

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 402**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6827 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2014 PCT/GB2014/050955**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14155105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2014 E 14719062 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2978860**

54 Título: **Evaluación del riesgo de aneuploidía**

30 Prioridad:

27.03.2013 GB 201305588

10.01.2014 GB 201400397

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.03.2020

73 Titular/es:

BLUEGNOME LTD (100.0%)

CPC4, Capital Park, Fulbourn

Cambridge, Cambridgeshire CB21 5XE, GB

72 Inventor/es:

HANDYSIDE, ALAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 751 402 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

Evaluación del riesgo de aneuploidía

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere generalmente a métodos y materiales para uso en la detección de anomalías del número de cromosomas completos o regiones cromosómicas (aneuploidía). Tiene una utilidad particular para evaluar el riesgo de aneuploidía de óvulos (es decir, ovocitos), óvulos fecundados o embriones desarrollados a partir de ellos en el contexto de la fecundación in vitro.

Antecedentes de la técnica

10 En la meiosis femenina normal, las células precursoras de los óvulos se multiplican y después reducen el número de cromosomas a la mitad en cada gameto en dos divisiones meióticas especializadas.

La meiosis se inicia en el ovario fetal antes del nacimiento durante el desarrollo temprano de las células germinales femeninas (ovocitos primarios), que eventualmente formarán óvulos maduros (u ovocitos, los términos se utilizan indistintamente) en la mujer adulta.

15 Para reducir el número de cromosomas de los 23 pares normales (euploides) de cromosomas homólogos (uno de cada par heredado del padre y el otro de la madre, entonces 46 en total) a 23 cromosomas individuales, hay una ronda de replicación de ADN en la cual cada cromosoma se duplica en dos cromátidas hermanas seguidas de dos divisiones meióticas especializadas, meiosis I y II.

20 Después de la replicación, los dos cromosomas homólogos de cada par se "emparejan" y se forma un solo cromosoma bivalente en el que las cuatro cromátidas hermanas están estrechamente unidas. Esto permite un número limitado de roturas en las cadenas de ADN de cromátidas adyacentes no hermanas para "entrecruzarse" y volver a unirse a la otra cromátida, lo que genera cromátidas recombinantes y no recombinantes (sin intercambio) y genera variación genética.

25 A medida que la célula se divide al final de la meiosis I, un cromosoma homólogo de cada par se introduce en el primer cuerpo polar y el otro en el ovocito secundario, que ahora tiene 23 cromosomas, cada uno con dos cromátidas hermanas.

30 En la meiosis II, después de la fecundación del ovocito por un espermatozoide que contiene el medio conjunto de cromosomas paternos, las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma finalmente se separan y segregan en el segundo cuerpo polar y el ovocito fecundado (ahora un cigoto). Por lo tanto, el cigoto hereda 23 cromátidas maternas únicas (ahora "cromosomas").

La aneuploidía se define como un número anormal de cromosomas completos o partes de cromosomas que causan un desequilibrio genético. Las aneuploidías más frecuentes y clínicamente significativas involucran cromosomas únicos (estrictamente "aneusomía") en los que hay tres ("trisomía") o solo uno ("monosomía") en lugar del par normal de cromosomas por célula somática.

35 La aneuploidía cromosómica es una causa importante de pérdida de embarazo y embarazo anormal con nacidos vivos y aumenta exponencialmente con la edad materna en la década anterior a la menopausia (Hassold y Hunt, 2001). La mayoría de las aneuploidías autosómicas y todas las monosomías autosómicas son letales, solo un pequeño número de trisomías son compatibles con el desarrollo a largo plazo, a menudo con anomalías congénitas graves.

40 Un patrón similar de aneuploidía ocurre en embarazos después de la concepción asistida utilizando fecundación *in vitro* (FIV) (Spandorfer et al., 2004). Además, el análisis de hibridación genómica comparativa basada en micromatrices (p. ej., matriz CGH, por sus siglas en inglés) ha demostrado que la mayoría de los ovocitos humanos en mujeres de edad materna avanzada (edad promedio 40) son aneuploides, la mayoría con múltiples aneuploidías (Flandyside et al., 2012).

45 Actualmente, los ovocitos humanos se pueden someter a ensayo para detectar aneuploidía utilizando la amplificación del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés) del primer y segundo cuerpo polar (PB1 y PB2, por sus siglas en inglés, respectivamente) mediante hibridación genómica comparativa basada en micromatrices (matriz CGH). La matriz CGH es una metodología que compara la cantidad de hibridación de ADN con sondas de ADN espaciadas típicamente a intervalos de 1 Mb a través del genoma, es decir, a través de cada cromosoma, en el ADN de prueba y control marcado con fluorocromos verde y rojo (24Sure™, BlueGnome Ltd; www.24Suretest.com), por ejemplo. Con los ovocitos humanos, los productos de WGA de los dos cuerpos polares se marcan e hibridan y las intensidades de la señal se comparan con el ADN de control masculino y femenino marcado en fluorocromos opuestos.

55 Los cuerpos polares son subproductos de las dos divisiones meióticas, la meiosis I y II, y dado que no forman parte del embrión, se pueden eliminar con un efecto mínimo utilizando métodos publicados bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, la biopsia de ambos cuerpos polares de cada ovocito requiere mucho trabajo para las clínicas y se requieren múltiples matrices para someter a ensayo cada ovocito.

Se han propuesto otros métodos para detectar aneuploidía como se describe en la presente memoria.

5 Por ejemplo, la presencia o ausencia de cada cromosoma en los cuerpos polares se puede detectar mediante PCR multiplex de paneles de secuencias específicas de cromosomas (Advalytix, Beckman Coulter; www.advalytix.com/advalytix/). Sin embargo, el sesgo de amplificación dificulta la cuantificación precisa de los productos, lo que limita la posible aplicación para ensayos de aneuploidía en cuerpos polares.

La dilución limitante en pocillos separados y la PCR digital se pueden utilizar para contar el número de cromátidas. Sin embargo, en virtud de las etapas involucradas, esta metodología puede ser técnicamente de provocación y aún no se ha validado ampliamente (por ejemplo, véase la publicación WO2011/138750 de MRC et al).

10 Por lo tanto, se puede ver que los métodos novedosos y menos complejos para evaluar el riesgo de aneuploidía de los óvulos, óvulos fecundados o embriones desarrollados a partir de ellos proporcionarían una contribución a la técnica.

Los siguientes documentos también pueden ser útiles para comprender la presente solicitud.

15 D. CHRISTOPIKOU ET AL, "Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age", HUMAN REPRODUCTION, (20130310), vol. 28, no. 5, doi: 10.1093/humrep/det053, ISSN 0268-1161, páginas 1426 - 1434 discute la precisión del análisis de matriz de hibridación genómica comparativa (matriz CGH) del primer cuerpo polar (PB1) y el segundo cuerpo polar (PB2) en la predicción de aneuploidías de origen meiótico materno en la etapa de escisión de embriones de mujeres de edad materna avanzada.

20 ALAN H HANDYSIDE ET AL, "Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation", EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, (20120701), vol. 20, no. 7, doi: 10.1038/ejhg.2011.272, ISSN 1018-4813, páginas 742 - 747 estudia las ganancias y pérdidas de números de copias para todos los cromosomas en los dos subproductos de la meiosis femenina, el primer y segundo cuerpo polar y los cigotos correspondientes en mujeres de edad materna avanzada sometidas a FIV, utilizando micromatrices de hibridación genómica comparativa (matriz CGH).

25 ALAN H. HANDYSIDE, "Molecular origin of female meiotic aneuploidies", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - MOLECULAR BASIS OF DISEASE, (20121201), vol. 1822, no. 12, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.07.007, ISSN 0925-4439, páginas 1913 - 1920 discute el análisis del número de copias de cromosomas en los tres productos de meiosis femenina, el primer y el segundo cuerpo polar y el cigoto correspondiente por micromatrices de hibridación genómica comparativa (matriz CGH), en mujeres de edad materna avanzada sometidas a FIV, que recientemente reveló un patrón de errores meióticos múltiples frecuentes, causados por la predivisión prematura de las cromátidas hermanas en la meiosis I y una alta incidencia de errores en la meiosis II.

30 ALTARESCU G ET AL, "Gene location matters: polar body analysis has limited informativity in centromeric genes", REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE, REPRODUCTIVE HEALTHCARE LTD, GB, vol. 18, ISSN 1472-6483, (20090101), páginas S-10.

35 El documento US2010/160717 describe métodos de fecundación *in vitro* en los que dicho método incluye el diagnóstico genético previo a la implantación de los 24 cromosomas de un embrión de FIV que comprende la amplificación del genoma completo y análisis de micromatrices basados en SNP.

40 A. H. HANDYSIDE ET AL, "Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes", JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, (20091025), vol. 47, no. 10, doi: 10.1136/jmg.2009.069971, ISSN 0022-2593, páginas 651-658 discute el uso de matrices de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en todo el genoma para el análisis citogenético molecular de alta resolución utilizando una combinación de análisis cuantitativo y genotipo bien establecido. Este estudio demuestra que mediante el análisis mendeliano de los genotipos SNP de los padres y un hermano u otro miembro de la familia apropiado para establecer la fase, es posible identificar loci informativos para cada uno de los cuatro haplotipos parentales en cada cromosoma y mapear la herencia de estos haplotipos y la posición de cualquier entrecruzamiento en el probando.

Descripción de la invención

50 Esta descripción proporciona un enfoque novedoso para evaluar si los óvulos (y, por lo tanto, los óvulos fecundados o los embriones desarrollados a partir de ellos) tienen un mayor riesgo de aneuploidía de origen meiótico materno, analizando el primer cuerpo polar (PB1), opcionalmente con otras medidas como se describe a continuación.

Heterocigosidad centromérica (CH, por sus siglas en inglés) en PB1 para utilizar en la evaluación del riesgo.

55 Más específicamente, se ha determinado que un mayor riesgo de errores en la meiosis II, que conduciría a una aneuploidía en el óvulo fecundado, se puede evaluar midiendo la heterocigosidad centromérica (CH) en PB1 solamente, opcionalmente con otras medidas como se describe a continuación. En particular, donde CH está presente o elevado, e incluso donde el ovocito secundario aparece euploide (que tiene 2n cromátidas hermanas) existe un

mayor riesgo de aneuploidía después de la segregación en la meiosis II, en comparación con donde CH no se detecta o está en un nivel bajo nivel.

5 Como se explica en la presente memoria, la situación normal para PB1 es que contiene un cromosoma que consiste en cromátidas hermanas predominantemente o completamente homocigóticas replicadas a partir de uno de los cromosomas homólogos de la madre. En tal situación, CH sería muy bajo o ausente.

10 Utilizando CH, esta situación normal se puede distinguir en PB1 a partir de la presencia anormal de uno o más cromosomas que comprenden dos o más cromátidas no hermanas, obtenidas a partir de las cromátidas de ambos cromosomas maternos homólogos. Tales cromátidas no hermanas pueden ser heterocigóticas en varios loci y, de manera importante, pueden mostrar al menos algún nivel de CH.

Debido a que la CH significativa no surgiría simplemente de la recombinación, se ha desarrollado un nuevo sistema en el que su presencia se puede utilizar para deducir un riesgo de aneuploidías de varios tipos, que se manifiestan después de la meiosis II.

15 Los nuevos sistemas descritos en la presente memoria se pueden emplear para estimar el estado de la ploidía (euploide, aneuploidía) del óvulo (y del óvulo fecundado y del embrión).

20 Se apreciará de la descripción en la presente memoria que las realizaciones de la descripción están dirigidas a evaluar el riesgo. Por lo tanto, una proporción de cromosomas en los que CH está presente o elevada en PB1 puede no dar lugar a aneuploidías, porque el patrón de segregación en la meiosis II da como resultado un óvulo euploide. Sin embargo, la invención, aún así, tiene una utilidad significativa en la práctica porque se sabe que muchos ovocitos (y los óvulos y embriones fecundados resultantes) tendrán múltiples aneuploidías. La presente descripción proporciona una metodología clínicamente útil para clasificar o seleccionar óvulos o embriones antes o después de la fecundación en función del riesgo relativo.

25 En particular, cuando se evalúa un panel de PB1 correspondiente a un panel de ovocitos, la descripción en la presente memoria proporciona una metodología basada en CH para seleccionar uno o más ovocitos en los que la probabilidad de que se produzcan errores durante la meiosis I se reduce en comparación con los otros ovocitos. Esto es discutido con más detalle a continuación.

Número de entrecruzamientos en PB1 para utilizar en la evaluación de riesgos.

30 Además, el análisis paralelo de los ovocitos y PB1 por los presentes autores ha revelado que el número total de entrecruzamientos en el primer cuerpo polar (de todos los cromosomas evaluados) se puede correlacionar con una tendencia general a la aneuploidía.

Más específicamente, los entrecruzamientos totales en algunos o preferiblemente todos los cromosomas en PB1 se pueden estimar a partir del número y la posición de los bloques de heterocigosidad, y esto se puede utilizar como un indicador para el número total de eventos de recombinación (entrecruzamientos, intercambios meióticos; los términos se utilizan como sinónimos a menos que el contexto exija lo contrario) en el ovocito respectivo.

35 Se sabe en la técnica que una baja frecuencia de recombinación está asociada con anomalías en la segregación cromosómica y, en particular, mayores niveles de no disyunción, que conducen a aneuploidía (véase Hassold, 2001). Por lo tanto, un número relativamente bajo de entrecruzamientos en el primer cuerpo polar puede ser indicativo de una tendencia a la aneuploidía del ovocito.

40 Por ejemplo, la detección de menos de o igual a 50 eventos de recombinación en todos los cromosomas en PB1 se puede tomar para indicar un riesgo significativamente mayor en el ovocito correspondiente que cuando se detectan números promedio o superiores al promedio (>75). La detección de eventos iguales o entre 51 y 74 en todos los cromosomas en PB1 se puede tomar para indicar un riesgo por encima del promedio. La detección de un valor mayor o igual a 75 se consideraría un riesgo promedio (es decir, no se extraerían inferencias adversas, basadas únicamente en el número total de eventos de recombinación).

45 Localización de los entrecruzamientos en PB1 para uso en la evaluación de riesgos

Se sabe que los cromosomas con una única recombinación localizada proximalmente (cercana al centrómero) o distalmente tienen más probabilidades de no separarse que aquellos con recombinaciones posicionadas más medialmente (véase Hassold, 2001). En consecuencia, cuando se detecta un evento de recombinación único en PB1, esto también puede sugerir una tendencia general a la aneuploidía en relación con ese cromosoma.

50 Otras utilidades del mapeo de alta resolución de SNP de PB1

Como se muestra en los ejemplos a continuación, el mapeo de alta resolución de SNP de PB1 puede revelar anomalías cromosómicas estructurales de novo. En particular, los autores han demostrado que los defectos estructurales cromosómicos en el ovocito se reflejaron en PB1.

Por lo tanto, además de CH, el análisis del número de entrecruzamientos en algunos o todos los cromosomas de PB1,

así como la localización de los entrecruzamientos, proporciona una metodología alternativa o adicional para evaluar los riesgos de aneuploidía. Como se describe en la presente memoria, eso tiene utilidad (*entre otras cosas*) en la selección de ovocitos o embriones y/o como un indicador de diagnóstico o pronóstico de la probabilidad de un embarazo exitoso.

5

Realizaciones preferidas

En realizaciones preferidas, se lleva a cabo un método de evaluación de CH mediante amplificación de genoma completo (WGA) y genotipado para loci heterocigóticos (p. ej., tales como polimorfismos de un solo nucleótido, SNP), que para la CH deben estar cerca y flanqueando los centrómeros de cada cromosoma en PB1.

