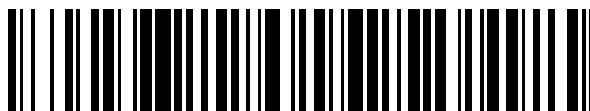


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 224**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/IB2015/050701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15707424 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3099818**

54 Título: **Evaluación de embriones previa a la implantación a través de la detección de ADN embrionario libre**

30 Prioridad:

30.01.2014 US 201461933340 P
10.10.2014 US 201462062182 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2020

73 Titular/es:

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM (50.0%)
Vasvári Pál u. 4
7622 Pécs, HU y
BAY ZOLTÁN ALKALMAZOTT KUTATÁSI
KÖZHASZNÚ NONPROFIT KFT. (50.0%)

72 Inventor/es:

BÓDIS, JÓZSEF;
KOVÁCS, L. GÁBOR;
VERMES, ISTVÁN;
FEKETE, CSABA;
RIDEG, ORSOLYA;
BIHARI, ZOLTÁN ENDRE;
PACH, FERENC PÉTER;
BATÓ, EMESE;
PAPP, ILDIKÓ;
GÁLIK, BENCE y
SZERZŐ, CSABA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 796 224 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 de embriones previa a la implantación a través de la detección de ADN embrionario libre

5 De acuerdo con los datos de GeoHive, hasta septiembre de 2014, el tamaño de la población mundial era de alrededor de 7.200 millones y este número está aumentando (www.geohive.com), la tasa de crecimiento promedio es de alrededor del 1,10% anual.

10 Por el contrario, los países desarrollados muestran tendencias demográficas negativas. A pesar de los llamamientos internacionales para la prevención y el tratamiento adecuado de la infertilidad, esta condición se está volviendo más común en todo el mundo desarrollado. La disminución del estándar de salud general de la población (obesidad, incidencia creciente de enfermedades de transmisión sexual que afectan los órganos reproductivos) puede, al menos parcialmente, ayudar a explicar el aumento de la infertilidad. Además, el aplazamiento de tener el primer hijo también se está volviendo cada vez más común. Juntas, estas consideraciones sociales y de salud significan que el número de casos de infertilidad está aumentando.

15 Desde el primer trabajo innovador sobre fertilización *in vitro* (IVF), la tecnología de reproducción asistida (ART) ha hecho un progreso considerable para superar la infertilidad y baja fertilidad humana (Gnoth et al., 2005; Habbema et al., 2009). Hoy en día, 3-4% del total de nacimientos se conciben mediante procedimientos de reproducción asistida. A pesar de algunos sorprendentes avances teóricos y tecnológicos logrados por ART (Wang y Sauer, 2006), la implementación práctica del concepto de "bebé sano" aún plantea desafíos únicos (Arce et al., 2013). La tasa de éxito del procedimiento es de solo alrededor del 30-34%. Debido a la evidencia de que la transferencia de embriones múltiples aumenta el riesgo de resultados perinatales adversos (Hansen et al., 2005), mejorar la confiabilidad de los embriones competentes en implantación se enfatiza cada vez más en la práctica clínica. Las dificultades encontradas en la selección de los embriones más viables están fuertemente asociadas tanto a la inconsistencia de los resultados obtenidos por diferentes biomarcadores como al conocimiento limitado de los antecedentes multifactoriales del desarrollo embrionario.

20 Es ampliamente aceptado que la muerte celular programada juega un papel importante en la etapa temprana de la embriogénesis, sin embargo, el vínculo entre la apoptosis, el grado de fragmentación del embrión y del ADN aún no se ha dilucidado definitivamente (Fujimoto et al., 2011).

25 En la práctica clínica actual de ART, los embriones se seleccionan para transferencia en gran medida en base a la evaluación morfológica. A pesar de que existe una fuerte correlación entre la morfología del embrión y la tasa de implantación (Vernon et al., 2011), la evaluación visual de la calidad del embrión sigue siendo problemática en términos de (I) número y propiedades interrelacionadas (jerarquía) de las variables de pronóstico; (II) consecuencias desconocidas de los fenotipos dismórficos; (III) observación discontinua de un proceso dinámico; (IV) limitaciones de la microscopía tradicional que extrae datos cuantitativos de imágenes; (V) la variedad de los sistemas de puntuación existentes y también sus sesgos podrían afectar dramáticamente la comparabilidad y confiabilidad de la predicción (Balaban et al., 2011; Machtinger y Racowsky, 2013).

30 Para superar las limitaciones y discrepancias derivadas de la clasificación morfológica, el desarrollo de métodos moleculares alternativos no invasivos son de interés.

35 Los avances metodológicos y la innovación en las técnicas existentes tales como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la PCR en tiempo real y la hibridación genómica comparativa basada en matriz (aCGH) tienen el potencial de hacer una contribución importante a la investigación cualitativa y cuantitativa. Los enfoques basados en secuenciación de próxima generación (NGS) (como secuenciación de escopeta masivamente paralela (MPSS), secuenciación dirigida, secuenciación SNP) brindan una oportunidad excepcional para identificar anomalías estructurales y numéricas de cromosomas completos.

40 Muchas áreas de la biología tienen una larga tradición en la utilización de marcadores moleculares tales como parámetros metabólicos, proteínas secretadas, sin embargo, el descubrimiento histórico del ADN libre de células abrió nuevas herramientas para el diagnóstico molecular no invasivo.

45 El valor de pronóstico del ADN libre de células se ha informado en diversas condiciones de enfermedad (Holdenrieder y Stieber, 2009), y también como parte de las pruebas prenatales no invasivas (NIPT). Sin embargo, la implementación del diagnóstico basado en ADN libre de células sigue siendo un tema de debate, en gran parte debido a la falta de un estándar dorado en la extracción de ADN y en la caracterización de ADN fragmentado. Los artefactos biológicos como la adición de nucleótidos sin plantilla, microvariantes, patrones trialélicos, alelos nulos, abandono alélico podrían conducir a un genotipado incorrecto del individuo.

50 Varias líneas de evidencia sugieren que el perfil genético de los medios de cultivo embrionarios consumidos debería ofrecer una oportunidad excepcional para la evaluación no invasiva de la viabilidad embrionaria (Stigliani et al., 2013).

55

Se ha establecido que las anomalías cromosómicas contribuyen significativamente a las enfermedades genéticas que resultan en pérdida reproductiva, infertilidad, mortinatos, desarrollo sexual anormal. Están presentes en al menos el 50% de los abortos espontáneos, el 6% de los mortinatos, aproximadamente el 5% de las parejas con dos o más abortos espontáneos y aproximadamente el 0,5% de los recién nacidos. En mujeres de 35 años o más, las anomalías cromosómicas se detectan en aproximadamente el 2% de todos los embarazos. Las parejas que participan en los procesos de ART se ven afectadas con mayor frecuencia por anomalías cromosómicas numéricas y/o estructurales conocidas o latentes, y hay un aumento significativo en las aberraciones cromosómicas sexuales y autosómicas nuevas después de ART (Devroey et al., 2004).

Las aneuploidías cromosómicas clínicamente significativas más comunes se definen como un número anormal de cromosomas y pueden involucrar a los cromosomas autosómicos o sexuales. La mayoría de las aneuploidías cromosómicas no son viables, lo que lleva a un aborto espontáneo temprano. Sin embargo, un subconjunto puede sobrevivir hasta el período del recién nacido y más allá, incluida la trisomía 21 (síndrome de Down), la trisomía 18 (síndrome de Edwards) y la trisomía 13 (síndrome de Patau). Juntas, estas ocurren en aproximadamente 1 de cada 450 nacimientos vivos). Cuando se incluyen aneuploidías cromosómicas sexuales, tales como la monosomía X (síndrome de Turner), esto aumenta a aproximadamente 1 de cada 250 nacimientos vivos. En general, la trisomía 21 es la aneuploidía al nacer más frecuente y la causa congénita más frecuente de retraso mental (Gardner et al., 2012). Otras aneuploidías, incluidas las trisomías 13 y 18, se asocian con una morbilidad clínica significativa y una alta tasa de mortalidad neonatal. Por lo tanto, la identificación de estos fetos al principio del embarazo proporcionaría a las madres/padres el tiempo suficiente para considerar las opciones de reproducción. Los desequilibrios cromosómicos numéricos a menudo (no siempre) están relacionados con anomalías cromosómicas estructurales tales como reordenamientos equilibrados (Robertsonianos) y desequilibrados. Los portadores desequilibrados siempre están asociados con anomalías clínicas debido a su desequilibrio genético inherente. Mientras que los pacientes que son portadores equilibrados tienen un riesgo dramáticamente elevado de producir gametos con un número incorrecto de cromosomas.

El primer uso clínico de las pruebas genéticas prenatales a principios de la década de 1990 se aplicó para determinar el sexo fetal usando ensayos basados en PCR específicos para el cromosoma Y (Handyside et al., 1990). La determinación del sexo fetal se ofrece para los portadores con alto riesgo de transmitir un trastorno recesivo relacionado con X (tal como la hemofilia A; B, distrofia muscular de Duchenne o Becker, ceguera al color rojo-verde, etc.) y para portadores de anomalías relacionadas con Y (tal como eliminaciones del AZF, retinitis pigmentosa, daltonismo, síndrome de XYY). En tales casos, la determinación del sexo antes de la implantación brinda la oportunidad de transferir embriones femeninos sanos.

El documento WO2013/116889 describe una discusión teórica sobre el análisis de ácido nucleico fetal libre de células y sugiere que FISH lleve a cabo la detección.

El documento WO2014/116881 describe la determinación de la alteración de la copia genómica a partir de ARN aislado de vesículas presentes en el medio de cultivo de embriones.

Assau et al., (Medical Hypotheses, vol. 83 no. 4, páginas 506-508, 2014) describen que los genes relacionados con Y pueden detectarse en el medio de cultivo de embriones masculinos pero no en embriones femeninos.

El documento WO2014/202696 describe que la amplificación nucleica de ADN libre de células puede usarse para la determinación del sexo, mencionando especialmente los genes TSPY1 relacionados con el cromosoma Y (proteína específica del testículo, isoforma 1 relacionada con Y) y RPS4Y1 (proteína ribosómica S4, isoforma 1 relacionada con Y).

La apoptosis se caracteriza por un conjunto de eventos morfológicos y bioquímicos, entre los cuales ocurre la aparición de la fragmentación de ADN de alto peso molecular y oligonucleosómico.

Para evitar concluir información genética falsa del embrión debido a la mala calidad del ADN fetal libre de células, debe tenerse en cuenta la evaluación de la calidad.

Basado en observaciones en ciencia forense, el análisis de repetición cortas en tándem (STR) proporciona un tecnología capaz para la evaluación de la calidad del ADN degradado. Las repeticiones cortas en tándem (STR), también conocidas como microsatélites, son secuencias de ADN repetidas en tándem generalizadas en todo el genoma humano. El número de repeticiones puede variar de 3 a más de 50 repeticiones con una estructura extremadamente polimórfica, lo que las convierte en marcadores genéticos importantes para las pruebas de identidad humana. Las unidades repetidas tienen una longitud de 2-6 pb y se amplifican fácilmente durante la PCR mediante el uso de cebadores que se unen en regiones conservadas del genoma que flanquean la región repetida. La detección de marcadores múltiples (13-16 marcadores de STR) a la vez proporciona una huella genética de la persona. Los marcadores de STR proporcionan ventajas considerables sobre los métodos utilizados anteriormente para la toma de huellas digitales del ADN, incluida la capacidad de obtener resultados de pequeñas cantidades y muestras de ADN degradadas.

