

TRABAJO FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a
la Reproducción Humana
Asistida

**APLICACIONES DE LA
SECUENCIACIÓN DEL EXOMA
EMBRIONARIO Y PARENTAL EN
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

Autor: María Ávila Gómez

Tutor: Dr. Elkin Muñoz

Alcobendas, septiembre 2022

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	RESUMEN	5
3.	PALABRAS CLAVE	5
4.	OBJETIVOS	6
5.	MÉTODOS	6
6.	RESULTADOS	7
4.1	WES: TÉCNICA	7
4.1.1	<i>VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE WES</i>	9
4.2	COMPLEJO OVOCITARIO MATERNO SUBCORTICAL.....	10
4.3	WES EMBRIONARIO Y DE POCs	16
4.4	WES PARENTAL.....	20
4.5	CUESTIONES ÉTICAS DE LA SECUENCIACIÓN DEL EXOMA.....	24
5	ARGUMENTACIÓN CRÍTICA	25
6	CONCLUSIONES	26
7	BIBLIOGRAFIA	29

1. INTRODUCCIÓN

El Proyecto Genoma Humano culmina en 2003 con la publicación del genoma completo de la especie humana, que llevó una década descifrar. Este hecho supuso una revolución a la hora de entender la biología molecular y la ciencia, así como sirvió de impulso llevando a comprender la necesidad de crear grandes equipos multidisciplinares e internacionales que permitieran procesar datos a gran escala (“big data”). [1]

Aunque originalmente existían otros métodos, no fue hasta 1977 cuando Frederick Sanger y colaboradores establecieron la estrategia que sería utilizada durante más de dos décadas y todavía en uso para ciertos casos, para cumplir con el objetivo de la secuenciación. Esta estrategia que actualmente se conoce como “método Sanger” y que dio lugar a las técnicas de secuenciación de primera generación, permitieron a los científicos encargados del trabajo conseguir que éste se llevase a cabo. [2]

Tras la publicación del proyecto, muchos fueron los grupos de investigadores que trataron de diseñar nuevas estrategias de secuenciación del material genético que permitiesen obtener la composición nucleotídica de los genomas de las diferentes especies en un menor periodo de tiempo, con una menor tasa de error y menor coste. De esta necesidad de evolución científica surgieron en 2005 las técnicas de segunda generación o NGS (“Next Generation Sequencing”), un avance que posibilitó alcanzar no sólo los objetivos descritos anteriormente, sino que además permitió llevar a cabo el análisis en paralelo de múltiples secuencias genómicas a la vez; lo que hoy en día conocemos como “High-throughput DNA sequencing”. [1].

Este proceso de evolución tecnológica y científica ha permitido conocer que cada individuo alberga en torno a 4-5 millones de variantes en su genoma, contribuyendo a que cada persona sea genéticamente única. La gran mayoría de estas variantes no presentan efectos sobre la salud de los individuos, mientras que ciertas mutaciones se encuentran implicadas en el incremento del riesgo de desarrollar determinadas patologías o la respuesta al tratamiento con fármacos, entre otras funciones.

Debido a la posibilidad de secuenciar el genoma humano en menor tiempo y a menor coste, la ciencia actualmente busca llegar a la “Medicina de precisión” que permita hacer un seguimiento personalizado a cada paciente según las variantes de las que sean portadores para determinar tratamientos y posibilitar cuidados preventivos personalizados.

La secuenciación completa del exoma (“Whole Exome Sequencing”, WES) es una técnica de secuenciación de nueva generación (NGS) que incluye la determinación de la secuencia de ADN de la mayoría de los genes codificantes para proteínas y, además puede incluir regiones genómicas codificantes para moléculas de ARN que no están implicadas en la síntesis de proteínas. [3].

Los exones representan aproximadamente el 2% del ADN del genoma, que comprende alrededor de 22.000 genes. La mayoría de los genes identificados implicados en la enfermedad mendeliana involucran a los exones, siendo el exoma la región en la que se acumula el mayor número de mutaciones (en torno al 85% de variantes conocidas) que resultan en alteraciones fenotípicas con relevancia clínica. [3]

La secuenciación del exoma completo tiene como fin principal ser una herramienta diagnóstica, permitiendo una aproximación sin sesgos al diagnóstico genético molecular que podría revelar muchos casos en los que el fenotipo de un paciente no se corresponde con el fenotipo clínico estándar de la enfermedad de la que es portador, o casos en los que otras pruebas genéticas específicas disponibles para ese fenotipo no han logrado llegar a un diagnóstico claro. También es útil aplicarlo ante pacientes que presentan un trastorno genético con alto grado de heterogeneidad, lo que hace que el análisis de múltiples genes simultáneamente sea un enfoque práctico. [4][5]

La técnica WES permite analizar genes conocidos relacionados con enfermedades de base genética, así como determinar si en casos de individuos afectados aparecen variantes raras que hasta el momento no se habían relacionado con dichas patologías.

Sin embargo, al igual que permite analizar genes conocidos, es una gran estrategia de investigación para dilucidar si existen otros genes implicados en estas enfermedades y que hasta el momento se desconocían.

En el campo de la reproducción asistida, las técnicas de secuenciación de nueva generación se abren paso permitiendo conocer o acercarse a la etiología de la infertilidad, así como analizar los casos en los que los tratamientos resultan sin éxito.

Hoy en día, las pruebas genómicas permiten llevar a cabo un asesoramiento reproductivo minucioso para las parejas, teniendo presentes el diagnóstico genético preimplantacional y las pruebas de detección de portadores previas a la concepción. [1] Además de todo ello, conocer la información genética de cada individuo es una herramienta para estimar el riesgo de desarrollar enfermedades tardías y así poder beneficiarse de cuidados preventivos y paliativos tanto el progenitor como la futura descendencia.

Los tratamientos de reproducción junto con las pruebas genéticas son un mecanismo directo para revelar fenotipos específicos asociados con fallos de implantación recurrentes o abortos tempranos, resultados que no están accesibles cuando se tratan de embarazos espontáneos. Además, WES puede proporcionar información sobre riesgos de recurrencia en fetos venideros para informar y asesorar en futuras elecciones reproductivas [6]

A todo lo expuesto anteriormente, se añade el asesoramiento genético por antecedentes familiares con etiología genética o sospecha de fetos con posibles alteraciones de esta base, en las que las pruebas específicas para los trastornos que se sospechan resultan no concluyentes. En estos casos es aconsejable realizar un WES. [1]

2. RESUMEN

La secuenciación completa del exoma (WES) es una técnica de secuenciación de nueva generación (NGS) que incluye la determinación de la secuencia de ADN de la mayoría de los genes codificantes para proteínas. Los tratamientos de reproducción junto con las pruebas genéticas son un mecanismo directo para revelar fenotipos específicos asociados con fallos de implantación recurrentes o abortos tempranos, resultados que no están accesibles cuando se tratan de embarazos espontáneos.

El objetivo de este estudio fue conocer las aplicaciones actuales con las que cuenta la secuenciación del exoma embrionario y parental en reproducción asistida, así como estudiar posibles aplicaciones futuras. Los artículos que han sido analizados en esta revisión se centran en la secuenciación de exoma completo parental, embrionario y de SCMC, así como sus aplicaciones, encontrándose similitudes entre ellos y llegando a la conclusión de que uno de los principales desafíos en la interpretación de la contribución genética monogénica a la pérdida gestacional es esclarecer la asociación de la enfermedad con la causa genética, y determinar una relación causa-efecto con la muerte fetal.

La etiología del aborto parece ser diversa y heterogénea, pero aun así habría genes que tendrían un papel más crítico y potencial en el desarrollo fetal, sin los cuales este desarrollo no puede continuar. En los casos de abortos recurrentes y fallos repetidos de los tratamientos de reproducción asistida a causa del bloqueo embrionario en etapas tempranas y sin ningún factor de riesgo a considerar, la secuenciación del exoma completo sería una vía diagnóstica para analizar las variantes de las que son portadoras las pacientes afectadas.

