuando se trata de una enfermedad monogénica ligada al cromosoma X, se puede realizar la selección del sexo mediante FISH y evitando así la enfermedad.

El desarrollo de la PCR fluorescente multiplex permite analizar simultáneamente la mutación y una serie de marcadores ligados, con lo que la fiabilidad de la prueba aumenta (26).

Existen alrededor de unas 17.000 enfermedades monogénicas. Las más frecuentemente estudiadas mediante DGP son:

fibrosis quística (27, 28).
beta-talasemias (29, 30)
atrofia muscular tipo I
distrofia miotónica (31)
enf. de Huntington (28)
enf. De Charcot-Marie-Tooth
síndrome X frágil (27, 32)
distrofia muscular de Duchenne (33)
distrofia muscular de Becker
hemofilia A (34)

Con el nuevo método de amplificación del DNA total altamente efectiva, se ha abierto una nueva vía para el desarrollo de nuevas tecnologías como el tipaje HLA (35) y los microarrays, aumentando el número de defectos genéticos que pueden ser detectados en embriones antes de la implantación. El número de casos que se diagnostican cada año va en aumento (36).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Egozcue J, Santalo J, Giménez C, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Aug 15;166(1): 21-5.
2. **Egozcue J, Santalo J, Giménez C, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Aug 15;166(1): 21-5.
3. **Munne S.:** Preimplantation genetic diagnosis and human implantation-a review.
4. **Maroulis GB, Koutlaki N.:** Preimplantation genetic diagnosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006Dec; 1092: 279-84.
5. **Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, et al.:** Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta,* 2003 Oct; 24 Suppl B: S77-83.
6. **Rubio C, Rodrigo L, Pérez-Cano I.:** FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online.* 2005 Oct; 11(4): 497-506.
7. **Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al.:** The rol of preimplantation diagnosis for aneuploidies.

8. **Munne S, Sandalinas M, Escudero T, et al.:** Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy.
9. **Kearns WG, Pen R, Gram J, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis and screening. *Semin Reprod Med.* 2005 Nov; 23(4): 336-47.
10. **Kahraman S, Benkhalifa M, Donmez E, et al.:** The results of aneuploidy screening in 276 couples undergoing assisted reproductive techniques. *Prenat Diagn.* 2004 Apr; 24(4): 307-11.
11. **Vidal F, Rubio C, Simona, et al.:** Is there a place for preimplantation genetic diagnosis screening in recurrent miscarriage patients?. *J. Reprod Fertil Suppl.* 2000; 55: 143-6.
12. **Rubio C, Simon C, Vidal F, et al.:** Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod.* 2003 Jan; 18(1): 182-8.
13. **Munné S, Chen S, Fischer J, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women age 35 years and older with history of recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2005 Aug; 84(2): 331-5.
14. **Munne S, Fischer J, Warner A, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril.* 2006 Feb; 85(2): 326-32.
15. **US department of Health and human services,** 1982.
16. **Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online.* 2005 Mar; 10(3): 381-8.
17. **Platteau P, Staessen C, Michiels A, et al.:** Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening ?. *Reprod Biomed Online.* 2006 Mar; 12(3): 334-9.
18. **Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al.:** Preimplantation diagnosis after assisted reproduction techniques for genetically-determined male infertility. *J Endocrinol Invest.* 200 Nov; 23(10): 711-6.
19. **Según datos del Grupo de interés de DGP (ASE-BIR) hasta 2005**
20. **Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, et al.:** Impact of parental gonosomal mosaicism detected in peripheral blood on preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online.* 2002 Nov-Dec; 5(3): 306-12.
21. **Munné S.:** *Fertil Steril* 2005; 84: 331-335.
22. **Otani T, Roche M, Mizuike M, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. *Reprod Biomed Online.* 2006 Dec; 13(6): 869-74.
23. **Gutiérrez-Mateo C, Gadea L, Benet J, et al.:** Aneuploidy 12 in a Robertsonian (13; 14) carrier: Case report. *Hum Reprod.* 2005 May; 20(5): 1256-60. Epub Feb 3.
24. **Munne S, Escudero T, Colls P, et al.:** Predictability of preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and translocations on prospective attempts. *Reprod Biomed Online.* 2004 Dec; 9(6): 645-51.
25. **Sermon KD.:** Preimplantation genetic diagnosis. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2006; 68(1): 5-32.
26. **Renwick P, Ogilvie CM.:** Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diag.* 2007 Jan; 7(1): 33-34.
27. **Eftedal I, Schwartz M, Bendtsen H, et al.:** Single intragenic microsatellite preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis sensitive allele identification of all CFTR genotypes for informative couples.
28. **Dreesen JC, Jacobs LJ, Bras M, et al.:** Multiplex PCR of polymorphic markers flanking the CFTR gene; a general approach for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod.* 2000 May; 6(5): 391-6.
29. **Jiao Z, Zhou C, Li J, et al.:** Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of beta-thalassemia by whole-genome amplification. *Prenat Diagn.* 2003 Aug; 23(8): 646-51.
30. **Vrettou C, Palmer G, Kanavakis E, et al.:** A widely applicable strategy for single cell genotyping of beta-thalassaemia mutations using DGGE analysis: application to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 1999 Dec; (13): 1209-16.
31. **Sermon K, Seneca S, De Rycke M, et al.:** PGD in the lab for triplet repeat diseases- myotonic dystrophy, Huntington's disease and Fragile-X syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Oct 22; 183 Suppl 1: S77-85.
32. **Sermon K, Seneca S, Vanderfaeillie A, et al.:** Preimplantation diagnosis for fragile X syndrome based on the detection of the non-expanded paternal and maternal CGG. *Prenat Diagn.* 1999 Dec; 19(13): 1223-30.
33. **Malcov M, Ben-Yosef D, Schwartz T, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy (DMD) by triplex-nested PCR.
34. **Michaelides K, Tuddenham EG, Turner C, et al.:** Live birth following the first mutation specific pre-implantation genetic diagnosis for haemophilia A. *Thromb Haemost.* 2006 Feb; 95(2): 373-9.
35. **Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, et al.:** Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *Reprod Biomed Online.* 2004 Aug; 9 (2): 210-21.
36. **Renwick P, Ogilvie CM.:** Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diag.* 2007 Jan; 7(1): 33-34.