



PGT-A no-invasivo (niPGT-A)

Protocolos de Cultivo Embrionario y Recolección de ADN

INFORMACIÓN GENERAL

Los estudios genéticos preimplantacionales para la detección de aneuploidías cromosómicas (PGT-A) se han basado, hasta la fecha, en el análisis de las células del trofoectodermo (TE) obtenidas generalmente a través de biopsia de blastocistos. Esta prueba invasiva, considerada como *gold standard* para la mayoría de las clínicas de FIV, requiere habilidades técnicas, equipamiento especializado y puede conducir a falsos positivos o negativos debido a discordancias entre el número de cromosoma en el TE y la masa celular interna (ICM). Por otro lado, el PGT-A no invasivo (niPGT-A) se basa en la secuenciación del ADN liberado por el embrión al medio de cultivo. Este material ha sido caracterizado por diferentes investigadores, como más representativo del genoma embrionario.

A continuación se describen dos protocolos de recolección del medio de cultivo, el primero a partir del cultivo de embriones frescos y el segundo a partir de embriones criopreservados.

NOTAS GENERALES

- El método de fertilización debe ser a través de ICSI.
- Asegurarse de remover TODAS las células del *cumulus* adheridas al embrión.
- Asegurarse de cambiar el tip, capilar o *stripper* antes de manipular cada embrión.
- La microgota del control blanco (BL) debe añadirse al proceso de cultivo embrionario en D4 a la tarde y debe recolectarse al final del procedimiento, luego de la toma del medio de cultivo. La microgota del control negativo (CN) debe tomarse directamente de la botella de medio de cultivo al final del procedimiento.
- Las gotas de medio de cultivo, tanto en las cápsulas de lavado como de cultivo, deben estar cubiertas con aceite mineral precalentando y equilibrado (37°C, 5% CO₂ y 5% O₂) en una incubadora Tri-gas desde la noche anterior a ser utilizadas.
- No agregar manualmente proteínas/suplementos de origen humano al medio de cultivo que ya contenga estos derivados añadidos previamente por el proveedor. Para medios libres de proteínas, agregar únicamente si el proveedor lo requiere.
- Observar la expansión, la calidad de la masa celular interna (ICM) y del trofoectodermo (TE) de los embriones. Recolectar en D5, D6 o D7 únicamente los medios de cultivo provenientes de blastocistos grado 4 (AA, AB, BA, BB), 5 (AA, AB, BA, BB), o 6 (AA, AB, BA, BB).
- Conservar la esterilidad durante todo el procedimiento. Todos los medios y embriones deben manipularse con técnicas asépticas y dispensarse con tips con filtro o *strippers* estériles, dentro de una cabina de flujo laminar. Los operadores deberán utilizar camisolín, guantes sin talco, gorra y barbijo.
- Previo a la recolección de medio de cultivo (15-20 minutos), puede realizar el colapso de cada uno de los embriones con un pulso de láser para favorecer la liberación de fluidos del blastocele.

PROTOCOLO PARA LA RECOLECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE EMBRIONES FRESCOS. DESDE D4 HASTA LA VITRIFICACIÓN.

1. Denudación de ovocitos

1.1. Prepare 3 pipetas Pasteur con diferentes diámetros internos para utilizarlas como *strippers*:

- grande (diámetro $\geq 150 \mu\text{m}$),
- mediana (diámetro 130-140 μm),
- pequeña (diámetro 120 μm).

Alternativamente, puede comprar *strippers* comerciales.

1.2. Luego de aislar las células del *cumulus* con hialuronidasa, utilice secuencialmente los 3 *strippers* (de grande a pequeño), succionando y soplando repetidamente hasta que las células del *cumulus* se hayan removido por completo.

Nota: Antes del ICSI, remueva todas las células del *cumulus* alrededor del ovocito. Si no logra removerlas completamente puede eliminar el resto en D3.

2. Fertilización ICSI y cultivo hasta D3

Realice la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) bajo el microscopio. Observe la evolución y clivaje de los embriones fertilizados hasta D2 y D3. Continúe cultivando aquellos que han sido fertilizados y escindidos.