En la actualidad, el estándar de atención para mujeres embarazadas en países desarrollados implica la discusión de las diversas opciones de diagnóstico prenatal, que incluyen la detección no invasiva y los métodos de diagnóstico invasivos. Por lo tanto, todavía existe la necesidad en la técnica de proporcionar una prueba no invasiva y altamente precisa para aumentar las tasas de éxito de ART.

5 La presente descripción tiene como objetivo proporcionar procedimientos precisos y reproducibles para el diagnóstico genético previo a la implantación, analizando ácidos nucleicos libres de células (ADN, ARN, miARN) liberados por el embrión en el medio de cultivo en el tercero (8-10 células) y el quinto (blastocisto) días de incubación. La evaluación de los embriones se habilita mediante la detección del contenido de ADN libre de células del tercer y quinto día consumido por el medio embrionario usando el ensayo de PCR TaqMan dirigido. En realizaciones específicas, la prevalencia del cromosoma Y en el medio consumido por los embriones masculinos se demostró aplicando un análisis genético dirigido al gen DYS14 idéntico al cromosoma Y. De acuerdo con los resultados, el contenido de ácido nucleico libre de células del medio consumido por los embriones proporciona un enfoque novedoso para las pruebas genéticas de no invasivas previas al implante.

15 En otro aspecto, la descripción divulga el empleo de las tecnologías de detección disponibles para identificar las STR, también se puede evaluar el contenido de ácido nucleico libre de células del medio consumido por los embriones. Teniendo en cuenta que la tecnología de detección de las STR permite la detección y tipificación de cantidades bajas y ADN degradado, los resultados de las STR, tales como los electroferogramas, podrían proporcionar información de la calidad de las muestras del medio de cultivo embrionario. En otro aspecto, la aneuploidía del embrión puede evaluarse mediante la aplicación de técnicas de secuenciación del genoma completo. De hecho, es un hallazgo muy sorprendente que tal análisis de los fragmentos de ADN libres de células del medio de cultivo de un embrión de 3 a 5 días de edad proporciona resultados válidos que se correlacionan directamente con la calidad/posterior viabilidad del embrión.

25 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método *in vitro* para la evaluación no invasiva previa a la implantación de un embrión, que comprende

- 30 a) proporcionar una muestra tomada del medio de cultivo *in vitro* del embrión en el tercer día de incubación;
 b) someter la muestra a amplificación de ácido nucleico con cebadores específicos para una secuencia de interés indicativa de una deficiencia genética;
 c) detectar el ácido nucleico amplificado por PCR,

35 en el que la presencia del ácido nucleico amplificado del medio de cultivo sugiere la presencia de la secuencia correspondiente en el embrión cultivado en dicho medio, permitiendo así la evaluación previa a la implantación del embrión con respecto a la secuencia de interés, en el que se evalúa que el embrión tiene una deficiencia genética si se detecta la presencia de la secuencia de interés en el medio de cultivo *in vitro* del embrión.

40 En una realización, la amplificación nucleica es PCR en tiempo real.

En otra realización, la detección incluye detectar marcadores fluorescentes.

45 En una realización adicional, la secuencia de interés es un gen y/o un alelo del mismo y/o una variante del mismo que porta una mutación específica.

En otra realización preferida, el gen está ubicado en el cromosoma Y.

50 En otra realización, se sabe que el gen está implicado en trastornos del desarrollo.

En un aspecto adicional de la invención, el método implica llevar a cabo una secuenciación completa del genoma basada en amplificación lineal, en la que la presencia de aneuploidía es indicativa de que un embrión tiene una probabilidad limitada de resultar en un embarazo exitoso.

55 En una realización preferida, la aneuploidía se evalúa mediante pruebas z.

60 La divulgación de Stigliani et al., (2013) sobre el ADN nuclear y mitocondrial liberado por el embrión en el medio de cultivo puede considerarse como la técnica anterior más cercana. Sin embargo, es claro a partir de los hallazgos presentados en este documento que no se puede establecer una correlación positiva entre la puntuación del embrión y los perfiles de ADN. No hay indicios de que genes específicos o deficiencias genéticas puedan detectarse y/o identificarse basándose en la presencia de ADN libre de células obtenido de los medios de cultivo de embriones.

65 Se cree que los embriones con cromosomas anormales explican una proporción significativa de los ciclos fallidos de IVF. Sin embargo, las tasas de falsos negativos (12-23%) y las tasas de falsos positivos (1,9-5,2%) de los métodos no invasivos tradicionales utilizados actualmente (como ultrasonido y marcadores de suero materno) y procedimientos invasivos (como amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas) son altos (Brynn Levy, 2013). Esto, junto con

el alto riesgo de aborto involuntario de procedimiento después de procedimientos invasivos (1 de cada 300 casos) propone la necesidad de desarrollar nuevos métodos genéticos no invasivos precisos y confiables para la evaluación de la viabilidad de los embriones antes de la transferencia materna.

5 En este estudio usando el ensayo idéntico del gen de beta globina, se probó la prevalencia de ADN libre de células en medio embrionario consumido de 3 días y 5 días. Después de esta verificación, se verificó y confirmó la prevalencia del cromosoma Y en gotitas embrionarias "masculinas" de 3 días y 5 días usando un ensayo idéntico de DYS14. Como prueba adicional de la presente invención, se llevó a cabo la identificación de otros genes/mutaciones autosómicas. Estos ejemplos específicos son los que podrían mostrar un vínculo con ciertas enfermedades genéticas como el gen de fibrosis quística/CFTR o genes/mutaciones que podrían tender a desarrollar cierta enfermedad como el gen de la protrombina, el gen de Leiden (trombosis), el gen 1 de resistencia a múltiples fármacos (mdr1) (resistencia a la terapia). En este estudio se verificó la prevalencia de ciertos genes autosómicos tal como el gen de la protrombina, el gen de Leiden y el gen de mdr1 en el medio embrionario consumido de 3 días y 5 días usando el ensayo de genes idéntico SYBRgreen y el análisis de la curva de fusión.

15 De acuerdo con estos resultados, el perfil genético del contenido de ácido nucleico libre de células (ADN, ARN, miARN) del medio embrionario consumido del 3er y 5to días, podría proporcionar una nueva oportunidad de detección genética previa a la implantación para aumentar las tasas de éxito de ART. Se describe el uso de perfiles de STR para caracterizar el ADN libre de células de los cultivos embrionarios. Aunque la metodología se desarrolló para el análisis forense de muestras de ácido nucleico escasas, su utilidad es cuestionable en muestras de ADN libre de células embrionarias. El estado de la técnica no tiene información al respecto.

20 La presente descripción establece una descripción clara de que la metodología de ensayo forense estándar es aplicable en muestras derivadas de procedimientos de ART estándar. Como se detalla en los ejemplos, los perfiles de STR obtenidos de las muestras de ART son útiles para proporcionar una diferenciación clara entre ADN de buena y mala calidad, por lo tanto, ayudan a decidir si se puede o no intentar una prueba adicional.

25 En un tercer aspecto, la secuenciación completa del genoma puede usarse para analizar el contenido de ADN libre de células de muestras derivadas de medios de cultivo embrionarios. En este aspecto, aunque el ADN libre de células está muy fragmentado y no se puede obtener información genómica completa en el sentido habitual, los presentes inventores descubrieron que las muestras analizadas utilizando los protocolos detallados en el presente documento proporcionan información crucial sobre el estado de la aneuploidía de una muestra. De acuerdo con la evaluación estadística de los datos de NGS de todo el genoma, los embriones que portan aneuploidías letales se pueden filtrar durante el período previo a la implantación.

30 Ambos aspectos de la presente invención son comunes en su capacidad para pronosticar efectivamente si un embrión específico es viable o no, es decir, tiene una buena posibilidad de desarrollo continuo. Es evidente que la presencia de deficiencias genéticas puede tener consecuencias directas sobre el desarrollo posterior y la viabilidad del embrión. En este contexto de la presente invención, el término "deficiencia genética" se define como cualquier modificación en el genoma que resulta en mutaciones que se manifiestan en un fenotipo alterado. Además, un embrión "viable" se define como un embrión que, después de la implantación, se convierte en un feto sano y da como resultado un embarazo exitoso. Cabe señalar que un embrión aún puede ser "viable" si contiene una o más "deficiencias genéticas". Sin embargo, cuando el especialista puede elegir entre embriones con y sin "deficiencia genética", la posibilidad de implantar un embrión "viable" es mayor cuando se selecciona uno sin deficiencia genética.

35 Está claro que ambos aspectos de la presente invención se usan como un método no invasivo para evaluar la viabilidad del embrión, usando muestras simples de medios de cultivo que se eliminan después de implantar los embriones que crecen allí. Los procedimientos en sí mismos son en su mayoría automatizados y pueden llevarse a cabo dentro de períodos de tiempo razonables, lo que permite a los especialistas expertos en técnicas de ART tomar decisiones informadas sobre la selección de los embriones, que brindan la mejor oportunidad para un embarazo exitoso en el caso de cualquier paciente.

Breve descripción de los dibujos

55 A continuación se proporciona un breve resumen de cada una de las figuras:

La Figura 1 muestra un gráfico de la amplificación del gen de la beta globina y del gen DYS14 en medio de cultivo embrionario masculino. Línea 1 (marrón): curva de amplificación positiva del gen beta globina en medio de cultivo embrionario masculino; línea 2 (azul): curva de amplificación positiva del gen DYS14 en medio de cultivo embrionario masculino; línea 3 (rojo): curva de amplificación negativa del gen de beta globina en una muestra de control negativo; línea 4 (verde): curva de amplificación negativa del gen DYS14 en una muestra de control negativa.

60 La Figura 2 muestra un gráfico de amplificación del gen de beta globina y del gen DYS14 en medio de cultivo embrionario femenino. Línea 1 (azul): curva de amplificación positiva del gen de beta globina en medio de cultivo embrionario femenino; línea 2 (rosa): curva de amplificación negativa del gen DYS14 en medio de cultivo embrionario femenino; línea 3 (rojo): curva de amplificación negativa del gen de beta globina en una muestra de control negativa; línea 4 (verde): curva de amplificación negativa del gen DYS14 en una muestra de control negativa.

La Figura 3 muestra un gráfico de amplificación del gen de protrombina, el gen de Leiden y del gen de *mdr1* en medio de cultivo embrionario. Línea 1 (marrón oscuro): curva de amplificación positiva del gen de Leiden en control humano; línea 2 (gris): curva de amplificación positiva del gen de *mdr1* en control humano; línea 3 (marrón dorado): curva de amplificación positiva del gen de protrombina en control humano; línea 4 (rosa): curva de amplificación positiva del gen de *mdr1* en medio de cultivo embrionario; línea 5 (gris claro): curva de amplificación positiva del gen de protrombina en medio de cultivo embrionario; línea 6 (marrón): curva de amplificación positiva del gen de Leiden en medio de cultivo embrionario; línea 7 (morado): control negativo.

La Figura 4 muestra un gráfico del análisis de la curva de fusión del gen de protrombina, el gen de Leiden y el gen de *mdr1*. Línea 1 (marrón oscuro): curva de fusión del gen de Leiden en control humano; línea 2 (marrón claro): curva de fusión del gen de Leiden en medio embrionario consumido; línea 3 (azul): curva de fusión del gen de protrombina en control humano; línea 4 (marrón dorado): curva de fusión del gen de protrombina en medio embrionario consumido; línea 5 (morado): curva de fusión del gen de *mdr1* en control humano; línea 6 (negro): curva de fusión del gen de *mdr1* en medio embrionario consumido; línea 7 (azul claro): curva de fusión de control negativo.

