



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 085**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06808513 .3**

96 Fecha de presentación : **13.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1951897**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Análisis cromosómico de cariotipado molecular.**

30 Prioridad: **15.11.2005 GB 0523276**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2011

73 Titular/es: **LONDON BRIDGE FERTILITY,
GYNAECOLOGY AND GENETICS CENTRE Ltd.
One St Thomas' Street
London, Greater London SE1 9RY, GB
BLUEGNOME LIMITED**

72 Inventor/es: **Handyside, Alan**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 360 085 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análisis cromosómico por cariotipado molecular

Campo técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere en general a procedimientos y materiales para usar para detectar anomalías del número de cromosomas enteros o regiones de cromosomas (aneuploidía). Tiene utilidad particular para el diagnóstico prenatal, antes de que el embarazo esté establecido en gametos y células tomadas de embriones tempranos, o más tarde en el embarazo en muestras de células de la placenta o el feto.

Antecedentes de la invención

10 **[0002]** En la meiosis normal las células precursoras del esperma o del óvulo deben multiplicarse y después reducir el número de cromosomas a un grupo de la mitad en cada gameto en dos divisiones meióticas especializadas. Durante las primeras etapas de la meiosis después de la replicación del ADN, las 4 cromátidas duplicadas de una pareja homóloga se alinean cercanas a lo largo de su longitud y pueden intercambiar segmentos, dando como resultado cromosomas no recombinantes (sin intercambio) y recombinantes, generando variación genética. Por lo tanto, los gametos resultantes, contienen cada uno un solo cromosoma que es un recombinante de
15 ambos cromosomas homólogos o no es recombinante y es idéntico a uno de los cromosomas parentales. Esto se muestra en la figura 1(a).

[0003] La aneuploidía se define como un número anómalo de cromosomas enteros o partes de cromosomas que produce un desequilibrio genético que puede ser letal en las primeras etapas de desarrollo, producir aborto espontáneo en el embarazo posterior o dar como resultado un embarazo viable pero anómalo. Las aneuploidías más
20 frecuentes y clínicamente significativas implican cromosomas solos (estrictamente "aneusomía") en las que hay tres ("trisomía") o sólo uno ("monosomía") en lugar del par normal de cromosomas.

[0004] Al principio del desarrollo, la aneuploidía puede surgir por la segregación cromosómica anómala después de replicación y división celular (1) durante las dos divisiones meióticas que normalmente dan un haploide, la mitad del grupo, en cada gameto antes de la fertilización, o (2) durante las primeras divisiones de la etapa de
25 escisión del embrión fertilizado. La figura 1(b) muestra los efectos de la no disyunción, es decir el fallo de los cromosomas replicados en la separación durante la división, lo cual es una causa común de la segregación de cromosomas anómala, durante las dos divisiones meióticas. El objetivo del cariotipado molecular es identificar anomalías cromosómicas numéricas o estructurales y en particular identificar cualquier desequilibrio en lugar de las dos copias normales de un cromosoma o segmento del cromosoma.

30 Actualmente hay dos procedimientos básicos para el cariotipado molecular:

[0005] El primero es usar marcadores genéticos moleculares, a menudo repeticiones cortas en tándem (STR) altamente polimorfas, para cada uno de los cromosomas parentales. Cuando hay una repetición diferente en cada uno de los cromosomas parentales el marcador de STR es completamente informativo, es decir, es capaz de
35 identificar la presencia de cada cromosoma (en esta posición). Mediante el uso de una serie de marcadores de STR se puede mejorar la confianza en el procedimiento. Un ejemplo del uso de las STR en el análisis de trisomía lo dan Findlay y col. (1998) *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol 15, No 5: 1998: 266-275. Findlay y col. (1998) *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* Vol 15, No 5: 1998: 266-275.

[0006] Slater y col. (*Am. J. Human Genetics*: 77, 709-726, 2005) describen un procedimiento de identificación de anomalías cromosómicas usando SNP. Usan la cuantificación de los SNP frente a una referencia como medida
40 de anomalías.

[0007] El segundo procedimiento, de hibridación genómica comparativa (CGH), implica el marcaje fluorescente de ADN genómico de ensayo y normal, y la comparación de las diferencias cuantitativas en las secuencias específicas de cromosomas mediante hibridación de los cromosomas de la metafase o clones de ADN en una micromatriz (matriz CGH). En general, el ADN de ensayo y de referencia se marcan con diferentes
45 fluorocromos y se hibridan en la micromatriz de ADN con una serie de ADN diana clonados, por ejemplo, clones de BAC, derivados de regiones cromosómicas particulares. Dichos "chips" se diseñan para el diagnóstico prenatal y otras aplicaciones de diagnóstico por inducción de BAC informativos, por ejemplo, para los síndromes de eliminación comunes así como aneuploidía y traslocación desequilibradas.

[0008] Dada la importancia del cariotipado, puede verse que procedimientos y métodos nuevos relacionados con el cariotipado molecular proporcionarían una contribución a la técnica.
50

Descripción de la invención

[0009] La presente invención describe que el análisis cromosómico por cariotipado molecular (por ejemplo para la detección de trisomía) se puede llevar a cabo usando un análisis de marcadores bialélicos del genoma completo (p. ej., polimorfismos de nucleótido único (SNP) bialélicos) que están distribuidos por el genoma, y que se pueden detectar fácilmente usando tecnologías existentes.

[0010] Este descubrimiento es inesperado por varias razones, principalmente porque a priori se supondría que un marcador bialélico (que proporciona solo información binaria en una posición dada en el cromosoma) no podría identificar positivamente la presencia de tres o más cromosomas diferentes.

[0011] No obstante, como se describe a continuación, la invención proporciona que este análisis de alta densidad de SNP adyacentes cercanos es capaz de identificar positivamente, entre otros, la presencia de dos cromosomas derivados de un progenitor y que basado en suposiciones bien establecidas sobre la frecuencia y espaciado de sucesos de recombinación entre cromosomas parentales durante la meiosis, esto permitirá la detección precisa de trisomía.

[0012] Además, se identifica en cada caso el origen parental del error, lo cual no es posible mediante algunos procedimientos de cariotipado.

[0013] Por lo tanto, los procedimientos de la invención no dependen de la cuantificación de las secuencias específicas de cromosomas, como se usa en algunos procedimientos disponibles actualmente, sino que más bien compara los haplotipos de la muestra de ensayo con los haplotipos conocidos de los progenitores. Cuando se combina con los procedimientos existentes para la amplificación del genoma entero, los procedimientos de la invención son particularmente útiles cuando sólo hay un número relativamente pequeño de células de muestra disponible para el análisis.

[0014] Por lo tanto, en un aspecto la invención proporciona un procedimiento de cariotipado de una célula diana para detectar desequilibrio cromosómico en la misma, comprendiendo el procedimiento:

- (a) examinar SNP bialélicos adyacentes cercanos a lo largo del cromosoma de la célula diana
- (b) comparar los resultados de (a) con el haplotipo del SNP de los cromosomas paterno y materno para montar un haplotipo teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno
- (c) evaluar el haplotipo del SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno para detectar aneuploidía del cromosoma en la célula diana

[0015] Como se expone a continuación, el procedimiento también se puede usar para evaluar la recombinación cromosómica, cuando se desee hacerlo.

[0016] La célula diana será una de una especie diploide, de reproducción sexual, con un genoma en el que los SNP bialélicos aparecen con una densidad suficiente para proporcionar un haplotipo teórico. Preferiblemente, la célula será una célula aviar, de reptil o mamífera. Más preferiblemente la célula es una célula de mamífero humano o no humano. El mamífero no humano puede ser, por ejemplo, un primate.

[0017] En una realización, la célula es humana, y se evalúan al menos 2, 3, 4, 5, 6 o todos los cromosomas humanos seleccionados del siguiente grupo: X, Y, 22, 21, 18, 16 y 13. Los desequilibrios en cualquiera de estos cromosomas se pueden asociar con embarazos viables pero anómalos.

[0018] Preferiblemente, se evalúan un total de al menos 10, 15 ó 20 cromosomas. En una realización, se evalúa el genoma entero de la célula diana (p. ej., los 24 cromosomas humanos).

[0019] Como se discute a continuación, los SNP se pueden examinar usando técnicas convencionales. A este le puede preceder una o más etapas de amplificación convencionales. Preferiblemente, la frecuencia del alelo menos frecuente de los marcadores bialélicos en los presentes mapas es al menos 10, 20 o 30% (es decir, una tasa de heterocigosidad de al menos 0,18, 0,32 ó 0,42).

[0020] El resultado del examen de los SNP dependerá de los nucleótidos encontrados en un locus polimorfo en todas las copias del cromosoma dado en la célula diana (es decir, normalmente 2 copias, pero puede haber 0, 1 ó 3 cuando hay anomalías cromosómicas, o en el caso del cromosoma X, 1 ó 3 copias en una hembra o 0 ó 2 copias en un macho, y en el caso del cromosoma Y, 2 copias en un embrión de macho). Salvo que el contexto indique otra cosa, cuando se hace referencia a "un" o "el" cromosoma en el presente documento con respecto al genotipado de SNP, esto se refiere al tipificado de todas las copias de ese cromosoma que están presentes en la célula diana.

[0021] La siguiente etapa, que es el montaje del haplotipo teórico, se discutirá ahora con más detalle.

Montaje de un haplotipo teórico

[0022] Para detectar y caracterizar la presencia de cromosomas de origen paterno o materno, la siguiente etapa es montar un haplotipo teórico de cada cromosoma. En el presente documento se llama "teórico" puesto que se infiere más que determina directamente, y en algunas realizaciones el haplotipo teórico de, por ejemplo, un cromosoma dado de origen paterno, se puede caracterizar en etapas posteriores del procedimiento cuando procede de dos copias de ese cromosoma de origen paterno (en casos de trisomía, por ejemplo).

Este haplotipo teórico se puede montar usando subgrupos particulares de SNP como sigue:

[0023] Suponiendo alelos de SNP aleatorios para cada cromosoma parental, hay 16 combinaciones diferentes de los 4 alelos parentales para cada SNP (Tabla 1).