3. PALABRAS CLAVE

Secuenciación del exoma completo; embriones; POCs; SCMC; Aborto recurrente; Reproducción Asistida.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es hacer una revisión bibliográfica de la secuenciación del exoma embrionario y conocer las aplicaciones que presenta en reproducción asistida.

Para cumplir con dicho objetivo, se han desarrollado objetivos secundarios que son:

1. Describir la base científica que permite el desarrollo de la secuenciación del exoma.
2. Desarrollar una introducción sobre la técnica de secuenciación completa del exoma.
3. Conocer el contexto histórico que ha llevado a la aparición de dicha técnica.
4. Ahondar en las aplicaciones generales de la técnica y conocer las aplicaciones específicas en reproducción asistida.
5. Conocer las ventajas y desventajas de utilizar la secuenciación del exoma.
6. Aportar una visión del estado actual de la técnica en reproducción asistida y conocer las posibles aplicaciones futuras.

5. MÉTODOS

La metodología seleccionada para llevar a cabo este trabajo ha sido una revisión bibliográfica narrativa basada en la búsqueda de información sobre la secuenciación del exoma completo incluyendo una introducción sobre la base científica de la técnica, sus aplicaciones genéricas y, de forma más específica en reproducción asistida.

Para comenzar, se ha llevado a cabo una búsqueda general en libros y artículos relacionados con el tema, filtrando según: año de publicación (2012-2022), especie (humanos), idioma (inglés), factor de impacto de los últimos 4 años de las revistas en las que han sido publicados (Q1 en Genética o Ginecología y obstetricia, según el artículo) y resumen que se ajustara al tema de interés. La principal base de datos escogidas ha sido Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

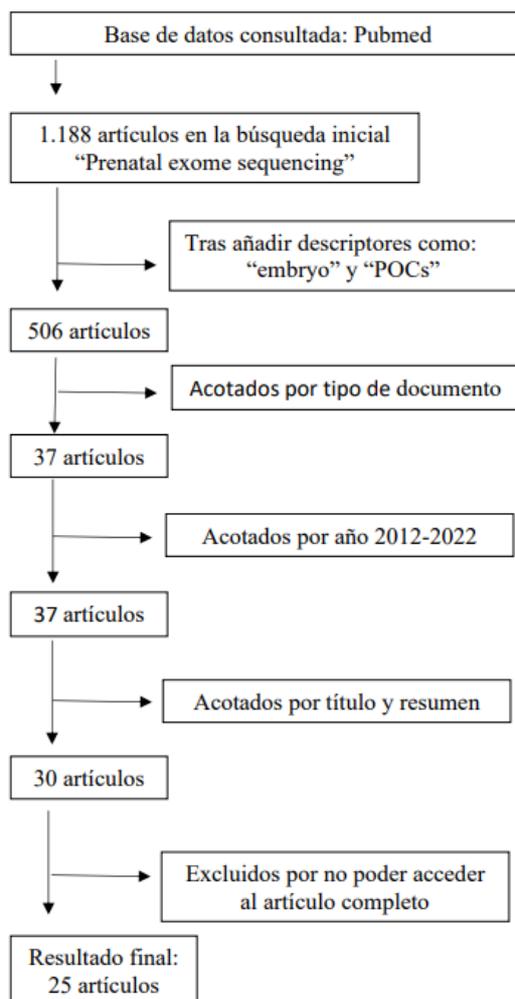


Figura 1. Diagrama de flujo para la selección de artículos.

6. RESULTADOS

4.1 WES: TÉCNICA

El genoma humano está compuesto por miles de millones de nucleótidos, siendo únicamente en torno al 2% de todo este genoma la parte codificante, es decir, los exones.

Las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) se basan en la secuenciación masiva paralela de múltiples regiones del genoma a partir de la síntesis de millones de fragmentos de ADN de secuencia conocida con una longitud de bases pequeña. Estos fragmentos se encuentran distribuidos al azar y, en muchas ocasiones, se encuentran superpuestos unos con otros de forma que se alinean a la secuencia de ADN de referencia

para así determinar su ubicación en el genoma, además de comparar el contenido nucleotídico de la secuencia de estudio con el genoma de referencia. [7]

La secuenciación de nueva generación cuenta con dos enfoques principales; un enfoque general que consiste en la secuenciación del genoma completo (WGS) y un enfoque específico, conocido como secuenciación de exoma completo (WES). [7]

Secuenciar el exoma completo requiere de una serie de pasos específicos que se han de seguir para completar la técnica. Se comienza con el fraccionamiento del ADN genómico de estudio en fragmentos pequeños al azar, de manera que se construyan librerías de ADN complementario (cDNA) que serán hibridadas con cebadores universales de secuencia conocida que posteriormente vayan a alinearse con la secuencia de referencia.

Es importante construir las librerías genómicas con los cebadores conocidos, ya que esto permitirá enriquecer y capturar las regiones específicas de interés. La base de esta técnica radica en secuenciar los exones, que constituyen una región relativamente pequeña del genoma, y son el principal motivo por el cual es necesario amplificar el ADN para así conseguir una mayor cobertura y resolución de la técnica. [8]

Una vez amplificado el ADN, se ha de conseguir la unión de los fragmentos que se han construido con los cebadores conocidos y las regiones de interés del ADN de referencia. Para ello, se lleva a cabo el proceso de hibridación de la muestra en el que se pretende conseguir la unión de ADNc y ADN de referencia.

Una vez terminado el proceso de hibridación se encuentra el ADN al completo, compuesto por regiones hibridadas y regiones sin hibridar (no interesan ya que no son exones: contienen intrones, elementos transponibles, ARN mensajeros, etc.). Una vez purificada la muestra, solo se secuencian los fragmentos capturados purificados, permitiendo una mayor profundidad de secuenciación y mayor precisión a menor coste. [8]

Cuando se secuencia el exoma es de gran importancia que la técnica tenga un nivel de cobertura de secuenciación alto (“coverage”) que nos permita aceptar los resultados con

un alto grado de confianza. Si encontramos casos en los que la cobertura es baja, es recomendable hacer el análisis con el método de secuenciación Sanger.

Actualmente, existen múltiples casas comerciales que ofrecen a los laboratorios kits completos con los cebadores de secuencia conocida de interés de manera que no es necesario completar el paso de construir las librerías de ADN complementarios requeridas para secuenciar el exoma. Cada casa comercial ofrece una librería determinada con un número de genes concreto, de manera que cuentan con diferentes paquetes de cebadores, dependiendo del tipo de proyecto de investigación o el grupo de genes que se quieran analizar.

Cabe destacar que la mayoría de estudios expuestos en este trabajo utilizan como secuenciadores Illumina HiSeq 2000/ Illumina HiSeq 3000 y de biblioteca genómica de cebadores SureSelect Human All Exon en sus diferentes versiones. [3]

4.1.1 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE WES

La secuenciación del exoma completo incluye las regiones exclusivamente codificantes del genoma, excluyendo alrededor del 98% de información genética. El hecho de secuenciar los exones donde están albergadas en torno al 85% de las alteraciones que dan lugar a las enfermedades, hacen que el WES se haya posicionado como técnica estrella en los últimos años en diferentes ámbitos de la ciencia. No fue hasta 2009 cuando esta técnica se introdujo en la práctica clínica como herramienta diagnóstica, presentando un rango de rendimiento diagnóstico de entre 20-60% tanto en la identificación de enfermedades como en el estudio de genes de herencia mendeliana implicados en dichas alteraciones.

Entre las principales ventajas que tiene secuenciar el exoma completo se encuentran: proporciona una mayor profundidad de lectura a la hora de secuenciar debido a que la región del genoma que se analiza es pequeña (2%), mayor precisión, sensibilidad y rapidez comparada con la secuenciación del genoma completo, reducción del tiempo de secuenciación y análisis y de los costes, así como reducción de costes para el procesamiento y almacenamiento de los datos. Sin embargo, WES también cuenta con

una serie de limitaciones entre las que se ha de destacar que no secuencian las regiones no codificantes del genoma en las que se encuentran elementos reguladores de gran importancia en la expresión génica, no cuenta con capacidad para detectar grandes variantes estructurales en el genoma (CNVs¹) y al necesitar enriquecer los exones previa secuenciación de los mismos, no se cubren completamente las regiones ricas en GC² por lo que la cobertura de la secuencia no es uniforme.