10 Cuando se realiza la amplificación del genoma completo y el análisis del genotipo de SNP, también puede ser deseable estimar los SNP de los cromosomas maternos. Esto permite deducir la existencia de heterocigosidad alrededor del centrómero en PB1 incluso en el caso de omisión aleatoria de alelos en los loci maternos heterocigóticos, distinguiendo nuevamente la "situación normal" de la presencia anormal de dos o más cromátidas no hermanas. Como se señaló anteriormente, generalmente se preferirá realizar el genotipo de SNP o el análisis de haplotipos en todo el genoma, con el fin de evaluar el número y/o la localización de los sitios de recombinación.

15

La amplificación del genoma completo y el análisis del genotipo se pueden utilizar adicionalmente, opcionalmente, para determinar la aneuploidía cromosómica resultante de los errores de meiosis I; por ejemplo, la ausencia de cualquier ADN centromérico para un cromosoma dado también identificaría un riesgo de aneuploidía.

20 El método difiere de los métodos cuantitativos de la técnica anterior, tal como la matriz CGH para evaluar el cambio en el número de copias en PB1, ya que esos métodos solo identificarían errores en la meiosis I (dando como resultado una aneuploidía en el ovocito secundario). En la presente invención, los posibles errores y riesgos derivados de la meiosis I y II se pueden identificar mediante el análisis de PB1 solo, reduciendo el tiempo y el coste. Además, el genotipado es en principio más fiable que la cuantificación porque no se ve afectado por el sesgo de amplificación que sigue a WGA.

25

La invención se discutirá ahora con más detalle:

30 La presente invención proporciona un método para evaluar la aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno en un óvulo humano, comprendiendo el método la evaluación de la presencia o grado de heterocigosidad centromérica para uno o más (preferiblemente todos) los cromosomas del primer cuerpo polar (PB1) del óvulo humano midiendo la heterocigosidad centromérica en el primer cuerpo polar y en donde el método se utiliza para predecir el riesgo de aneuploidía en un óvulo o embrión fecundado después de la meiosis II, en donde se utiliza la presencia de un mayor nivel de CH en el primer cuerpo polar para deducir un mayor riesgo de dicha aneuploidía cromosómica en el óvulo o embrión fecundado correspondiente desarrollado a partir del mismo en comparación con la presencia de una ausencia o un nivel más bajo de CH en el primer cuerpo polar.

30

35 Por lo tanto, los datos no solo proporcionan información sobre la heterocigosidad centromérica (CH), sino también los entrecruzamientos totales y la localización de los entrecruzamientos. Estos a su vez pueden utilizar para deducir una mayor probabilidad de aneuploidía, que puede, por ejemplo, deducirse por un número total relativamente bajo de eventos de entrecruzamiento, o eventos de recombinación única específica cerca del centrómero o telómero de un cromosoma dado.

35

40 En un aspecto preferido, se proporciona un método para investigar el estado de ploidía de un óvulo humano (o evaluar el riesgo de aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno en el óvulo), el método comprende evaluar la presencia o el grado de heterocigosidad centromérica (CH) para uno o más cromosomas del primer cuerpo polar del óvulo humano.

40

Como se explica en la presente memoria, la evaluación del cuerpo polar puede predecir el riesgo de aneuploidía en el óvulo correspondiente y, por lo tanto, también en el óvulo o embrión fecundado después de la meiosis II.

45

Preferiblemente se evalúa una pluralidad o panel o cromosomas.

Preferiblemente, se evalúa una pluralidad de primeros cuerpos polares diferentes, y los óvulos correspondientes, u óvulos o embriones fecundados desarrollados a partir de los mismos, se clasifican según el riesgo como se describe en la presente memoria. Esto a su vez se puede utilizar como parte de un método de FIV.

50 En particular, la presencia de un mayor nivel de heterocigosidad centromérica (CH) en un primer cuerpo polar se puede utilizar para deducir un mayor riesgo de dicha aneuploidía cromosómica en el óvulo o embrión correspondiente desarrollado a partir de ella en comparación con una ausencia o menor nivel de CH en un primer cuerpo polar.

50

La evaluación del riesgo por CH también puede, además, utilizar:

(i) entrecruzamientos totales en PB1.

(ii) localización de entrecruzamientos de cromosomas en PB1.

- 5 En una realización, los métodos descritos en la presente memoria se basan en el uso de CH para distinguir un PB1 "normal" que contiene un cromosoma que consiste en cromátidas hermanas homocigóticas replicadas de uno de los cromosomas homólogos de la madre, de un PB1 "anormal" en donde los cromosomas comprenden dos o más cromátidas no hermanas, que son colectivamente obtenidas a partir de ambos cromosomas maternos homólogos. Esta información, opcionalmente con el número de entrecruzamientos y/o el análisis de localización, se puede utilizar para deducir un riesgo de aneuploidías, de varios tipos, que se manifiestan después de la meiosis II.
- 10 El PB1 puede ser de una mujer humana post pubescente de cualquier edad. Opcionalmente, el PB1 puede ser de una mujer humana de 35 años o más. Prácticamente, el PB1 puede ser de un sujeto humano (de cualquier edad) que puede tener, o se sospecha que tiene, problemas de fertilidad o tiene o es portador de una enfermedad hereditaria. El PB1 puede ser de un sujeto humano sometido a tratamiento de FIV.
- A menos que el contexto exija lo contrario, donde se hace referencia a "un" o "el" cromosoma en la presente memoria con respecto al genotipo SNP, esto se refiere a tipificar una pluralidad de copias de ese cromosoma (o la correspondiente cromátida o cromátidas) que están presentes en la célula diana.
- 15 En una realización, se evalúan al menos 2, 3, 4, 5 o 6 o todos los cromosomas humanos seleccionados del siguiente grupo: X, 22, 21, 18, 16 y 13. Los desequilibrios en cualquiera de estos cromosomas pueden estar asociados con embarazos viables pero anormales. Una combinación preferida de cromosomas para la evaluación comprende los cromosomas 21, 18 y 13.
- Preferiblemente se evalúa un total de al menos 5, 10, 15 o 20 cromosomas.
- 20 En una realización, se evalúa el genoma completo de PB1 (es decir, se analiza la CH de los 23 cromosomas). Esto es particularmente deseable cuando se evalúa el número total de entrecruzamientos en PB1, para detectar la existencia de una baja frecuencia de entrecruzamientos o recombinación.
- Preferiblemente, CH se evalúa en los métodos descritos en la presente memoria mediante genotipado de una pluralidad de loci de SNP. Estos incluyen la secuenciación del genoma, p. ej. por métodos tal como la llamada "secuenciación de nueva generación" (NGS, por sus siglas en inglés) –véase p. ej. www.illumina.com. Preferiblemente, la evaluación de CH está precedida por WGA.
- 25 La evaluación basada en CH puede o no utilizarse junto con (antes o después) los métodos de cuantificación.
- Como se discute en la presente memoria, los SNP se pueden estudiar utilizando técnicas convencionales. Esto puede estar precedido por una o más etapas de amplificación convencionales.
- 30 En una realización, la invención comprende primero identificar la posición de los centrómeros en la secuencia de SNP consecutivos a través de cada cromosoma a evaluar.
- Por lo tanto, la invención puede comprender estudiar SNP bialélicos muy adyacentes que flanquean los centrómeros de los cromosomas de PB1.
- 35 En una realización se estudian igual a o al menos 25, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 o más SNP que flanquean el centrómero. Preferiblemente, se evalúan al menos alrededor de 200 SNP.
- Este número puede ser estudiado en cada uno de los brazos p y q de cada cromosoma (o brazos q solo para cromosomas acrocéntricos).
- 40 Sin embargo, para cromosomas individuales, un número menor puede ser suficiente; esto puede ser evaluado por los expertos en la técnica de acuerdo con el método preferido de tipificación y la precisión asociada con él y con cualquier método opcional de amplificación empleado.
- En una realización, se analizan 200 SNP a través de una región de 2Mb del cromosoma dentro de 5-10Mb del centrómero.
- Una vez que se han estudiado los SNP, se puede establecer la proporción de SNP heterocigóticos ('AB').
- 45 Una proporción de estos SNP estudiados dentro de la región genotipada que flanquea el centrómero que superan, p. ej., 50, 60, 70, 80, 90 o 100% se pueden tomar como altamente heterocigóticos ("alta CH") de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.
- La recombinación es significativamente menos frecuente cerca del centrómero (véase Lynn, A., Ashley, T. y Hassold, T. (2004). Variation in human meiotic recombination, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 317-49). Por lo tanto, se puede deducir que altos niveles de CH están asociados con la presencia de cromosomas maternos homólogos en comparación con las cromátidas hermanas. A este respecto, es altamente preferible utilizar *ADN genómico materno como referencia* cuando se realizan los métodos u otros aspectos de la invención.
- 50 Por lo tanto, es preferible calcular la proporción de SNP heterocigóticos (AB) maternos que también son

heterocigóticos en el primer cuerpo polar. En este caso, se pueden evaluar 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200 o más SNP heterocigóticos (en la célula materna) o por lo menos, por flanco.

5 Algunos de estos p. ej. que superan 10, 20, 30, 40 o una proporción de estos, p. ej. que supera 50, 60, 70, 80, o 90% se puede considerar como "altamente" heterocigótico de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Se entenderá que incluso un bloqueo mínimo (de incluso 5 o más, o 10 o más) de SNP heterocigóticos dentro de la región centromérica genotipada (proximal) puede ser indicativo de una alta heterocigosidad de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. La presencia de tales SNP heterocigóticos encontrados en ambos lados del centrómero proporcionarían una confirmación adicional, pero no requerida. Los expertos en la técnica apreciarán a partir de la descripción en la presente memoria que el umbral elegido será el que acomode la pequeña probabilidad de recombinación que se produce cerca del centrómero en la región genotipada y/o cualquier "error de identificación" (miscalls) o "ganancia de alelos", la probabilidad que dependerá de la tecnología de detección adoptada. Los presentes autores han determinado que la ganancia de alelos de fondo (es decir, donde un alelo homocigótico se puede llamar heterocigótico) se pueden mantener a niveles extremadamente bajos, siendo menos del 5% en los ejemplos ensayados. Por lo tanto, es preferible un umbral de más del 5% de heterocigosidad.

20 Como se explica con más detalle en la presente memoria, estimando los SNP en los cromosomas maternos, se puede minimizar cualquier efecto de la omisión aleatoria de alelos en loci maternos heterocigóticos. Por lo tanto, en una realización, la presencia o un nivel más alto de CH en un primer cuerpo polar, por ejemplo, en comparación con una proporción umbral de alelos heterocigóticos en un primer cuerpo polar normal, y se puede correlacionar con un mayor riesgo de aneuploidía cromosómica en el correspondiente óvulo o embrión resultante de, por ejemplo, una segregación errónea de cromátidas simples en la meiosis II. Como se explica en los ejemplos, esto puede seguir la biorientación de los cromosomas bivalentes en la metafase I de la meiosis I. Dicha segregación errónea puede conducir a que un óvulo carezca del cromosoma relevante, o en el que estén presentes ambos cromosomas maternos homólogos (véase, p. ej., la Fig. 4).

25 En otra realización, la presencia o un nivel más alto de CH en un primer cuerpo polar se puede correlacionar con un mayor riesgo de aneuploidía cromosómica en el óvulo o embrión correspondiente como resultado de la no disyunción de cromosomas bivalentes en la meiosis I que conduce a un óvulo en el que están presentes ambos cromosomas maternos homólogos (véase, p. ej., la Fig. 2).

30 En una realización diferente, la falta de alelos centroméricos en un primer cuerpo polar implica un mayor riesgo de aneuploidía cromosómica en el óvulo o embrión correspondiente desarrollado a partir del mismo (en comparación con la presencia de alelos centroméricos). Dicha ausencia puede implicar la no disyunción de los cromosomas bivalentes en la meiosis I, lo que conduce a que un óvulo carezca del cromosoma materno relevante (véase, p. ej., la Fig. 2).

35 En ciertas realizaciones, se puede desear someter adicionalmente el ácido nucleico en PB1 a cuantificación, p. ej. utilizando PCR cuantitativa fluorescente o cualquier otro método conocido. Esto puede proporcionar, por ejemplo, información más detallada sobre la ploidía del óvulo o embrión fecundado.

Por ejemplo, cuando se ha determinado la presencia o un nivel más alto de CH y se determina que el primer cuerpo polar es euploide con $2n$ cromátidas por cromosoma, la presencia o un nivel más alto de CH puede implicar una mayor probabilidad de aneuploidía cromosómica del origen meiótico maternal resultante de la segunda división meiótica del ovocito secundario después de la fecundación (véase, p. ej., la Fig. 4).

40 Cuando se ha determinado una ausencia o un nivel más bajo de CH, y se determina que el primer cuerpo polar es aneuploide que tiene $0n$ cromátidas para uno o más cromosomas, esto puede implicar aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno resultante de la primera división meiótica del ovocito primario p. ej. resultante de la no disyunción de cromosomas bivalentes (véase, p. ej., la Fig. 2).

45 Cuando se ha determinado la presencia o un nivel más alto de CH, y se determina que el primer cuerpo polar es aneuploide que tiene $4n$ cromátidas para uno o más cromosomas, esto puede implicar aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno resultante de la primera división meiótica del ovocito primario p. ej. resultante de la no disyunción de cromosomas bivalentes (véase, p. ej., la Fig. 2).

50 Cuando se ha determinado la presencia o un nivel más alto de CH, y se determina que el primer cuerpo polar es aneuploide que tiene $3n$ cromátidas para uno o más cromosomas, esto puede implicar aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno resultante de la primera división meiótica del ovocito primario p. ej. resultante de la predivisión prematura de las cromátidas (véase, p. ej., la Fig. 3).

55 Cuando se ha determinado una ausencia o un nivel más bajo de CH, y se determina que el primer cuerpo polar es aneuploide que tiene $1n$ cromátidas para uno o más cromosomas, esto puede implicar aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno resultante de la primera división meiótica del ovocito primario p. ej. resultante de la predivisión prematura de las cromátidas (véase, p. ej., la Fig. 3).

Esto se resume en la Tabla 1 a continuación. En referencia a la tabla, el genotipo de SNP centromérico del primer cuerpo polar normal sería AA o BB (sin CH) y el número normal de copias del cromosoma materno en un cigoto es 1.

5 Cualquier aspecto o realización de la invención puede abarcar además la caracterización de un cigoto (óvulo fecundado o embrión) que tiene un patrón de segregación normal o uno de los patrones de segregación anormales como se describe en la Tabla 1 mediante la evaluación de la CH de PB1 y, opcionalmente, el número de copias del cromosoma, p. ej., de acuerdo con las combinaciones mostradas en la Tabla 1.

Cualquier aspecto o realización de la invención puede abarcar además la predicción del número de copias del cromosoma materno en un cigoto (óvulo fecundado o embrión) como es cualquiera de:

0

1

10 2

0 ó 1

1 ó 2

0, 1 ó 2

15 evaluando la CH de PB1 y preferiblemente el número de copias cromosómicas, p. ej. de acuerdo con las combinaciones mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1

Patrón de segregación	Figura de referencia	Genotipo de SNP centromérico del primer cuerpo polar (AB = CH)	Número de copias del cromosoma del primer cuerpo polar	Número de copias del cromosoma materno en el cigoto
Normal	2.1	AA o BB	2	1
No disyunción – Meiosis II	2.2	AA o BB	2	2
	2.3	AA o BB	2	0
No disyunción – Meiosis I	2.4	No resultado	0	2
	2.5	AB*	4	0
Predivisión prematura – Meiosis I	3.1	AB*	3	0
	3.2	AB	3	1
	3.3	AA o BB	1	1
	3.4	AA o BB	1	2
Biorientación de cromosomas homólogos – Meiosis I y II	4.1	AB	2	1
	4.2	AB*	2	0
	4.3	AB*	2	2

Utilidad y aplicaciones pronósticas

20 Una lista no limitante de utilidades para la presente invención incluye el análisis del PB1 solo como un cribaje para priorizar los embriones para la transferencia y proporcionar información pronóstica al posible progenitor, y PB1 seguido de PB2 para el diagnóstico de aneuploidía y la selección de embriones, donde se requiere una mayor precisión.