La Figura 5 muestra electroferogramas representativos de perfiles de repetición corta en tándem (STR). Panel A, muestra de control de un voluntario caucásico sano; panel B, electroferograma del embrión del día 3; panel C, electroferograma del embrión del día 5. Los triángulos rojos indican el intervalo de cierto marcador cromosómico; las líneas grises indican los lugares de los alelos ya descritos; las líneas rosa indican los lugares de los alelos hipotéticos. La Figura 6, Panel A muestra la correlación entre el tamaño de los marcadores de STR y la tasa de amplificación; panel B, comparación de tamaño y eficiencia de los loci individuales de STR.

La Figura 7 muestra gráficos de cajas que reflejan la distribución del índice de integridad del ADN total libre de células (DFI) de los embriones del día 3 y del día 5. La línea horizontal dentro de la caja indica la mediana.

La Figura 8 muestra los datos NGS evaluados estadísticamente de los 3 tipos distintivos diferentes de ADN embrionario. Las relaciones de lectura de secuenciación autosómica mapeada de casos de IVF individuales y la media de los autosomas de control están representados por cromosomas. Los paneles marcados con A representan el día 3, mientras que con B corresponden al estado embrionario del día 5. 1: embriones morfológicamente no viables; 2: embriones implantables sin éxito; 3: embriones sucesivamente implantables. Las líneas grises representan los intervalos de confianza del 95% de las voluntarias sanas, las líneas discontinuas se refieren a los umbrales de relación artificial del embarazo exitoso. Los cuadrados negros (3A) y los triángulos (3B) muestran los valores de relación de embriones implantados con éxito, pero luego abortados espontáneamente.

Métodos y materiales

Aprobación ética

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Pécs (número de aprobación: 5273-2/2012/EHK). El consentimiento informado firmado se obtuvo de todos los pacientes que participaron en el estudio. La investigación se ajusta a los principios esbozados en la Declaración de Helsinki.

Procesamiento de ovocitos y sistemas de cultivo de embriones.

El procedimiento de aspiración de folículos fue guiado por el sistema de ultrasonido Sono Ace 6000C (Samsung Medison). Con el fin de reducir el pH potencial, la osmolalidad y los desequilibrios térmicos, se aplicó medio G-MOPS^{MR} precalentado (Vitrolife) para el manejo de los ovocitos en la atmósfera ambiente. La denudación de ovocitos individuales se realizó enzimáticamente en HYASE-10X^{MR} diluido (Vitrolife) de acuerdo con el método de gran volumen recomendado en un manual de la serie G 6.0 (<http://www.vitrolife.com>). El día de la recuperación de ovocitos (Día 0), se realizó una ICSI en ovocitos maduros (metafase II) de acuerdo con los procedimientos de inseminación de rutina de laboratorio (Bódis et al., 2010). Los ovocitos inyectados se cultivaron individualmente en medio secuencial suplementado con albúmina de suero humano (HSA) G-1TMv5 y G-2TMv5 (Vitrolife), optimizado para los procesos de embriogénesis temprana durante los días 1-3 y días 3-5 respectivamente. El cultivo de embriones humanos en microgotitas de medio de IVF se cubrió con aceite mineral y se incubó a 37,0 °C en una atmósfera humidificada de tres gases de 6% de CO₂, 5% de O₂ y 89% de NO₂ utilizando una incubadora de mesa (MINC).

Evaluación de la calidad del embrión y recolección de muestras

Se evaluó la fertilización normal microscópicamente 15 a 20 horas después de la ICSI (día 1) con la aparición de dos pronúcleos, cuerpos polares y la disponibilidad de una vesícula germinal. La clasificación de los embriones tempranos (día 3) se basó en el número real de células (blastómeros), el grado de fragmentación y la uniformidad del tamaño celular específico de la etapa. El día 5, la evaluación morfológica de los blastocistos se calificó de acuerdo con la combinación de desarrollo y grado de la masa celular interna (ICM) y el trofoblasto (TE) de acuerdo con lo recomendado por Alpha Scientists en el taller de consenso de Estambul sobre evaluación embrionaria (Balaban et al., 2011). Las características morfológicas de los embriones se observaron inmediatamente antes de la transferencia programada utilizando un microscopio de contraste de fase invertida Diaphot 300 (Nikon) equipado con software de adquisición y archivo de imágenes (OCTAX EyeWear^{MR} v1.5). Los embriones identificados para la transferencia, ya sea el día 3 o el día 5, dependiendo de la etapa de desarrollo, se retiraron de las gotitas con un volumen mínimo de medio y se separaron para el proceso de implantación. Los individuos con consentimiento fueron sometidos a doble

transferencia de embriones. Se recogieron los 40 µL restantes de medio de cultivo embrionario consumido, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ADN.

Medidas de los resultados

Para determinar las tasas de éxito de los tratamientos con ICSI, el embarazo clínico se confirmó mediante observaciones ultrasónicas del saco de gestación intrauterino. Se identificaron los números de nacimientos vivos/transferencia y el género de los fetos durante y después del nacimiento. A pesar de los procesos de doble implantación de embriones, el 100% de las transferencias observadas resultaron en nacimientos únicos.

Extracción de ADN y cuantificación

Para mejorar la recuperación de ADN total libre de células (ADNtlc) del medio de cultivo embrionario consumido de baja concentración, se usó habitualmente el kit QIAamp Min Elute Virus Spin (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADN purificado final no se diluyó. Opcionalmente, el ADNtlc se puede capturar mediante técnicas de separación de perlas paramagnéticas o de filtración en gel.

Todas las muestras de ADNtlc extraídas se analizaron inicialmente con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific) y/o un fluorómetro Qubit (Life Technologies), y luego se analizaron adicionalmente en un bioanalizador Agilent Technologies 2100 usando un kit de ADN de alta sensibilidad y/o un kit DNA 1000 (Tecnologías Agilent).

Se usaron microgotitas libres de embriones de medios secuenciales (G-1 y G-2) incubadas junto con el cultivo que contenía embriones como control negativo en cada experimento.

Ejemplo 1 - Detección de genes individuales

Selección de muestras

Para evitar las discrepancias en la identificación de género, que surge de la doble transferencia - un solo nacimiento vivo, se analizaron en paralelo gotitas de transferencia a la vez. Los medios de cultivo consumidos se firmaron como el entorno del embrión "masculino" si se detectó el cromosoma Y en ambas gotitas y el género del recién nacido demostró el resultado del análisis genético. Los medios de cultivo consumidos se firmaron como el entorno del embrión "femenino" si el cromosoma Y no se presentaba en gotitas o si el género del recién nacido demostraba el resultado del análisis genético.

De acuerdo con el número de nacimientos vivos, en este estudio retrospectivo, de los 25 medios de cultivo embrionarios consumidos 16 se firmaron como gotitas "masculinas" y 9 se firmaron como gotitas "femeninas". De los 16 medios "masculinos" 11 se recogieron el día 3, 5 el día 5. De los 9 medios "femeninos" 5 se recogieron el día 3, 4 el día 5.

Amplificación por PCR en tiempo real

El ADN de embriones individuales y controles de medios del blanco se amplificaron con el sistema LightCycler 2.0 (Roche Applied Biosystem). Se utilizaron diluciones en serie de diez veces del ADN genómico humano total de control (Roche; Cat. N.:1 691112; 0.2 µg/µL; 10⁴ - 10⁰) como curva estándar de beta globina. Se utilizaron diluciones en serie de diez veces del plásmido DYS14 (10⁸ copias/µL; 10⁸ - 10⁰) como curva estándar del gen DYS14.

La amplificación por PCR se realizó con la mezcla madre LightCycler TaqMan (catálogo No.: 04535286001). Ingredientes: mezcla de PCR TaqMan 5x: 4 µL; H₂O: 9 µL; cebadores directo/inverso (véase la Tabla 1): 0,6 µL (0,3 µM); sonda Taq: 0,8 µL (0,4 µM); plantilla de ADN: 5 µL. El volumen de reacción total fue de 20 µL. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en las siguientes condiciones: etapa inicial de 95 °C durante 10 minutos, 50 °C durante 2 minutos seguido por 50 ciclos de 95 °C durante 15 s, 68 °C durante 1 minuto a 20 °C/s 50x; la reacción se terminó a 40 °C durante 30s.

Los resultados se analizaron mediante el software LightCycler versión 4.05.

Tabla 1. Gen de beta globina, gen DYS14, gen de protrombina, gen de Leiden y cebador del gen de resistencia a múltiples fármacos y secuencias de sonda y números de acceso.

Gen beta de hemoglobina HBB de H. sapiens	(NG_000007)
Cebador directo	5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3'
Cebador inverso	5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'
Sonda TaqMan	5-6FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TMR-3'
Proteína específico de testículo TSPY1H, de H sapiens, isoforma 1 relacionada con Y (DYS14)	NG_027958

(continuación)

Gen beta de hemoglobina HBB de H. sapiens	(NG_000007)
Cebador directo	5'-GGGCCAATGTTGTATCCTTCTC-3'
Cebador inverso	5'-GCCCATCGGTCACCTTACACTTC-3'
Sonda TaqMan	5'-FAM-AGCACCTCTCCACTAGAAAGGCCG-BBQ-3'
Gen de protrombina	NG_M17262
Cebador directo	5'-CCGCTGGTATCAAATGGG-3'
Cebador inverso	5'-CCAGTAGTATTACTGGCTCTTCCTG-3'
Gen de Leiden	NG_M17262
Cebador directo	5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'
Cebador inverso	5'-CTTGAAGGAAATGCCCCATTA-3'
Gen 1 de resistencia a múltiples fármacos	NG_5343
Cebador directo	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3'
Cebador inverso	5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'

Detección del gen de cromosoma Y

- 5 Las personas que participaron en este estudio retrospectivo se sometieron a doble transferencia de embriones, sin embargo, el 100% de las transferencias dieron como resultado un solo nacimiento vivo. Para evitar las discrepancias en la identificación de género, surgiendo de la doble transferencia - un solo nacimiento vivo, las gotitas de transferencia a la vez se analizaron en paralelo.
- 10 Con base en el número de nacimientos vivos totales, de los 25 medios de cultivo embrionarios consumidos 16 se firmaron como gotitas "masculinas" y 9 se firmaron como gotitas "femeninas". De los 16 medios "masculinos" 11 se recogieron el día 3, 5 el día 5. De los 9 medios "femeninos" 5 se recogieron el día 3, 4 el día 5. Cada medio consumido se analizó en busca de genes de beta globina y gen DYS14.
- 15 Se detectó el gen de beta globina en cada muestra usando un valor de corte de Ct 35. El valor de Ct promedio fue 24,1. Ninguno de los controles negativos dio resultado falso positivo. Véase la Figura1.

De las 16 muestras de gotitas "masculinas" (véase la Figura 1), se detectó el gen DYS14 en 11 casos, 6 del día 3, 5 del día 5, usando el valor de corte de Ct 35. El valor de Ct promedio fue 31. Ninguna de las gotitas "femeninas" y los controles negativos dieron resultados falsos positivos. Véase la Figura2.

De las 16 muestras de gotitas "masculinas", se detectó el gen DYS14 en 11 casos, 6 del día 3, 5 del día 5. Con base en los resultados y el resultado del nacimiento en estos casos, se transfirieron gemelos embrionarios de niño. Aunque en 5 casos no se pudo detectar el gen DYS14 en ninguno de los medios probados en paralelo, de acuerdo con los resultados y el resultado del nacimiento, en estos casos se transfirieron gemelos embrionarios de niño o gemelos de niño - niña.

Ninguna de las gotitas "femeninas" dio resultado falso positivo del gen DYS14.