4.2 COMPLEJO OVOCITARIO MATERNO SUBCORTICAL

La infertilidad es una enfermedad que afecta en torno a 48 millones de mujeres en todo el mundo, presentando diferentes factores causantes de la misma. Las causas conocidas de infertilidad se clasifican en: defectos en la producción de gametos, anomalías en el tracto reproductivo que impiden el correcto tránsito de espermatozoides, defectos en la fecundación, problemas del desarrollo embrionario o defectos en la implantación embrionaria y anomalías en la implantación embrionaria, entre otras causas. No obstante, alrededor del 20% de casos resultan ausentes de diagnóstico, por lo que avanzar en causas desconocidas de infertilidad es crucial para poder ofrecer nuevas alternativas de tratamientos a estos pacientes. [9]

El avance científico y tecnológico surgido en las últimas décadas ha permitido adquirir un mayor conocimiento sobre el papel que juega la genética en la etiología y desarrollo de numerosas enfermedades, así como comprender la respuesta diferencial a los fármacos y prever el avance de múltiples patologías. En el campo de la reproducción asistida, la secuenciación del exoma completo contempla aplicaciones tanto parentales como embrionarias o también aplicaciones para el SCMC. Este último caso pretende analizar mediante la amplificación del exoma un grupo concreto de genes para prever y comprender la respuesta a los tratamientos de determinadas pacientes.

El complejo materno subcortical (SCMC) es un complejo multiprotéico que comprende módulos funcionales de proteínas materno-específicos de ovocito a embrión, codificadas por genes de efecto materno (MEG³). [9] Se localiza en el citoplasma, bajo el córtex

¹ CNVs: Variantes en el número de copias o “Copy number variants”. Se refiere al rasgo genético que implica el número de copias de un gen determinado presente en el genoma de un individuo.

² GC: Nucleótidos Guanina y Citosina.

³ MEG: “Maternally Expressed Genes”

ovocitario presentando un papel clave en los primeros estadios de desarrollo embrionario en los que permanece en la periferia del embrión preimplantatorio. [10]

Se ha observado la presencia de mutaciones inactivantes de genes de efecto materno en mujeres con infertilidad de origen idiopático. Estos genes juegan un papel clave en la embriogénesis, puesto que son los encargados de producir los transcritos (ARNs mensajeros y proteínas) que se acumulan en el citoplasma ovocitario durante el proceso de ovogénesis, actuando posteriormente de sostén para el desarrollo del cigoto antes de que se produzca la activación del genoma embrionario (EGA). [10]

La comunicación continua entre citoplasma y núcleo es esencial para la maduración de los ovocitos, el establecimiento del patrón epigenético, así como para el potencial desarrollo del embrión preimplantatorio. La correcta instauración del patrón de impronta genética es crucial para que se dé una exitosa embriogénesis tras la fecundación. Principalmente, debido a la necesidad de establecer las marcas de impronta genómica y, en segundo lugar, debido a que tras el borrado epigenético que se da en las células germinales primordiales, los ovocitos son marcados con un patrón epigenético único que los diferencia del resto de células somáticas. [11]

El SCMC está compuesto principalmente por cinco proteínas, entre las que se encuentran: el antígeno requerido por los embriones (MATER) codificado por *NLRP5*, el factor de localización ovocitaria que permite la embriogénesis (FLOPED) codificado por *OOEP*, una tercera proteína conocida como peptidilarginina deiminasa tipo VI (*PADI6*) codificada por *PADI6*, un potenciador tipo transducina (*TLE6*) que es a su vez codificado por *TLE6* y, por último, Filia codificada por *KHDC3L*. [12]

Tabla 1. Genes de efecto materno, símbolo, manifestación clínica y funciones en las que se han visto asociados durante la transición ovocito-embrión. Fuente: ASEBIR [13]

Gen	Símbolo	Manifestación clínica en mutantes	Funciones en las que se han visto asociados durante la transición ovocito-embrión
Mater	<i>NLRP5</i>	Bloqueo del desarrollo en 2 células, reducción de la transcripción embrionaria, incremento de ROS, problemas en la distribución mitocondrial.	Control de la posición del huso, regulación de la formación del RE y distribución de orgánulos.
Filia	<i>KHDC3L</i>	Inestabilidad, aneuploidía, reducción de las tasas de fecundación (ratón) y del desarrollo preimplantacional.	Actividad genómica.
Floped	<i>OOEP</i>	Bloqueo en etapa de 2 células, mala progresión del ciclo celular, asimetría.	Control de la posición del huso, regulación de la formación del RE y actividad genómica.
Tle6	<i>TLE6</i>	Asimetría, reducción de la fertilidad, mala distribución de orgánulos.	Control de la posición del huso y distribución de orgánulos.
Nlrp2	<i>NLRP2</i>	Morfología anormal, subfertilidad.	
Padi6	<i>PADI6</i>	Arresto en etapa de 2 células, problemas en ZGA, defectos en la redistribución de orgánulos.	Regulación de la formación del RE y distribución de orgánulos.

Las mutaciones de pérdida de función en los genes que codifican para las proteínas del SCMC resultan en un amplio espectro de fenotipos reproductivos anómalos. Entre dichos fenotipos se incluyen casos de subfertilidad e infertilidad debido a la aparición de alteraciones en la fusión del huso acromático y en el alineamiento de los cromosomas, constituyendo al desarrollo de aneuploidías. [10] No obstante, el fenotipo más conocido como resultado de las variantes en el SCMC humano es el bloqueo embrionario en etapas tempranas de desarrollo. [9]

Entre los resultados negativos que provocan dichas variantes también se encuentran la pérdida de metilación del ADN en regiones diferencialmente metiladas (DMRs), estas regiones están estrictamente protegidas ante la desmetilación que se da en el cigoto tras la fecundación puesto que controlan la expresión monoalélica de genes de impronta materna [11]. Otro efecto negativo comprende la formación de molas hidatiformes y abortos recurrentes [9].

Múltiples estudios demuestran que, la ausencia de cualquier miembro del SCMC, resulta en la desestabilización del complejo al completo [13]. Por lo tanto, la esterilidad femenina resultante no se debe a foliculogénesis, ovulación, fecundación o receptividad uterina alteradas, sino a la falta de macromoléculas que comprenden la reserva materna requeridas por el cigoto para sobrevivir hasta el EGA. A pesar del enfoque que se ha dado recientemente con los estudios llevados a cabo, el mecanismo biológico exacto del SCMC continua en gran medida sin estar esclarecido. [10]

Tabla 2. Estudios relacionados con el SCMC y principales hallazgos

Tipo de estudio	Autor	n	Indicación	Técnica	Hallazgos principales
Estudio prospectivo	Sara Arian <i>et al.</i> , 2020	40	Estudiar los resultados reproductivos en mujeres con variantes genéticas en <i>NLRP2</i> y comprender los resultados de los ciclos de FIV subyacentes	Secuenciación con PCR	<ul style="list-style-type: none"> · La ausencia de algún elemento del complejo SCMC desestabiliza el complejo al completo y afecta a la formación del huso acromático y segregación correcta de los cromosomas. · El fenotipo provocado por las variantes en <i>NLRP2</i> es ovocito específico y no revierte al transferir los embriones a un útero sano. · Defecto primario ovocitario como consecuencia de variantes genéticas que afectan al SCMC y a <i>NLRP2</i> en concreto. · Los tratamientos de FIV no serían una buena alternativa terapéutica para mujeres con mutaciones en <i>NLRP2</i>.
Estudio prospectivo	Wei Zheng <i>et al.</i> , 2020	50	Conocer el espectro de variantes en SCMC en las mujeres con infertilidad	WES y Sanger	<ul style="list-style-type: none"> · Hallaron 13 nuevas variantes del SCMC y su significado. · Se sugiere que <i>PADI6</i> y <i>TLE6</i> regulan la correcta división celular en etapas tempranas. Afectas de estas variantes pueden dar lugar a descendencia con alteraciones de impronta en múltiples loci y abortos. · Las variantes de <i>KHDC3L</i>, <i>NLRP2</i>, <i>NLRP5</i> y <i>NLRP7</i> serían la causa de fecundación anormal o bloqueo embrionario.
Estudio prospectivo	Xueqian Wang <i>et al.</i> , 2018	84	Investigar sobre mutaciones desconocidas del SCMC y fenotipos subyacentes	WES	<ul style="list-style-type: none"> · Identificaron 5 nuevas variantes en <i>TLE6</i>, <i>PADI6</i> y <i>KHDC3L</i> en 4 pacientes independientes con infertilidad primaria y los proponen como marcadores diagnósticos en pacientes con fallos de FIV/ICSI recurrentes.