25 Actualmente, la selección de uno o más embriones, por ejemplo, para la transferencia en tratamientos de FIV, se puede llevar a cabo sobre la base de un sistema de puntuación morfológico relativamente estimado que clasifica cada embrión, típicamente en una escala de 1-4. El puntaje se basa en el número de células que un embrión debería haber alcanzado en el momento de la observación, qué tan uniformemente se han dividido las células del embrión, la presencia de cualquier anomalía nuclear visible, etc. Se selecciona el número adecuado de embriones con los mejores resultados o con resultados iguales.

30 El uso de la detección de CH proporciona una incorporación importante o alternativa a estos métodos morfológicos o morfocinéticos. Como se explicó anteriormente, la detección de CH puede resaltar la mayor posibilidad de resultados de aneuploidía (véase, p. ej., los escenarios 2.5, 3.1, 4.2 y/o 4.3 en la Tabla 1, que están marcados con un *). Por lo tanto, esta información se puede utilizar para estimar un riesgo de aneuploidía y/o simplemente para seleccionar o clasificar los óvulos de acuerdo con el riesgo relativo. El análisis de CH se puede hacer en combinación con el número de copias cromosómicas. Sin embargo, como se desprende de 4.2 y 4.3, esta evaluación puede tener utilidad incluso cuando una evaluación cuantitativa ha mostrado un número de copia normal para el PB1 relevante o cuando el análisis morfológico o morfocinético no permite una selección efectiva.

5 Preferiblemente, junto con las relaciones o correlaciones conocidas entre poblaciones de mujeres de diferentes edades y tipos de infertilidad, y opcionalmente las otras evaluaciones descritas en la presente memoria, la incidencia de cromosomas totalmente heterocigóticos y/o CH en PB1 de sus ovocitos se utiliza como un indicador pronóstico general de mayor riesgo de aneuploidía y, por lo tanto, menor probabilidad de embarazo. En base al análisis anterior, se puede estimar un riesgo real de aneuploidía deduciendo la probabilidad de errores meióticos de los tipos mostrados en las Figuras y/o utilizando evidencia experimental en la que los cromosomas totalmente heterocigóticos y/o CH se siguen de un análisis de número de copia por, por ejemplo, matriz CGH en los embriones correspondientes, para establecer la incidencia real de segregación anormal en la meiosis.

10 Más específicamente, se ha demostrado que la mayoría de los errores (> 90%) en los ovocitos son causados por la predivisión prematura de las cromátidas hermanas (Figura 3) y muy pocos son causados por la no disyunción de los cromosomas completos (Figura 2). Si se identifica CH para un cromosoma particular, es muy probable que sea causado por una predivisión o biorientación prematuras (véase la Tabla 1 anterior). En el primer caso, una sola cromátida está presente en el ovocito secundario y se segregará al azar a PB2 o al ovocito fecundado al completar la segunda división meiótica después de la fecundación. A partir de los primeros principios, la probabilidad de aneuploidía (óvulo fecundado que falta en ese cromosoma) se puede tomar como 50%. De manera similar para la biorientación, dos cromátidas individuales están presentes en el ovocito secundario y éstas también se segregan al azar a PB2 o al óvulo fecundado después de la meiosis. Por lo tanto, sobre esta base, la probabilidad de que ambas cromátidas se segreguen al cuerpo polar o al ovocito es del 25% (causando monosomía y trisomía materna, respectivamente). Si la probabilidad de que una segregación de cromátidas a PB2 y otra al óvulo fecundado (diploide) sea del 50%, un cromosoma del PB1 que exhibe CH tiene aproximadamente un 50% de probabilidad de resultar en aneuploidía.

20 Si se identifica que dos o más cromosomas tienen CH, la probabilidad de que el óvulo fecundado sea aneuploide para al menos uno de esos cromosomas se puede calcular como una probabilidad binomial acumulativa estándar utilizando la fórmula:

25
$$b(x; n, P) = {}_n C_x * P^x * (1 - P)^{n-x}$$

donde

x: El número de éxitos que resultan del experimento binomial.

n: El número de ensayos en el experimento binomial.

P: La probabilidad de éxito en un ensayo individual.

30 1-P: La probabilidad de fallo en un ensayo individual.

b(x; n, P): Probabilidad binomial: la probabilidad de que un experimento binomial de n-ensayos resulte exactamente en x éxitos, cuando la probabilidad de éxito en un ensayo individual es P.

${}_n C_r$: El número de combinaciones de n cosas, tomadas r veces.

35 Por lo tanto, la probabilidad de un óvulo fecundado con el siguiente número de cromosomas con CH que tiene ≥ 1 aneuploidías es:

1 0,5

2 0,75

3 0,875

4 0,9375

40 7 0,96875

Más generalmente, cuando uno o más centrómeros muestran una alta proporción de alelos heterocigóticos (p. ej., SNP) que indican uno o más cromosomas CH, existe una mayor probabilidad de que el óvulo correspondiente (o óvulo fecundado o embrión) sea aneuploide, en comparación con un PB1 que tiene un menor grado de CH.

45 Cuando todas las regiones centroméricas muestran una baja proporción de alelos heterocigóticos (p. ej., SNP) y se deduce que hay cero (0) cromosomas CH, existe una mayor probabilidad de que el óvulo correspondiente (o óvulo fecundado o embrión) sea euploide.

50 En la práctica, los ovocitos (que posteriormente se fecundan normalmente) con 0 cromosomas CH se pueden transferir selectivamente por delante de aquellos con 1, 2 o más cromosomas que exhiben CH, con el objetivo de transferir aquellos con una mayor probabilidad de tener un número normal de cromosomas maternos que aumentan las tasas de embarazo y reducen las tasas de aborto espontáneo.

Si se desea, los expertos en la materia pueden utilizar el análisis morfocinético u otro análisis morfológico junto con la evaluación del riesgo realizado con CH, así como el número de entrecruzamientos y/o el análisis de localización.

- 5 En resumen, se puede ver que cuando hay una cantidad de óvulos o embriones fecundados adecuados para la implantación, los métodos actuales pueden ayudar a maximizar la posibilidad de seleccionar embriones que son euploides y, por lo tanto, es más probable que avancen a un desarrollo a largo plazo sin anomalías congénitas.

Por lo tanto, cualquiera de los métodos o sistemas descritos en la presente memoria puede comprender además la etapa de seleccionar un embrión u óvulo fecundado en donde PB1 exhibe CH o CH alto, o en el que la CH de PB1 indica la presencia o probable presencia de una aneuploidía en el embrión u óvulo fecundado.

10 Referencia materna

- 15 Como se explicó anteriormente, la precisión de la detección de SNP heterocigóticos en las regiones que flanquean los centrómeros mejora enormemente al limitar el análisis de SNP a aquellos SNP que son heterocigóticos en la madre y determinar cuál de ellos es heterocigótico en PB1. Como se apreciará fácilmente, el genotipo SNP de la madre se puede obtener del ADN genómico de una muestra de sangre o de las células del cúmulo materno descartadas que rodean el óvulo cuando se recolecta. Alternativamente, dado un número de genotipos PB1, el genotipo materno se puede reconstruir suponiendo que la mayoría de los pares de cromosomas maternos se segregarán normalmente en la primera división meiótica, por ejemplo, donde el genotipo sea AA en uno o más PB1 y BB en otros, es probable que el genotipo materno sea AB.

Estimación de los SNP heterocigóticos maternos

- 20 Esto se puede lograr utilizando el análisis genético estándar (véase, p. ej., Kong, 2008; Chowdhury, 2009), por ejemplo, la estimación de los dos haplotipos en los dos cromosomas homólogos se puede determinar genotipificando el ADN de la madre y comparando los resultados con uno o más cuerpos polares. Tanto PB1 como PB2 normalmente deberían ser homocigóticos para uno u otro haplotipo y al examinar varios de estos, los haplotipos se pueden reconstruir con un alto grado de precisión.

- 25 Por lo tanto, en una realización, el haplotipo de SNP (y, por lo tanto, la eliminación gradual de SNP heterocigóticos) se obtiene a partir del análisis de múltiples gametos haploides individuales o PB1.

Referencia PB2

- 30 Aunque el método presentado en la presente memoria prevé analizar los SNP centroméricos (o SNP de todo el genoma) solo en PB1 y deducir la probabilidad o el riesgo relativo de aneuploidía en base a un trastorno anormal de heterocigosidad, se apreciará que el análisis de PB1 y PB2 para CH proporcionaría confirmación del estado euploide/aneuploide de los cromosomas con CH en PB1.

Análisis de loci SNP a través del cromosoma

- 35 En una realización, las matrices de SNP de todo el genoma se utilizan para genotipificar loci de SNP más allá de la región que flanquea el centrómero, extendiéndose así en regiones donde no se suprime la recombinación, p. ej. en toda la longitud de cada cromosoma. Dicho de otra manera, el análisis primario de los loci SNP que flanquean cada centrómero, como se explica en detalle anteriormente, se puede extender a lo largo de cada brazo cromosómico para proporcionar más información sobre la ploidía.

- 40 En una segregación de cromosoma normalmente analizado en el PB1 después de completar la meiosis I, cada cromosoma es homocigótico (en loci maternos heterocigóticos) para uno de los dos haplotipos maternos en la región que flanquea el centrómero. Sin embargo, más allá del primer entrecruzamiento, una de las dos cromátidas hermanas tiene un segmento del otro cromosoma homólogo que resulta en heterocigosidad en todos los loci SNP maternos heterocigóticos. Este patrón de bandas alternas homocigóticas y heterocigóticas se repite a medida que se producen más entrecruzamientos en cada brazo. Esto da como resultado un patrón característico para cada cromosoma según el número típico y la localización de cada entrecruzamiento.

- 45 Se podrían utilizar tres patrones anormales para extender el análisis de CH en los centrómeros:

- (1) La presencia de dos cromátidas de un cromosoma homólogo con una cromátida hermana del otro homólogo (causada por predivisión prematura) en PB1 causará CH y el tamaño de las bandas homocigóticas más abajo del cromosoma se reducirá o no existirá en comparación con el patrón normal debido a un patrón diferente de entrecruzamientos (véase Figura 3, referencia 3.1 y 3.2 en comparación con la Figura 4, referencia 4.1, 4.2, 4.3).

- 50 (2) La presencia de ambos cromosomas homólogos (las cuatro cromátidas hermanas) en PB1 hará que todos los loci de SNP heterocigóticos maternos sean heterocigóticos a lo largo de toda la longitud del cromosoma (véase Figura 2, referencia 2.5 en comparación con 4.1, 4.2, 4.3).

(3) La presencia de una sola cromátida hermana en PB1 dará como resultado que todos los loci SNP sean homocigóticos a lo largo de todo el cromosoma, lo que indica un riesgo de trisomía en el ovocito correspondiente

después de la fecundación (véase Figura 3, referencia 3.3 y 3.4). Cabe señalar que un cromosoma homólogo sin entrecruzamientos dará un patrón similar, pero esto también es anormal y puede provocar aneuploidía.

5 Como se señaló anteriormente, la evaluación del número y la localización de los entrecruzamientos tiene una utilidad más directa para establecer una tendencia a la aneuploidía, por ejemplo, si se revela que la frecuencia de recombinación es baja, o que la recombinación se ha producido solo cerca del centrómero o telómero.

Estudio de SNP

10 Existen varios métodos para el análisis a gran escala del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (véase Syvanen, 2005, especialmente la Tabla 1). Estos incluyen SNPstream (Bell, P.A. *et al.* SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *Biotechniques Suppl.*, 70-72, 74, 76-77 (2002)); Genorama, APEX (Kurg, A. *et al.* Arrayed primer extension: solid-phase four-colour DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet. Test.* 4, 1-7 (2000)); GeneChip 100K (Matsuzaki, H. *et al.* Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat. Methods* 1, 109-111 (2004)); placas Perlegen (Hinds, D.A. *et al.* Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 307, 1072-1079 (2005)); Sondas de inversión molecular (Hardenbol, P. *et al.* Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay. *Genome Res.* 15, 269-275 (2005)); Ensayo GoldenGate (Fan, J.B. *et al.* Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb. Symp. En cuant. Biol.* LXVII, 69-78 (2003)). Otros métodos incluyen la "matriz de perlas" de Illumina que se describe a continuación. También se entenderá que las plataformas de secuenciación del genoma (por ejemplo, como están disponibles de Illumina y otras) se pueden utilizar para establecer la heterocigosidad directamente. Las llamadas plataformas de "secuenciación de nueva generación" son particularmente preferidas.

25 Las realizaciones preferidas de los métodos para determinar la aneuploidía de cuerpos polares y ovocitos descritos en la presente memoria comprenden el uso de técnicas de micromatrices. Una micromatriz puede incluir una población de diferentes moléculas de sonda que están unidas a uno o más sustratos de modo que las diferentes moléculas de sonda se puedan diferenciar entre sí según la localización relativa. Una matriz puede incluir diferentes moléculas de sonda, o poblaciones de las moléculas de sonda, que están localizadas en una localización direccionable diferente en un sustrato. Alternativamente, una micromatriz puede incluir sustratos ópticos separados, tales como perlas, cada uno con una molécula de sonda diferente, o una población de moléculas de sonda, que se pueden identificar según la localización de los sustratos ópticos en una superficie a la que están unidos los sustratos o según las localizaciones de los sustratos en un líquido. Las matrices ejemplares en las que se localizan sustratos separados en una superficie incluyen, sin limitación, una matriz BeadChip disponible de Illumina®, Inc. (San Diego, CA), por ejemplo las matrices GoldenGate BeadChip y las matrices Infinium BeadChip, u otras que incluyen perlas en pocillos tales como las descritas en las patentes de EE.UU. Núms. 6,266,459, 6,355,431, 6,770,441, 6,859,570 y 7,622,294; y publicación PCT nº WO 00/63437. Otras matrices que tienen partículas en una superficie incluyen las establecidas en los documentos EE.UU. 2005/0227252; WO 05/033681; y WO 04/024328.

40 Se puede utilizar cualquiera de una variedad de micromatrices conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, las establecidas en la presente memoria. Una micromatriz típica contiene sitios, a veces denominados características, cada uno con una población de sondas. La población de sondas en cada sitio es típicamente homogénea y tiene una sola especie de sonda, pero en algunas realizaciones las poblaciones pueden ser heterogéneas. Los sitios o las características de una matriz suelen ser discretos y se separan con espacios entre sí. El tamaño de los sitios de la sonda y/o la separación entre los sitios puede variar de tal manera que las matrices pueden ser de alta densidad, densidad media o menor densidad. Las matrices de alta densidad se caracterizan por tener sitios separados por menos de aproximadamente 15 µm. Las matrices de densidad media tienen sitios separados por aproximadamente 15 a 30 µm, mientras que las matrices de baja densidad tienen sitios separados por más de 30 µm. Una matriz útil en la invención puede tener sitios separados por menos de 100 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm o 0.5 µm.