- 30 Detección del gen de mdr1, gen de protrombina y gen de Leiden

Selección de muestras

35 Con base el método de extracción de ADN estandarizado como se describió anteriormente, se procesaron un total de 20 muestras, correspondientes a la etapa de escisión del día 3 (n = 10) y la etapa de blastocisto del día 5 (n = 10), de medios de cultivo embrionarios consumidos. Los medios de incubación libres de embriones tales como G1 (del día 0 al día 3) y G2 (del día 3 al día 5) como controles negativos también se pasaron a lo largo del procedimiento de extracción. El ADNtlc de embriones individuales, los controles de medio de blanco y el ADN genómico humano como control positivo se amplificaron con el sistema LightCycler PCR 2.0. La amplificación por PCR se realizó con LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I. (Catálogo No.: 03515869001).

45 Ingredientes: mezcla de PCR SYBRgreen 5x: 4 µL; H₂O: 9 µL; Cebadores directo/inverso (véase la Tabla 1): 1,0 µL (10x); plantilla de ADN: 5 µL. El volumen de reacción total fue de 20 µL. La PCR cualitativa en tiempo real se realizó en las siguientes condiciones: etapa inicial de 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C durante 10s, 55 °C durante 10 s y 72 °C durante 10s con una velocidad de rampa de 20 °C/s; el análisis de la curva de fusión se realizó a 95 °C durante 0 segundos, 65 °C durante 1 minuto y 95 °C durante 0 segundos con una velocidad de rampa de 0,1 °C/s. Los resultados fueron analizados mediante software LightCycler, versión 4.05.

Resultados

50 Con base en estos resultados, los tres genes probados como: mdr1, protrombina y Leiden se detectaron en cada muestra (Figura 3). Los valores promedio de Ct en las muestras de medio consumido embrionario ocurrieron de la

siguiente manera: 33 para el gen de *mdr1*, 35 para el gen de protrombina y 35 para el gen de Leiden. Los valores promedio de Ct en la muestra de control humano fueron los siguientes: 20 para el gen de *mdr1*, 20 para el gen de Leiden y 22 para el gen de protrombina. Para demostrar la especificidad de la prueba, se realizó un análisis de la curva de fusión (Figura 4) de los genes probados. Estos resultados indican que las temperaturas de fusión detectadas en el ADN de control humano y en las muestras de medio consumido embrionario se corresponden entre sí. Las temperaturas de fusión fueron las siguientes: 88 °C para el gen de *mdr1*, 85 °C para el gen de protrombina y 82 °C para el gen de Leiden.

Ejemplo 2 de referencia: perfil de repetición corta en tándem (STR)

Selección de muestras

Con base en un método de extracción de ADN bien estandarizado, se procesaron un total de 50 muestras, correspondientes a la etapa de escisión del día 3 (n = 24) y la etapa de blastocisto del día 5 (n = 26), de medios de cultivo embrionarios consumidos.

Amplificación por PCR multiplex

La amplificación por PCR multiplex del conjunto estándar europeo (EES) de 15 loci de STR y tecnología de coloración fluorescente en la detección y análisis automatizados del perfil de ADN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con una modificación menor. Brevemente: con base en la cuantificación del contenido de ADNtlc de los medios de cultivo, las cantidades totales de ADN de plantilla se establecieron en el intervalo de 0,2-0,5 ng para cada reacción PCR en un volumen final reducido de 12,5 µL. De lo contrario, se aplicó el protocolo estándar de ciclos de PCR en un termociclador T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) Siguiendo las pautas del kit Investigator ESSplex (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con lo recomendado por el fabricante.

Electroforesis capilar

Las muestras de STR amplificadas con ESSplex se prepararon para la electroforesis combinando formamida altamente desionizada, estándar de tamaño GeneScan^{MR} 500 LIZ^{MR} (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) con 1,5 µL de producto amplificado. Después de la desnaturalización (95 °C durante 3 min) y el enfriamiento rápido (3 min), las muestras preparadas se inyectaron secuencialmente en un analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems) usando polímero POP-4 y capilar de 47 cm a 15 kV durante 10 segundos. Los datos sin procesar recopilados se almacenaron como archivos .fsa y se analizaron utilizando el software GeneMapper ID versión 3.2 con un umbral de amplitud máxima de 100 RFU y la configuración predeterminada del filtro de perturbación del 20%.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos tales como el coeficiente de correlación de Pearson (r), el coeficiente de correlación tau-b de Kendall (τ), los cálculos de R cuadrado (R²) y de probabilidad (valor p) se realizaron utilizando estadística SPSS de IBM para Windows, versión 20.0 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.). La fuerza de las correlaciones se evaluó en consecuencia: correlación nula o débil (0 < r < ± 0,3); correlación moderada (± 0,3 < r < ± 0,7); y correlación fuerte (r > ± 0,7). Los datos se consideraron estadísticamente significativos con un valor p < 0,05.

Resultados

Detección y cuantificación de ADNtlc de medios de cultivo embrionarios consumidos

Se procesaron un total de 50 muestras, correspondientes a la etapa de escisión del día 3 (n = 24) y la etapa de blastocisto del día 5 (n = 26), se procesaron los medios de cultivo de embriones consumidos. Independientemente de la duración del tiempo de incubación del embrión y de la evaluación real de la morfología del embrión (Tabla 2), cada muestra reveló una cantidad medible de ADNtlc que varía de 44,1 a 253,6 ng/µL (promedio 68,75 ng/µL).

Tabla 2. Evaluación morfológica de los embriones del día 3 y día 5.

Propiedades del embrión Muestra ID	Días	FR	DE	ICM	TE
188/3, 416/7, 416/6, 121/4, 412/3, 184/1, 376/2, 138/5, 113/3, 251/3, 201/2, 474/8, 412/1, 430/3, 26/4	3	1 (buena)			
230/3, 416/8, 192/4, 236/2, 245/2, 379/1, 229/1, 431/3	3	2 (regular)			
364/3	3	3 (pobre)			

(continuación)

Propiedades del embrión Muestra ID	Días	FR	DE	ICM	TE
41/2, 33/1, 33/2, 38/2, 31/1, 41/3, 23/1, 37/2, 31/2	5		1 (temprana)	2 (regular)	1 (regular)
23/2	5		1 (temprana)	1 (buena)	2 (regular)
41/1	5		1 (temprana)	2 (regular)	3 (pobre)
31/3	5		1 (temprana)	3 pobre	3 (pobre)
38/1, 19/1, 19/2	5		2 (blast.)	1 (buena)	1 (buena)
22/1, 46/1	5		2 (blast.)	2 (regular)	1 (buena)
34/1, 47/1, 29/2, 67/2, 58/1, 29/3	5		2 (blast.)	2 (regular)	2 (regular)
46/2	5		2 (blast.)	3 (pobre)	2 (regular)
37/1	5		2 (blast.)	1 (buena)	3 (pobre)
47/2	5		2 (blast.)	2 (regular)	3 (pobre)

5 Para mejorar la precisión de la medición de las lecturas de NanoDrop y estimar la distribución del tamaño de ADNtlc, las muestras se volvieron a analizar en una plataforma Agilent Bioanalyzer basada en microfluidos, y se visualizaron mediante imágenes de pseudo-gel así como en electroforesis en gel tradicional. En general, los datos resultantes indicaron claramente que la medición de absorbancia UV a 260 nm tiende a sobreestimar masivamente (aproximadamente diez veces) la prevalencia de ADNtlc. Sin embargo, la comparación por pares de las concentraciones de ADNtlc reveló una buena concordancia entre las dos técnicas (t de Kendall fue 0,895, p = 0,000).
10 Con base en los niveles clarificados de ADNtlc, se encontró una relación lineal estadísticamente significativa (p = 0,038) (r = 0,410) entre los días de incubación (día 3 y día 5 después de ICSI) y las cantidades de ADNtlc recuperadas de los medios de cultivo embrionarios consumidos.

Ejemplo 3 de referencia: perfil de STR del ADNtlc recuperado de los medios de cultivo embrionarios consumidos

15 Con base en el kit comercial de calidad controlada (véase la sección de Materiales y métodos) se evaluó la amplificación por PCR múltiplex de 15 STR individuales, localizados en 13 autosomas diferentes. El nombre del locus, la ubicación cromosómica, el motivo de repetición del alelo de referencia, el tamaño promedio de los productos amplificados (pb) y la proporción (%) de amplificaciones de PCR positivas se resumen en la Tabla 3.

20 Tabla 3. Información específica del lugar para los marcadores de STR.

Locus	Ubicación	Motivo repetido	tamaño (pb)	% de eficiencia
D1S1656	1q42	[TAGA] ₁₆ [TGA] [TAGA] [TAGG] ₁ [TG] ₅	180,684	78,72
D2S441	2p14	[TCTA] ₁₂	100,043	72,34
D2S1338	2q35	[TGCC] ₆ [TTCC] ₁₁	409,632	59,57
D3S1358	3p25.3	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	177,938	78,72
D8S1179	8q23.1-23.2	[TCTA] ₁₂	312,081	57,44
D10S1248	10q26.3	[GGAA] ₁₃	109,965	78,72
D12S391	12p13.2	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇ [AGAC] ₆ AGAT	251,384	80,85
D16S539	16q24.1	[GATA] ₁₁	114,356	76,59
D18S51	18q21.3	[AGAA] ₁₃	173,022	78,72
D19S433	19q12	AAGG [AAAG] AAGG	253,693	82,9
D21S11	21q21.1	TAGG [AAGG] ₁₁	351,940	48,93
D22S1045	22q12.3	[ATT] ₁₄ ACT [ATT] ₂	174,056	80,85
FGA	4q28.2	[TTTC] ₃ TTTTCT	329,685	65,95
TH01	11p15.5	[CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	95,088	78,72
vWA	12p13.31	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	267,865	78,72

Para obtener información valiosa sobre la precisión y las características de los perfiles de ADNtlc, también se tuvieron en cuenta factores adicionales tales como el tamaño y la complejidad de los motivos de repetición del núcleo, la tasa de mutación de los loci y la longitud de los amplicones, que pueden afectar la eficiencia de amplificación de los STR. Todos menos uno de los 15 marcadores de STR empleados en el presente estudio fueron tetranucleótidos con estructuras de repetición principalmente simples o compuestas (Tabla 3). Las tasas de mutación del locus individual varían entre 0,01% y 0,22% (NIST, STRBase; <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>), sin embargo, todas ellas pertenecen al grupo de loci de bajas tasas de mutación (<0,3%). Para evaluar el rendimiento general de la amplificación y las posibles fluctuaciones estocásticas en los procedimientos de tipificación, se analizó el producto de PCR con plantilla de ADN purificada de voluntarios caucásicos sanos como controles positivos. La huella digital de STR generada a partir de las muestras de control positivo reveló perfiles completos y todos los alelos eran claramente visibles por encima del umbral de llamada (100 RFU) (Figura 5A). Estos resultados demostraron que, ciertos factores del rasgo de loci de STR autosómicos, es decir, clases de repetición (tri o tetranucleótido), complejidad de los motivos de repetición del núcleo (simple, compuesto o complejo) y diferencias en la tasa de mutación de los loci si esta es inferior al 0,3% no parece tener un fuerte efecto primario sobre la efectividad de la creación de perfiles de STR cuando hay cantidades ilimitadas de plantillas de ADN de alta calidad disponibles.

Después de la validación del método y los procedimientos de control de calidad, se analizaron cincuenta medios de cultivo de embriones consumidos mediante el ensayo de STR múltiplex. La mayoría de estas muestras no habían logrado generar un perfil completo utilizando condiciones de PCR estándar. De 50 muestras recuperadas de ADNtlc, 32 revelaron perfiles de STR parciales, 15 completos, mientras que las tres muestras restantes no proporcionaron resultados apreciables. Las micrografías representativas de los embriones del día 3 (etapa de escisión) y del día 5 (etapa de blastocisto) con sus electroferogramas generados a partir de los medios de cultivo embrionarios consumidos correspondientes se muestran en las Figuras 5B y 5C.