					· Los fenotipos analizados en este estudio son consistentes con las variantes previamente descritas, mostrando bloqueo temprano del desarrollo embrionario.
--	--	--	--	--	---

El gen *NLRP2* codifica para una de las proteínas del SCMC. Se ha observado que aquellas mujeres con mutaciones de pérdida de función en dicho gen presentan un amplio espectro de fenotipos entre los que se encuentran: ausencia de descendencia debido al bloqueo embrionario, anomalías de crecimiento prenatales y posnatales y mayor incidencia de muerte neonatal.

Arian *et al.*, 2020 investigaron sobre la respuesta que se obtenía de embriones procedentes de mujeres con variantes en *NLRP2* en diferentes ambientes, de forma que pudiesen esclarecer el motivo de la interrupción en el desarrollo embrionario. Tras este estudio concluyeron que la causa del bloqueo es ovocito-específica, por lo que en casos de mujeres portadoras de variantes en *NLRP2* y fallos en los tratamientos reproductivos sugirieron que la fecundación *in vitro* no sería una alternativa terapéutica adecuada ya que los embriones procedentes de estos casos son más sensibles a los cambios en el ambiente. Se aconseja dar opción de donación de ovocitos, aunque no se descarta que el útero de las mujeres portadoras de la mutación esté afectado ya que el *NLRP2* es homólogo del *NLRP7*, ambos implicados en la respuesta al sistema inmune y apoptosis. [10]

Zheng *et al.*, 2020 en su estudio que aborda el espectro de variantes del SCMC, hallaron trece nuevas mutaciones en este complejo que se pueden clasificar en tres tipos: 10 fueron variantes de cambio de sentido, 2 mutaciones sin sentido y 1 delección con cambio del marco de lectura. [9]

Todos los embriones analizados en el estudio quedaron bloqueados durante la etapa de 3-7 células, siendo una minoría los que lograron llegar a 8 blastómeras. Debido a estos acontecimientos se dividieron en dos grupos y se analizó el genoma para determinar si se debía a alguna variante genética y cuáles eran. En pacientes con embriones de fecundación normal y alto grado de fragmentación se encontraron variantes bialélicas en *TLE6* entre las que se hallaban variantes homocigotas y heterocigotas compuestas.

Mientras que en aquellas pacientes con embriones de fecundación anormal y baja tasa de fragmentación celular (<20%) se notificaron principalmente variantes homocigotas y heterocigotas compuestas en *NLRP5* y dos variantes homocigotas en *NLRP2* y *PADI6*. [9]

Todas las variantes fueron heredadas siguiendo un patrón autosómico recesivo, excepto tres variantes homocigotas que resultaron en herencia desconocida puesto que no se disponía de muestra parental. Se clasificaron como variantes de significado incierto exceptuando tres de ellas que fueron reconocidas como variantes patogénicas (p.Trp446* en *TLE6*, p.Arg115* en *NLRP2* y p.Ser278Profs*59 en *PADI6*) siguiendo con lo acordado por el Colegio Americano de Medicina Genética y Genómica (ACMG). [9]

Como se ha mencionado, los genes de efecto materno tienen un papel importante en la embriogénesis, de forma que las alteraciones en estos genes van acompañadas de fallos de maduración ovocitaria o desarrollo embrionario alterado ya que quedan bloqueados en estadios tempranos de división celular. Wang *et al.*, 2018 estudiaron cuáles son las variantes genéticas de los genes del SCMC que causan bloqueo embrionario durante el proceso de embriogénesis. En este estudio hallaron una mutación homocigótica de cambio en el marco de lectura detectada en *TLE6* y que lleva a la formación de la proteína truncada (p.A378Efs*75), así mismo notificaron una variante heterocigota compuesta en *PADI6* y, mediante Sanger confirmaron que esta variante era heredada y no surgió “de novo” en la paciente. Además de la variante mencionada, en *PADI6* se halló una mutación homocigota de cambio de lectura y analizaron otra variante homocigota de cambio en el marco de lectura, pero en *KHDC3L* todas las variantes encontradas fueron directamente relacionadas por causar bloqueos embrionarios ya sea en etapas tempranas o tardías de su desarrollo.

Compararon los resultados que obtuvieron con los estudios previos, confirmando que *TLE6* juega un papel fundamental tanto en la maduración ovocitaria como en el desarrollo de los cigotos en humanos. Los pacientes con embriones portadores de mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en *PADI6* refieren un bloqueo embrionario entre estadio de cigoto y 5 células. Tanto *NLRP7* como *KHDC3L* son dos genes implicados en el establecimiento de patrón epigenético y la impronta genómica actuando en mayor y menor medida, respectivamente. Las variantes que involucran a estos dos

genes se caracterizan por formar proteínas truncadas y permitir la degradación de ARNs mensajeros.[12]

4.3 WES EMBRIONARIO Y DE POCs

El aborto recurrente o aborto de repetición (AR) se define como dos o más pérdidas gestacionales, consecutivas o no consecutivas, antes de la semana 20 de gestación. La incidencia de la pérdida embrionaria desde la implantación hasta el aborto reconocido clínicamente se encuentra en un 30% de mujeres entre 15-44 años. [14] Se ha de diferenciar la pérdida gestacional recurrente y la pérdida de embarazo espontánea. Esta última se da en el 15-25% de los embarazos, generalmente antes de la semana 10 de gestación y, entre las causas principales de este suceso se encuentran las alteraciones cromosómicas (generalmente, numéricas). Entre las causas reconocidas de los abortos de repetición se diferencian de origen paterno, materno, mixto o bien alteraciones embrionarias. [15]

La secuenciación de nueva generación ha pasado a ocupar un papel importante en el estudio de los abortos recurrentes y sus productos (productos de la concepción; POCs) debido a que permiten conocer alteraciones genéticas que no podrían ser detectadas mediante las estrategias tradicionales de análisis cromosómico (análisis citogenético), tales como variaciones del número de copias (CNVs) o variantes de significado incierto (VUS). Las técnicas de cariotipado únicamente permiten conocer reordenamientos estructurales y numéricos de los cromosomas. Además, las técnicas NGS han permitido prestar mayor atención a los abortos de repetición mediante las estrategias de identificación de genes que podrían estar involucrados en el origen de las pérdidas gestacionales, de manera que los casos que podrían darse como esporádicos se pueda determinar si son causados por herencia mendeliana de variantes génicas que estaban pasando desapercibidas. [16]

Una vez se conocieron las aplicaciones que presentaba la secuenciación del exoma completo, muchos fueron los estudios que se centraron en identificar relaciones genotipo-fenotipo en adultos y niños, sin embargo, no se encuentra tanta información en relación a identificar las causas de los abortos tempranos y las pérdidas prenatales más tardías. Los estudios llevados a cabo en ratones mostraron la existencia de mutaciones autosómicas recesivas en genes importantes para el desarrollo y que resultaban en

anomalías en el desarrollo embrionario y muerte fetal, lo que llevó a pensar que podrían estar ante genes candidatos para múltiples alteraciones en fetos humanos que permanecían con etiología desconocida. [16]