55 Otros ejemplos de micromatrices disponibles comercialmente que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, una micromatriz Affymetrix® GeneChip® u otra micromatriz sintetizada de acuerdo con las técnicas a veces denominadas tecnologías VLSIPS™ (síntesis de polímeros inmovilizados a gran escala) como se describe, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. Núms. 5,324,633; 5,744,305; 5,451,683; 5,482,867; 5,491,074; 5,624,711; 5,795,716; 5,831,070; 5,856,101; 5,858,659; 5,874,219; 5,968,740; 5,974,164; 5,981,185; 5,981,956; 6,025,601; 6,033,860; 6,090,555; 6,136,269; 6,022,963; 6,083,697; 6,291,183; 6,309,831; 6,416,949; 6,428,752 y 6,482,591. También se puede utilizar una micromatriz de dos colores en un método según una realización de la invención. Una micromatriz de dos colores ejemplar es una matriz CodeLink™ disponible en Amersham Biosciences. Otra micromatriz que es útil es una que se fabrica utilizando métodos de impresión de inyección de tinta, tal como la tecnología SurePrint™ disponible en Agilent Technologies.

Los sistemas y métodos establecidos en la presente memoria se pueden utilizar para detectar la presencia de un SNP definido que puede estar presente en un PB1, embrión, ovocito o derivado del mismo.

60 Una realización preferida emplea la micromatriz Affymetrix GeneChip™ 10K que está diseñada para analizar 10,000 SNP distribuidos a una distancia promedio de 0.2Kb en cada uno de los 22 cromosomas (véase Matsuzaki, H. *et al.* Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array, *Genome*

Res. 14, 414-425 (2004).

En el caso de chips de oligonucleótidos, los oligonucleótidos que se pueden unir a un chip según la invención serán capaces de distinguir SNP bialélicos a través del genoma. Se prefieren oligonucleótidos de 25 nucleótidos de longitud.

5 Por lo tanto, en una realización, los SNP se estudian en un chip o micromatriz de "gen" u "oligonucleótido". Como es bien sabido en la técnica, estos son vehículos miniaturizados, en la mayoría de los casos hechos de vidrio o silicio, en cuya superficie los oligonucleótidos de secuencia conocida están inmovilizados en una rejilla ordenada de alta densidad.

10 Otra realización preferida emplea el chip de perlas CyllSNP-12 humano de Illumina Infinium™. Este sistema permite la genotipificación de todo el genoma de aproximadamente 300,000 marcadores de SNP. El sistema se basa en el ensamblaje aleatorio de perlas microscópicas derivatizadas de aproximadamente 3 µm de tamaño colocadas en pocillos de un sustrato estandarizado, y permite que se estudien combinaciones específicas de SNP.

Las micromatrices Infinium se utilizaron en los ejemplos de la descripción, sin embargo, también se podría utilizar cualquier plataforma de micromatrices diseñada adecuadamente.

15 Amplificación

Como se utiliza en la presente memoria, "amplificación" se refiere a cualquier método para multiplicar cadenas de ácido nucleico, tal como ADN genómico, in vitro.

20 Las técnicas de amplificación incluyen, pero no se limitan a, métodos basados en la biblioteca de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); y métodos de amplificación isotérmica, tal como la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés). Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, (3ª ed.), Wiley & Sons; 2001, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition); 1982, Maniatus et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; ADN Cloning: A practical Approach, vol. I y II (D. Glover, ed.); 1984; Spits, et al., 2006, Nature
25 Protocols 1: 1965-1970 "Whole genome multiple displacement amplification from single cells"; Patente de EE.UU. 6,124,120. Los métodos de amplificación del genoma completo aplicables a PGD son bien conocidos por los expertos en la técnica y han sido revisados por Ying-ming Zheng, Ning Wang, Lei Li y Fan en "Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis" J Zhejiang Univ Sci B. Enero 2011; 12 (1): 1-11. doi: 10.1631/jzus.B1000196 PMID: PMC3017410.

Sistemas

30 Preferiblemente, un sistema para utilizar en la presente invención comprendería medios para el estudio de SNP más un dispositivo o medio de almacenamiento programado para hacer que un ordenador analice los datos resultantes. Los datos de estudio de SNP se podrían almacenar para su posterior análisis o analizarse "sobre la marcha", tal como se utiliza en la presente memoria, el término "base de datos" cubre ambos tipos de fuente de datos.

35 Los medios preferidos para el estudio de SNP serían un chip oligonucleotídico que estudiaría al menos los cromosomas preferidos a la densidad apropiada en la vecindad del centrómero como se discute en la presente memoria.

40 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden implementar con la ayuda de un ordenador. Normalmente, esto incluiría una unidad central de procesamiento (CPU, por sus siglas en inglés) conectada por un bus del sistema u otro medio de conexión a una interfaz de comunicación, memoria del sistema (RAM), memoria no volátil (ROM) y uno o más dispositivos de almacenamiento, tal como una unidad de disco duro, una unidad de disquete y una unidad de CD ROM.

45 El ordenador también incluye un dispositivo de visualización, tal como una impresora, un monitor CRT o una pantalla LCD, y un dispositivo de entrada, tal como un teclado, ratón, bolígrafo, pantalla táctil o sistema de activación por voz. El dispositivo de entrada puede recibir datos directamente de los medios para el estudio de SNP a través de una interfaz (como, por ejemplo, con un sistema basado en el producto Affymetrix o illumina).

El ordenador almacena y ejecuta varios programas, tal como un sistema operativo y programas de aplicación.

50 El medio utilizable por ordenador haría que el ordenador analizara CH y evaluara la probabilidad de aneuploidías de origen materno de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. El medio se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en un disco duro, un disquete, memoria de acceso aleatorio, memoria de solo lectura y memoria de solo lectura programable y borrrable eléctricamente.

El medio utilizable por ordenador tiene un código de programa legible por ordenador o instrucciones almacenadas en él (es decir, un dispositivo de almacenamiento programado) para hacer que un ordenador ejecute un método que evalúe el riesgo de aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno en un óvulo humano después de la fecundación, siendo el método uno cualquiera de los discutidos en la presente memoria.

Preferiblemente, el método comprende:

(a) acceder a una base de datos que comprende datos de genotipo obtenidos de una pluralidad de loci de SNP consecutivos presentes en un cromosoma del PB1,

5 (b) determinar una posición de centrómero,

(c) determinar la proporción de SNP heterocigóticos en una región que flanquea la posición del centrómero determinando el número de SNP que dan una heterocigosidad llamada (n) en comparación con el número total de SNP (t) en la región;

10 (d) determinar que el óvulo o embrión fecundado correspondiente tiene mayor riesgo de aneuploidía cuando la proporción excede una proporción de referencia.

Preferiblemente, el método comprende evaluar la CH en una región correspondiente de los cromosomas de una célula materna (p. ej., somática). Los SNP que no son heterocigóticos en los datos maternos no son informativos, y el método se puede basar únicamente en esos lugares que son heterocigóticos en los datos maternos.

15 El método puede utilizar adicional o alternativamente la evaluación de los loci de SNP presentes en una pluralidad de (preferiblemente todos) cromosomas de PB1 para detectar niveles inusualmente bajos de recombinación, lo que es indicativo de una tendencia a la aneuploidía.

El método puede utilizar adicional o alternativamente la evaluación de los loci de SNP presentes en una pluralidad de (preferiblemente todos) cromosomas de PB1 para detectar instancias de eventos de recombinación únicos cerca del centrómero o telómero.

20 La invención también proporciona un ordenador programado para ejecutar un método como se describió anteriormente.

Los expertos en la materia apreciarán en la técnica que los métodos descritos, en la medida en que implica el análisis de SNP en PB1 (opcionalmente con PB2 también) para deducir la naturaleza de los cromosomas maternos en el óvulo o embrión fecundado, se pueden llevar a cabo junto con otras metodologías en las que esos datos también se pueden utilizar, o pueden ser de interés, al determinar la aneuploidía o para el diagnóstico de otras enfermedades o trastornos en un sujeto. Los ejemplos incluyen el diagnóstico de enfermedades por ligamiento, o el diagnóstico de la presencia o susceptibilidad a una enfermedad o cáncer asociado con alelos o haplotipos SNP particulares, por ejemplo, defectos genéticos únicos conocidos relevantes para el riesgo de enfermedad (véase, p. ej., la Tabla I del documento WO2011/138750 del MRC et al.).

30 Definiciones

Alelo - Cada célula somática normal tiene dos copias del genoma en pares de cromosomas homólogos. Una copia única de un gen o marcador de ADN, que puede diferir en la secuencia de la otra copia, se denomina alelo. El término "alelo" se utiliza de acuerdo con su significado en la técnica de la biología. Un alelo es una o más formas alternativas de un gen, secuencia genética o nucleótido único (p. ej., un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP) que se encuentra en una localización específica, o locus, en un cromosoma.

35 SNP - Un polimorfismo de un solo nucleótido es un par de bases único en la secuencia de ADN que varía entre individuos. Estos ocurren frecuentemente en todo el genoma y son útiles como marcadores. Por ejemplo, los SNP bialélicos pueden tener cualquiera de las dos bases en una posición particular que se denominan genéricamente "A" y "B" en la presente memoria.

40 Cromosoma homólogo - El genoma humano se duplica en cada célula en 23 pares de cromosomas homólogos, uno de cada par heredado del padre y uno de la madre.

Cromátida hermana - La replicación del ADN da como resultado la duplicación de cada cromosoma en dos cromátidas hermanas que permanecen firmemente unidas hasta que se separan y se segregan a los polos opuestos durante la división celular.

45 Centrómero - Región especializada del cromosoma que facilita la unión de los microtúbulos del huso durante la división celular.

Brazo p - Término utilizado para el más corto de los dos brazos de cromosomas con centrómeros colocados más o menos centralmente (también "brazo corto").

50 Brazo q - Término utilizado para el más largo de los dos brazos de cromosomas con centrómeros colocados más o menos centralmente (también "brazo largo").

Los subtítulos en la presente memoria se incluyen solo por conveniencia, y no se deben interpretar como limitantes de la descripción de ninguna manera.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Figuras

Figura 1 - segregación cromosómica en la meiosis femenina I y II

5 (1) La meiosis femenina se inicia en el ovario fetal antes del nacimiento durante el desarrollo temprano de las células germinales femeninas (ovocitos primarios), que eventualmente formarán óvulos u ovocitos maduros en la mujer adulta. (2) Para reducir el número de cromosomas de los 23 pares de cromosomas homólogos normales (euploides) (uno de cada par heredado del padre (lado izquierdo, que incluye el alelo A representativo) y uno de la madre (lado derecho, que incluye el alelo B representativo), o 46 en total, a 23 cromosomas individuales, hay una ronda de replicación de ADN en la que cada cromosoma se duplica en dos cromátidas hermanas seguidas de dos divisiones meióticas especializadas, meiosis I y II. Las dos cromátidas hermanas tienen secuencias de ADN idénticas y, por lo tanto, los genotipos de SNP en esta etapa, que incluyen las regiones que flanquean el centrómero como se representa aquí en las cajas en la posición de los centrómeros, permanecen estrechamente unidas. (3) Los dos cromosomas homólogos de cada par se "emparejan" y se forma un solo cromosoma bivalente en el que las cuatro cromátidas hermanas están estrechamente unidas. Esto permite un número limitado de roturas en las cadenas de ADN de las cromátidas adyacentes no hermanas para "entrecruzarse" y volver a unirse a la otra cromátida, lo que resulta en el intercambio de un segmento cromosómico desde ese punto hasta el final del brazo cromosómico. (4) A medida que la célula se divide al final de la meiosis I, un cromosoma homólogo de cada par se introduce en el primer cuerpo polar (izquierda) y el otro en el ovocito secundario (derecha), que, por lo tanto, ahora tiene 23 cromosomas, cada uno con dos cromátidas hermanas. Cabe observar también que los cromosomas homólogos de origen paterno y materno se segregan al azar según la primera ley de Mendel. En el diagrama, se ilustra un solo entrecruzamiento entre dos cromátidas no hermanas. Cuando los dos cromosomas homólogos se separan, por lo tanto, hay una cromátida hermana no recombinante y otra recombinante, es decir, una cromátida que ha intercambiado parte del cromosoma con el otro cromosoma homólogo. Cabe observar que debido a que los entrecruzamientos generalmente ocurren a cierta distancia del centrómero, en todas las posiciones heterocigóticas maternas que flanquean el centrómero, las dos cromátidas hermanas de ambos cromosomas homólogos son homocigóticas para uno de los dos alelos (copias) SNP maternos. Más allá de la posición del entrecruzamiento hacia los extremos del cromosoma, algunas combinaciones de SNP en las dos cromátidas hermanas pueden ser heterocigóticas. (5) En la meiosis II, después de la fecundación por un espermatozoide que contiene la mitad del conjunto de cromosomas paternos, las dos cromátidas hermanas de cada cromosoma finalmente se separan y segregan en el segundo cuerpo polar y el ovocito o cigoto fecundado. Por lo tanto, el cigoto hereda 23 cromátidas maternas únicas (o más simplemente en esta etapa "cromosoma").

Los errores en este patrón normal de duplicación y segregación de cromosomas durante la meiosis femenina pueden causar que se hereden números anormales de cromosomas maternos (aneuploidía) en el cigoto. Se sabe que tres mecanismos básicos están asociados con estos errores y se ilustran en las Figuras 2-4 y los resultados euploides/aneuploides resumidos en la Tabla 1.

Figura 2 - errores meióticos femeninos que resultan en aneuploidía: (1) No disyunción clásica de cromosomas homólogos (Meiosis I) y cromátidas hermanas (Meiosis II)

40 Normalmente, los dos cromosomas homólogos, que forman el cromosoma bivalente único, se unen al final de la meiosis I y se mueven a los polos opuestos para que un cromosoma homólogo (con dos cromátidas hermanas) termine en el primer cuerpo polar (PB1; izquierda) y el otro en el ovocito secundario (derecha) (2.1). El mecanismo clásico que causa aneuploidía en los ovocitos humanos es la no disyunción de los dos cromosomas homólogos en la meiosis I (2.4 y 2.5), o las dos cromátidas hermanas en la meiosis II (2.2 y 2.3). La segregación de cromosomas homólogos al ovocito secundario es aleatoria, por lo que hay dos posibles variantes de 2.1-2.3. Ahora se sabe que este mecanismo solo ocurre en una minoría de casos de aneuploidía.

Figura 3 - errores meióticos femeninos que resultan en aneuploidía: (2) Predivisión prematura de cromátidas hermanas (Meiosis II).

50 La predivisión prematura de las cromátidas hermanas ahora se considera el mecanismo principal que causa la aneuploidía en el ovocito humano. Aquí es donde uno de los dos cromosomas homólogos que forman el único cromosoma bivalente se separa normalmente y se tira hacia uno u otro polo. Sin embargo, las dos cromátidas hermanas del otro cromosoma homólogo se separan prematuramente y una cromátida hermana se segrega al primer cuerpo polar (PB1) (izquierda) y otra al ovocito secundario (derecha). En la meiosis II, las dos cromátidas hermanas de los cromosomas homólogos intactos (si están presentes en el ovocito secundario) se separan y segregan al segundo cuerpo polar (PB2) y al ovocito o cigoto fecundado (como es normal). La cromátida hermana única se segrega al azar al PB2 o al cigoto. Por lo tanto, el cigoto es euploide para ese cromosoma materno (3.2 y 3.3) porque la segregación de la cromátida única en la meiosis II equilibró el error en la meiosis I, o es aneuploide (3.1 y 3.4). Como el cromosoma homólogo intacto se segrega aleatoriamente al PB1 o al ovocito secundario y de manera similar que cualquiera de las cromátidas hermanas de los cromosomas homólogos que se predividen prematuramente se pueden segregar al PB2 o cigoto, hay 4 posibles variantes de 3.1-3.4

Figura 4: errores meióticos femeninos que producen aneuploidía: (3) Biorientación de ambos cromosomas homólogos (Meiosis I).