[0024] Basándose en los haplotipos (es decir, la secuencia de los alelos de SNP) de cada cromosoma parental, se puede predecir que 8 de estas combinaciones producen genotipos en el ADN de ensayo que identifican positivamente la presencia de uno de los cuatro cromosomas parentales en esta posición ("informativo") y otros 4, dependiendo de los resultados, identificarán un par de cromosomas uno de cada progenitor ("informativo") o identificarán dos posibles combinaciones de cromosomas parentales, de entre las cuatro posibles combinaciones de pares ("semiinformativo").

[0025] Por lo tanto, en una realización de la invención, el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno se monta usando:

(i) alelos de SNP informativos que identifican positivamente a partir de cuál de los cuatro cromosomas paternos y maternos se ha originado un cromosoma en la célula diana, o identifican positivamente a partir de qué cromosoma paterno y de qué cromosoma materno se ha originado un par de cromosomas en la célula diana, y opcionalmente

(ii) alelos de SNP semiinformativos que identifican positivamente a partir de cuál de las dos posibles combinaciones de las cuatro combinaciones de pares posibles de cromosomas paternos y maternos, se ha originado un par de cromosomas en la célula diana.

Caracterización del origen cromosómico de la célula diana

[0026] En una realización de la invención, la etapa (c) se lleva a cabo como sigue:

(c1) evaluando el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno y asignando así cada cromosoma como ausente, no recombinante, recombinante, o presente en 2 o más copias,

(c2) deduciendo la aneuploidía del cromosoma en la célula diana cuando la etapa (c1) indica un desequilibrio de cromosomas de origen paterno y de origen materno.

[0027] Una vez compilado el haplotipo teórico, el cromosoma relevante se puede asignar como no recombinante o recombinante como sigue:

Cromosoma no recombinante: Los alelos de SNP serán idénticos a uno de los cromosomas parentales a lo largo de la longitud entera del cromosoma. Por lo tanto, siempre que haya una combinación informativa de los genotipos de SNP en los progenitores para ese cromosoma particular, los resultados serán positivos, mientras que, e igualmente significativo, en los SNP informativos para el otro cromosoma el resultado será negativo. Los SNP semiinformativos darán resultados de acuerdo con la presencia de ese cromosoma parental particular (véase la figura 2(a)).

[0028] Por lo tanto, en una realización un cromosoma en la célula diana se identifica como no recombinante, cuando los resultados de su haplotipo de SNP teórico están de acuerdo con:

(i) sus alelos de SNP son idénticos a los alelos de SNP de uno de los dos cromosomas paternos o uno de los dos cromosomas maternos a lo largo de la longitud del cromosoma, y

(ii) una ausencia de los alelos de SNP de la alternativa de los dos cromosomas paternos o maternos.

[0029] **Cromosomas recombinantes:** con los cromosomas recombinantes, el patrón será como para los cromosomas no recombinantes excepto que puede haber uno o más segmentos alternantes de ambos de estos cromosomas parentales que resultan de una recombinación sencilla, doble o de orden superior entre los cromosomas parentales originales durante la primera división meiótica (véase la figura 2 (a)).

5 [0030] Cuando se lleva a cabo la presente invención, debe considerarse el hecho de que cuando los SNP informativos o semiinformativos sucesivos indican un cambio de la identificación de un cromosoma parental al otro (un suceso de entrecruzamiento aparente) esto puede deberse a (1) un entrecruzamiento real durante la meiosis (es decir, recombinación normal, como se ha hecho referencia antes), (2) la presencia de un segundo cromosoma parental (trisomía, como se discute en lo sucesivo), o (3) un error de genotipado del SNP.

10 [0031] Considerando el error de genotipado del SNP, puesto que los procedimientos de genotipado del SNP del genoma completo se diseñan para reducir errores al mínimo, en cualquier caso dado un suceso de entrecruzamiento será la alternativa más probable puesto que normalmente hay al menos un entrecruzamiento por brazo de cromosoma. Una sucesión larga de resultados de SNP informativos y semiinformativos de acuerdo con ese cromosoma y no el otro cromosoma parental sugeriría, por lo tanto, recombinación normal (véase la figura 2).

[0032] Por lo tanto, en una realización un cromosoma en la célula diana se identifica como recombinante cuando los resultados de su haplotipo de SNP teórico corresponden a los alelos de SNP de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos en uno o más segmentos alternantes de acuerdo con la recombinación normal entre los dos cromosomas.

15 [0033] Se sabe que la recombinación normal dependerá de (1) datos medios, sexo y específicos de cromosoma para la serie de recombinaciones, y (2) interferencia entre quiasma que previene sucesos de recombinación múltiples a lo largo de distancias cortas.

20 [0034] Por lo tanto, en una realización la coherencia con la recombinación normal se evalúa basándose en la probabilidad estadística de la recombinación normal entre alelos de SNP informativos y adyacentes particulares de dos cromosomas paternos o dos cromosomas maternos durante la primera división meiótica. Preferiblemente, la probabilidad estadística se evalúa basándose en uno o más de los siguientes criterios:

- 25 (i) el número medio de sucesos de recombinación para el cromosoma paterno o materno específico,
 (ii) la posición de los sucesos de recombinación aparentes en cada brazo de cromosoma unos con respecto a otros, el centrómero y el telómero, es decir los extremos del brazo del cromosoma implicado

[0035] **Cromosomas múltiples:** si los SNP informativos y semiinformativos sucesivos alternan de forma repetida y/o aparentemente de forma aleatoria entre los dos cromosomas parentales, es muy probable que el ADN de ensayo sea trisómico en lugar de una serie de sucesos de entrecruzamiento doble o recombinación (figura 3; figura 4).

30 [0036] Esto se debe a que el patrón de la recombinación normal no es aleatorio y específicamente la presencia de un entrecruzamiento inhibe físicamente otro entrecruzamiento cercano, un fenómeno conocido como interferencia de entrecruzamiento (Broman y Weber, 2000).

35 [0037] Con dos cromosomas no recombinantes de un progenitor, el haplotipo del SNP teórico resultante alternará a lo largo de todo el cromosoma. Con otras combinaciones de cromosomas no recombinantes y recombinantes, los dos haplotipos parentales serán detectables para un segmento del cromosoma que muestra la alternancia repetitiva, aparentemente aleatoria.

[0038] En términos de las frecuencias de segmentos alternantes "normales", basándose en un conjunto grande de datos experimentales, Broman y Weber (2000) proponen que la probabilidad de un entrecruzamiento doble entre dos polimorfismos informativos no recombinantes se puede calcular de acuerdo con la fórmula:

$$p = (0,0114d - 0,0154)^4$$

40 en la que p es la probabilidad de un entrecruzamiento doble en un intervalo d medido como distancia genética en centimorganios (cM) entre el dos locus no recombinantes.

[0039] La probabilidad de que un SNP que indica la presencia del otro cromosoma parental (o >1 SNP informativo sin SNP informativos contradictorios intermedios) sea el resultado de un entrecruzamiento doble, se define, por lo tanto, por la probabilidad de los SNP informativos flanqueadores adyacentes para ese cromosoma (figura 2).

45 [0040] Por lo tanto, en una realización, la probabilidad estadística de un entrecruzamiento doble entre dos alelos de SNP se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$p = (0,0114d - 0,0154)^4$$

en la que p es la probabilidad de un entrecruzamiento doble en un intervalo d medido como distancia genética en centimorganios (cM) entre los alelos de SNP.

[0041] Como un ejemplo de la operación de esta fórmula, para un espaciado medio de 0,32 cM (por el sistema Affymetrix GeneChip 10K) y n SNP:

N	d (cM)	p
10	3,2	$1,6 \cdot 10^{-7}$
50	16	$8,35 \cdot 10^{-4}$
100	32	0,015
200	64	0,254

5 **[0042]** Por lo tanto, en la mayoría de los casos la probabilidad de un patrón que alterna entre los haplotipos de ambos cromosomas de un progenitor en sucesivos SNP informativos y semiinformativos, será muy baja, en particular cuando la densidad de los SNP analizados es alta y en general mucho menor que la posibilidad de error de genotipado.

[0043] La probabilidad de trisomía aumenta además con el número y la extensión de estos patrones alternantes que dependerán del número y posición de los sucesos de entrecruzamiento verdaderos en ambos cromosomas.

10 **[0044]** Además del número de entrecruzamientos aparentes en los haplotipos teóricos, se pueden usar varios otros supuestos acerca del número y distribución de entrecruzamientos a lo largo del genoma (Lynn y col., 2004) en la asignación del cromosoma como probablemente recombinante o no:

- Los recuentos directos del número de quiasmas indican que el número total medio en machos es 50,6 (Hulten, 1974) y en hembras 70 (Hulten y Tease, 2003; Tease y Hulten, 2004).
- El número medio de entrecruzamientos en cromosomas individuales.
- La distribución de los entrecruzamientos en cromosomas individuales.

Densidad y naturaleza de los SNP

20 **[0045]** A lo largo del genoma completo cuando se analizan, por ejemplo SNP 10K, a pesar de la alta tasa de precisión, pueden aparecer uno o más errores de genotipado aleatorios que causan resultados positivos individuales aislados en los SNP informativos para el segundo cromosoma parental.

[0046] Por lo tanto, en realizaciones preferidas se fija un número umbral de SNP informativos y semiinformativos positivos y negativos.

25 **[0047]** En una realización, se usan al menos 5000 y/o 2500 alelos de SNP informativos y/o semiinformativos, respectivamente, distribuidos a lo largo del genoma completo, para montar el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno. Sin embargo, para cromosomas individuales puede ser suficiente un número menor; esto lo pueden evaluar los expertos en la materia de acuerdo con el procedimiento preferido de tipificado y la precisión asociada con el mismo y con cualquier procedimiento opcional de amplificación usado.

[0048] En una realización, la distancia media entre los SNP investigados es menor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ó 0,5 kb.

30 **[0049]** En una realización, la distancia media entre los SNP investigados es menos de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ó 0,5 cM.

35 **[0050]** Debido a la pérdida alélica (AD), es decir el fallo aleatorio de amplificación de uno de los alelos parentales, cuando se amplifica el ADN a partir de una sola célula o un número pequeño de células para la aplicación en el diagnóstico genético preimplantacional, el análisis del genotipo de SNP puede basarse preferiblemente todo o en parte en aquellos resultados que den un resultado heterocigoto en un SNP informativo o semiinformativos. Por lo tanto, en una realización se usan al menos 2500 alelos de SNP informativos heterocigotos ("AB" en la tabla 1) para montar el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno.