En los estudios llevados a cabo por Filges *et al.*, 2013 se observó que, en muchas de las gestaciones en las que el embrión era portador de alteraciones genéticas, los fetos heredaban mutaciones en el mismo gen por parte paterna y materna, resultando en la herencia de mutaciones heterocigotas compuestas y, en consecuencia, adquirirían el gen defectuoso. Así mismo, observaron que los genes mayormente afectados tienen funciones importantes en procesos biológicos fundamentales para el desarrollo embrionario y fetal, así como para la fertilidad de los progenitores. [15][17]

La herencia de variantes procedentes de uno u ambos progenitores puede estar influyendo significativamente en el éxito de la gestación. Es por ello por lo que algunos estudios de investigación como el de Qiao *et al.*, 2015 no buscan analizar las variantes de un gen en concreto, si no que pretenden inferir la contribución de la suma de las variantes patogénicas en todos los genes afectados, tanto en la descendencia como en los progenitores. Sugiriendo así que, además de las mutaciones genéticas aisladas, la suma de variantes que afecten a vías biológicas relevantes podría contribuir a la susceptibilidad de la enfermedad. El análisis de genes con mutaciones detectadas en abortos recurrentes y parejas mostró que estos genes están enriquecidos en vías biológicas involucradas en el embarazo, el aborto y la fertilidad.

El gen *DYNC2HI* codifica a una dineína encargada en el transporte intraflagelar de cilios, proceso esencial para el mantenimiento y generación de los mismos. Alteraciones en dicha proteína causan una distrofia torácica potencialmente letal en fetos. Además de las mutaciones descritas en *DYNC2HI*, se han encontrado variantes en *ALOX15* implicadas en condiciones patológicas (procesos inflamatorios, carcinogénesis y alteraciones cardiovasculares) siendo de relevancia conocida la asociación de las mutaciones en dicho gen y la respuesta de estrés del retículo endoplasmático en abortos tempranos. Se ha observado que la sobreexpresión de *ALOX15* se relaciona con una menor fertilidad y mayor tasa de aborto. [15]

Lord y colaboradores llevaron a cabo el mayor estudio hasta la fecha sobre secuenciación del exoma embrionario para detectar anomalías fetales estructurales. Para ello contaron con un panel virtual de genes específicos relacionados con trastornos en el desarrollo que

comprendía 1628 genes. Los 610 fetos fueron subclasificados en 11 grupos según el lugar en el que se situaban las anomalías detectadas, que iban desde la columna vertebral hasta anomalías multisistémicas. [6] Se hallaron variantes diagnósticas o de relevancia clínica en 52 y 24 fetos, respectivamente. Aunque en estudios anteriores se notificaron ratios de sensibilidad diagnóstica del 50%, estos presentaban un menor tamaño muestral y criterios de inclusión/exclusión menos estrictos que los utilizados por Lord y colaboradores, los cuales obtuvieron una ratio de diagnóstico del 12,5% que fue consistente con el expuesto por el estudio anterior más reciente (Yates *et al.*, 2017) en el cual se estudió el rendimiento diagnóstico de WES en fetos fallecidos en los que se obtuvo una ratio de diagnóstico del 20%. [5]

La detección mediante secuenciación del exoma completo de variantes genéticas diagnósticas en anomalías estructurales fetales es significativamente menor que la notificada en niños diagnosticados con trastornos en el desarrollo, a pesar de que la estrategia de secuenciación e interpretación fue similar.

Los estudios WES en fetos y embriones han implicado múltiples genes del desarrollo en anomalías estructurales y, aunque 19 de estos genes han sido identificados en varios estudios, Lord y colaboradores han notificado las primeras mutaciones en varios genes. La secuenciación del exoma también permite conocer los riesgos de recurrencia, y en los casos en los que este riesgo sea elevado los padres pueden buscar diagnósticos genéticos preimplantacionales o prenatales en embarazos futuros. [6]

Zhao *et al.*, 2021 buscaban conocer si la secuenciación del exoma de fetos inviábiles productos de la concepción es una herramienta útil para determinar el diagnóstico del aborto recurrente. Para ello, secuenciaron el exoma de muestras de fetos con cariotipo normal, es decir, sin alteraciones ni mutaciones de variaciones en el número de copias. De dicha secuenciación encontraron 39 variantes en 36 genes que se clasificaron en variantes patogénicas (6), variantes probablemente patogénicas (16) y variantes de significado incierto (17). [14]

Todas estas variantes tienen una clara asociación con patrones de herencia mendeliana ya sean autosómicos dominantes, recesivos, mixtos o ligados al cromosoma X. Cabe destacar que las variantes estudiadas con herencia autosómica dominante presentaban una incidencia en la población que oscila entre cero y extremadamente baja, por lo que infieren que son variantes muy raras; así mismo, observaron que tres de los casos

analizados en la investigación contaban con variantes en más de un gen implicado, atendiendo a la presencia de varias alteraciones genéticas. Se destaca que en el 47% de los casos de la cohorte utilizada en este estudio se han descrito causas fetales que fueron clasificadas en investigaciones anteriores, lo que apoya la teoría de que contribuyen a mecanismos compartidos y condiciones mendelianas implicadas en el aborto espontáneo. [14]

La recurrencia de determinadas categorías de enfermedades, así como los genes y variantes relacionados son considerados evidencia clínica que apoya el efecto causal de la pérdida gestacional. Se han relacionado doce categorías de alteraciones entre las causas mencionadas de aborto. Sin embargo, no todas aparecen con la misma relación en los casos analizados. Entre las principales causas se encuentran desórdenes multisistémicos, el segundo puesto lo ocupan las alteraciones cardíacas o arritmias seguidas de alteraciones renales y del sistema nervioso central. [14]

Los resultados de este estudio plantean que la etiología del aborto parece ser diversa y heterogénea, pero aun así habría genes que tendrían un papel más crítico y potencial en el desarrollo fetal, sin los cuales este desarrollo no puede continuar.

Tabla 3. Estudios de WES en POCs y fetos y principales hallazgos.

Tipo de estudio	Autor	n	Indicación	Técnica	Hallazgos principales
Estudio prospectivo	Chen Zhao <i>et al.</i> , 2021	102	Evaluar la aplicación clínica de la secuenciación embrionaria para identificar la etiología genética del aborto recurrente.	WES	· Variantes patogénicas, probablemente patogénicas y de significado incierto. De estas, algunas han sido previamente categorizadas aportando evidencia a que existen mecanismos compartidos y contribución de alteraciones monogénicas en el aborto recurrente.
Estudio de cohorte prospectivo	Jenny Lord <i>et al.</i> , 2019	610	Evaluar la proporción de fetos con alteraciones estructurales portadores de variantes en genes asociados con trastornos del desarrollo que pueden ser detectados mediante	WES	· 321 variantes genéticas (255 diagnósticos potenciales) entre las que había SNV e indels, CNV y disomías uniparentales, así como mutaciones de novo. · Se halló una variante diagnóstica o potencialmente relevante en 76 fetos (12,5%) · Las variantes en <i>KMT2D</i> fueron uno de los principales hallazgos.

			secuenciación del exoma.		·Se han informado primeras mutaciones diagnosticadas prenatalmente en varios genes.
Estudio prospectivo	Carin L Yates <i>et al.</i> , 2017	84	Determinar el rendimiento diagnóstico de la secuenciación del exoma completo en fetos con anomalías ecográficas que resultaron en muerte fetal o interrupción del embarazo.	WES	·Porcentaje de diagnóstico del 20% en aquellos fetos con resultado positivo. ·Detectaron una mutación sin sentido heterocigota compuesta en <i>CRB2</i> causante de quistes renales.
Estudio prospectivo	Ying Qiao <i>et al.</i> , 2015	7	Buscar variantes patogénicas en abortos tempranos euploides de parejas con abortos recurrentes y previo análisis de microarrays cromosómico de alta resolución	WES	·En el 50% de las muestras se detectaron mutaciones heterocigotas compuestas. ·Dos productos de la concepción eran portadores de mutaciones heterocigotas compuestas en <i>DYNC2HI</i> y <i>ALOX15</i> , respectivamente. ·Las variantes encontradas ya sean individualmente o como grupo, podrían contribuir a abortos recurrentes.
Estudio prospectivo	Filges <i>et al.</i> , 2013	2	Identificar las variantes causales de un patrón recurrente de un síndrome de anomalías congénitas fetales letales no descrito.	WES	·Mutaciones bialélicas inactivantes en <i>KIF14</i> que provocan un defecto en los cilios primarios impidiendo la correcta división celular y resultando letal para el embrión. ·Variantes en <i>KIF4</i> resultan en fenotipos viables y/o de microcefalia.