5 El tercer mecanismo que causa la aneuploidía es donde las dos cromátidas hermanas de ambos cromosomas homólogos se separan y segregan a los polos opuestos (biorientar). En este caso, dos cromátidas no hermanas separadas se segregan al primer cuerpo polar (PB1; izquierda) y las otras dos al ovocito secundario (derecha). En la meiosis II después de la fertilización, ambas cromátidas se segregan aleatoriamente a cada polo y una cromátida se segrega al segundo cuerpo polar (PB2) (derecha) y otra al ovocito o cigoto fecundado (centro) (4.1) o ambas se segregan juntas al PB2 o al cigoto que causa aneuploidía (4.2 y 4.3). Cabe observar que debido a que hay dos combinaciones posibles de cromátidas no hermanas en la meiosis I y debido a la segregación aleatoria de las cromátidas en la meiosis II, existen 4 variantes de 4.1 y dos para 4.2 y 4.3.

Figura 5 - diagrama de flujo

Esta figura muestra un diagrama de flujo que ilustra un método para la predicción de aneuploidía mediante análisis de heterocigosidad centromérica basado en los métodos descritos.

15 Figura 6 - heterocigosidad centromérica detectada en un primer cuerpo polar (PB1)

Para cada autosoma (1-22) y el cromosoma X, el genotipo de los loci de SNP heterocigóticos maternos consecutivos que flanquean cada centrómero están representados por columnas continuas en las que la longitud es proporcional al número de loci. En la figura, el amarillo [más claro] y el verde [más oscuro] indican los loci de SNP homocigóticos para los dos haplotipos maternos y el rojo representa los loci de SNP heterocigóticos. La posición del centrómero para cada cromosoma se indica mediante una banda verde claro cerca del centro del cromosoma (o en la parte superior de los cromosomas 13-15 y 21-22).

25 La heterocigosidad centromérica (CH) está presente para los cromosomas 4, 16 y 22 con 72, 66 y 65% de los loci AB heterocigóticos, respectivamente, intercalados con identificación homocigótica de cualquiera de los haplotipos maternos causados por la omisión aleatoria de alelos. Un análisis similar del correspondiente ovocito de metafase II demostró que la CH para los cromosomas 4 y 16 fue causada por la biorientación y segregación de las cromátidas hermanas en ambos cromosomas homólogos, ya que también se observó CH. Mientras que, para el cromosoma 22, los loci heterocigóticos maternos cercanos al centrómero eran homocigóticos en el ovocito. Esto indica que la predicción de las cromátidas hermanas en un cromosoma homólogo había dado como resultado tres cromátidas que se segregan a PB1 y solo una cromátida al ovocito que podría haber resultado en una monosomía después de la fecundación. Todos los demás cromosomas son homocigóticos en la región que flanquea el centrómero para uno de los dos haplotipos maternos (amarillo o verde) que demuestran la herencia independiente de uno de los cromosomas de la madre (homólogo único con dos cromátidas hermanas) (primera ley de Mendel) con solo una identificación errónea heterocigótica ocasional (estas identificaciones erróneas aparecen como una o más líneas "delgadas" separadas en varios de los cromosomas, es decir, 2, 6-12, 14, 17-21, x).

35 Se detectan tres entrecruzamientos alejados (distales) de los centrómeros en los cromosomas 5, 6 y 17. Cabe observar que solo se muestra la región que flanquea el centrómero, por lo que la recombinación es relativamente infrecuente. Más allá de estos entrecruzamientos, está presente una banda de heterocigosidad ya que una cromátida hermana recombinante ahora tiene un segmento del otro cromosoma homólogo. Una vez más, el análisis del correspondiente ovocito de metafase II confirmó la presencia del otro homólogo (con dos cromátidas hermanas) con los loci de SNP homocigóticos para el haplotipo materno opuesto y el mismo patrón de bandas heterocigotas.

40 El cambio aparente de la homocigosidad de un haplotipo a otro en el cromosoma 7 (verde a amarillo) es un artefacto y es el resultado de un entrecruzamiento en el genotipo de referencia utilizado para la fase de los alelos maternos A y B. Este aparente cambio de etapa completa en el haplotipo materno se puede detectar fácilmente y distinguirse del patrón bastante diferente de identificación resultante de CH real o entrecruzado distal al centrómero, y por lo tanto se puede ignorar en el análisis.

Figura 7 - Mapeo de recombinación en los tres productos de meiosis en ovocitos humanos adultos.

50 (a) Entrecruzamiento y formación bivalente entre cromosomas homólogos durante el desarrollo fetal. Tras la maduración de los ovocitos, los cromosomas homólogos (definidos por marcadores genéticos pericentroméricos) se segregan y se forma PB1. Estos ovocitos MII maduros se detienen nuevamente, antes de ser activados por los espermatozoides (o ionóforo Ca²⁺) y completar la segunda división meiótica. A la derecha, se muestra una imagen de campo claro de un ovocito activado con PB2.

55 (b) Esquema de la amplificación MDA de ADN de PB1, PB2 y ovocitos en tres reacciones separadas seguidas de hibridación con la matriz de SNP 300K de Illumina. La lectura de la matriz de SNP se muestra en la parte inferior. El punto de ruptura del haplotipo se puede ver en el ovocito y hay un bloqueo heterocigótico recíproco en el PB1. Cabe observar que los SNP en esta región de PB1 no se pueden estimar.

(c) Esquema del cromosoma que muestra los entrecruzamientos, que se pueden determinar mediante análisis de heterocigosidad de PB1 (puntas de flecha, lado izquierdo) y aquellos que requieren análisis de PB2 u ovocitos (flecha,

lado derecho).

Figura 8 - Distribución entrecruzada y longitudes del tracto entrecruzado en la meiosis femenina humana.

5 (a) Eventos de recombinación estimados a partir de los tríos de ovocitos-PB (Trio), solo ovocitos, solo PB1 y PB2 solo en uno a cuatro ovocitos de cinco donantes diferentes.

(b-e) Correlación de Spearman (ρ) entre los niveles de entrecruzamiento basados en Trio y PB1, Trio y ovocito, trio y PB2 y ovocito y PB2. Cabe observar que los ensayos de Wilcoxon dieron valores significativos, pero no para (e).

Figura 9 - Histograma que resume los resultados de la Tabla 2 en el Ejemplo 3

El histograma demuestra claramente la relación entre el patrón de heterocigosidad PB1 y el cariotipo embrionario.

10 Ejemplos

Ejemplo 1- Errores meióticos que pueden conducir a aneuploidía en un óvulo fecundado

Como se ilustra en la Figura 1, normalmente en la meiosis I, los dos homólogos de cada cromosoma, que ahora consisten en pares de cromátidas hermanas, se emparejan y se unen, las cromátidas homólogas no hermanas se someten a una o más recombinaciones o entrecruzamientos.

15 Posteriormente, los cromosomas homólogos del cromosoma bivalente condensado se "orientan conjuntamente" a los mismos polos del huso, de modo que los cromosomas homólogos se separan entre sí en PB1 y el ovocito secundario. En la meiosis II, las dos cromátidas hermanas se separan en PB2 y ovocitos fecundados (cigoto u óvulo) después de la fecundación.

20 Por lo tanto, se puede ver que en el ovocito normal (euploide) todas las regiones centroméricas de cada cromosoma son homocigóticas en PB1, ya que esta parte de las cromátidas hermanas generalmente no se verá significativamente afectada por la recombinación o los entrecruzamientos.

Como se ilustra en la Figura 2, un mecanismo clásico que causa errores en la meiosis es la "no disyunción" de los cromosomas homólogos en la meiosis I y las cromátidas hermanas en la meiosis II.

25 Cuando se ha producido este tipo de error, el análisis de CH o la pérdida de ADN centromérico en PB1 detectaría estos errores en la meiosis I. Este tipo de error ahora se sabe que es raro.

30 Como se ilustra en la Figura 3, otra fuente de errores es la "predivisión prematura de las cromátidas hermanas" en la meiosis I. El análisis del número de copias por matriz CGH ha confirmado que este es el mecanismo predominante que causa aneuploidía en la edad materna avanzada (Handyside et al., 2012). La ganancia de una cromátida hermana sería detectada por CH en PB1 pero la pérdida de una cromátida hermana no sería detectada ya que el centrómero parecería ser homocigótico.

Todos los errores anteriores en la meiosis I se pueden detectar mediante cuantificación utilizando métodos de la técnica anterior, como 24sure™ (BlueGnome, Cambridge, Reino Unido) siguiendo el protocolo del fabricante.

35 Como se ilustra en la Figura 4, también se ha determinado que pueden surgir errores en la meiosis I por lo que los cromosomas homólogos "bi-orientan" las cromátidas hermanas a los polos opuestos del huso y se separan en la meiosis I, en una división "similar a la mitosis". Es probable que las dos cromátidas hermanas no apareadas se segreguen aleatoriamente a cualquiera de los polos en la meiosis II y en el 50% de los casos, ambas cromátidas hermanas se segregarán a PB2 o al ovocito, lo que dará como resultado una aneuploidía. Además, se ha demostrado que este aumento del riesgo de aneuploidía en el óvulo fecundado resultante después de la meiosis II, que surge de la separación original de las cromátidas hermanas en la meiosis I, se puede detectar por CH en PB1.

40 En particular, se esperaría que los ovocitos euploides normales tuviesen todos los loci heterocigóticos centroméricos homocigóticos en PB1, mientras que uno o más centrómeros heterocigóticos o faltantes en PB1 implicarían un ovocito en riesgo.

45 Se entenderá que la combinación de la detección de CH en PB1 con la cuantificación sería totalmente informativa para los errores de meiosis I (véase Figuras 1 (3)) y al mismo tiempo podría evaluar el riesgo de errores de meiosis II incluso cuando hay un PB1 aparentemente normal (euploide).

Ejemplo 2 - Evaluación de CH en PB1 a partir del número de ovocitos diferentes.

En este ejemplo, el estado de los SNP definidos se evaluó en PB ("genotipo PB1") y los ovocitos secundarios correspondientes ("genotipo de óvulo").

Métodos

50 Se lisaron los PB y ovocitos y se amplificó todo el genoma (WGA) mediante amplificación de desplazamiento múltiple

5 según las instrucciones del fabricante (Repli-g, Qiagen). Después, los productos de WGA se genotipificaron en una matriz de perlas de SNP de nuevo según el protocolo del fabricante (Infinium Human CytoSNP-12, illumina). Los datos del genotipo se exportaron como un archivo de texto y se importaron a Microsoft Excel y se utilizó un macro para identificar los SNP que flanquean los centrómeros de cada cromosoma y mostrar los resultados. El macro también calculó el porcentaje de SNP heterocigóticos.

10 El genotipo materno se determinó utilizando la misma matriz de perlas, pero se utilizó ADN genómico aislado de una muestra de sangre por métodos estándar. Estos datos también se importaron a Excel y se utilizaron para identificar todos los SNP heterocigóticos en las regiones de los centrómeros, de modo que el análisis posterior de los PB1 podría limitarse solo a estos loci.

Mediante este método, se evaluaron 200 SNP que flanquean cada uno de los centrómeros de los 18 cromosomas no acrocéntricos y en el brazo q de los 5 cromosomas acrocéntricos para un total de 8200 SNP definidos (18x400 + 5x200) en PB y ovocitos secundarios.

Consideraciones teóricas

15 Teóricamente, la presencia anormal de dos cromátidas no hermanas, una de cada uno de los dos cromosomas homólogos, debería dar como resultado que todos los loci SNP maternos heterocigóticos que flanquean el centrómero a la posición del primer entrecruzamiento también sean heterocigóticos en PB1. Por lo tanto, analizar solo los loci heterocigóticos maternos (como se muestra en la Figura 6) daría como resultado una serie continua de SNP heterocigóticos hasta el punto del entrecruzamiento, cuando todos los SNP serían homocigóticos.

20 Estos SNP homocigóticos más allá del entrecruzamiento, serán consistentes con uno u otro de los haplotipos maternos (si los SNP maternos se estiman).

25 En la práctica, cuando se genotipifican células individuales después de la amplificación del genoma completo, el fallo para amplificar una de las dos copias de SNP en cada locus heterocigótico (omisión alélica o ADO) es relativamente frecuente (hasta aproximadamente el 50%). Por lo tanto, el patrón esperado en PB1 para la situación anormal es un cromosoma con una alta incidencia de loci heterocigóticos, incluso alrededor del centrómero (CH), pero intercalado con SNP homocigóticos de cualquiera de los haplotipos maternos al azar.

Más allá del entrecruzamiento, todavía puede haber un error ocasional de genotipificación ("identificaciones erróneas" o "ganancias de alelos") que resulta en un SNP homocigótico que se llama heterocigótico (aproximadamente 5-10%).

Resultados

30 Los resultados se muestran en la Figura 6 para un óvulo (denominado "óvulo9"). Los datos mostraron que había niveles relativamente bajos ($\leq 5\%$) de "identificaciones erróneas" o "ganancias de alelos" de AB para la mayoría de los cromosomas (es decir, una baja incidencia de donde se determinó que la madre no era heterocigótica, pero el PB1 asociado con el óvulo9 era llamado como heterocigótico).

35 Se encontró un alto nivel de heterocigosidad centromérica (CH) para los cromosomas 4, 16 y 22 al evaluar PB1 asociado con el óvulo9.

Los tres cromosomas afectados (4, 16 y 22) demuestran el patrón teórico explicado anteriormente, con una alta incidencia de loci heterocigóticos cerca del centrómero intercalado con SNP homocigóticos de cualquiera de los haplotipos maternos al azar debido a ADO. Como se puede ver fácilmente en la Figura 6, la presencia de esta ADO no impidió la detección precisa de CH.

40 Un análisis similar del correspondiente ovocito de metafase II (no mostrado) demostró que dos de estos (4 y 16) fueron causados por la biorientación de ambos homólogos, de modo que los centrómeros en el ovocito también eran heterocigóticos. Para el cromosoma 22, la CH fue causada por la predivisión prematura de las cromátidas hermanas con una cromátida adicional que se heredó en PB1 y el cromosoma del ovocito fue homocigótico en la región del centrómero. Por lo tanto, el primero tendría un número de copia normal y la CGH no detectaría el riesgo de aneuploidía.

45 Además, el cromosoma 17 tenía niveles heterocigóticos elevados, pero se descubrió que esto se debía a un entrecruzamiento cerca del centrómero en el brazo q, lo que resultó en una heterocigosidad distal (es decir, lejos del centrómero) que se podía distinguir fácilmente de los cromosomas afectados.

Uso pronostico

50 Debido a la presencia de un alto nivel de CH en el PB1 asociado con el Óvulo9, pudiéndose clasificar el Óvulo9 como de mayor riesgo que un óvulo correspondiente en el que la CH era menor o ausente en su PB1 asociado.

En conclusión, los cromosomas 4 y 16 demostraron alta CH en ambos productos de meiosis I (PB1 y ovocito secundario) del Óvulo9. Ambos homólogos de estos cromosomas se han dividido de forma "similar a la mitosis", lo que da como resultado una cromátida para cada homólogo en el PB1 y en el ovocito de meiosis II. Cabe destacar que como el número de copias de estos cromosomas es normal en PB1 (2n cromátidas), esto no es detectado por la matriz

CGH. Sin embargo, como no hay replicación del ADN en la meiosis II, las dos cromátidas individuales se segregarán teóricamente al azar, dando como resultado un riesgo del 50% de aneuploidía en el ovocito fecundado (Figura 4).

5 Con el cromosoma 22, hay un alto nivel de CH en PB1, pero no en el ovocito secundario. Esto indica ganancia de cromátida en PB1 y un riesgo de pérdida del 50% en el ovocito fecundado (véase Figura 1 (3)). En ausencia de datos del ovocito secundario, esto se podría confirmar mediante análisis cuantitativo de PB1.