3. Cambio de medio en D3 y cultivo hasta D4 a la tarde

Antes de realizar el cambio de medio en D3, observe si aún quedan células del *cumulus* en la zona pelúcida. De ser necesario, remuévalas completamente realizando un segundo proceso de denudación. Utilice *strippers* como los preparados en el paso 1.1. Luego de pipetear repetidamente, observe cuidadosamente para asegurarse que se hayan removido en su totalidad.

Una vez decumulados los embriones, transfiera cada uno de ellos a una gota de medio de cultivo de blastocisto e incúbelos a 37°C, 5% de CO₂ y 5% de O₂ hasta la tarde del D4.

4. Lavado en D4 y transferencia a un nuevo medio de cultivo

4.1. En la tarde del D4 los embriones se transferirán a una nueva cápsula de cultivo. Por, tal motivo, en el D3 prepare dos nuevas cápsulas, una para lavado de los embriones y otra para el cultivo propiamente dicho:

- Cápsula de lavado: Para cada embrión, prepare 3 gotas de medio de cultivo.
- Cápsula de cultivo del blastocisto: Para cada embrión, prepare una gota de medio de cultivo de **20-30 μL** (recomendado **20 μL**). Además, prepare una única gota de control blanco (BL) de 20 μL por proceso y operador.

Nota: cada gota de control blanco (BL) atraviesa el mismo proceso de cultivo en la incubadora que los embriones y se recolectan al final de cada procedimiento de cultivo, después de recolectar el medio de cultivo de todos los embriones.

4.2. Tome el embrión y lávelo en cada una de las 3 gotas individuales dispuestas en la cápsula de lavado. Para ello, tome una pequeña cantidad de líquido de la primera gota de lavado y aspire el embrión correspondiente (tomando la menor cantidad de líquido posible). Transfiera el embrión secuencialmente desde la primera a la tercera gota de lavado.

Nota: utilice los capilares, las gotas de lavado y medio de cultivo con un único embrión para evitar posibles contaminaciones.

4.3. Transfiera el embrión a la gota de medio de cultivo correspondiente en la cápsula de re-cultivo de blastocisto. Coloque aceite mineral y cultive los embriones en la incubadora. Cuando el blastocisto se desarrolle hasta el grado morfológico 4BB o superior (los embriones deben estar completamente expandidos), recolecte el medio de cultivo.

5. Recolección del medio de cultivo (ADN)

Previo a la recolección del medio, retire del congelador (-20°C) los tubos necesarios conteniendo el buffer de conservación (kit de *Yikon Genomics*). Mantenga estos tubos a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar durante al menos 2 minutos. Realice un *spin-down* y coloque estos tubos en una gradilla fría durante el procedimiento.

Recolecte el medio de cultivo de la siguiente manera:

- I. Retire los embriones para su vitrificación.
- II. Recolecte el medio de cultivo y el BL utilizando una pipeta de 10-100 µL. Colecte, en lo posible, todo el volumen de la microgota pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3-5 veces cuidadosamente. No aspire aceite.
- III. Transfiera el volumen del medio recolectado al tubo con el buffer de conservación (kit de *Yikon Genomics*) previamente descongelado. Asegúrese que la pared del tip no contenga aceite.
- IV. Centrifugue el tubo brevemente. En caso de haber recogido aceite, remuévalo completamente con una pipeta.
- V. Pipetee desde la botella 20 µL del medio utilizado para el cultivo de blastocisto para utilizarlo como control Negativo (CN) y colóquelo en un tubo con el buffer de conservación (kit de *Yikon Genomics*). Centrifugar el tubo brevemente.
- VI. Cierre con cuidado todos los tubos, etiquételos, colóquelos en el del kit de transporte de Biocódices y guarde la caja a -20°C o -80°C.

A continuación, siga los pasos descritos en el **procedimiento para el transporte de muestras de Biocódices**.