4.4 WES PARENTAL

Para la búsqueda y clasificación eficiente de variantes genéticas, se ha demostrado a lo largo de los estudios llevados a cabo hasta la fecha que el análisis de tríos fetal-parental es preferible a la secuenciación del exoma completo de fetos o embriones únicamente. Esto se debe a que la evaluación de tríos permite identificar aquellas variantes que han surgido “de novo” en la descendencia mediante la comparativa con el genoma parental. Además, permiten determinar si las variantes patogénicas bialélicas heterocigotas se encuentran configuradas en cis o en trans. [6]

Los defectos de maduración ovocitario (OOMDs) se encuentran entre las causas comunes de infertilidad primaria que llegan a las clínicas de reproducción asistida, traducándose en fallos de fecundación tanto *in vitro* como *in vivo*. Han sido numerosos los estudios previos que han identificado genes relacionados con los defectos de maduración de los ovocitos, tales como *ZP1*, *ZP2*, *ZP3*, *WEE2*, *PATL2* y *TUBB8*.

Tabla 4. Genes de defectos de maduración, tipo y consecuencias.

Gen	Defecto de maduración	Consecuencia // Resultado
<i>ZP1</i>	OMMD1	Ausencia de zona pelúcida, degeneración de los ovocitos y síndrome del folículo vacío.
<i>ZP2</i>	OMMD6	Ausencia de zona pelúcida, degeneración de los ovocitos y síndrome del folículo vacío.
<i>ZP3</i>	OMMD3	Ausencia de zona pelúcida, degeneración de los ovocitos y síndrome del folículo vacío.
<i>WEE2</i>	OMMD5	Boqueo de maduración ovocitaria en MII e incapacidad para formar el pronúcleo tras la fecundación.
<i>PATL2</i>	OMMD4	Fallo de fecundación y bloqueo embrionario temprano.
<i>TUBB8</i>	OMMD2	Huso acromático dañado en MI o MII y subsecuente fallo de fecundación.

La maduración ovocitaria es un proceso clave para la fecundación. Una correcta maduración nuclear y citoplasmática asegura un desarrollo embrionario preciso. Durante el proceso de maduración, se dan una serie de eventos entre los que se incluyen: la rotura de la vesícula germinal, la formación del huso acromático y la diferenciación de la polaridad del córtex, entre otros. Cualquier anomalía en los procesos mencionados resultan en alteraciones en la fase de maduración de los mismos (fecundación y desarrollo embrionario) contribuyendo al desarrollo de infertilidad primaria femenina. [17]

Aunque la maduración ovocitaria ha sido ampliamente estudiada en ratones, el mecanismo genético implicado en este proceso en la especie humana continúa sin estar esclarecido. [17]

El huso acromático está formado por un conjunto de microtúbulos que son polímeros dinámicos de alfa y beta-tubulina. El genoma de la especie humana cuenta con nueve isotipos de beta-tubulina, entre los que se encuentra *TUBB8* (tubulina beta de clase 8). Feng *et al.*, 2016 llegaron a la conclusión de que *TUBB8* es el isotipo de beta-tubulina

predominante en el huso acromático ovocitario, y las variantes en este gen son responsables del bloqueo madurativo en los ovocitos. [18]

Los estudios llevados a cabo hasta la fecha sobre el fallo de maduración ovocitaria tipo 2, han mostrado multitud de fenotipos tanto en ovocitos como en embriones. Se han encontrado casos de (1) ovocitos completamente bloqueados en MI, (2) ovocitos con corpúsculo polar presente que no pueden ser fecundados, (3) ovocitos con corpúsculo polar que son fecundados, pero los embriones quedan bloqueados en una célula y (4) embriones con corpúsculo polar que son fecundados y comienzan las divisiones celulares, pero resultan bloqueados en estadios tempranos de desarrollo.

Se han clasificado algunos tipos de mutaciones entre las que se numeran: mutaciones heterocigotas de pérdida de sentido, heterocigotas compuestas, mutaciones homocigotas de pérdida de sentido y deleciones en *TUBB8*. Estas variantes actuarían influenciando la unión, estabilidad y regulación de la proteína o, en algunos casos, alterarían la unión de los nucleótidos. [17] Cabe destacar que cuentan con patrones de herencia autosómicos dominantes y/o recesivos. [19]

Tabla 5. Variantes y fenotipos hallados en pacientes con mutaciones en *TUBB8* y defectos de maduración ovocitaria. [18]

Variante	Fenotipo
p.P50L	Ensamblaje del huso anómalo; fallo total de polimerización
p.I4L	Pueden ser fecundados, pero resultan bloqueados tras extruir el corpúsculo polar
p.V353I	Pueden ser fecundados, pero resultan inviábiles a partir de D+3
p.E205K	Pueden ser fecundados y llegan a blastocito. Algunos resultan en fallo de implantación
p.E194K; p.M451I	Pueden ser fecundados, pero resultan bloqueados en D+3
p.C12Y	Pueden ser fecundados, pero resultan bloqueados tras extruir el corpúsculo polar
Deleción total <i>TUBB8</i>	Huso acromático anormal

La infertilidad primaria en mujeres es el principal rasgo fenotípico de OOMD2 y la expresión de la proteína que da lugar a este defecto madurativo cuando está alterada se da únicamente en ovocitos y embriones tempranos, por lo que hombres portadores de mutaciones en *TUBB8* no presentarán problemas de fertilidad. [19]

Chen B *et al.*, 2016 en la búsqueda de nuevas variantes en *TUBB8*, determinaron que aquellas mujeres portadoras de p.P70L y p.C12Y con padres portadores de las mutaciones heterocigotas de pérdida de sentido, no eran infértiles. Este hecho implicaría un efecto de haploinsuficiencia más que un efecto dominante negativo para las dos mutaciones mencionadas. El hecho de encontrar diferentes efectos se podría explicar debido a que cada mutación implicaría una alteración estructural determinada en la proteína, de manera que no todas implican el mismo efecto negativo. Así mismo, Xing *et al.*, 2020 publicaban el hallazgo de una nueva variante en *TUBB8* en una familia consanguínea en la que los padres eran portadores heterocigotos de la mutación y, la hija afectada con p.A54V presentaba la variante en homocigosis, resultando en infertilidad de origen primario debido al efecto de haploinsuficiencia que conlleva la mutación.

Tabla 6. Estudios sobre WES de muestras parentales y hallazgos principales.

Tipo de estudio	Autor	n	Indicación	Técnica	Hallazgos principales
Cohortes	Qiong Xing et al., 2020	4	Investigar las bases genéticas de los defectos de maduración ovocitaria	WES	· Nueva mutación rara de pérdida de sentido en <i>TUBB8</i> responsable de afectar a la formación del huso acromático y dando lugar a OOMD2.
Estudio prospectivo	Biaobang Chen et al., 2016	10	Investigar la existencia de nuevas mutaciones en <i>TUBB8</i> en pacientes con fallos de maduración ovocitarios, de fecundación y desarrollo embrionario	WES	· Hallaron nuevas mutaciones homocigotas y heterocigotas compuestas. · Variabilidad de fenotipos ovocitarios y embrionarios.