Cariotipado

40 **[0051]** Como se ha indicado antes, la aneuploidía del cromosoma en la célula diana se detecta cuando el haplotipo teórico indica un desequilibrio de cromosomas de origen paterno y de origen materno. Los detalles de las estrategias de detección de diferentes aneuploidías son los siguientes:

En una realización, cuando el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana indica la presencia de un cromosoma de origen paterno y un cromosoma un de origen materno, se deduce que la célula es diploide normal con respecto al cromosoma relevante.

Nulisomía: en una realización, cuando el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana indica una ausencia de cualquiera de los cromosomas o segmento de cromosoma de origen paterno y de origen materno, se deduce que la célula es nulisómica para el cromosoma o segmento de cromosoma relevante.

5 **[0052] Monosomía:** aquí, habrá sólo un cromosoma de un progenitor, pero puede ser no recombinante o recombinante. Por lo tanto, la monosomía se detectará de dos formas (1) homocigosidad aparente (sea "AA" o "BB" y no "AB") para todos los SNP a lo largo del cromosoma, y (2) identidad con el haplotipo para uno de los cromosomas parentales (no recombinante) o un patrón alternante entre los dos haplotipos de un progenitor (de acuerdo con la recombinación normal entre dos cromosomas). Por lo tanto, en una realización cuando el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana indica una ausencia de un cromosoma o segmento de cromosoma sea de origen paterno o de origen materno, pero no de ambos, se deduce que la célula es monosómica para el cromosoma o segmento de cromosoma relevante.

Las monosomías se pueden detectar surjan antes o después de la fertilización

15 **[0053] Trisomía:** como se ha discutido antes, cuando el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana indica la presencia de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos con un patrón y/o frecuencia no concordantes con la recombinación normal entre los dos cromosomas, se deduce que la célula es trisómica para todo o parte del cromosoma o segmento de cromosoma relevante.

20 **[0054]** Específicamente, el procedimiento está adaptado para detectar la trisomía cuando los cromosomas emparejados en cada una de las células paternas o maternas difieren (lo cual es habitualmente el caso) y cuando los dos cromosomas de origen paterno o materno en la célula diana difieren a lo largo de todo o parte del cromosoma (lo que se aplicaría a la mayoría de las trisomías, es decir la mayoría de las que surgen durante la meiosis, véase la figura 1(b)) y aparecen los SNP informativos y semiinformativos y se investigan en las regiones que difieren (lo cual se aplicaría típicamente cuando se evalúa una densidad suficiente de SNP).

25 **[0055]** Por lo tanto, se proporciona una herramienta útil para detectar aneuploidía en estas situaciones comunes. Habiendo descrito algunas realizaciones de la invención antes, ahora se discutirán algunos modos particulares de operación.

Estrategias de detección combinadas y múltiples

[0056] Si se desea, la invención se puede combinar con una o más estrategias de cariotipado distintas.

30 **[0057]** Por ejemplo, una etapa adicional puede incluir la cuantificación de alelos para aumentar la precisión y la resolución de la detección de trisomía, es decir, en una realización el procedimiento comprende además confirmar la deducción mediante cuantificación de los SNP a lo largo del cromosoma de la célula diana (Meng y col., 2005).

35 **[0058]** En una realización, el procedimiento comprende además diagnosticar la presencia de una enfermedad genética hereditaria en la célula diana comparando el haplotipo de SNP teórico de la célula diana con los alelos de SNP de los cromosomas paternos y los cromosomas maternos y uno o más hermanos afectados para diagnosticar la enfermedad en la célula diana por conexión. La conexión es un procedimiento en el que en lugar de detectar la propia mutación genética que causa la enfermedad, se usan uno o más marcadores informativos tales como STR o SNP, sea cercanos a o dentro del gen afectado, para rastrear la copia afectada del gen por comparación con los marcadores heredados por un hijo afectado (Abou-Sleiman y col., 2002). Con el análisis de SNP del genoma completo del genotipo de la célula diana como se ha discutido antes, se pueden analizar múltiples SNP unidos cercanos que flanquean el gen afectado, permitiendo un análisis por conexión muy preciso.

40 **[0059]** En una realización, el procedimiento comprende además diagnosticar la presencia de una susceptibilidad a una enfermedad común o al cáncer en una célula diana, comparando el haplotipo de SNP teórico con el haplotipo que se sabe que está asociado con dicha enfermedad. Dichas asociaciones se están estableciendo cada vez más, por ejemplo por el "Consortio internacional HapMap" que está haciendo el mapa de la variación en el genoma completo en los haplotipos de SNP en la población humana, facilitando los estudios de asociación de enfermedades (International HapMap Consortium, 2005). Las asociaciones no forman parte de la invención por sí mismas, pero la combinación de este análisis de haplotipos con el procedimiento de cariotipado descrito en el presente documento forman un aspecto de la invención.

Células paternas y maternas y haplotipos cromosómicos

[0060] En una realización, las células paternas y maternas se proporcionan de sangre o de la cavidad bucal.

5 **[0061]** Los análisis de SNP de individuos relacionados al menos a través de una generación, permiten la identificación de un haplotipo para cada cromosoma en posiciones en las que los alelos son diferentes. Específicamente, el haplotipo de los alelos de SNP se puede determinar analizando el ADN de cada progenitor y comparando los resultados con un gameto haploide, de hijo o de progenitor o una combinación de estos. Los expertos en la materia son conscientes de los numerosos algoritmos y programas de software relacionados que permiten deducir los haplotipos del análisis de individuos diploides, p. ej., PHASE (Stephens y Donnelly, 2003) y SIMHAP (www.genepi.com.au/simhap).

10 **[0062]** En una realización, el haplotipo de SNP de cromosomas paternos y maternos se obtiene del análisis del haplotipo de SNP de células obtenidas de embriones fertilizados de hermanos después de fertilización in vitro (FIV) después de amplificación del genoma completo.

15 **[0063]** En una realización, el haplotipo de SNP de cromosomas paternos y maternos se obtiene del análisis de múltiples gametos haploides parentales individuales después de amplificación del genoma entero. Cuando se muestra que dos cromosomas o segmentos de cromosomas de un progenitor son idénticos, el procedimiento no se aplicará para este cromosoma o segmento y deberían usarse procedimientos alternativos.

Células diana

[0064] En una realización la célula diana se ha proporcionado de un embrión de mamífero que ha resultado de FIV. En una realización, el embrión es un embrión de preimplantación (véase, p. ej. Handyside y col, 2004).

20 **[0065]** Cuando la invención se aplica a animales tales como ganado, el embrión se puede recuperar del útero.

[0066] En una realización, la o las células diana se han proporcionado de un feto.

[0067] En una realización, se proporciona un número igual a, o de al menos, 1, 2, 3, 4, ó 5 células.

[0068] En una realización, al examen de SNP le precede la amplificación del genoma entero.

25 **[0069]** En una realización, la amplificación del genoma entero usa amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) isotérmica que permite la amplificación del genoma entero usando la polimerasa phi29 de bacteriófago para la amplificación a partir de números pequeños de células (véase, p. ej., Handyside y col, 2004).

Examen de los SNP

[0070] Los marcadores preferidos son SNP bialélicos, que aparecen a lo largo del genoma (~10 millones por genoma, en el que el SNP se define como >1% de variación entre individuos en una población).

30 **[0071]** Existen diferentes procedimientos para el análisis del polimorfismo de nucleótido único (SNP) a gran escala (véase, Syvanen, 2005, en especial la Tabla 1). Estos incluyen SNPstream (Bell, P.A. y col. "SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery". *Biotechniques Suppl.*, 70-72, 74, 76-77 (2002)); Genorama, APEX (Kurg, A. y col. "Arrayed primer extension: solid-phase four-colour DNA resequencing and mutation detection technology". *Genet. Test.* 4, 1-7 (2000)); GeneChip 100K (Matsuzaki, H. y col. "Genotyping over 35 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays". *Nat. Methods* 1, 109-111 (2004)); pastillas Perlegen (Hinds, D.A. y col. "Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations". *Science* 307, 1072-1079 (2005)); Molecular Inversion Probes (Hardenbol, P. y col. "Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay". *Genome Res.* 15, 269-275 (2005)); ensayo de GoldenGate (Fan, J.B. y col. "Highly parallel SNP genotyping". *Cold Spring Harb. Symp. On Quant. Biol.* LXVII, 69-78 (2003)). Otros procedimientos incluyen el ensayo Illumina "BeadArray".

[0072] Una realización preferida usa la micromatriz de GeneChip™ 10K de Affymetrix que está diseñada para analizar 10.000 distribuidos a una distancia media de 0,2 Kb a lo largo de los 22 cromosomas (véase, Matsuzaki, H. y col. "Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array". *Genome Res.* 14, 414-425 (2004)).

45 **[0073]** En el caso de los chips de oligonucleótidos, los oligonucleótidos que se pueden unir a un chip de acuerdo con la invención serán capaces de distinguir los SNP bialélicos a lo largo del genoma. Se prefieren los oligonucleótidos de 25 nucleótidos de longitud.

[0074] Por lo tanto, en una realización los SNP se examinan en un chip o micromatriz de “genes” u “oligonucleótidos”. Como se sabe en la materia, estos son vehículos miniaturizados, en la mayoría de los casos hechos de vidrio o silicio, en cuya superficie se han inmovilizado oligonucleótidos de secuencia conocida en una rejilla ordenada de alta densidad.

5 **[0075]** Otra realización preferida usa BeadChip Human-1 "infinium"™ de Illumina. Este sistema puede permitir el genotipado del genoma entero de alrededor de 100.000 marcadores SNP, 70% de los cuales están localizados en exones o en 10 kb de transcritos (véase, p. ej., *Pharmacogenomics* (2005) 6(7), 777-782). El sistema se basa en el montaje aleatorio de perlas microscópicas derivatizadas de aproximadamente 3 µm de tamaño, en pocillos de un sustrato patrón, y pueden permitir el examen de combinaciones especificadas de SNP.

10 *Sistemas*

[0076] Preferiblemente, un sistema para usar en la presente invención comprendería medios para el examen de SNP más un dispositivo o medio de almacenamiento programado para hacer que un ordenador analice los datos resultantes. Los datos de examen de los SNP se podrían almacenar para el análisis posterior o analizar “al vuelo”; como se usa en el presente documento la expresión “base de datos” cubre ambos tipos de fuentes de datos.