Con el fin de proporcionar una visión detallada y completa de la huella digital de STR de los medios de cultivo de embriones consumidos individuales, se calcularon los tamaños de los amplicones específicos de locus frente a la eficacia de la amplificación. En línea con las expectativas teóricas, se detectó una correlación negativa entre la longitud de los amplicones y su eficiencia de amplificación (correlación de Pearson: $r = -0,683$, valor de regresión $R^2 = 0,467$, significativa a nivel de $p = 0,01$) (Figura 6A). Los datos colectivos indicaron que los amplicones más cortos eran menos sensibles a la degradación y las pérdidas de señal para productos de PCR de mayor tamaño eran más características. Sin embargo, también es interesante observar que algunos loci, por ejemplo, D21S11, D8S1179, D2S441 y D2S1338 residen en las ubicaciones de los cromosomas 21q21.1, 8q23.1-23.22q35, 2q35 y 2p14 respectivamente, revelaron una mayor distancia (desviación) desde el punto de datos hasta la línea de tendencia, lo que infiere que el tamaño de los loci no podría explicar toda la variación en el éxito de la amplificación (Figura 6B).

Aunque varias líneas de evidencia han corroborado un vínculo entre los grados de fragmentación citoplásmica y la competencia de desarrollo de los embriones humanos previos a la implantación, poco se sabe acerca de si la degradación del ADNtlc está relacionada con parámetros embrionarios específicos y/o su potencial de implantación. Para investigar la capacidad predictiva del perfil de ADNtlc, se calificó la primera aparición morfológica de fragmentación celular de acuerdo con un esquema de calificación de tres categorías (buena <10%, regular 10-25%, pobre > 25%), (Tabla 2), y luego se estimó cualitativamente el daño del ADNtlc mediante genotipificación de STR no invasiva. En general, se acepta que la calidad de la plantilla de ADN juega un papel importante en el abandono alélico, lo que permite determinar la degradación del ADNtlc en lugar de simplemente enfocarse en la cantidad de ADNtlc presente en las muestras. El grado de degradación del ADNtlc se expresó en términos del índice de fragmentación del ADN (DFI), que es la proporción del número de loci "silenciosos" que puede ser potencialmente amplificable mediante PCR múltiplex. Sorprendentemente, el coeficiente de correlación calculado (r de Pearson = 0,145) entre las tasas de fragmentación de los embriones del día 3 y el índice de fragmentación de ADNtlc de los medios de cultivo embrionarios consumidos correspondientes no respaldaba la hipótesis de investigación de que los dos parámetros son directamente proporcionales. Del mismo modo, no se encontró correlación entre el DFI de los embriones del día 3 y el resultado del embarazo, sin embargo, el grado de fragmentación citoplásmica se correlacionó inversamente con la prevalencia de nacimientos vivos ($r = -0,205$), aunque sin alcanzar significación estadística. A pesar de que el DFI no se correlacionó significativamente con la clasificación de las características morfológicas individuales, tales como la formación de masa celular interna (ICM) y trofotodermo (TE) del blastocisto, se observaron diferencias claras entre la mediana de fragmentación de ADNtlc de embriones del día 3 y día 5 (Figura 7).

Los marcadores de STR proporcionan ventajas considerables sobre los métodos utilizados previamente para la toma de huellas digitales de ADN, incluida la capacidad de obtener resultados de pequeñas cantidades y muestras de ADN degradadas. De acuerdo con las expectativas teóricas, la tasa de éxito promedio de la amplificación de STR fue del 94,1% (47 electroferogramas evaluables del producto de PCR de 50 muestras).

La generación de alta frecuencia de perfiles de STR exitosos demostró claramente que el ADNtlc extraído cumple con los estándares deseados de cantidad y calidad para el ensayo de STR múltiplex y puede usarse para la secuenciación del genoma completo.

los datos enfatizan la creencia de que la introducción de ensayos de fragmentación de ADNtlc a la metodología no invasiva de ART puede ayudar a mejorar los métodos actuales de selección de embriones.

Ejemplo 4: secuenciación completa del genoma para detectar aneuploidía
 Detección de aneuploidía de NGS de todo el genoma

Materiales y métodos del laboratorio experimental

Antes de la amplificación del genoma completo, se determinó la concentración de ADNtlc usando el kit de ensayo Qubit ADNbc HS con el fluorómetro Qubit 2.0 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Los cebadores 5N3T y 5N3G que constan de ocho nucleótidos de secuencia aleatoria y una etiqueta común de 27 nt se hibridaron hasta 11 ng de ADN plantilla y se extendieron mediante una polimerasa en una reacción de desplazamiento de cadena isotérmica de 30 µL en tubos de PCR de 0,2 mL (ABGene) en un termociclador Veriti 96 (Life Technologies) de la siguiente manera:

Tabla 4. Preparación de la mezcla maestra de amplificación lineal.

Componente	Volumen
Tampón Bst 10x (NEB)	3 µL
Cebador 5N3T 3,2 µM (IDT)	3 µL
5'-GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNTTT-3'	
Cebador 5N3T 2,5 µM (IDT)	3 µL
5'-GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNGGG-3'	
Mezcla de dNTP 25 mM (Fermentas)	3 µL
Agua grado biología molecular AccuGene (Lonza)	18-x µL
Plantilla de ADN	x µL
Total	30 µL

Los tubos se incuban a 94 °C durante 3 minutos, luego se enfrían inmediatamente en hielo durante 1 minuto.

Tabla 5. Preparación de la mezcla de enzimas polimerasa.

Componente	Volumen
Fragmento largo de polimerasa Bst 8U/µL (NEB)	0,31 µL
Tampón de reacción Bst 10x (NEB)	0,029 µL
Agua grado biología molecular AccuGene (Lonza)	0,261 µL
Total	0,6 µL

Luego se agregan 0,6 µL de la mezcla de polimerasa en cada tubo de PCR y se aplican las siguientes etapas de temperatura: 45 s a 10 °C, 45 s a 20 °C, 45 s a 30 °C, 45 s a 40 °C, 45 s a 50 °C, 2 min a 65 °C y 20 s a 95 °C. Los tubos se enfrían rápidamente en hielo durante 1 minuto seguido de la adición de la misma cantidad de polimerasa. Después de cinco ciclos de amplificación lineal utilizando las etapas de temperatura 45 s a 10 °C, 45 s a 20 °C, 45 s a 30 °C, 45 s a 40 °C, 45 s a 50 °C, 3 min a 62 °C, 20 s a 95 °C y 20 s a 58 °C, el ADN resultante se amplificó aún más por PCR estándar de alta fidelidad a un nivel suficiente para la secuenciación de próxima generación.

Tabla 6. Preparación de la mezcla maestra de amplificación estándar.

Componente	Volumen
Producto de amplificación lineal	30 µL
Tampón de reacción Phusion 5x (Thermo Scientific)	10 µL
ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (Thermo Scientific)	0,5 µL
Mezcla de dNTP 10 mM (Fermentas)	1 µL
Cebador BioGAT 9,9 µM (IDT)	3,3 µL
5'-Biotina-GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG-3'	

ES 2 796 224 T3

Componente	Volumen
Agua grado biología molecular AccuGene (Lonza)	5,2 µL
Total	50 µL

Para la PCR estándar, se usó el siguiente programa: 30 s a 98 °C; 18 ciclos de 15 s a 98 °C, 20 s a 59 °C y 1 min a 72 °C; y 1 min a 72 °C.

- 5 La concentración del producto se determinó usando el kit de ensayo Qubit ADNbc HS, y 100 ng del producto de ADN bicatenario se fragmentaron usando el kit de fragmentación de ADN NEBNext Fast y de preparación de bibliotecas (NEB) de la siguiente manera:

Tabla 7. Preparación de la mezcla maestra de fragmentación de ADN.

Componente	Volumen
100 ng del producto de ADNbc	x µL
Agua grado biología molecular AccuGene (Lonza)	17,25-x µL
Tampón de reacción de fragmentación (NEB)	2 µL
Mezcla maestra de fragmentación (NEB)	0,75 µL
Total	20 µL

- 10 Después de mezclar por pipeteo, los tubos de PCR se incuban durante 5 minutos a 25 °C y luego durante 10 minutos a 70 °C. Los fragmentos biotinilados se eliminan usando perlas de enriquecimiento Ion PGM (Dynabeads MyOne Streptavidin C-1, Life Technologies) de acuerdo con el siguiente protocolo. Las perlas magnéticas se agitan mediante vórtice durante 10 s, luego se agrega su volumen adecuado a un nuevo tubo LoBind de 1,5 mL (Eppendorf) que
 15 contiene diez volúmenes de solución de lavado de perlas MyOne. Después de pipetear la solución 10 veces hacia arriba y hacia abajo, los tubos se colocan en un imán DynaMag-2 durante 2 minutos, luego el sobrenadante se retira y se desecha. Se agrega solución de lavado de diez volúmenes nuevamente y las perlas se resuspenden por pipeteo. Se transfieren 2 µL de la suspensión preparada a cada muestra en tubos LoBind, que se agitan a 800 rpm durante 30 minutos. Los tubos se colocan en un imán DynaMag-2 durante 2 minutos y el sobrenadante se usa para el siguiente
 20 procedimiento de ligadura del adaptador.

Tabla 8. Preparación de la mezcla maestra de ligadura.

Componente	Volumen
Tampón de ADN Ligasa T4 (NEB)	4 µL
ADN polimerasa Bst (NEB)	1 µL
Adaptador P1 1,4 µM (KAPA)	4 µL
Adaptador con código de barras 1,4 µM (KAPA)	4 µL
ADN ligasa T4 (NEB)	4 µL
Agua grado biología molecular AccuGene (Lonza)	3 µL
ADN plantilla	20 µL
Total	40 µL

- 25 Las mezclas de reacción se pipetea hacia arriba y hacia abajo 5 veces, se transfieren a tubos de PCR, que se incuban durante 15 minutos a 25 °C y luego durante 5 minutos a 65 °C. Después de la adición de 5 µL de tampón de parada, con agitación de vórtice durante 10 s y centrifugación por pulsos, los volúmenes de reacción se complementan con 55 µL de agua AccuGene.

- 30 El kit AgenCourt AMPure XP (Beckman Coulter) se aplica para seleccionar por tamaño el ADN fragmentado y ligado al adaptador con dos rondas de unión a las perlas paramagnéticas seguido por lavado y elución. La primera ronda elimina selectivamente el ADN > 500 pb mediante las perlas AMPure XP, mientras que la segunda ronda elimina el ADN <200 pb del sobrenadante.

- 35 Se agregan a la muestra 130 µL de reactivo AMPure diluido, que consiste en 20 µL de perlas AMPure y 110 µL de NaCl 1,8 M - PEG 6000 al 15,6% (Sigma-Aldrich), se pipetea 5 veces hacia arriba y hacia abajo para mezclar completamente la suspensión de perlas con el ADN, luego se pulsa por giro y se incuban a temperatura ambiente

5 durante 5 minutos. Se centrifuga por pulsos y se coloca el tubo de muestra en un gradilla magnética DynaMag-2 durante 5 minutos. Cuidadosamente se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo LoBind de 1,5 mL y se agregan 20 μ L de perlas de reactivo AgenCourt AMPure XP en la segunda ronda. Se pipetea hacia arriba y hacia abajo 5 veces para mezclar completamente la suspensión de perlas con el ADN, luego se centrifuga por pulsos y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifuga por pulsos y se coloca el tubo de la muestra en la gradilla magnética durante 5 minutos o hasta que la solución se aclare. Se retira y desecha el sobrenadante sin perturbar el sedimento de perlas. Sin quitar el tubo del imán, dispensar 200 μ L de etanol al 80% recién preparado a la muestra. Se incuba durante 30 segundos, girando el tubo cuatro veces en el imán para mover las perlas. Después de que la solución se aclara, se retira y desecha el sobrenadante sin alterar el sedimento, y se repite esta etapa para un segundo lavado. Para eliminar el etanol residual, se centrifuga el tubo (10 s, 6000 rpm), se vuelve a colocar en la gradilla magnética y se retira con cuidado cualquier sobrenadante restante con una pipeta de 20 μ L sin alterar el sedimento. Se mantiene el tubo sobre el imán, se secan al aire las perlas a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se retira el tubo del imán y se agregan 46 μ L de agua AccuGene a la muestra. Se pipetea la mezcla hacia arriba y hacia abajo 5 veces, se coloca el tubo en la gradilla magnética durante 2 minutos. Después de que la solución se aclara, se transfiere el sobrenadante que contiene el ADN eluido a un nuevo tubo de PCR de 0,2 mL sin alterar el sedimento.