La probabilidad binomial acumulativa de que al menos uno de estos cromosomas producirá aneuploidía es, por lo tanto, de 0.875.

10 Por lo tanto, se puede ver que la evaluación de la presencia o el grado de heterocigosidad centromérica en los cromosomas del primer cuerpo polar del óvulo se puede utilizar para evaluar el riesgo de aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno.

Ejemplo 3 - Comparación de la matriz CGH para la detección cuantitativa de aneuploidía en PB1 y PB2 con genotipificación de SNP, haplotipificación materna y análisis de CH en PB1 solo, o PB1 y PB2.

15 Se recolectaron diez ovocitos maduros bloqueados en MII de un paciente sometido a un ensayo de aneuploidía mediante una matriz CGH de PB1 y PB2. Se realizó una biopsia de PB1 de cada ovocito antes de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides y, después de la fecundación y la reanudación de la meiosis, también se biopsió PB2. Ambos cuerpos polares fueron lisados, el ADN se amplificó mediante WGA y partes alícuotas de los productos se utilizaron para la matriz CGH. Los resultados de la matriz CGH indicaron que todos los embriones tenían una o más anomalías en el número de copias en PB1 y/o PB2, excepto uno, supuesto embrión euploide (Embrión # 20 1), que por lo tanto se seleccionó para la transferencia (Tabla 2). Con el consentimiento de los pacientes, los 9 embriones aneuploides supuestos restantes se lisaron y el ADN se amplificó mediante WGA. El ADN genómico de ambos padres, los productos de WGA de todos los cuerpos polares y los embriones correspondientes se genotipificaron con SNP. Después se utilizó una combinación de (1) haplotipificación materna utilizando un PB2 como referencia para estimar los SNP maternos heterocigóticos, (2) análisis de heterocigosidad y (3) haplotipificación de 25 ambos cromosomas parentales en el embrión (Handyside et al., 2010) para analizar el patrón de entrecruzamientos de todo genoma en PB1, PB2 y los embriones correspondientes.

El análisis de SNP de los PB y los embriones correspondientes fueron 100% concordantes y confirmó que 7/9 de los embriones predichos como aneuploides por la matriz CGH de PB1 y PB2, eran aneuploides. Sin embargo, los dos embriones restantes (Embriones #2 y 12; Tabla 2) con tres y múltiples anomalías en el número de copias, respectivamente, identificadas mediante la matriz CGH eran euploides (Tabla 2; véase también la Figura 9). Además, no se detectaron patrones anormales de SNP, incluida la heterocigosidad centromérica, para ninguno de los cromosomas en estos dos embriones euploides. En contraste, 19 ejemplos de patrones anormales de SNP ocurrieron en los 7 embriones aneuploides (en negrita indica un resultado aneuploide en el embrión correspondiente):

- **1xMI NDJ** (ver Figuras 2.4, 2.5)
- 35 • 3x PD (1x balanceado (véase Figura 3.2), **2x no balanceado** (Figura 3.4))
- 15x BO (11x balanceado, **4x no balanceado**; véase Figuras 4.1 vs. 4.2, 4.3)

Se confirmó que todos los 11x BO balanceados tenían haplotipos centroméricos opuestos en PB2 y embrión (Figura 4.1).

40 Por lo tanto, mientras que el análisis de la matriz CGH de PB1 solo habría predicho la posibilidad de 3/7 de aneuploidías, el análisis de la distribución de SNP heterocigóticos en PB1 solo incluyó anomalías para 7/7 de los cromosomas aneuploides más otras 12 anomalías asociadas con un mayor riesgo de aneuploidía. Esto demuestra la utilidad del uso de la evaluación de la heterocigosidad de PB1 para el cribado diagnóstico o pronóstico.

Más específicamente, se predijeron 7/7 aneuploidías en base al análisis de haplotipos en:

- 9x cen het (embrión 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16) -> 1x MI trisomía 1x monosomía
- 45 7x hetero (embrión 8, 10, 13, 14) -> 2x monosomía
- 2x homo (embrión 7, 10) -> 2x MI trisomía
- 1x pérdida (embrión 11) -> 1x MI trisomía

Tabla 2 Ejemplo de datos que comparan el análisis de la matriz CGH del número de copias de cromosomas en PB1 y PB2 con genotipificación de SNP y haplotipificación materna, y haplotipificación parental (cariomapeado) de los embriones correspondientes.

Embrión #	Matriz CGH		Haplotipificación Mat		Tipo de anomalía	Cariomapa del embrión
	PB1	PB2	PB1	PB2		
1	Euploide	Euploide	Euploide	Euploide	Ninguna	Transferido
2	+6, +10, +18	Euploide	Euploide	Euploide	Ninguna	Euploide
7	-22	Euploide	16-cen het 21-cen het 22-homo	Euploide	16-BO bal 21-BO bal 22-PD unbal	+22 MI
8	+ 15	-9, -15	9-cen het 15-hetero	-9, -15	9-BO unbal 15-PD bal	+9 MI
10	-15, -19, -22	Euploide	15-homo 16-hetero 19-hetero 21-cen het 22-cen het	Euploide	15-PD unbal 16-BO bal 19-BO bal 21-BO bal 22-BO bal	+ 15 MI
11	-22	+22	4-cen het -22	22-cen het	4-BO bal 22-MI NDJ	+22 MI
12	Euploide	Anomalías múltiples en el número de copias	Euploide	Euploide	Ninguna	Euploide
13	Euploide	del 4, +22	16-cen het 21-hetero 22-hetero	del 4 22-hetero	16-BO bal 21-BO bal 22-BO unbal	-22 Mil
14	Euploide	-10, -13, +19, - 20	17-cen het 19-hetero 22-hetero	19-hetero	17-BO bal 19-BO unbal 22-BO bal	-19 Mil
16	Euploide	+21	21-cen het	21-cen het	21-BO unbal	-21 Mil

NDJ = No disyunción (véase Figura 2); PD = Predivisión prematura (véase Figura 3); BO = Biorientación (véase Figura 4); Euploide (un número normal de cromosomas maternos); Del = eliminación parcial; Bal = balanceado; Unbal = no balanceado; NR = Sin resultados

5

Ejemplo 4 - Análisis de recombinación meiótica

Se sabe en la técnica que una baja incidencia y/o un patrón anormal de recombinación cerca del centrómero o telómero se asocia con anomalías en la segregación cromosómica que conduce a la aneuploidía (véase Hassold, 2001). Por ejemplo, en la población humana, el proyecto del Síndrome de Down Nacional de EE. UU. ha dado a conocer que la tasa de cromosomas 21 que carecen de eventos de recombinación está enriquecida en pacientes con Trisomía 21 en comparación con individuos sanos.

10

Se llevó a cabo un análisis similar al descrito anteriormente para el Ejemplo 3, con 13 ovocitos de 5 pacientes. Sin embargo, en este ejemplo, después de la biopsia de PB1, se inició la reanudación de MII y la extrusión de PB2 activando artificialmente los ovocitos (Fig. 7a). Ambos cuerpos polares y el ovocito activado se lisaron después, el ADN se amplificó mediante WGA y el SNP se genotipificó junto con el ADN genómico del paciente (Fig. 7b). Utilizando el genotipo de uno de los PB2 u óvulos, los dos haplotipos maternos se determinaron y analizaron después junto con el patrón de heterocigosidad en PB1, PB2 y los ovocitos activados correspondientes. Esto permitió mapas de recombinación meiótica de todo el genoma mediante el análisis de los haplotipos maternos presentes.

15

Los entrecruzamientos (recombinación) entre los cromosomas homólogos (es decir, entre dos cromátidas no hermanas) dan como resultado un cambio en el haplotipo distal al punto de ruptura del haplotipo tanto en PB1 como en el PB2 o el óvulo, pero no en ambos (Fig. 7c, puntas de flecha). En PB1, que normalmente retiene ambas cromátidas hermanas para un homólogo, da como resultado una heterocigosidad distal al primer punto de rotura (azul), seguida de bandas alternas de homocigosidad y heterocigosidad en entrecruzamientos sucesivos hacia el telómero de cada brazo cromosómico. Mientras que en el PB2 o en el óvulo, que normalmente tiene una sola cromátida del otro homólogo, esto da como resultado un cambio de un haplotipo a otro (amarillo a verde o viceversa) y todo el cromosoma es homocigótico. Por lo tanto, el número y la posición de estos entrecruzamientos se pueden determinar analizando el número y la posición de las regiones de heterocigosidad en PB1 solo.

20

25

Además, sin embargo, los entrecruzamientos también pueden ocurrir entre cromátidas hermanas en regiones donde un entrecruzamiento proximal dio como resultado cromátidas hermanas con haplotipos opuestos. Estos solo se pueden detectar examinando el patrón de cambio de haplotipo en PB2 y/o ovocitos (Fig. 7c, flecha) ya que solo involucran uno de los dos cromosomas homólogos. En las regiones heterocigóticas correspondientes del otro cromosoma homólogo en PB1, estos entrecruzamientos no se pueden detectar en absoluto mediante análisis de genotipo, ya que ambas cromátidas hermanas (con haplotipos opuestos) cambian de haplotipos y el cromosoma permanece heterocigótico. Por lo tanto, la estimación más cercana de la posición y el número total de entrecruzamientos para cada cromosoma es la suma de los que se pueden detectar mediante el análisis de PB1 solo y los que ocurren solo en PB2 y ovocitos.

30

35

5 El análisis del patrón de heterocigosidad y haplotipos maternos en los 13 ovocitos activados reveló 920 entrecruzamientos en los 23 cromosomas analizados (22 autosomas y el cromosoma X). Hubo una amplia variación en el número total de entrecruzamientos detectados en PB1, PB2 y ovocitos y el número total (trío) en ovocitos individuales (Fig. 8a). Sin embargo, el número de entrecruzamientos en PB1 estaba altamente correlacionado con el número total que combina el análisis de PB1, PB2 y ovocitos ("Trio") (Fig. 8b).

10 Por lo tanto, el número de entrecruzamientos en PB1, que es determinable utilizando los métodos descritos en la presente memoria, se puede utilizar como una herramienta o herramienta adicional para evaluar el riesgo de aneuploidía en el ovocito. Eso a su vez se puede utilizar en la selección de ovocitos o embriones y/o como un indicador pronóstico de probabilidad de embarazo.

Ejemplo 5: el mapeo SNP de alta resolución de PB1 puede revelar anomalías cromosómicas estructurales de novo

En los humanos, las anomalías cromosómicas, ya sea en estructura o en números, contribuyen a los trastornos, la infertilidad y la pérdida del embarazo (Nagaoka, 2012).

15 El análisis realizado por los autores de todos los productos de meiosis descritos en los Ejemplos 3 y 4 anteriores, les permitió discernir alteraciones de novo en los cromosomas que se podrían asignar específicamente a la línea germinal femenina humana.

Por ejemplo, en los datos descritos en el Ejemplo 4, se observaron tres defectos estructurales principales (0,5% de los cromosomas) de tres ovocitos diferentes, todos los cuales incluían un desequilibrio en el propio ovocito.

20 Uno consistió en la ganancia de una pequeña parte del brazo q del cromosoma 22 (1.5 Mb) concomitante con la pérdida de la mayoría del brazo q en el ovocito. Tanto la ganancia como la pérdida se reflejaron en el PB1. La pérdida efectivamente conduce a un ovocito aneuploide y se predice que causará la pérdida de embriones. En humanos, incluso una deleción relativamente pequeña de 22q13.3 está asociada con el síndrome de Phelan-McDermid (Phelan, 1993).

25 El segundo cambio estructural fue la adición de 9.2 Mb del brazo p del cromosoma 8 en el ovocito, con pérdida concomitante en el PB1. Esto podría ser una inversión-duplicación o un fragmento del cromosoma 8 no asociado cromosómicamente. La ganancia de 8p está asociada con el síndrome mieloproliferativo (Macdonald, 1995).

Finalmente, casi 2/3 del brazo q del cromosoma 15 estuvo presente dos veces en un tercer ovocito, con una pérdida concomitante en el PB1.

30 Estas observaciones respaldan la conclusión de que los defectos estructurales surgieron durante la meiosis en la línea germinal femenina, y que el PB1 se puede utilizar para observar o deducir la posible presencia de tales defectos.

Lista de referencias

- Chowdhury, R., Bois, P. R., Feingold, E., Sherman, S. L. y Cheung, V. G. Genetic analysis of variation in human meiotic recombination. *PLoS Genet* 5, e1000648, doi:10.1371/journal.pgen.1000648 (2009).
- 35 Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA, Griffin DK (2009) "Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes" *J Med Genet*. Oct de 2010; 47 (10): 651-8.
- Handyside, A.H., Montag, M., Magli, M.C., Repping, S., Harper, J., Schmutzler, A., Vesela, K., Gianaroli, L., and Geraedts, J. (2012). Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *Eur J Hum Genet* 70, 742-7.
- 40 Hassold, T. and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2, 280-91.
- Kong, A. y col. Sequence variants in the RNF212 gene associate with genome-wide recombination rate. *Science* 319, 1398-1401, doi:10.1126/science.1152422 (2008).
- 45 Macdonald, D., Aguiar, R. C., Mason, P. J., Goldman, J. M. & Cross, N. C. A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review. *Leukemia* 9, 1628-1630 (1995).
- Nagaoka, S. I., Hassold, T. J. & Hunt, P. A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet* 13, 493-504, doi:10.1038/nrg3245 (2012).
- Phelan, K. y Rogers, C. in *GeneReviews* (eds R. A. Pagon et al.) (1993).
- 50 Spandorfer, S.D., Davis, O.K., Barmat, L.I., Chung, P.H. y Rosenwaks, Z. (2004). Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss. *Fertil Steril* 81, 1265-9.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar la aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno en un óvulo humano, comprendiendo el método evaluar la presencia o el grado de heterocigosidad centromérica (CH) para uno o más de los cromosomas del primer cuerpo polar (PB1) del óvulo;
- 10 midiendo la heterocigosidad centromérica en el primer cuerpo polar y en donde el método se utiliza para predecir el riesgo de aneuploidía en un óvulo fecundado o embrión después de la meiosis II,
- 10 en donde la presencia de un nivel más alto de CH en el primer cuerpo polar se utiliza para deducir un mayor riesgo de dicha aneuploidía cromosómica en el óvulo fecundado o embrión correspondiente desarrollado a partir del mismo en comparación con donde una ausencia o nivel más bajo de CH está presente en el primer polar cuerpo.
- 15 2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la heterocigosidad de algunos o todos los cromosomas del primer cuerpo polar del óvulo se utiliza para evaluar el número total de entrecruzamientos en los cromosomas del PB1, en donde se utilizan un número total de entrecruzamientos por debajo del promedio en los cromosomas del PB1 para deducir un mayor riesgo de aneuploidía en el óvulo fecundado o embrión correspondiente desarrollado a partir del mismo, en comparación con donde un número promedio de entrecruzamientos están determinados en los cromosomas del PB1.
- 20 3. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la heterocigosidad de uno o más de los cromosomas del primer cuerpo polar del huevo se utiliza para evaluar la posición de los entrecruzamientos en dicho uno o más de los cromosomas del PB1, en donde un cromosoma del PB1 muestra solo un solo entrecruzamiento proximal al telómero o centrómero, esto se utiliza para deducir un mayor riesgo de aneuploidía en el óvulo fecundado o embrión correspondiente desarrollado a partir del mismo, en comparación con donde se determina una pluralidad de entrecruzamientos distribuidos medialmente a través del cromosoma del PB1 .
- 25 4. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la heterocigosidad de uno o más de los cromosomas del primer cuerpo polar del huevo se utiliza para evaluar la presencia de defectos estructurales en dicho uno o más de los cromosomas del PB1,
- en donde un cromosoma del PB1 muestra un defecto estructural, esto se usa para deducir un mayor riesgo de aneuploidía en el óvulo fecundado o embrión correspondiente desarrollado a partir del mismo y en donde los defectos estructurales se seleccionan entre: ganancias; pérdidas; duplicaciones.
- 30 5. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método se utiliza para distinguir un cuerpo polar que contiene un cromosoma que consiste en cromátidas hermanas replicadas de uno de los cromosomas homólogos de la madre de un cuerpo polar en donde los cromosomas comprenden dos o más cromátidas no hermanas que están colectivamente obtenidas a partir de los dos cromosomas maternos homólogos, en donde este último implica un mayor riesgo de aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno en el óvulo correspondiente.
- 35 6. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método comprende evaluar una pluralidad de primeros cuerpos polares diferentes, tal como clasificar los óvulos correspondientes, o los óvulos fecundados o embriones desarrollados a partir de los mismos, según su riesgo de posible aneuploidía cromosómica de origen meiótico materno.
- 40 7. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cuerpo polar es de una mujer humana que se está sometiendo a un tratamiento de FIV.
8. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se evalúan al menos 2, 3, 4, 5 o 6 de los cromosomas humanos seleccionados del siguiente grupo: X, 22, 21, 18, 16 y 13.
- 45 9. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la heterocigosidad centromérica se evalúa estudiando o genotipificando una pluralidad de loci de SNP.
- 50 10. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la heterocigosidad centromérica (CH) se evalúa estudiando los SNP bialélicos estrechamente adyacentes que flanquean los centrómeros de los cromosomas del cuerpo polar, en donde:
- (i) se estiman los SNP de los cromosomas maternos;
- (ii) la estimación de SNP de la etapa (i) se utiliza para deducir la presencia de CH a partir de los SNP bialélicos estrechamente adyacentes, que son loci maternos heterocigóticos, pero en donde el estudio produce una identificación homocigótica debido a la omisión aleatoria de alelos, y en donde al menos se estudian 25, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 o más SNP que flanquean el centrómero, en donde se evalúan los SNP en los brazos p y q de cada cromosoma no acrocéntrico.
11. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en donde después del estudio de