15 **[0077]** El medio preferido para el examen de SNP sería un chip de oligonucleótidos que examinaría al menos los cromosomas preferidos con la densidad adecuada discutidos antes. Preferiblemente, incluiría el genoma entero.

[0078] Por lo tanto, el medio preferido para el examen de los SNP incluiría:

- 20 (i) Una alta densidad de SNP bialélicos en cromosomas asociados con frecuencia con aborto natural o embarazos anómalos viables (X, Y, 22, 21, 18, 16, 13). El medio puede examinar un grupo polimórfico entero en estos cromosomas.
- (ii) Los SNP que son muy heterocigotos en la población general que aumentan su suministro de información,
- (iii) La densidad relativamente mayor en todas las regiones de síndrome de microeliminación conocidas,
- 25 (iv) La densidad relativamente mayor en regiones asociadas con defectos de un solo gen,
- (v) Los “haplomarcadores” de SNP conocidos asociados con la predisposición a enfermedades complejas comunes.

[0079] La presente invención se puede implementar con un ordenador. Típicamente este incluiría una unidad de procesamiento central (CPU) conectada a un sistema de buses u otro medio de conexión a una interfase de comunicación, memoria del sistema (RAM), memoria no volátil (ROM), y uno o más dispositivos de almacenamiento distintos tales como un disco duro, una disquetera y un lector de CD ROM.

30

[0080] El ordenador también incluye un dispositivo visualizador, tal como una impresora, monitor CRT o una pantalla LCD, y un dispositivo de entrada, tal como un teclado, ratón, lápiz, pantalla táctil, o sistema de activación por voz. El dispositivo de entrada puede recibir datos directamente del medio para el examen de los SNP por una interfase (tal como por ejemplo con el sistema Affymetrix).

35

[0081] El ordenador almacena y ejecuta diferentes programas tales como un sistema operativo y programas de aplicación.

[0082] El medio que puede usar el ordenador hará que el ordenador analice los haplotipos y lleve a cabo el cariotipado molecular para asignar el origen parental a lo largo de la longitud de cada cromosoma, y que describa una aneuploidía donde ésta se detecte. El medio se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en un disco duro, un disco flexible, memoria de acceso aleatorio, memoria de solo lectura y memoria de solo lectura borrrable y programable eléctricamente.

40

[0083] Por lo tanto, la invención proporciona un medio que puede usar el ordenador que tiene un código o instrucciones del programa que puede leer el ordenador almacenados en el mismo (es decir, un dispositivo de almacenamiento programado) para hacer que el ordenador ejecute un procedimiento para determinar la aneuploidía o recombinación cromosómica en una célula diana, siendo el procedimiento uno cualquiera de los discutidos en el presente documento.

45

[0084] Preferiblemente el procedimiento comprende:

- 50 (a) acceder a una base de datos que comprende datos de genotipo obtenidos de una pluralidad de locus de SNP bialélicos adyacentes y cercanos presentes en un cromosoma de la célula diana,

(b) acceder a una base de datos que comprende datos de haplotipos de SNP de los correspondientes cromosomas paternos y maternos (es decir, "P1", "P2", "M1", "M2"),

(c) comparar los datos de los SNP de la célula diana de la base de datos de la etapa (a) con los datos de haplotipos de SNP de la base de datos de la etapa (b) para montar un haplotipo teórico de regiones de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno,

(d) evaluar el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno para detectar aneuploidía o recombinación cromosómica del cromosoma en la célula diana.

[0085] Opcionalmente, a cada locus de los SNP "x" de la base de datos en la etapa (b) se le asigna un valor "n" de acuerdo con cuál de las 16 combinaciones de los 4 alelos de SNP parentales está presente en este locus, y en el que la etapa (c) comprenden montar un haplotipo teórico en el locus comparando

(i) los datos de genotipo para el SNP bialélico en este locus a partir de la base de datos de la etapa (a) y,

(ii) el valor de "n" en este locus a partir de la base de datos de la etapa (b) con,

(iii) una tabla de origen cromosómico,

y de esta forma asignando el locus de SNP de los cromosomas de la célula diana como procedentes de un cromosoma paterno o materno.

[0086] Por "tabla de origen cromosómico" se entiende una referencia al conjunto de datos por el cual el origen cromosómico (p. ej., "P2", "P2", "M1" o "M2") se puede asignar a este locus basándose en los valores de (i) y (ii). Esto puede corresponder al dado en la tabla 1, última columna.

[0087] Preferiblemente, el haplotipo de SNP teórico de las regiones de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno se monta usando un subconjunto de locus de SNP "x" de la base de datos de la etapa (b), cuyo subconjunto consiste en:

(i) alelos de SNP informativos que identifican positivamente a partir de cuál de los 4 cromosomas paternos y maternos se ha originado un cromosoma en la célula diana, o identifica positivamente a partir de qué cromosoma paterno y qué cromosoma materno se ha originado un par de cromosomas en la célula diana, y opcionalmente

(ii) alelos de SNP semiinformativos que identifican positivamente a partir de cuál de dos posibles combinaciones de las 4 posibles combinaciones de pares de cromosomas paternos y maternos se ha originado un par de cromosomas en la célula diana.

[0088] Opcionalmente, el subconjunto puede consistir en alelos de SNP informativos heterocigotos.

[0089] Opcionalmente, el procedimiento puede comprender almacenar el resultado del haplotipo teórico obtenido para cada locus de SNP de los SNP "x", o un subconjunto de los mismos.

[0090] Se lista en el apéndice 1 un ejemplo de software (Excel Visual Basic for Applications (VBA) code I), y este identifica las diferentes combinaciones de alelos parentales en cada SNP y asigna el origen parental en los locus de SNP informativos. La figura 4 muestra los haplotipos teóricos que resultan y los haplotipos de la célula diana reales, determinados independientemente.

[0091] El programa puede identificar el cromosoma en la célula diana como no recombinante en el que los resultados de su haplotipo de SNP teórico están de acuerdo con:

(i) sus alelos de SNP son idénticos a los alelos de SNP de uno de los dos cromosomas paternos o uno de los dos cromosomas maternos a lo largo de la longitud del cromosoma, y

(ii) una ausencia de los alelos de SNP de la alternativa de los dos cromosomas paternos o maternos.

[0092] El programa puede identificar el cromosoma en la célula diana como recombinante cuando los resultados de su haplotipo de SNP teórico corresponden a los alelos de SNP de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos en uno o más segmentos alternantes de acuerdo con la recombinación normal entre los dos cromosomas.

[0093] El programa puede identificar el cromosoma en la célula diana como trisómico para el cromosoma cuando el haplotipo de SNP teórico del cromosoma de la célula diana indica la presencia de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos con un patrón y/o una frecuencia no concordantes con la recombinación normal entre los dos cromosomas.

[0094] El programa puede analizar estadísticamente la probabilidad de la recombinación normal entre los locus de SNP basándose en uno o más de los siguientes criterios:

- 5 (i) una base de datos del número medio de sucesos de recombinación para el cromosoma paterno o materno específico,
 (ii) la posición de los sucesos de recombinación aparentes en cada brazo de cromosoma uno con respecto a otro, el centrómero y el telómero.

[0095] Opcionalmente, el programa puede calcular una medida numérica de la probabilidad de, por ejemplo, trisomía, basándose en esta frecuencia y datos de patrón.

10 **[0096]** El programa puede identificar el cromosoma en la célula diana como nulisómico para el cromosoma en el que el haplotipo de SNP teórico del cromosoma de la célula diana indica una ausencia del cromosoma o un segmento del mismo tanto de origen paterno como de origen materno.

[0097] El programa puede identificar el cromosoma en la célula diana como monosómico para el cromosoma cuando el haplotipo de SNP teórico del cromosoma de la célula diana indica una ausencia del cromosoma o un segmento del mismo de origen paterno y de origen materno, pero no de ambos.

15 **[0098]** Opcionalmente, se fija un número umbral de SNP informativos y opcionalmente semiinformativos positivos y negativos, y se determina un cariotipo sólo cuando se supera este número.

[0099] La invención también proporciona un ordenador programado para ejecutar un procedimiento como se ha descrito antes.

20 **[00100]** La invención ahora se describirá con más detalle con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes. A la luz de estos, a los expertos en la materia se les ocurrirán otras realizaciones de la invención.

FIGURAS

[00101]

Figura 1(a): muestra de forma esquemática la meiosis normal I y II

Figura 1(b): muestra de forma esquemática la no disyunción durante la meiosis que conduce a aneuploidía

25 Figura 2: representación esquemática del análisis de genotipo de SNP para un par de cromosomas en el ADN de ensayo de un feto o embrión. Cada fila representa un locus de SNP y cada columna los haplotipos para los dos cromosomas paternos (P1 y P2) y los dos cromosomas maternos (M1 y M2). Un resultado positivo en un SNP informativo está sombreado. Un resultado negativo en un SNP informativo se marca con ?PX (se omite ?MX por claridad). En la figura 2(a) el segmento marcado A de la copia paterna del cromosoma se identifica como un
 30 recombinante doble porque múltiples SNP informativos consecutivos identifican positivamente el haplotipo de P1 y otros informativos para P2 son negativos. También se tendrían en cuenta la longitud del segmento cromosómico y el número de entrecruzamientos tanto para este cromosoma como en general, y debido a que la interferencia por entrecruzamiento normalmente se extendería a lo largo de un número mayor de SNP que en esta representación en diagrama. En la figura 2(b) el cromosoma materno es no recombinante en esta región y solo los SNP informativos
 35 para M1 son positivos.

Figura 3: representación esquemática del análisis de genotipo de SNP para un par de cromosomas en el ADN de ensayo de un feto o embrión como se describe en la figura 2. En este ejemplo, el segmento marcado B se asigna como trisómico debido al resultado positivo para los SNP informativos alternantes múltiples para ambos cromosomas. La probabilidad de cada resultado positivo individual para P1 de que sea un recombinante doble entre
 40 los resultados positivos que flanquean para P2 (marcados A) es muy pequeña dada la distancia genética media entre SNP cuando se usa análisis de SNP de alta densidad.

Figura 4: datos de genotipo parental y de la progenie de ensayo analizados usando el código de Excel VBA del apéndice 1, que ilustra cómo las combinaciones informativas de SNP bialélicos permiten la identificación del origen parental a lo largo del cromosoma.