Tabla 9. Preparación de la mezcla maestra de amplificación de biblioteca.

Componente	Volumen
ADN, seleccionado por tamaño, ligado al adaptador	46 μ L
Mezcla de cebador Ion Torrent (NEB)	4 μ L
Mezcla maestra de PCR 2X de alta fidelidad NEBNext (NEB)	50 μ L
Total	100 μ L

20 Después de pipetear la mezcla 5 veces hacia arriba y hacia abajo, se usó el siguiente programa de PCR: 30 s a 98 °C; 8 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 58 °C y 30 s a 72 °C; y 5 min a 72 °C.

25 Los cebadores se eliminan usando 20 μ L de reactivo AgenCourt AMPure XP diluido con 130 μ L de NaCl 1,8 M - PEG 6000 al 15,6% en una configuración de una sola ronda. Después de lavar con etanol al 80% dos veces, el ADN de la biblioteca se eluyó con 20 μ L de agua AccuGene.

30 Las bibliotecas preparadas se calificaron y cuantificaron con Bioanalyzer 2100 (Agilent). Después de la PCR en emulsión y el enriquecimiento del objetivo (kit Ion PGM Template OT2 200), se realizó una secuenciación unidireccional de la biblioteca agrupada con aproximadamente una cobertura de lectura de 0,01x en un sistema Ion Torrent PGM usando el Kit Ion 318 Chip v2 y el Kit de secuenciación 200 Ion PGM v2 de acuerdo con el protocolo de Life Technologies.

Proceso de análisis de aneuploidía: métodos bioinformáticos y estadísticos

35 Durante el procesamiento de la secuencia, la primera etapa es el filtrado de los datos de secuencia sin procesar con base en la puntuación de calidad promedio (Q). El valor Q se calcula mediante el sistema de puntuación de calidad de Ion PGM que utiliza un conjunto de predictores cuyos valores están correlacionados con la probabilidad de una llamada errónea de base. La segunda etapa es el recorte, en la que se eliminan las secuencias de cebador (que se usan en la preparación de la biblioteca). Después del recorte, el programa de mapeo Bowtie2 (con la transformación de Burrows-Wheeler) se aplica a las lecturas de mapa para el genoma de referencia humano (hg19). Bowtie2 es una herramienta rápida y eficiente de memoria para alinear lecturas de secuenciación cortas con secuencias de referencia largas.

45 Después de la etapa de mapeo, los números de lectura absoluta de los cromosomas somáticos se usan para calcular los valores de porcentaje de lectura, que se normalizan a la longitud nominal del cromosoma dado. Por lo tanto, cuanto más grandes sean los autosomas, mayores serán los números de lectura correspondientes. Primero, el porcentaje de lectura de referencia (línea base) debe construirse con base en las muestras de ADN aisladas de sangre periférica de voluntarios sanos. Los valores reales de la relación cromosómica se conocen como los valores del porcentaje de lectura normalizado del caso de IVF dividido por el porcentaje de lectura de referencia.

50 Las estadísticas descriptivas principales (media y desviación estándar) de las relaciones cromosómicas se usan para calcular los valores de puntuación z. La participación de los valores de la puntuación z asegura la aplicación de pruebas estadísticas (prueba z) para la comparación exacta de diferentes casos (por ejemplo, caso de prueba versus línea base). Además, estandariza las relaciones cromosómicas en la misma escala, por lo tanto, la comparación visual de los casos de prueba y control también es muy efectiva (por ejemplo, un diagrama adicional de puntuación z). Para la evaluación estadística y los gráficos, se utilizó el entorno estadístico R.

55 Resultados

El método de detección de aneuploidía se ha validado en muestras procedentes de hombres, mujeres, sanos, individuos con síndromes de Down y Klinefelter⁵, y de líneas celulares cariotipadas REH2 pseudodiploides y MHH-CALL2 hiperdiploides. Estos resultados revelan no solo el sesgo de amplificación reducido como resultado de la amplificación lineal, sino la distribución equitativa de las lecturas secuenciadas en todo el genoma.

De acuerdo con estos hallazgos, las relaciones cromosómicas de cada embarazo exitoso están entre 0,7 y 1,35. Curiosamente, todos los embriones morfológicamente no viables probados se encuentran entre estos umbrales artificiales, sin embargo, se pudo detectar eventos de aneuploidía significativos en embriones implantables con éxito o sin éxito de 3 y 5 días (véase la Figura 8; Relaciones > 1,35). Ambos embarazos comenzaron a partir de embriones que tenían relaciones cromosómicas superiores a 1,35 y condujeron al aborto espontáneo. Todos los puntos que se encuentran fuera de este umbral corresponden a embriones no viables, implantables o abortados sin éxito.

Se puede concluir que el método de detección de aneuploidía basado en NGS evaluado mediante pruebas z estadísticas parece pronosticar eficientemente las aneuploidías genéticas letales, y en línea con esto, el rendimiento de los nacimientos vivos de IVF probablemente se puede aumentar más adelante, sin embargo, otros factores también pueden desempeñar un papel importante en la tasa de éxito del proceso de implantación mismo.

Referencias

- Arce JC, Nyboe Andersen A, Collins J. Resolving methodological and clinical issues in the design of efficacy trials in assisted reproductive technologies: a mini-review. *Human Reproduction* 2005; 20: 1757-1771.
- Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D, Hardarson T, Lundin K, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 2011; 26(6): 1270-1283.
- Bódis J, Várnagy A, Sulyok E, Kovács GL, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Negative association of L-arginine methylation products with oocyte numbers. *Human Reproduction* 2010; 25(12): 3095-3100.
- Devroey P, VanSterteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Human Reproduction Update* 2004; 10: 19-28.
- Fujimoto VY, Browne RW, Bloom MS, Sakkas D, Alikani M. Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertility and Sterility* 2011; 95: 1197-1204.
- Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction* 2005; 20(5): 1144-1147.
- Habbema JD, Eijkemans MJ, Nargund G, Beets G, Leridon H, Te Velde ER. The effect of *in vitro* fertilization on birth rates in western countries. *Human Reproduction* 2009; 24(6): 1414-1419.
- Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA. *Nature* 1990; 344: 768-770.
- Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects - a systematic review. *Human Reproduction* 2005; 20(2): 328-338.
- Holdenrieder S, Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2009; 46(1): 1-24.
- Levy B, Norwitz E. Non-invasive prenatal aneuploidy testing: technologies and clinical implication. *MLO Med Lab Obs* 2013; 45 (6): 8, 10, 12.
- Machtinger R, Racowsky C. Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive BioMedicine Online* 2013; 26(3): 210-221.
- Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction* 2013; 28(10): 2652-2660.
- Vernon M, Stern JE, Ball GD, Winger D, Mayer J, Racowsky C. Utility of the national embryo morphology data collection by the Society for Assisted Reproductive Technologies (SART): correlation between day-3 morphology grade and live-birth outcome. *Fertility and Sterility* 2011; 95: 2761-2763.
- Wang J, Sauer MV. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2006; 2(4): 355-364.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la evaluación no invasiva previa a la implantación de un embrión, que comprende
- 5 a) proporcionar una muestra tomada del medio de cultivo *in vitro* del embrión en el tercer día de incubación;
b) someter la muestra a amplificación de ácido nucleico con cebadores específicos para una secuencia de interés indicativa de una deficiencia genética;
c) detectar el ácido nucleico amplificado por PCR,
- 10 en el que la presencia del ácido nucleico amplificado del medio de cultivo sugiere la presencia de la secuencia correspondiente en el embrión cultivado en dicho medio, permitiendo así la evaluación previa a la implantación del embrión con respecto a la secuencia de interés, y
en el que se evalúa que el embrión tiene una deficiencia genética si se detecta la presencia de la secuencia de interés en el medio de cultivo *in vitro* del embrión.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la PCR es PCR en tiempo real.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la detección incluye detectar marcadores fluorescentes.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de interés es un gen y/o un alelo del mismo y/o una variante del mismo que porta una mutación específica.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el gen está ubicado en el cromosoma Y.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que se sabe que el gen está implicado en trastornos del desarrollo.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el método implica además llevar a cabo una secuenciación del genoma completo basada en amplificación lineal, en el que la presencia de aneuploidía es indicativa de que un embrión tiene una probabilidad limitada de resultar en un embarazo exitoso.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la aneuploidía se evalúa mediante pruebas z.