Estudio prospectivo	Feng et al., 2016	10	Heterogeneidad de fenotipos causados por las variantes en <i>TUBB8</i>	WES	<ul style="list-style-type: none"> · Reportaron 8 nuevas mutaciones homocigotas/heterocigotas en familias con infertilidad primaria. · Las variantes encontradas tienen un efecto dominante-negativo resultando en una disfuncionalidad del huso acromático.
---------------------	-------------------	----	--	-----	--

4.5 CUESTIONES ÉTICAS DE LA SECUENCIACIÓN DEL EXOMA

Las pruebas de análisis genómico como son la secuenciación del exoma completo, la secuenciación del genoma completo y los microarrays cuentan con el potencial de aumentar significativamente las tasas de diagnóstico frente a las técnicas utilizadas previamente. A medida que el conocimiento sobre las nuevas estrategias diagnósticas vaya avanzando, es probable que el potencial aumente aún más y se ofrezca a los pacientes la oportunidad de tomar decisiones desde una postura más informada tanto en embarazos actuales como en futuros, así como ofrecerles más información sobre las intervenciones terapéuticas existentes según cada caso.

No solo se habla de beneficios, la mayor disponibilidad de información genómica con respecto a padres e hijos conllevan desafíos éticos importantes que se han de esclarecer para garantizar una completa comprensión por parte de los pacientes de la información que se va a obtener y el fin real que tienen las pruebas de diagnóstico genético. Han sido muchas las líneas de opiniones abiertas sobre cuánta información se debe dar y hasta dónde se debe llegar para una correcta práctica de asesoramiento genético, llegándose a la conclusión de que se ha de ofrecer toda la información disponible que el paciente desee conocer evitando dar una sobrecarga de información que conlleve a crear frustración, en lugar de servir al objetivo de elección autónoma. [20]

Se ha alcanzado un consenso en la bibliografía publicada sobre ética en el cual se dicta que todos los datos que sean clínicamente procesables deben comunicarse a los pacientes o participantes en la investigación, quedando en desacuerdo si se debe informar sobre

variantes de significado incierto o por el contrario estas carecen de importancia para ser informadas y se podría evitar mayor ansiedad que si se comunicara al paciente.

La genómica prenatal, además de las cuestiones mencionadas, conlleva la pregunta sobre las responsabilidades que recaen en los profesionales de la salud para con las familias que se someten a estas pruebas. [20]

5 ARGUMENTACIÓN CRÍTICA

La reproducción asistida y la genética son dos campos que van de la mano. Muchos han sido los estudios publicados hasta la fecha que muestran el origen genético de la infertilidad, los fallos de los tratamientos o de muchas de las enfermedades que encontramos hoy en día en la población. Así mismo, se ha visto una clara asociación entre genética y farmacología, siendo determinante la variante genética de la que seas portador en determinados genes que definirán la respuesta ante los fármacos.

Tras concluir el presente estudio sobre el estado actual de las aplicaciones de la secuenciación del exoma embrionario y parental en reproducción asistida, se deja entrever la necesidad de continuar explorando esta parte de la ciencia de forma que en un futuro se ofrezca a los pacientes la posibilidad de secuenciar el exoma embrionario previo a los tratamientos de reproducción, y conocer de esta manera, si hay un origen genético de la infertilidad. Una vez se conozcan las variantes genéticas de las que son portadores, los profesionales de la reproducción asistida podrán ofrecer a los pacientes una consulta totalmente personalizada, que busque el éxito gestacional en el primer ciclo o bien, reduzca lo máximo posible la incertidumbre, miedo y angustia que presentan los pacientes en el caso en el que no haya ninguna opción para su caso, dependiendo de los resultados de las pruebas y las opciones reproductivas de las pacientes.

La información disponible sobre las aplicaciones embrionarias y parentales son escasas, debido a que no fue hasta 2009 cuando WES se introdujo en la práctica clínica, así como los asuntos bioéticos y legales que van acompañados de cualquier técnica que trate con datos humanos de gran relevancia. No obstante, es un tema de gran valor científico y clínico que tiene grandes salidas, no solo en la reproducción si no en la medicina personalizada, por lo que las puertas abiertas a nuevos proyectos que dejan los grupos de

investigación que ya han iniciado andaduras en este sector, son sin duda el prelude de grandes descubrimientos en genética y reproducción.

6 CONCLUSIONES

Uno de los principales desafíos en la interpretación de la contribución genética monogénica a la pérdida gestacional es esclarecer la asociación de la enfermedad con la causa genética y determinar una relación causa-efecto con la muerte fetal.

Los genes de efecto materno componen el SCMC y son esenciales para el correcto desarrollo embrionario y la maduración ovocitaria, siendo las mutaciones inactivantes de los mismos, causas directas de la infertilidad de origen desconocido. Se ha demostrado en los estudios que abordan la vía biológica de actuación del SCMC, que la ausencia de cualquier miembro de este complejo resulta en una desestabilización del complejo al completo resultando en un bloqueo embrionario en etapas tempranas de la embriogénesis, así como en falta de maduración ovocitaria.

En los casos de abortos recurrentes y fallos repetidos de los tratamientos de reproducción asistida a causa del bloqueo embrionario en etapas tempranas y sin ningún factor de riesgo a considerar, la secuenciación del exoma completo sería una vía diagnóstica para analizar las variantes de las que son portadoras las pacientes afectadas. De esta manera, si se encuentran mutaciones en algunos de los genes de efecto materno descritas o “de novo” se podría inferir la causa principal de los fallos en los tratamientos y dar a las parejas el asesoramiento genético adecuado de forma que puedan comprender la situación y conocer las opciones terapéuticas que tienen, siempre buscando minimizar la angustia y afecciones psicológicas que conllevan los tratamientos de reproducción asistida. En los casos en los que las pacientes sean portadoras de variantes descritas anteriormente en genes de efecto materno o implicados en la embriogénesis y, además se conozca que la probabilidad de que estos embriones no queden bloqueados sea muy baja, la mejor alternativa a ofrecerles sería la donación de ovocitos, aunque se deben hacer más estudios en referencia al ambiente uterino de estas pacientes afectadas ya que se desconoce si es nocivo para los embriones o resulta intacto.

El umbral diagnóstico de secuenciación de nueva generación en productos de la concepción es del 20%. Se ha visto que los genes mayormente afectados tienen funciones importantes en procesos biológicos fundamentales para el desarrollo embrionario y fetal, así como para la fertilidad de los progenitores de forma que las mutaciones en alguno de estos genes resultan letales para los embriones. Los resultados de los diferentes estudios sobre la etiología de los abortos recurrentes mediante WES muestran que el origen de las pérdidas gestacionales es diverso y heterogéneo, pero aun así hay genes que cuentan con un papel más crítico y potencial en el desarrollo fetal, sin los cuales este desarrollo no puede continuar. Así mismo, la recurrencia de determinadas categorías de enfermedades vistas en fetos y POCs, así como los genes y variantes relacionados, se consideran evidencia clínica suficiente para apoyar la teoría de que incurrirían en el efecto causal de la pérdida gestacional.

Las mujeres portadoras de variantes en los genes implicados en los defectos de maduración ovocitaria no siempre presentarán el mismo espectro de afecciones. Esto es debido a la localización de la mutación en el gen y la proteína resultante. De esta forma se encontrarán variantes con efecto dominante negativo o variante con efecto de haploinsuficiencia en la que la mayoría de mujeres portadoras no mostrarán un fenotipo tan severo de infertilidad.

WES facilita el diagnóstico genético de anomalías estructurales fetales, lo que permite predicciones más precisas del pronóstico fetal y el riesgo de recurrencia en futuros embarazos. Sin embargo, la detección general de variantes genéticas diagnósticas en una cohorte con una amplia gama de anomalías estructurales fetales es menor que la sugerida por estudios previos a menor escala de menos fenotipos. WES mejoró la identificación de trastornos genéticos en fetos con anomalías estructurales; sin embargo, antes de la implementación clínica, se debe considerar cuidadosamente la selección de casos para maximizar la utilidad clínica.