45 Figura 5: diagrama de flujo que ilustra la presente invención con múltiples estrategias de detección.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Antecedentes teóricos

[00102] Durante la meiosis y la formación de gametos, los cromosomas homólogos se emparejan y recombinan produciendo 4 cromosomas, que como media consistirán en dos cromosomas no recombinantes y dos recombinantes. Por lo tanto, ahora cada uno de los cromosomas resultante tiene un haplotipo de SNP único.

5 **[00103]** Después de la fertilización, cada embrión tiene una combinación única de haplotipos de los cromosomas no recombinantes o recombinantes segregados de los dos gametos de los dos progenitores. En embriones euploides, con los pares normales de cada cromosoma, cada cromosoma tendrá un haplotipo distinto y el origen parental de cada cromosoma se podrá identificar a partir del haplotipo no recombinante o recombinante único. De forma similar, serán detectables la trisomía y la monosomía.

10 **[00104]** La siguiente tabla 1 presenta cómo se pueden clasificar los SNP como informativos, semiinformativos o no informativos.

Tabla 1. Las 16 combinaciones de haplotipos de SNP parentales basados en una distribución aleatoria de los alelos. Las combinaciones informativas identifican un haplotipo parental independientemente del resultado. Las combinaciones informativas/semiinformativas de alelos identifican uno de los dos cromosomas parentales o dos posibles combinaciones dependiendo del genotipo del ADN que se está ensayando.

Tipo de información	nº	P1	P2	M1	M2	Genotipo de ensayo
No-informativo	1	A	A	A	A	AA
	2	B	B	B	B	BB
	3	A	A	B	B	AB
	4	B	B	A	A	AB
Informativo (todos los resultados identifican la presencia de 1 cromosoma parental)	5	A	B	B	B	AB=P1 BB=P2
	6	B	A	B	B	AB=P2 BB=P1
	7	B	B	A	B	AB=M1 BB=M2
	8	B	B	B	A	AB=M2 BB=M1
	9	B	A	A	A	AB=P1 AA=P2
	10	A	B	A	A	AB=P2 AA=P1
	11	A	A	B	A	AB=M1 AA=M2
	12	A	A	A	B	AB=M2 AA=M1
Informativo/ semi- informativo (2/3 de posibles resultados identifican un par de cromosomas parentales y 1/3 de resultados podrían ser cualquiera de dos combinaciones)	13	A	B	A	B	AA=P1M1 BB=P2M2 AB=P1M2 o P2M1
	14	B	A	B	A	AA=P2M2 BB=P1M1 AB=P2M1 o P1M2
	15	A	B	B	A	AA=P1M2 BB=P2M1 AB=P1M1 o P2M2
	16	B	A	A	B	AA=P2M1 BB=P1M2 AB=P2M2 o P1M1

15

Ejemplo 2 - Tipo de información de SNP y ADO

[00105] En algunas realizaciones, cuando el ADN se amplifica a partir de células individuales, por ejemplo, para el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), uno de los alelos parentales puede fracasar en la amplificación

aleatoria dando como resultado la pérdida alélica (ADO). La siguiente tabla 2 demuestra que cuando se produce ADO en los SNP informativos, la mitad de estos se detectarán porque no es posible el genotipo de ensayo aparente y por lo tanto se puede deducir el resultado heterocigoto verdadero ("AB").

Tabla 2: Efecto de la pérdida alélica (ADO) en los SNP informativos

Cr materno (M)		Cr paterno (P)		Genotipo de ensayo y cromosoma identificado
1	2	1	2	
B	A	A	A	AA = M2 AB = M1 (BB = AB*)
A	B	A	A	AA = M1 AB = M2 (BB = AB*)
A	A	B	A	AA = P2 AB = P1 (BB = AB*)
A	A	A	B	AA = P1 AB = P2 (BB = AB*)
A	B	B	B	BB = M2 AB = M1 (AA = AB*)
B	A	B	B	BB = M1 AB = M2 (AA = AB*)
B	B	A	B	BB = P2 AB = P1 (AA = AB*)
B	B	B	A	BB = P1 AB = P2 (AA = AB*)

*Para esta combinación de SNP parentales, el genotipo de ensayo no puede tener dos copias de este alelo indicando la pérdida alélica (ADO), es decir, fallo para amplificar uno de los alelos parentales de forma aleatoria. Por lo tanto, se puede suponer que el genotipo de ensayo es AB. Este procedimiento aumenta el poder del ensayo cuando la invención se usa en aplicaciones de célula individual como el cribado genético preimplantacional.

5

Ejemplo 3 - Análisis basado en secuencia y cuantitativo combinados de SNP

[00106] Si se logra la *cuantificación* relativa de cada alelo de SNP, las combinaciones de genotipo disómicas normales, "AA", "AB" y "BB", son complementadas por "A" y "B" en la monosomía y "AAA", "BBB", "AAB" y "ABB". La tabla 3 demuestra la información extra que está disponible combinando el genotipado y la cuantificación de SNP. Mientras que estas posibles combinaciones de genotipado de alelos de SNP pueden ser no informativas, la cuantificación identificaría el cromosoma como trisómico incluso aunque el origen parental sea desconocido en los dos primeros ejemplos.

10

Tabla 3: Genotipado y cuantificación combinados de SNP

Cr materno (M)		Cr paterno (P)		Genotipo de ensayo y cromosoma identificado
1	2	1	2	
A	A	A	A	AAA = Trisómico M1 M2 o P1 P2
B	B	B	B	BBB = Trisómico M1 M2 o P1 P2
A	A	B	B	AAB = M1 M2 P1 o P2 ABB = M1 o M2 P1 P2
B	B	A	A	AAB = M1 o M2 P1 P2 BBA = M1 M2 P1 o P2
A	B	A	B	AAB=M1 P1+ M2 o P2 ABB = M2 P2 + M1 o P1
B	A	A	B	AAB = M2 P1 + M1 o P2 ABB=M1 P2+ M2 o P1
A	B	B	A	AAB=M1 P2+ M2 o P1 BBA = M2 P1 + M1 o P2
B	A	B	A	AAB = M2 P2 + M1 o P1 BBA = M1 P1+ M2 o P2

15

Ejemplo 4 - uso de la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)

[00107] El programa de Microsoft Excel VBA macro (análisis de SNP (1)) para analizar estas combinaciones de SNP y genotipos de ensayo se presenta a continuación en el apéndice 1.

[00108] Los resultados se muestran en la figura 4. Los datos son el análisis de genotipo de ensayo de los SNP a lo largo del cromosoma 21. Se han creado los haplotipos materno y paterno basándose en un genotipado individual usando la micromatriz de Affymetrix GeneChip 10K. En algunos SNP los alelos no se pudieron identificar de forma fiable ("sin denominación"). De lo contrario, con propósitos de ilustración, se supone que el genotipo de ensayo es 100% preciso y se basa en los haplotipos de ensayo reales mostrados. Las combinaciones de haplotipos parentales

20

numeradas son como se definen en la tabla 1. En este ejemplo, solo se han usado combinaciones de SNP totalmente informativos (5-12) para identificar los haplotipos de ensayo. Además, se usarían las combinaciones semiinformativas y se analizaría después la información para distinguir la recombinación doble de la trisomía o de los errores de genotipado. Se muestran dos ejemplos - uno normal disómico y uno trisómico para el cromosoma 21. Los círculos en negro indican los resultados de SNP críticos que indican que esta muestra de ensayo es trisómica, es decir, demuestran la presencia de segmentos alternantes que no son concordantes con la recombinación normal entre los dos cromosomas.

Ejemplo 5 - Diagnóstico prenatal después de CVS o amniocentesis

[00109] Los procedimientos actuales de análisis para cromosomas incluyen el cariotipado, la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para un número restringido de pares de cromosomas o PCR fluorescente cuantitativa. El perfil de los SNP de acuerdo con la presente invención combina la detección de aneuploidía, eliminaciones y traslocaciones no equilibradas.

[00110] Los procedimientos actuales para la detección de defectos de genes individuales combinan la detección de la mutación (que requiere la identificación de la mutación) y marcadores de conexión informativos que en algunos casos requieren el análisis por conexión previo y desarrollo del ensayo. Debido a la densidad de los SNP que se puede analizar, también serán posibles las conexiones con combinaciones de SNP en muchos casos.

Ejemplo 6 - Diagnóstico genético preimplantacional después de FIV

[00111] El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) requiere el análisis de una sola célula o un número pequeño de células obtenidas de cada embrión temprano y, si es posible a las 36-72 h, de modo que los embriones identificados como no afectados se pueden transferir sin crioconservación.

[00112] Los procedimientos actuales para la aneuploidía incluyen el FISH secuencial para el análisis de 9 cromosomas, hibridación genómica comparativa de todos los cromosomas que requiere crioconservación y PCR fluorescente múltiple. Cada translocación recíproca y cada tipo de translocación robertsoniana requieren el desarrollo de una estrategia específica. Los procedimientos actuales para la detección de un solo gen incluyen la detección de mutación y el análisis de unión por PCR fluorescente múltiple.

Tabla 4. Ventajas de la presente invención en el diagnóstico prenatal y el diagnóstico genético preimplantacional

	Ventajas
Diagnóstico prenatal	- Cribado universal de aneuploidía (posibles excepciones) - Detección de alta resolución de translocaciones desequilibradas y eliminaciones comunes
Diagnóstico genético preimplantacional	- Cribado universal de aneuploidía (incluyendo translocaciones) combinado con detección por conexión de defecto genético individual - No requiere el desarrollo del ensayo - Identifica el origen parental de la aneuploidía

Referencias

[00113] Handyside y col (2004) "Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease". *Mol. Hum. Reprod.* 10, 767-772.

[00114] Syvanen, AC (2005) "Toward genome wide SNP genotyping". *Nature Genetics* 37, S5-S10.

[00115] Broman, K.W. y Weber, J.L. (2000) "Characterisation of human crossover interference". *Am. J. Hum. Genet.* 66,1911-1926.

[00116] Hulten, "maternal (1974) Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male". *Hereditas* 76, 55-78.

[00117] Hulten M.A. y Tease C. (2003) "Genetic maps: direct meiotic analysis". En: Cooper DN (ed) *Encyclopaedia of the Human Genome* Nature Publishing Group, Londres

[00118] Lynn, A., Ashley, T. y Hassold, T. (2004) "Variation in human meiotic recombination". *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 5, 317-349.