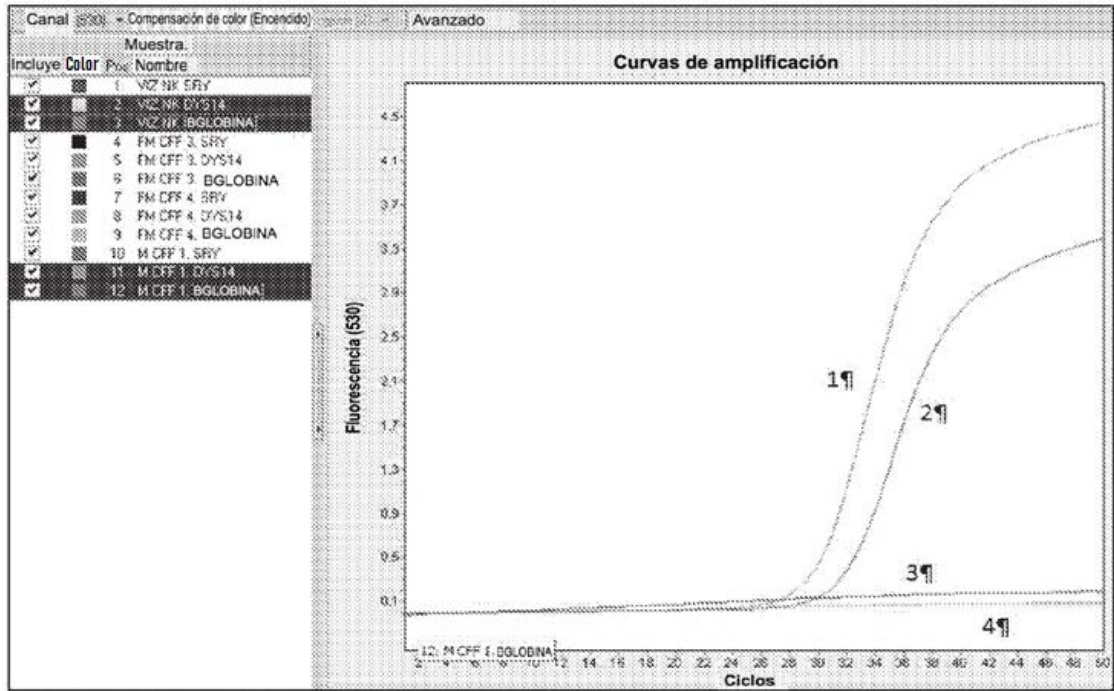


Fig. 1

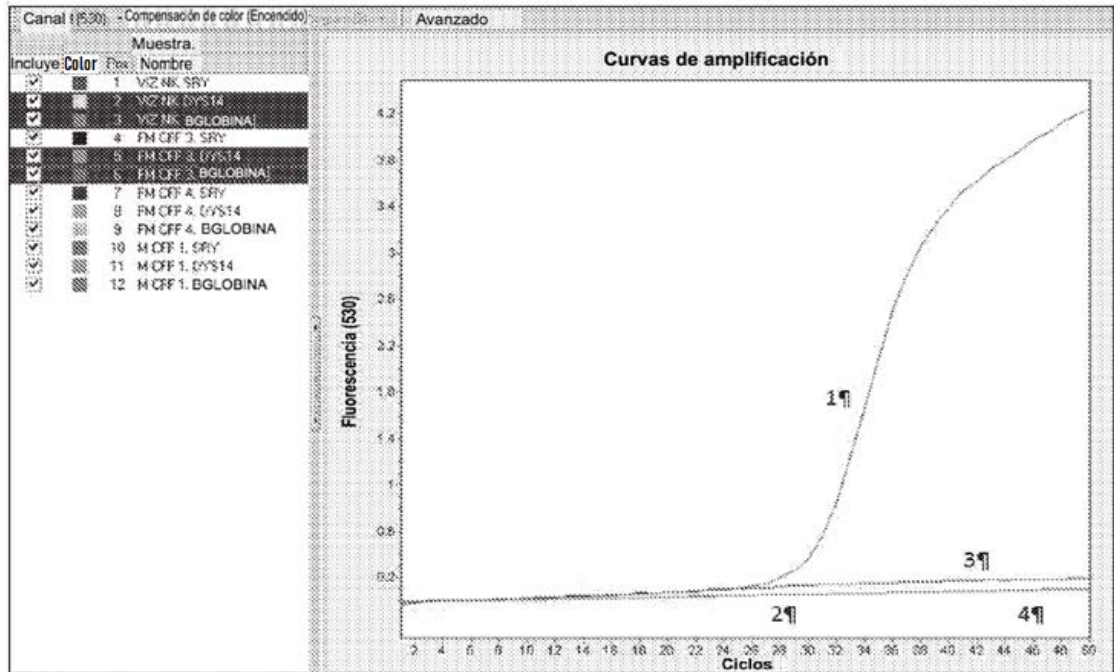


Fig. 2

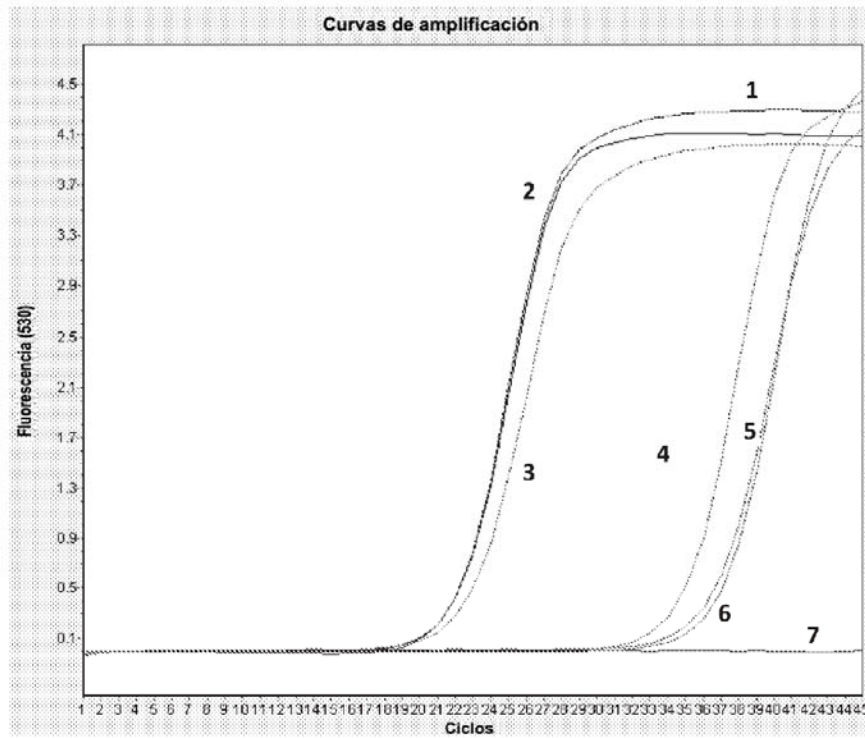


Fig3.

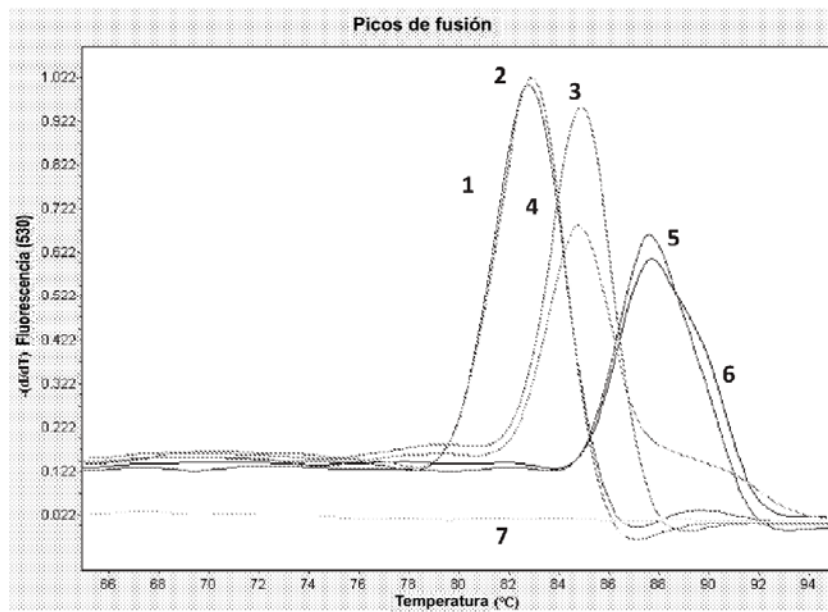
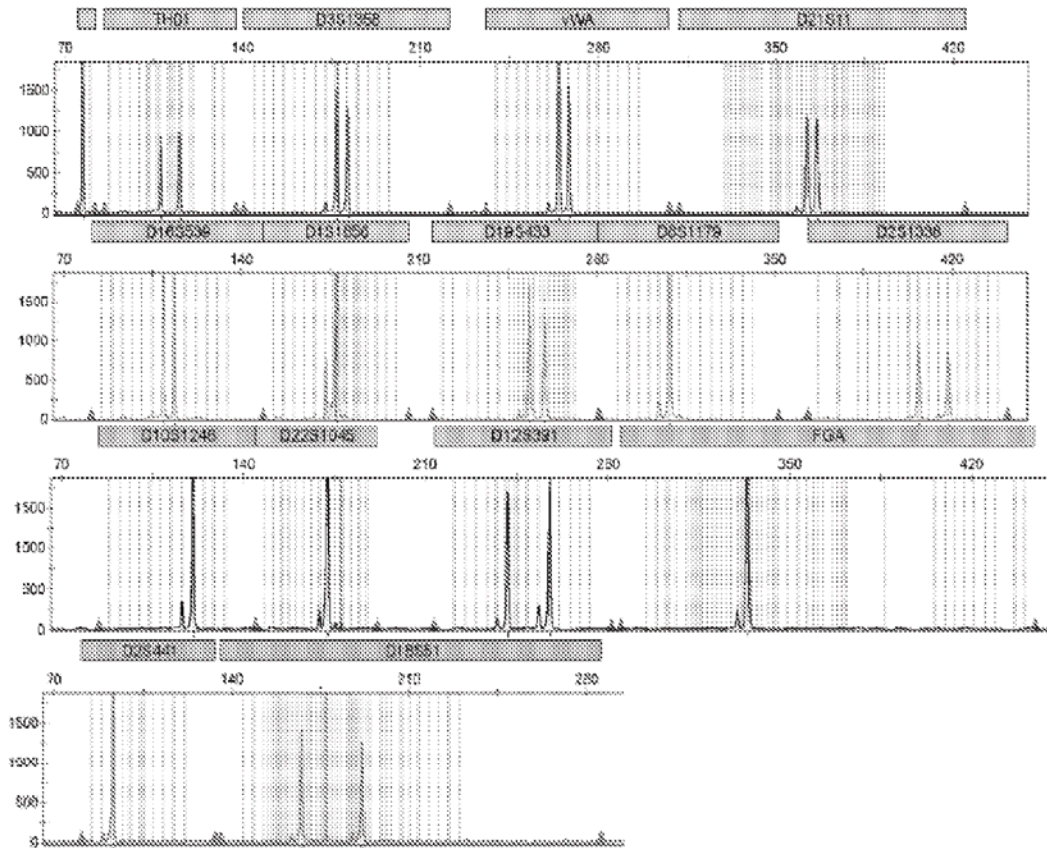
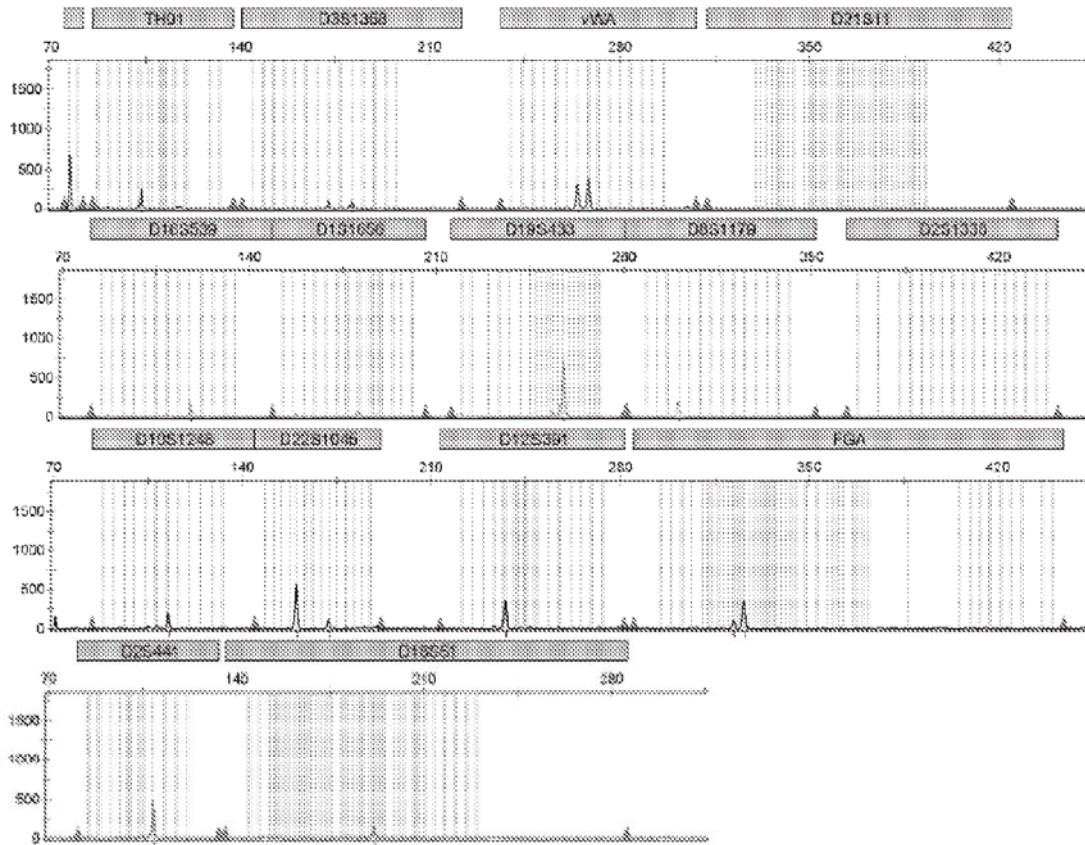