5 los SNP se cuantifica la proporción de SNP heterocigóticos, en donde la proporción de SNP heterocigóticos en el cuerpo polar se compara con la proporción de SNP heterocigóticos en el genotipo de la célula materna, en donde preferiblemente se evalúan al menos 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más SNP que son heterocigóticos en la célula materna, y en donde si es mayor del 50, 60, 70, 80 o 90% de los SNP heterocigóticos maternos evaluados son también heterocigóticos en el primer cuerpo polar, después se considera que el óvulo correspondiente incluye dos o más cromátidas no hermanas que se obtienen colectivamente a partir de ambos cromosomas maternos homólogos.

10 12. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde una pluralidad de loci de SNP se genotipa más allá de la región del centrómero, y opcionalmente a lo largo de la longitud total del cromosoma o de cada uno, para determinar la presencia de uno o más de:

(i) la presencia de dos cromátidas de un cromosoma homólogo con una cromátida hermana del otro cromosoma homólogo;

(ii) la presencia de ambos cromosomas homólogos que comprenden las cuatro cromátidas hermanas;

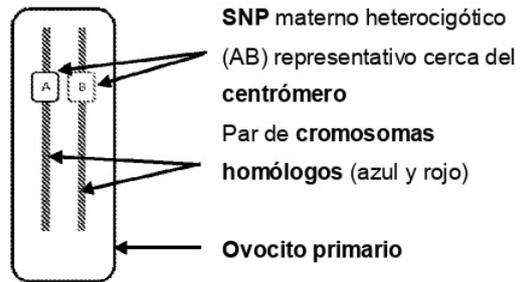
(iii) la presencia de una sola cromátida hermana.

15 13. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que adicionalmente comprende la etapa de cuantificar el número de cromosomas o cromátidas o partes de los mismos presentes en el cuerpo polar.

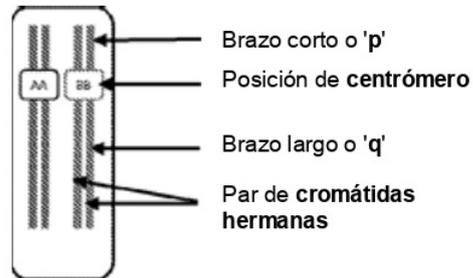
Figura 1

SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA EN LA MEIOSIS FEMENINA I y II

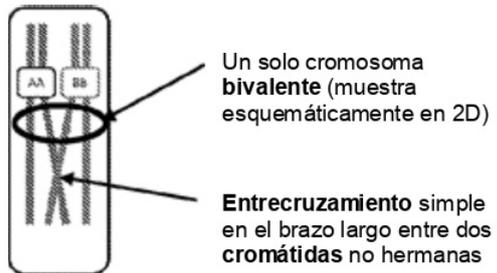
1) El ovocito primario en el ovario fetal tiene 23 pares de cromosomas homólogos (46 en total), uno heredado del padre y otro de la madre, como en las células somáticas.



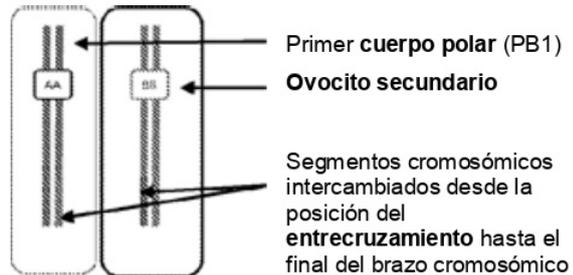
2) Después de la replicación del ADN temprano en la **meiosis I**, ambos cromosomas homólogos consisten en pares de **cromátidas hermanas** estrechamente unidas, con **SNP** duplicados idénticos.



(3) El par de cromosomas homólogos y las cuatro cromátidas hermanas se unen estrechamente en 23 cromosomas **bivalentes** filiformes. Las **cromátidas** se rompen y las **cromátidas** no hermanas se unen e intercambian partes de los brazos cromosómicos en los **entrecruzamientos**



(4) Antes de la ovulación en el **adulto**, el ovocito en maduración completa la **meiosis I**. Los dos cromosomas homólogos dentro de cada bivalente se segregan en el **primer cuerpo polar (PB1)** y el **ovocito secundario** que se detiene en la metafase de la **meiosis II**



(5) En la fecundación, se completa la **meiosis II** y las dos **cromátidas hermanas** en el **ovocito secundario** se segregan en el **segundo cuerpo polar (PB2)** y el ovocito fecundado o cigoto reduce el número de cromosomas maternos de 46 a 23 (no se muestran los cromosomas paternos)

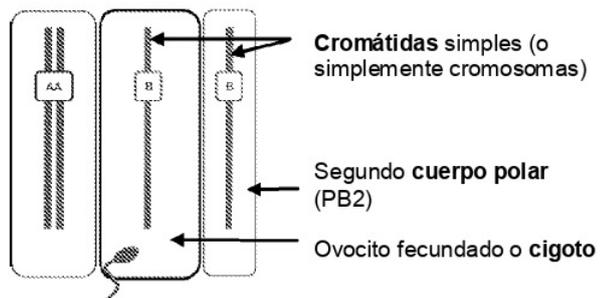


Figura 2
ERRORES MEIÓTICOS FEMENINOS QUE DAN COMO RESULTADO ANEUPLOIDÍA:
(1) NO DISYUNCIÓN CLÁSICA DE CROMOSOMAS HOMÓLOGOS (MEIOSIS I) Y CROMÁTIDAS HERMANAS (MEIOSIS II)

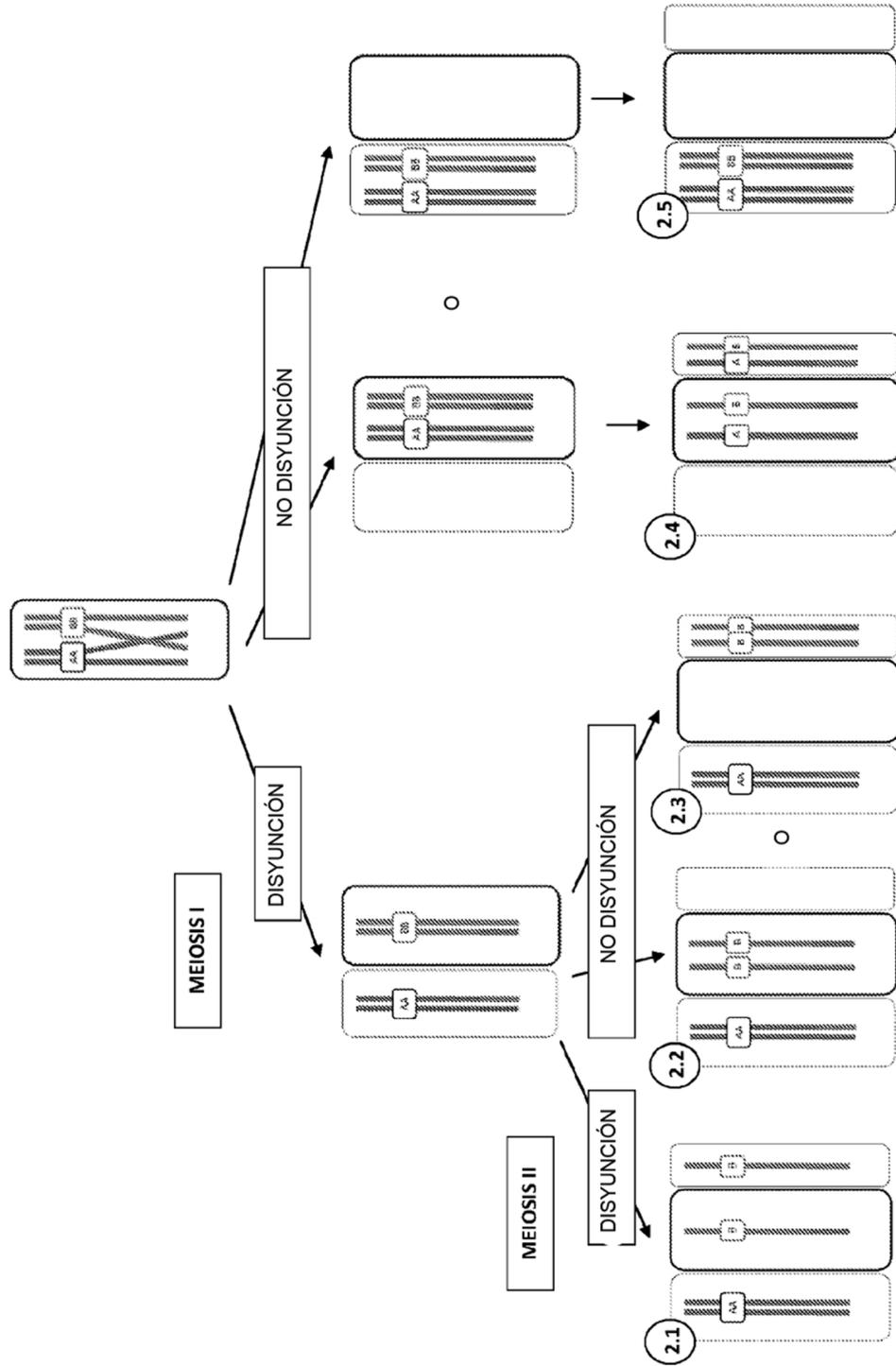


Figura 3

ERRORES MEIÓTICOS FEMENINOS QUE DAN COMO RESULTADO ANEUPLOIDÍA:
(2) PREDIVISIÓN PREMATURA DE CROMÁTIDAS HERMANAS (MEIOSIS I)

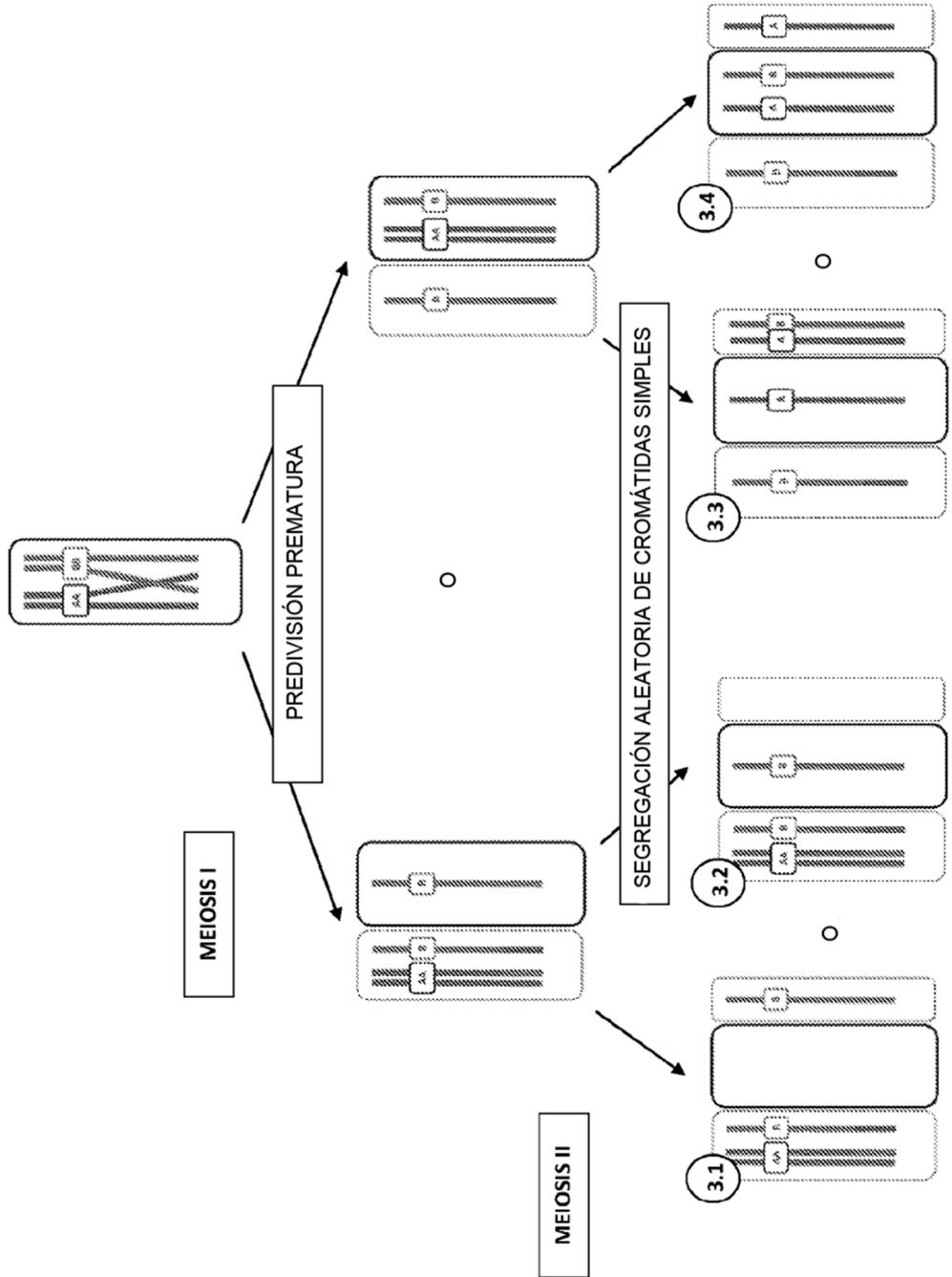


Figura 4

ERORES MEIÓTICOS FEMENINOS QUE DAN COMO RESULTADO ANEUPLOIDÍA:
(3) BIORIENTACIÓN DE AMBOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS

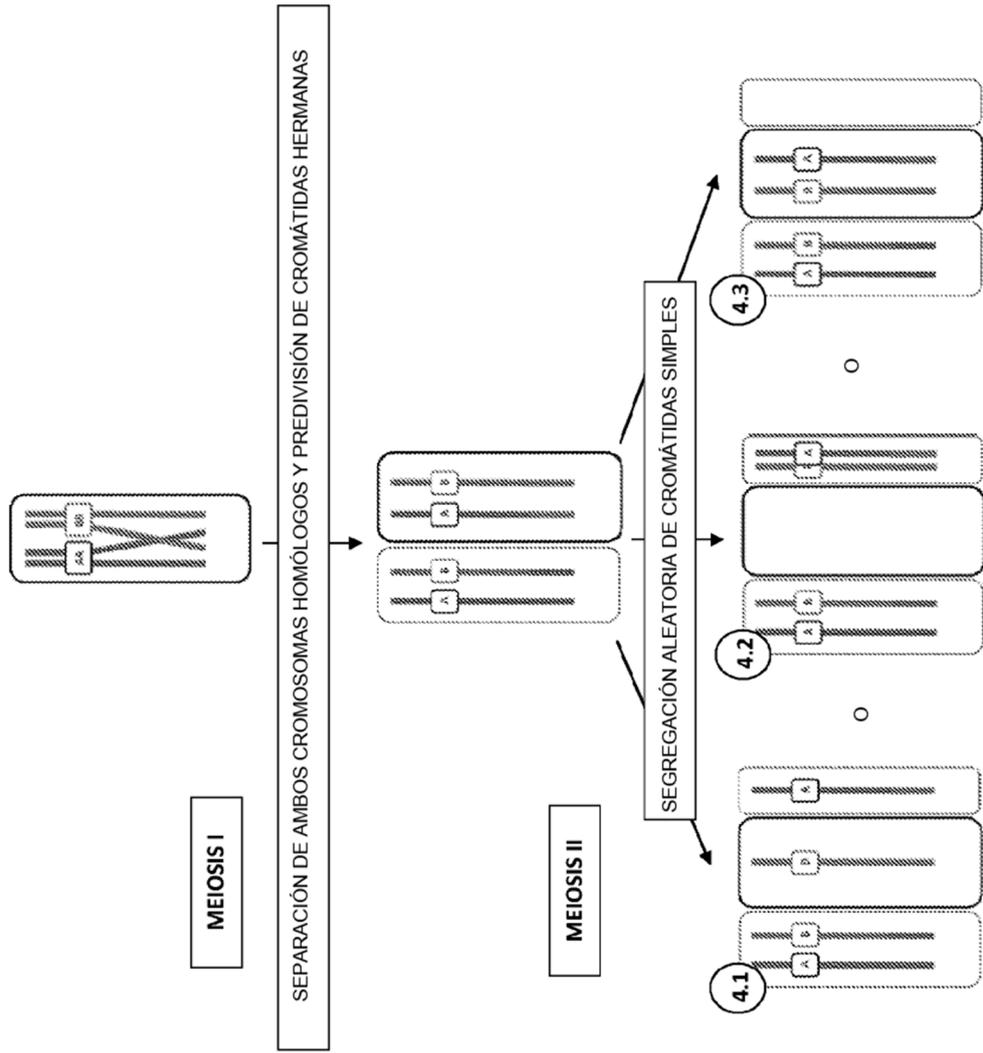


Figura 5

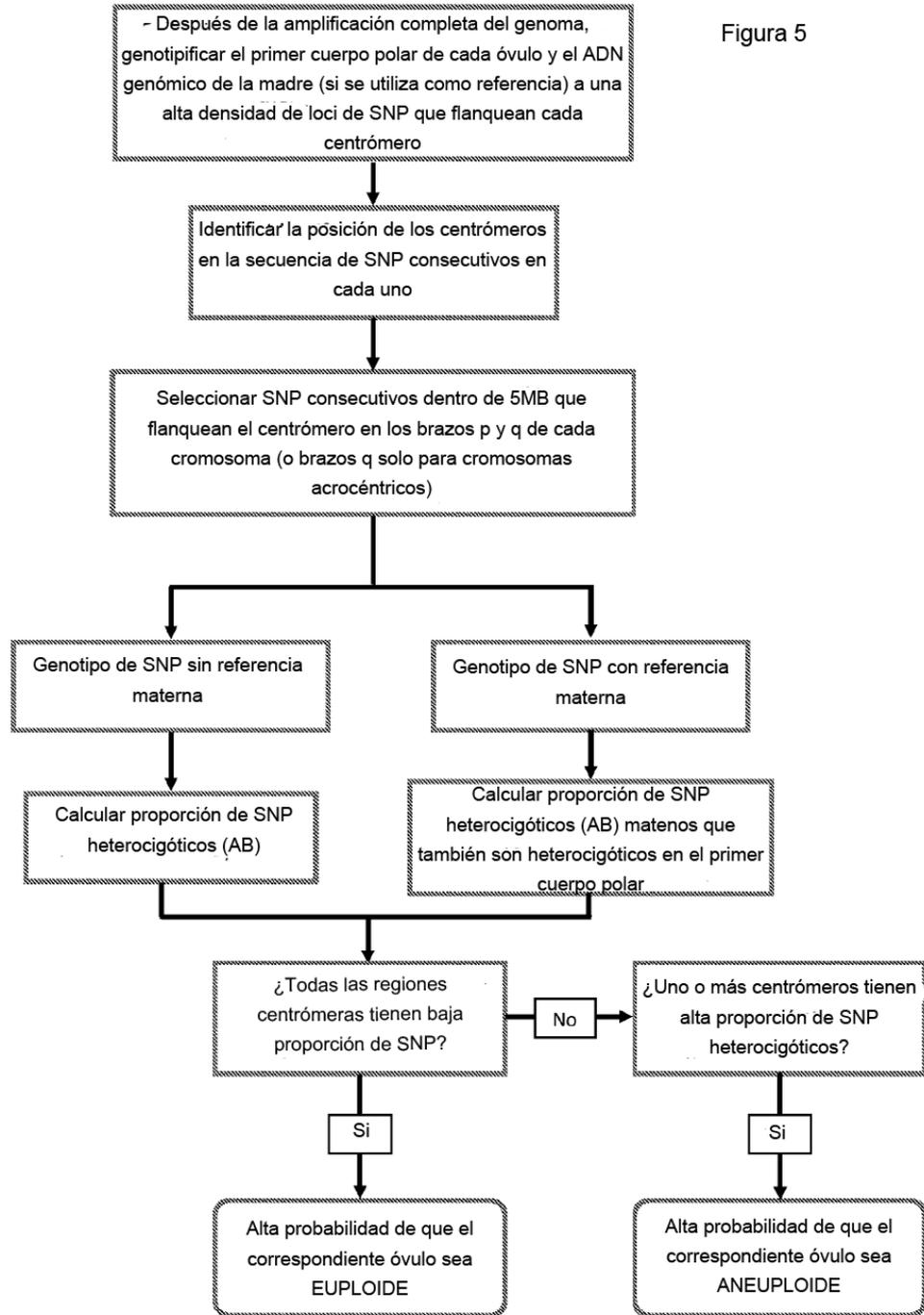


Diagrama de flujo del método para predecir aneuploidía de origen meiótico materno en óvulos humanos y embriones después de la fecundación mediante análisis de heterocigosidad centromérica (CH) para cada cromosoma

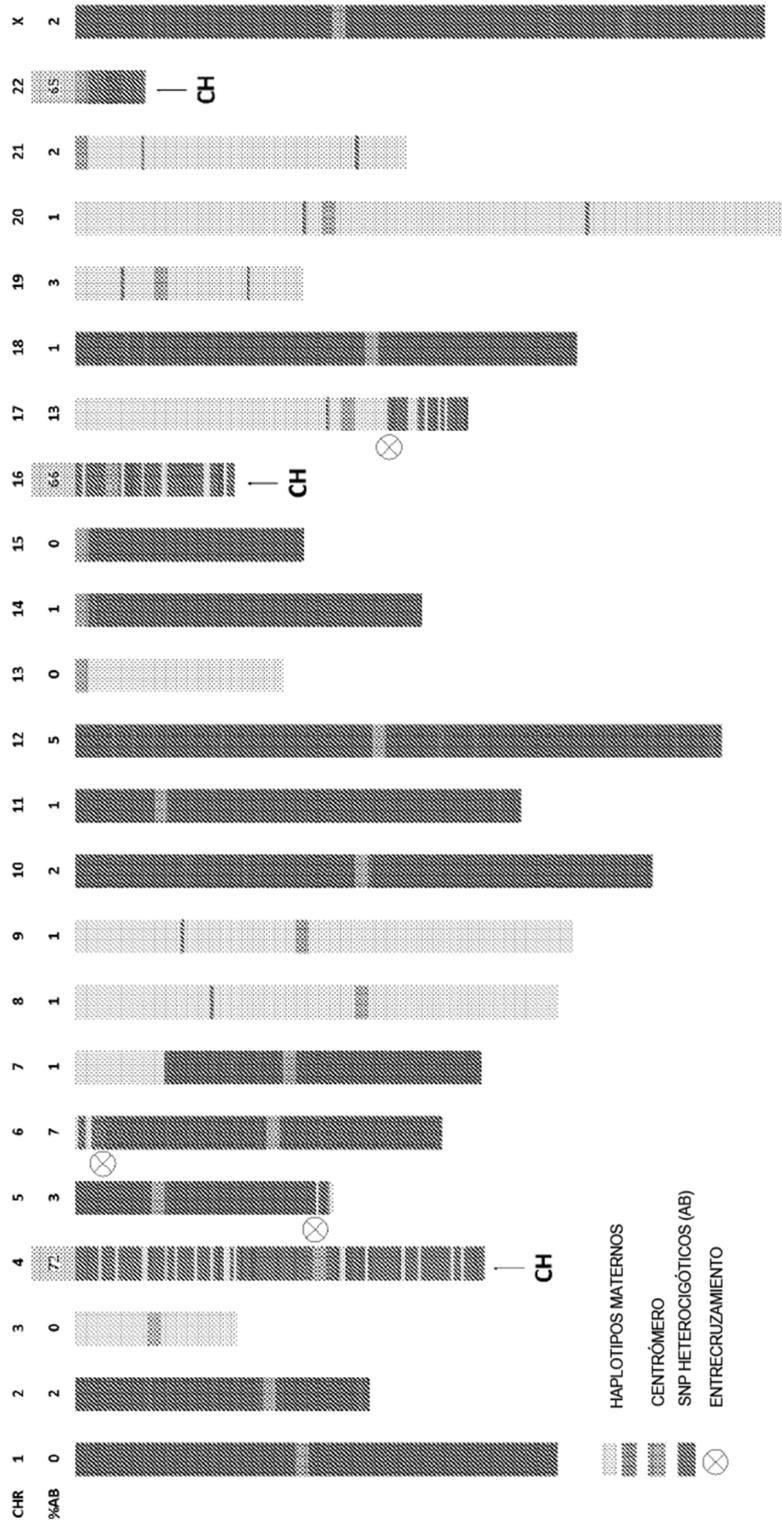


Figura 6

Figura 7

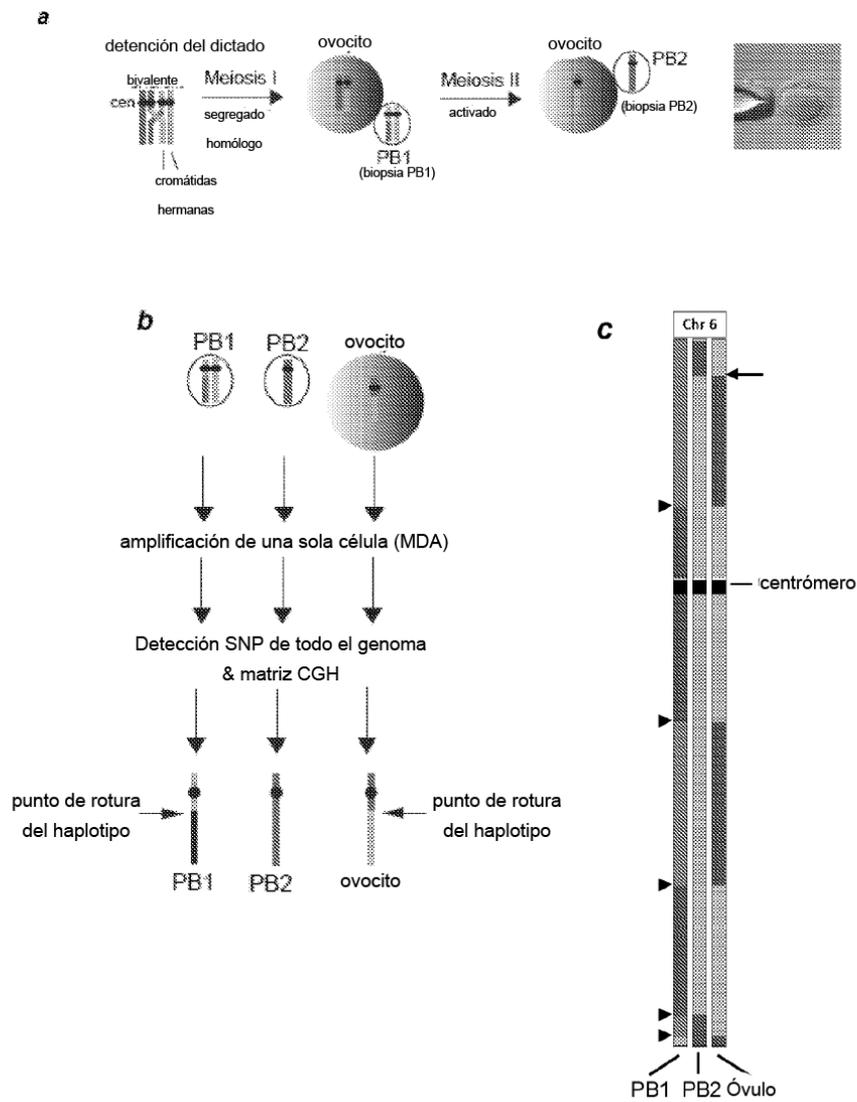


Figura 8

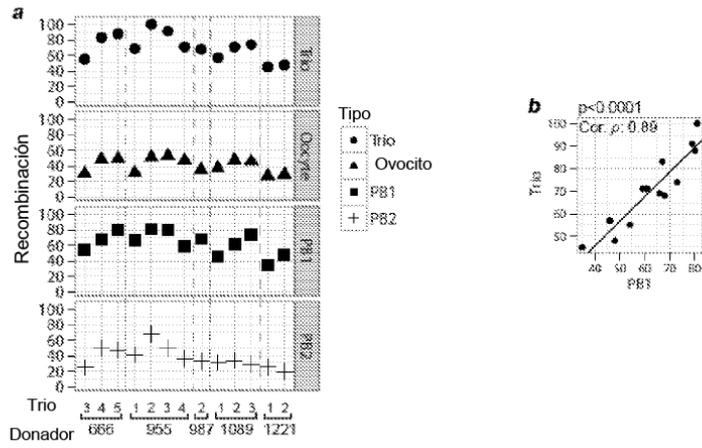


Figura 9

Embrión #	Patrón de heterocigosidad de PB1	Incidencia			Cariotipo del embrión
		1	2	≥3	
2	CH Hetero Homo Pérdida				Euploide
7	CH Hetero Homo Pérdida				+22
8	CH Hetero Homo Pérdida				+9
10	CH Hetero Homo Pérdida				+15
11	CH Hetero Homo Pérdida				+22
12	CH Hetero Homo Pérdida				Euploide
13	CH Hetero Homo Pérdida				-22
14	CH Hetero Homo Pérdida				-19
16	CH Hetero Homo Pérdida				-21