[00119] Tease C. y Hulten M.A. (2004) "Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells". *Cytogenet Genome Res.* 107, 208-215.

[00120] Meng H., Hager K. y Gruen J.R. (2005) "Detection of Turner syndrome using high-throughput quantitative genotyping". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3419-3422.

[00121] International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.

5 [00122] Abou-Sleiman P.M., Apeessos A., Harper J.C., Serhal P., Winston R.M. y Delhanty J.D. (2002) "First application of preimplantation genetic diagnosis to neurofibromatosis type 2 (NF2)". *Prenatal Diagnosis* 22, 519-524.

[00123] Stephens M. y Donnelly P. (2003) "A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data". *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1162-1169.

Apéndice 1

Microsoft Excel VBA macro: análisis de SNP (1)

10 Private Sub CommandButton1_Click()

[00124] Para i = 1 a X (nº de SNP analizados)

Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 1

15 Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 2

Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 3

Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 4

20 Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 5

Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 6

25 Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 7

Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 8

Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 9

30 Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 10

Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 11

35 Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 12

Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 13

Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "A" Y las células(i, 4) = "B" Entonces las células(i, 5).Valor = 14

40 Si las células(i, 1) = "A" Y las células(i, 2) = "B" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 15

Si las células(i, 1) = "B" Y las células(i, 2) = "A" Y las células(i, 3) = "B" Y las células(i, 4) = "A" Entonces las células(i, 5).Valor = 16

Siguiente i

45

[00125] Para i = 1 a X

Si las células(i, 5) = 5 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 9).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

Si las células(i, 5) = 5 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 9).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

Si las células(i, 5) = 5 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 8).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

50 Si las células(i, 5) = 6 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 8).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

Si las células(i, 5) = 6 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 8).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

Si las células(i, 5) = 6 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 9).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

Si las células(i, 5) = 7 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 8).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

Si las células(i, 5) = 7 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 8).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

55 Si las células(i, 5) = 7 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 9).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)

```

Si las células(i, 5) = 8 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 9).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)
Si las células(i, 5) = 8 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 9).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)
Si las células(i, 5) = 8 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 8).Interior.Color = RGB(200, 0, 0)
Si las células(i, 5) = 9 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 11).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
5 Si las células(i, 5) = 9 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 11).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 9 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 10).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 10 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 10).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 10 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 10).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 10 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 11).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
10 Si las células(i, 5) = 11 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 10).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 11 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 10).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 11 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 11).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 12 Y las células(i, 6) = "AB" Entonces las células(i, 11).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si las células(i, 5) = 12 Y las células(i, 6) = "AA" Entonces las células(i, 11).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
15 Si las células(i, 5) = 12 Y las células(i, 6) = "BB" Entonces las células(i, 10).Interior.Color = RGB(0, 0, 200)
Si siguiente i
End Sub

```

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cariotipado de una célula diana humana para detectar desequilibrio cromosómico en la misma, comprendiendo el procedimiento:

- 5
- (a) examinar los SNP bialélicos adyacentes y cercanos a lo largo del cromosoma de la célula diana
 - (b) comparar los resultados de (a) con el haplotipo de SNP de los cromosomas paterno y materno para montar un haplotipo teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno
 - 10 (c) evaluar el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno para detectar aneuploidía del cromosoma en la célula diana, en el que el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno se monta en la etapa (b) usando:
 - 15 (i) alelos de SNP informativos que identifican positivamente a partir de cuál de los cuatro cromosomas paternos y maternos se ha originado un cromosoma en la célula diana, o identifican positivamente a partir de qué cromosoma paterno y de qué cromosoma materno se ha originado un par de cromosomas en la célula diana, y opcionalmente
 - 20 (ii) alelos de SNP semiinformativos que identifican positivamente a partir de cuál de las dos posibles combinaciones de las cuatro combinaciones de pares posibles de cromosomas paternos y maternos, se ha originado un par de cromosomas en la célula diana.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que:

- 25
- (i) se examinan al menos 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 de los cromosomas seleccionados del grupo que consiste en: X, Y, 22, 21, 18, 16 y 13, o
 - (ii) se examinan los 24 cromosomas.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la aneuploidía del cromosoma en la célula diana se detecta en la etapa (c) por:

- 30
- (c1) evaluación del haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno y de esta forma asignación de cada cromosoma como recombinante o no recombinante y/o presente en 0, 1 o más copias,
 - 35 (c2) deducción de la aneuploidía del cromosoma en la célula diana cuando la etapa (c1) indica un desequilibrio de cromosomas de origen paterno y de origen materno.

4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que un cromosoma en la célula diana se identifica como no recombinante cuando los resultados de su haplotipo de SNP teórico están de acuerdo con:

- 40
- (i) sus alelos de SNP son idénticos a los alelos de SNP de uno de los dos cromosomas paternos o uno de los dos cromosomas maternos a lo largo de la longitud del cromosoma, y
 - (ii) una ausencia de los alelos de SNP de la alternativa de los dos cromosomas paternos o maternos, y en el que un cromosoma en la célula diana se identifica como recombinante cuando los resultados de su haplotipo de SNP teórico corresponden a los alelos de SNP de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos en uno o más segmentos alternantes de acuerdo con la recombinación normal entre los dos cromosomas.
 - 45

5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana indica la presencia de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos con un patrón y/o frecuencia de acuerdo con la recombinación normal entre los dos cromosomas, y se deduce que la célula es trisómica para todo o parte del cromosoma o segmento de cromosoma relevante.

- 50
6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que la coherencia con la recombinación normal se evalúa basándose en la probabilidad estadística de la recombinación normal entre alelos de SNP informativos y adyacentes particulares de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos durante la primera división meiótica, y en el que la probabilidad estadística se evalúa basándose en uno o más de los siguientes criterios:
- 55

- (i) el número medio de sucesos de recombinación para el cromosoma paterno o materno específico,
- (ii) distancia entre los sucesos de recombinación aparentes en cada brazo de cromosoma, y su posición relativa unos respecto a otros, el centrómero y el telómero.

5 7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana indica

- (i) la presencia de un cromosoma de origen paterno y un cromosoma de origen materno, y se deduce que la célula es diploide normal con respecto al cromosoma relevante, o indica
- 10 (ii) una ausencia de cualquier cromosoma o segmento de cromosoma de origen paterno y de origen materno, y se deduce que la célula es nulisómica para el cromosoma o segmento de cromosoma relevante, o indica
- 15 (iii) una ausencia de un cromosoma o segmento de cromosoma sea de origen paterno o de origen materno pero no ambos, y se deduce que la célula es monosómica para el cromosoma o segmento de cromosoma relevante.

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la distancia media entre los SNP examinados es menor que 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ó 0,5 kb, o menor que 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ó 0,5 cM.

20 9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende la etapa de cuantificación de los alelos de SNP examinados.

10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende:

- 25 (i) diagnosticar la presencia de una enfermedad genética hereditaria en la célula diana comparando el haplotipo del SNP teórico de la célula diana con los alelos de SNP de los cromosomas paternos y los cromosomas maternos y de uno o más hermanos afectados para diagnosticar la enfermedad en la célula diana por conexión y/o
- 30 (ii) diagnosticar la susceptibilidad a una enfermedad común o al cáncer en la célula diana comparando el haplotipo de SNP teórico con un haplotipo que se sabe que está asociado con dicha enfermedad.

35 11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el haplotipo de SNP de cromosomas paternos y maternos se obtiene por el análisis del haplotipo de SNP de células obtenidas de embriones fertilizados hermanos después de fertilización in vitro (FIV) después de la amplificación del genoma entero o de análisis de múltiples gametos haploides parentales individuales después de la amplificación del genoma entero.

40 12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula diana se ha obtenido de un embrión de mamífero que opcionalmente es resultado de una FIV y opcionalmente es un embrión preimplantado.

13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se proporciona y se ensaya un número igual a, o de al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 células diana.

45 14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al examen de SNP le precede la amplificación del genoma entero.

15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el examen de SNP se lleva a cabo mediante un chip de oligonucleótidos.

50 16. Un medio usable con ordenador que tiene un código del programa almacenado en el mismo que puede ser leído por el ordenador, para hacer que un ordenador ejecute un procedimiento para determinar la aneuploidía o recombinación cromosómica en una célula diana, cuyo procedimiento comprende:

- 55 (a) acceder a una base de datos que comprende los datos de genotipo obtenidos de una pluralidad de locus de SNP bialélicos adyacentes y cercanos presentes en un cromosoma de la célula diana,
- (b) acceder a una base de datos que comprende los datos de haplotipo de SNP de los correspondientes cromosomas paternos y maternos,
- (c) comparar los datos de SNP de la célula diana de la base de datos de la etapa (a) con los datos de haplotipo de SNP de la base de datos de la etapa (b) para montar un haplotipo teórico de regiones de cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno,
- 60 (d) evaluar el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y

origen materno para determinar la aneuploidía o recombinación cromosómica del cromosoma en la célula diana.

5 17. Un medio usable con ordenador según la reivindicación 16, en el que a cada locus de SNP de los SNP "x" de la base de datos en la etapa (b) se le asigna un valor "n" de acuerdo con cuál de las 16 combinaciones de los 4 alelos de SNP parentales está presente en ese locus, y en el que la etapa (c) comprende montar un haplotipo teórico en este locus comparando:

- 10 (i) los datos de genotipo para el SNP bialélico en ese locus de la base de datos de la etapa (a) y,
 (ii) el valor "n" en ese locus de la base de datos de la etapa (b) con,
 (iii) una tabla de origen cromosómico,

y de esta forma asignar el locus de los cromosomas de la célula diana como procedentes de un cromosoma paterno o materno.

15 18. Un medio usable con ordenador según la reivindicación 16 ó 17, en el que el haplotipo de SNP teórico de regiones de cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno se monta usando un subconjunto de los locus de SNP "x" de la base de datos en la etapa (b), cuyo subconjunto consiste en:

- 20 (i) alelos de SNP informativos que identifican positivamente cuál de los 4 cromosomas paternos y maternos ha originado un cromosoma en la célula diana, o identifican positivamente qué cromosoma paterno y qué cromosoma materno han originado un par de cromosomas en la célula diana, y opcionalmente
 25 (ii) alelos de SNP semiinformativos que identifican positivamente cuál de las dos posibles combinaciones de las 4 posibles combinaciones de pares de cromosomas paternos y maternos ha originado un par de cromosomas en la célula diana, en el que se fija un número umbral de SNP informativos y opcionalmente semiinformativos positivos y negativos, y se determina un cariotipo sólo cuando se supera este número.