Fig 4



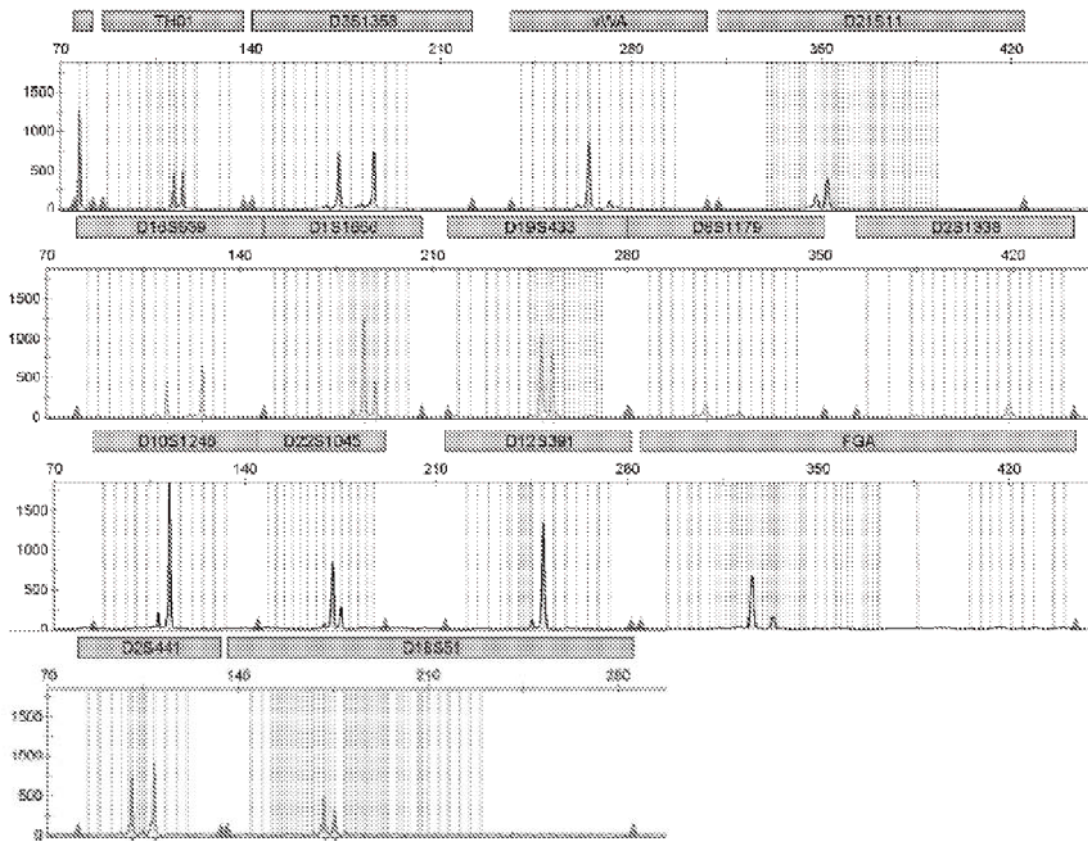
Control

Fig. 5A



Embrión día 3

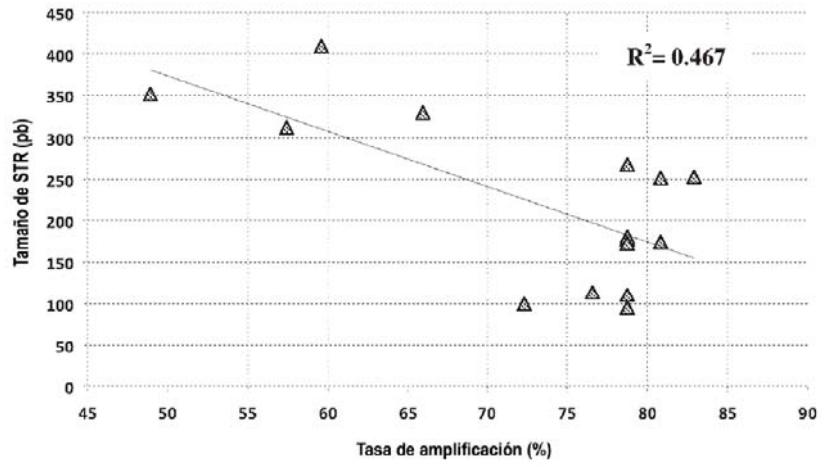
Fig. 5B



Embrión día 5

Fig. 5C

A



B

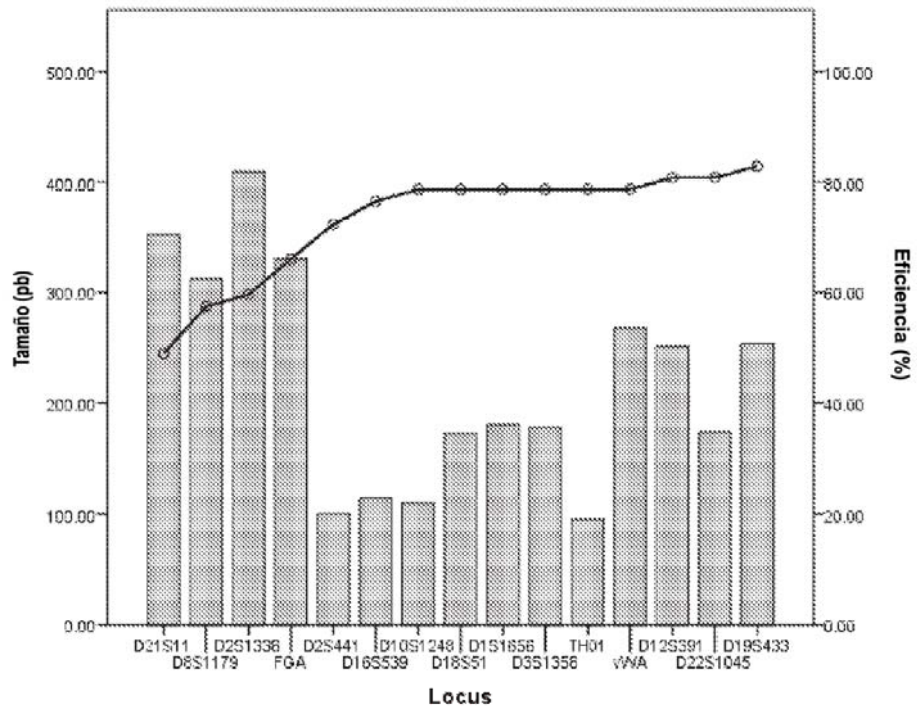


Fig. 6

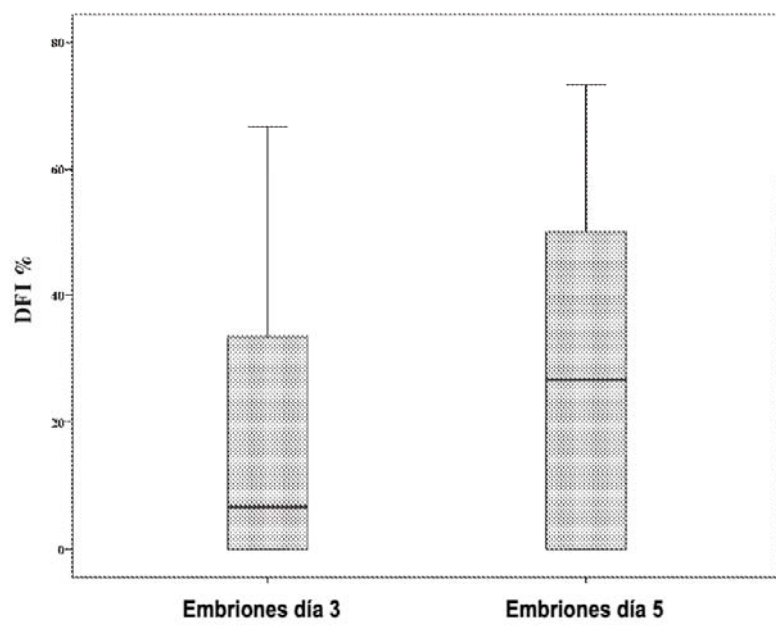


Fig. 7

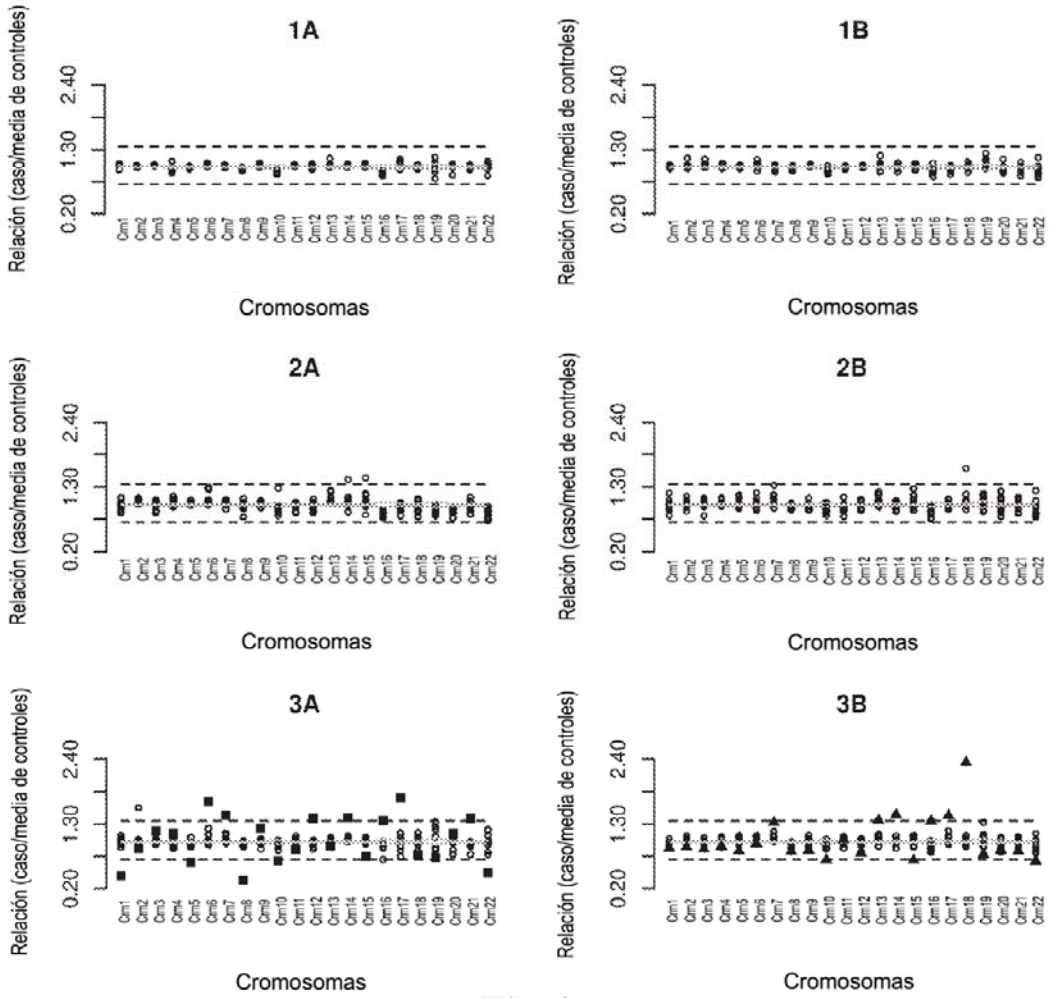


Fig. 8