La secuenciación del exoma completo es una buena opción diagnóstica en casos en los que se desconoce el origen de la infertilidad, los abortos recurrentes, el bloqueo embrionario temprano o fallos de implantación y que tras varios intentos de ciclos de reproducción asistida, no se consiga una gestación a término, de forma que mediante la información codificada en los exones se pueda llegar a inferir la causa de los

acontecimientos que se están dando y ofrecer a los pacientes opciones terapéuticas personalizadas, si las hubiere. Sin embargo, hoy en día y con la información de la que se dispone, no se trabaja con WES como primera línea de diagnóstico a pesar de los resultados que se obtienen. No obstante, muchos son los grupos de investigación que están apostando por WES como método diagnóstico y continúan investigando para esclarecer los campos que precisan de mayor información, de cara a que esta técnica pueda ser una técnica rutinaria que permita ahorrar costes, tiempo y aumente el éxito reproductivo tanto para los pacientes como para las clínicas.

Es esencial ofrecer a los pacientes que se sometan a secuenciación del exoma completo una información completa y veraz sobre los resultados que se pueden obtener de la técnica y sus implicaciones tanto a nivel clínico como emocional de las parejas. Así mismo, deben ser ellos los que tomen todas las decisiones que les incumban y ofrecerles que decidan desde el conocimiento absoluto de los pasos que se van a seguir hasta alcanzar los resultados. De esta forma se cumpliría con el principio de autonomía de los pacientes, esencial para cumplir con las normas de ética descritas en la Ley de Reproducción Humana Asistida.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Capalbo, A., Poli, M., Riera-Escamilla, A., Shukla, V., Kudo Høffding, M., Krausz, C., Hoffmann, E. R., & Simon, C. (2021). Preconception genome medicine: current state and future perspectives to improve infertility diagnosis and reproductive and health outcomes based on individual genomic data. *Human reproduction update*, 27(2), 254–279. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa044>
2. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977 Dec, Proc Natl Acad Sci U S A, págs. 74(12):5463-7.
3. Whole Exome Sequencing | Detect exonic variants. (2016). Illumina. <https://emea.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/exome-sequencing.html>
4. Benjamín Rodríguez-Santiago; Lluís Armengol (2012). New generation sequencing technologies in pre- and postnatal genetic diagnosis, 23(2), doi:10.1016/j.diapre.2012.02.001
5. Yates, C. L., Monaghan, K. G., Copenheaver, D., Retterer, K., Scuffins, J., Kucera, C. R., Friedman, B., Richard, G., & Juusola, J. (2017). Whole-exome sequencing on deceased fetuses with ultrasound anomalies: expanding our knowledge of genetic disease during fetal development. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 19(10), 1171–1178. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.31>
6. Lord, J., McMullan, D. J., Eberhardt, R. Y., Rinck, G., Hamilton, S. J., Quinlan-Jones, E., Prigmore, E., Keelagher, R., Best, S. K., Carey, G. K., Mellis, R., Robart, S., Berry, I. R., Chandler, K. E., Cilliers, D., Cresswell, L., Edwards, S. L., Gardiner, C., Henderson, A., Holden, S. T., ... Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium (2019). Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet (London, England)*, 393(10173), 747–757. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31940-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31940-8)
7. Liang, W. S., Stephenson, K., Adkins, J., Christofferson, A., Helland, A., Cuyugan, L., & Keats, J. J. (2018). Whole Exome Library Construction for Next Generation Sequencing.

8. van den Veyver, I. B., & Eng, C. M. (2015). Genome-Wide Sequencing for Prenatal Detection of Fetal Single-Gene Disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(10), a023077. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023077>
9. Zheng, W., Hu, H., Dai, J., Zhang, S., Gu, Y., Dai, C., Guo, J., Xu, X., Li, Y., Zhang, S., Hu, L., Gong, F., Lu, G., & Lin, G. (2021). Expanding the genetic and phenotypic spectrum of the subcortical maternal complex genes in recurrent preimplantation embryonic arrest. *Clinical genetics*, 99(2), 286–291. <https://doi.org/10.1111/cge.13858>
10. Arian, S., Rubin, J., Chakchouk, I., Sharif, M., Mahadevan, S. K., Erfani, H., Shelly, K., Liao, L., Lorenzo, I., Ramakrishnan, R., & Van den Veyver, I. B. (2021). Reproductive Outcomes from Maternal Loss of Nlrp2 Are Not Improved by IVF or Embryo Transfer Consistent with Oocyte-Specific Defect. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 28(7), 1850–1865. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00360-x>
11. Monk, D., Sanchez-Delgado, M., & Fisher, R. (2017). NLRPs, the subcortical maternal complex and genomic imprinting. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(6), R161–R170. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0465>
12. Wang, X., Song, D., Mykytenko, D., Kuang, Y., Lv, Q., Li, B., Chen, B., Mao, X., Xu, Y., Zukin, V., Mazur, P., Mu, J., Yan, Z., Zhou, Z., Li, Q., Liu, S., Jin, L., He, L., Sang, Q., Sun, Z., ... Wang, L. (2018). Novel mutations in genes encoding subcortical maternal complex proteins may cause human embryonic developmental arrest. *Reproductive biomedicine online*, 36(6), 698–704. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.03.009>
13. Influencia de los genes de efecto materno y transición materno-cigótica (2019, 15 marzo). Revista Asebir. <https://revista.asebir.com/influencia-de-los-genes-de-efecto-materno-y-transicion-materno-cigotica/>
14. Zhao, C., Chai, H., Zhou, Q., Wen, J., Reddy, U. M., Kastury, R., Jiang, Y., Mak, W., Bale, A. E., Zhang, H., & Li, P. (2021). Exome sequencing analysis on products of conception: a cohort study to evaluate clinical utility and genetic etiology for pregnancy loss. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 23(3), 435–442. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-01008-6>

15. Qiao, Y., Wen, J., Tang, F., Martell, S., Shomer, N., Leung, P. C., Stephenson, M. D., & Rajcan-Separovic, E. (2016). Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss. *Molecular human reproduction*, 22(5), 364–372. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw008>
16. Filges, I.; Nosova, E.; Bruder, E.; Tercanli, S.; Townsend, K.; Gibson, W.T.; Röthlisberger, B.; Heinimann, K.; Hall, J.G.; Gregory-Evans, C.Y.; Wasserman, W.W.; Miny, P.; Friedman, J.M. (2014). Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype. *Clinical Genetics*, 86(3), 220–228. doi:10.1111/cge.12301
17. Chen, B., Li, B., Li, D., Yan, Z., Mao, X., Xu, Y., Mu, J., Li, Q., Jin, L., He, L., Kuang, Y., Sang, Q., & Wang, L. (2017). Novel mutations and structural deletions in TUBB8: expanding mutational and phenotypic spectrum of patients with arrest in oocyte maturation, fertilization or early embryonic development. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(2), 457–464. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew322>
18. Feng, R., Yan, Z., Li, B., Yu, M., Sang, Q., Tian, G., Xu, Y., Chen, B., Qu, R., Sun, Z., Sun, X., Jin, L., He, L., Kuang, Y., Cowan, N. J., & Wang, L. (2016). Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. *Journal of medical genetics*, 53(10), 662–671. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103891>
19. Xing, Q., Wang, R., Chen, B., Li, L., Pan, H., Li, T., Ma, X., Cao, Y., & Wang, B. (2020). Rare homozygous mutation in TUBB8 associated with oocyte maturation defect-2 in a consanguineous mating family. *Journal of ovarian research*, 13(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00637-4>
20. Horn, R., & Parker, M. (2018). Opening Pandora's box?: ethical issues in prenatal whole genome and exome sequencing. *Prenatal diagnosis*, 38(1), 20–25. <https://doi.org/10.1002/pd.5114>