30 19. Un medio usable con ordenador según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que:

el cromosoma en la célula diana se identifica como no recombinante cuando los resultados de su haplotipo de SNP teórico están de acuerdo con:

- 35 (i) sus alelos de SNP son idénticos a los alelos de SNP de uno de los dos cromosomas paternos o uno de los dos cromosomas maternos a lo largo de la longitud del cromosoma, y
 (ii) una ausencia de los alelos de SNP de la alternativa de los dos cromosomas paternos o maternos, y en el que el cromosoma en la célula diana se identifica como recombinante

40 en el que los resultados de su haplotipo de SNP teórico corresponden a los alelos de SNP de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos en uno o más segmentos alternantes de acuerdo con la recombinación normal entre los dos cromosomas.

45 20. Un medio usable con ordenador según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que:

- (i) el cromosoma en la célula diana se identifica como trisómico para el cromosoma cuando el haplotipo de SNP teórico del cromosoma de la célula diana indica la presencia de ambos de los dos cromosomas paternos o los dos cromosomas maternos con un patrón y/o frecuencia no concordante con la recombinación normal entre los dos cromosomas;
 50 (ii) el cromosoma en la célula diana se identifica como nulisómico para el cromosoma cuando el haplotipo de SNP teórico del cromosoma de la célula diana indica una ausencia del cromosoma o un segmento del mismo tanto de origen paterno como de origen materno;
 (iii) el cromosoma en la célula diana se identifica como monosómico para el cromosoma cuando el haplotipo de SNP teórico del cromosoma de la célula diana indica una ausencia del cromosoma o un
 55 segmento del mismo de origen paterno y de origen materno, pero no de ambos.

21. Un sistema para el cariotipado de una célula diana para detectar desequilibrio cromosómico en la misma, comprendiendo el sistema:

- 60 (i) medios para examinar los SNP bialélicos adyacentes y cercanos a lo largo del cromosoma una célula diana, que es un chip de oligonucleótidos,

(ii) un ordenador programado para,

(1) ejecutar un procedimiento para determinar la aneuploidía o recombinación cromosómica en una célula diana, cuyo procedimiento comprende:

- 5
- (a) acceder a una base de datos que comprende datos de genotipo obtenidos de una pluralidad de locus de SNP bialélicos adyacentes y cercanos presentes en un cromosoma de la célula diana,
 - 10 (b) acceder a una base de datos que comprende datos de haplotipo de SNP de los correspondientes cromosomas paternos y maternos,
 - (c) comparar los datos de SNP de la célula diana de la base de datos de la etapa (a) con los datos de haplotipo de SNP de la base de datos de la etapa (b) para montar un haplotipo teórico de regiones de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno,
 - 15 (d) evaluar el haplotipo de SNP teórico de los cromosomas de la célula diana de origen paterno y de origen materno para determinar aneuploidía o recombinación cromosómica del cromosoma en la célula diana:

o,

20 (2) programado con un medio usable con ordenador como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20.

MEIOSIS I Y II

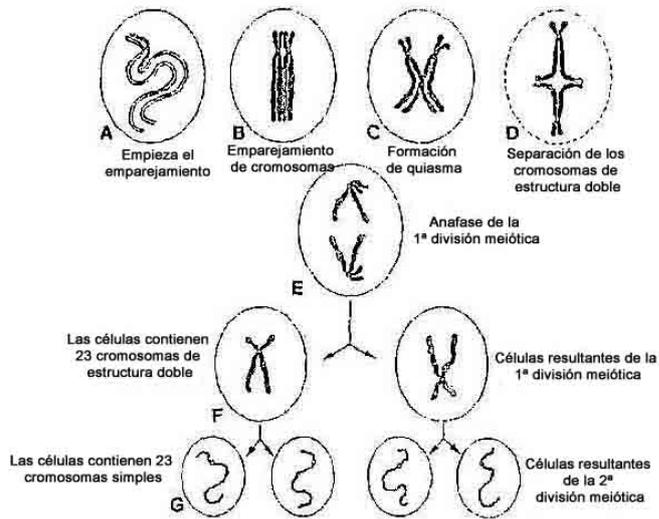


Figura 1a

LA NO DISYUNCIÓN PRODUCE ANEUPLOIDÍA

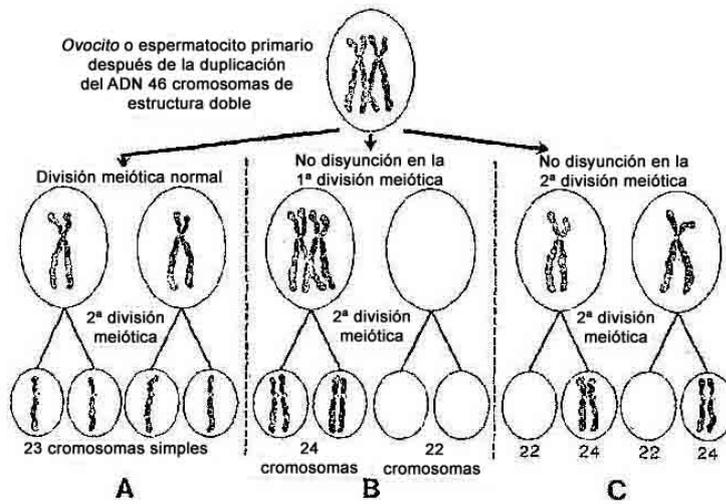


Figura 1b

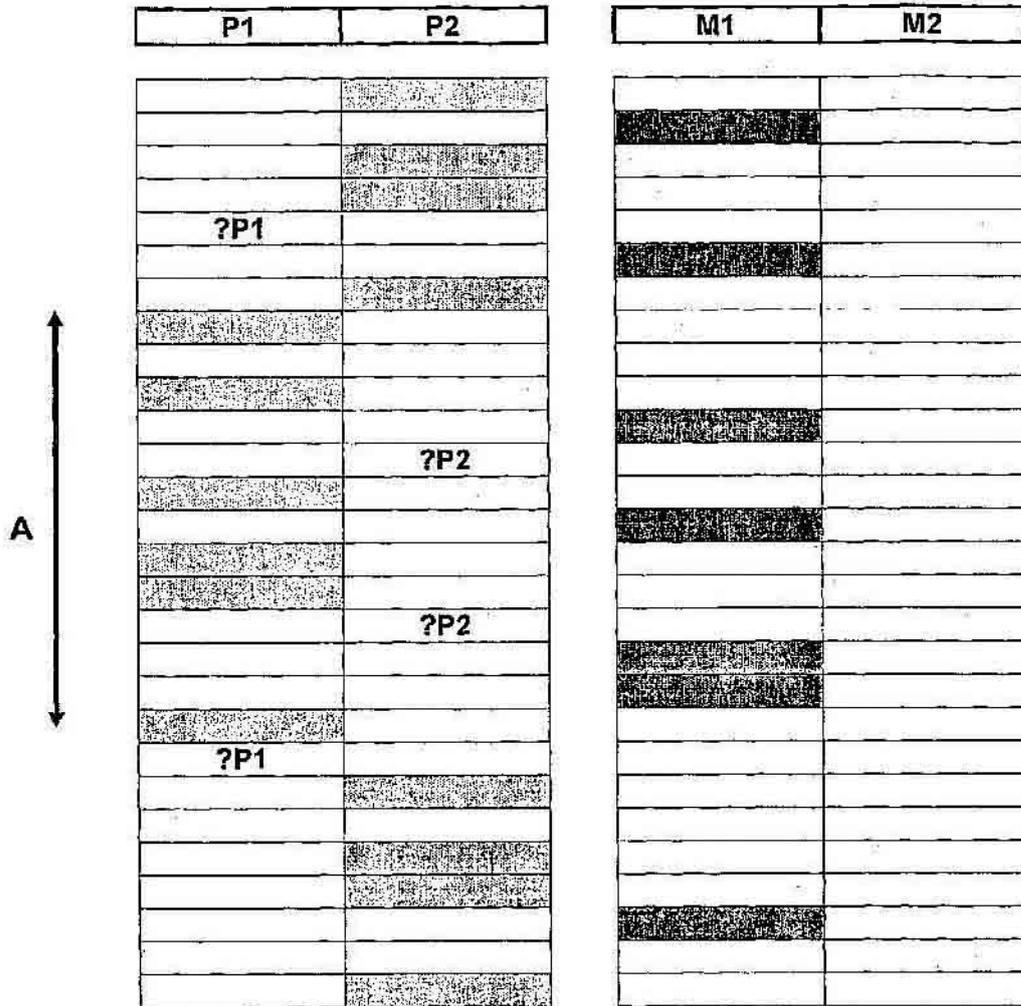
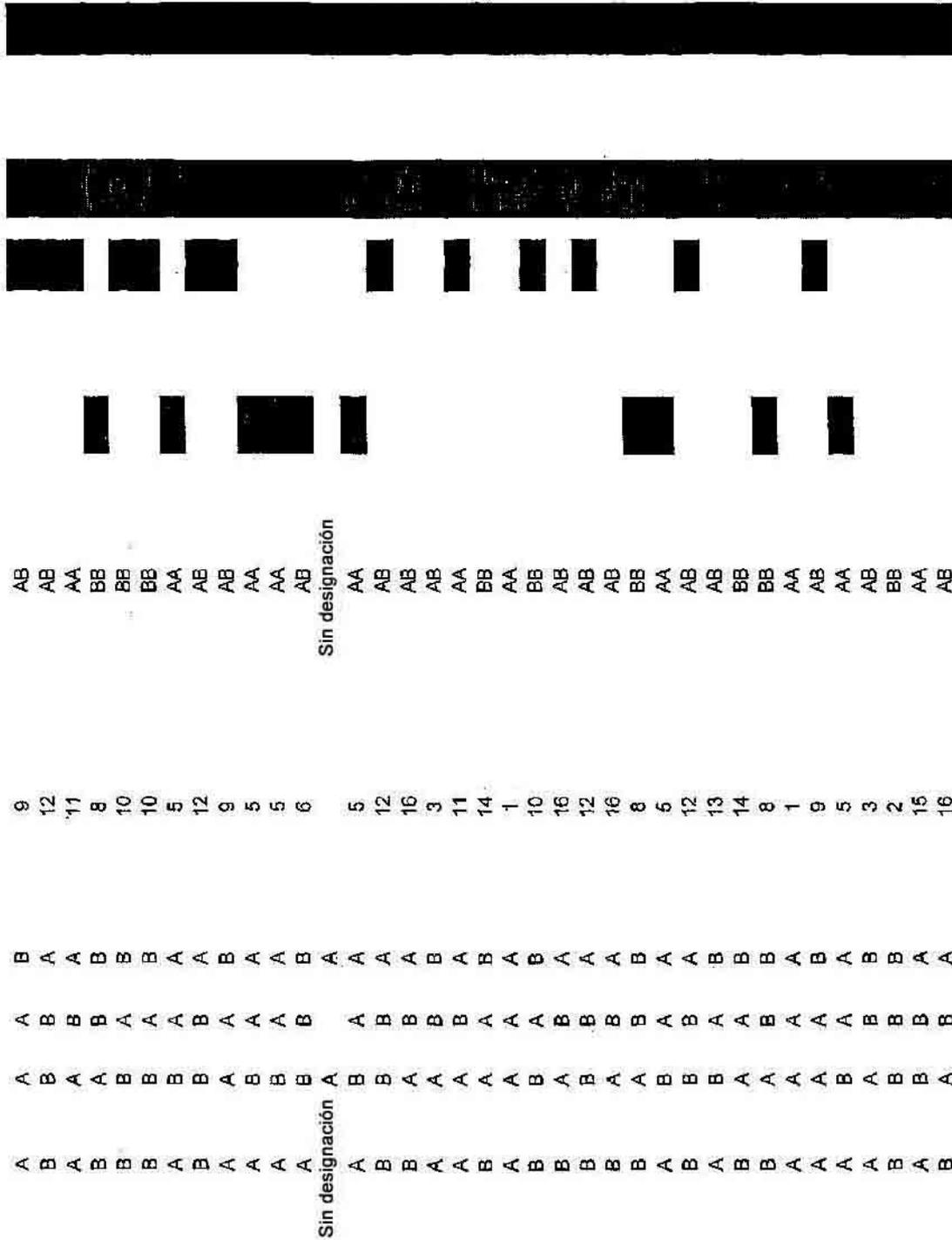


Figura 2a y 2b

Figura 4 (continuación)



Figura 4 (continuación)



Ejemplo 2: trisomía (mismos cr. que el ejemplo 1 con cr. 21 (M1) materno no recombinante adicional)

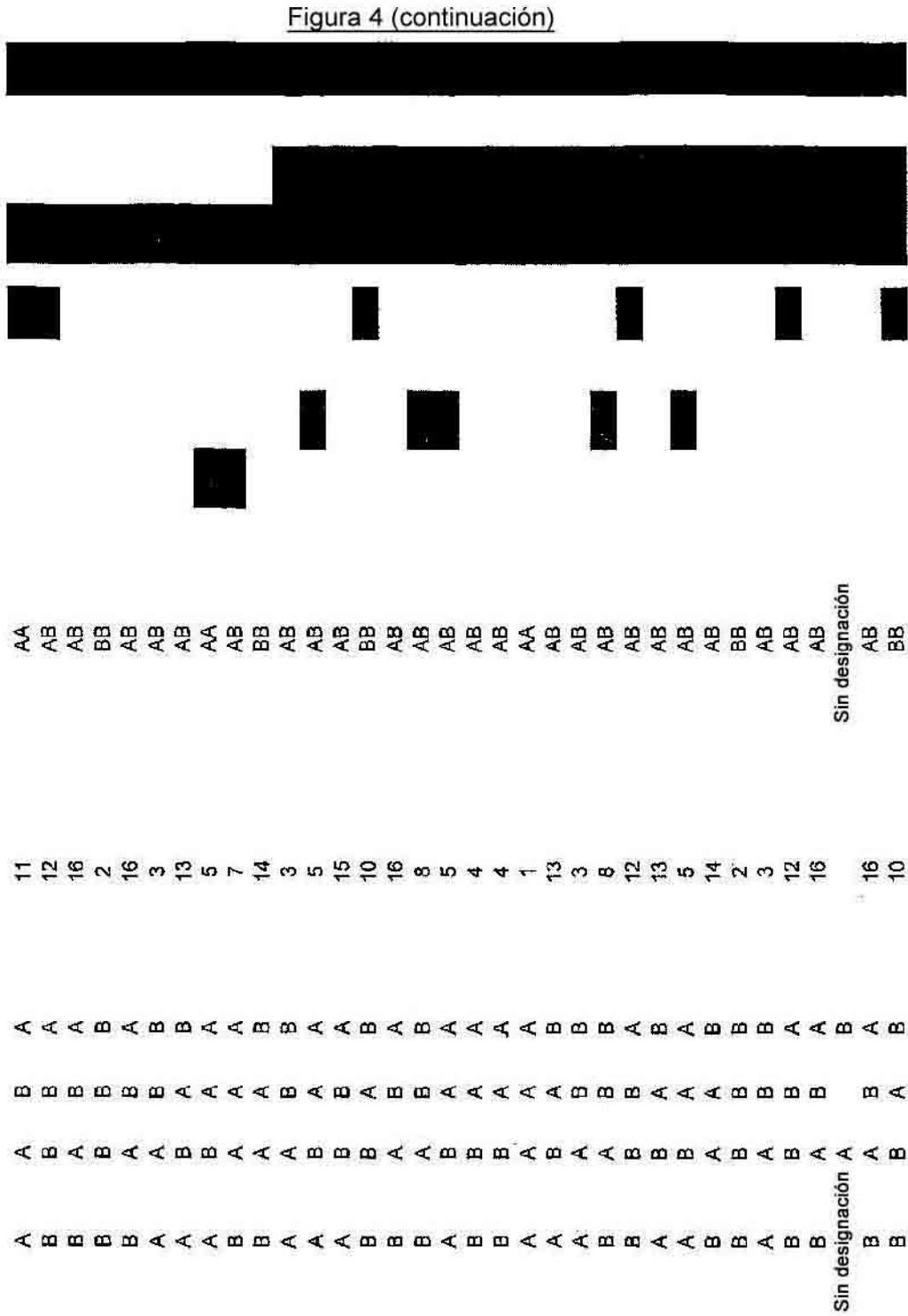


Figura 4 (continuación)

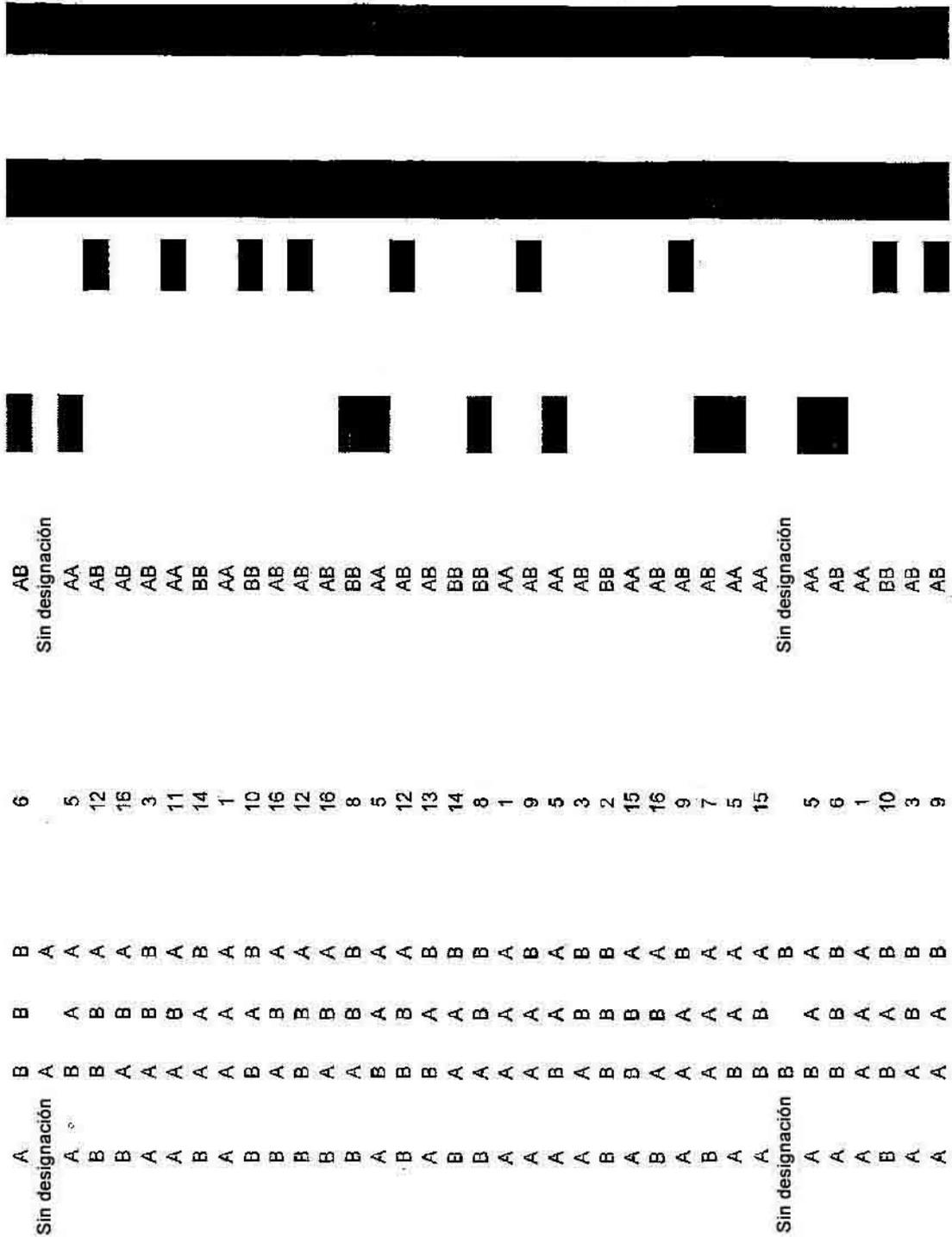


Figura 4 (continuación)