Nota: Asegúrese de que las recolecciones se lleven a cabo en un ambiente limpio y estéril y compatible con todas las prácticas estándar de FIV. Siempre use gorros quirúrgicos, mascarillas y guantes estériles al manipular tubos de PCR. Los tubos de conservación con el medio recolectado pueden ser conservados a -20°C por 2 semanas o a -80°C por 3 meses.

PROTOCOLO PARA LA RECOLECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO A PARTIR DE EMBRIONES VITRIFICADOS.

Nota: Recolecte únicamente medios de blastocistos descongelados re-cultivados y expandidos hasta grado morfológico 4BB o superior.

1. Lavado luego de la desvitrificación y re-cultivo

1.1. Prepare dos cápsulas, una para lavado de los embriones y otra para el re-cultivo propiamente dicho:

- Cápsula de lavado. Para cada embrión, prepare 3 gotas de medio de cultivo.
- Cápsula de re-cultivo del blastocisto. Para cada embrión, prepare una gota de medio de cultivo de **10-15 µL** (recomendado **15 µL**). Además, prepare una única gota de control blanco (BL) de 15 µL por proceso y operador.

Nota: cada gota de control Blanco (BL) atraviesa el mismo proceso de cultivo en la incubadora que los embriones y se recolectan al final de cada procedimiento de cultivo, después de recolectar el medio de cultivo de todos los embriones.

1.2. Tome el embrión y lávelo en cada una de las 3 gotas dispuestas en la cápsula de lavado. Para ello, tome una pequeña cantidad de líquido de la primera gota de lavado y aspire el embrión correspondiente (tomando la menor cantidad de líquido posible). Transfiera el embrión secuencialmente desde la primera a la tercera gota de lavado. Asegúrese de que se remuevan todas las células del *cumulus* pipeteando hacia arriba y hacia abajo en cada una de las gotas.

Nota: utilice capilares, gotas de lavado y medio de cultivo con un único embrión para evitar posibles contaminaciones.

1.3. Transfiera el embrión a la gota de medio de cultivo correspondiente en la cápsula de cultivo de blastocisto. Coloque aceite mineral y cultive los embriones durante 12-16 horas (máximo 24 horas) y luego observe la expansión de los embriones, la masa celular interna y la calidad del trofoectodermo. Cualquier embrión expandido (4BB o superior) es elegible para continuar con la recolección del medio de cultivo.

2. Recolección del medio de cultivo (ADN)

Previo a la recolección del medio, retire del congelador (-20°C) los tubos necesarios conteniendo el buffer de conservación (kit de Yikon Genomics). Mantenga estos tubos a temperatura ambiente dentro de una campana de flujo laminar durante al menos 2 minutos. Realice un *spin-down* y coloque los tubos en frío durante el procedimiento.

Recolecte el medio de cultivo de la siguiente manera:

- I. Retire los embriones para su vitrificación.
- II. Recolecte el medio de cultivo y el BL utilizando una pipeta de 10-100 µL. Colecte, en lo posible, todo el volumen de la microgota pipeteando hacia arriba y hacia abajo 3-5 veces cuidadosamente. No aspire aceite.
- III. Transfiera el volumen del medio recolectado al tubo con el buffer de conservación (kit de Yikon Genomics) previamente descongelado. Asegúrese que la pared del tip no contenga aceite
- IV. Centrifugue el tubo brevemente. En caso de haber recogido aceite, remuévalo completamente con una pipeta.
- V. Pipetee desde la botella 15 µL del medio utilizado para el cultivo de blastocisto para utilizarlo como control Negativo (CN) y colóquelo en un tubo con el buffer de conservación (kit de Yikon Genomics). Centrifugar el tubo brevemente.
- VI. Cierre con cuidado todos los tubos, etiquételos, colóquelos en el del kit de transporte de Biocódices y guarde la caja a -20°C o -80°C.

A continuación, siga los pasos descritos en el **procedimiento para el transporte de muestras de Biocódices.**

Nota: Asegúrese de que las recolecciones se lleven a cabo en un ambiente limpio y estéril y compatible con todas las prácticas estándar de FIV. Siempre use gorros quirúrgicos, mascarillas y guantes estériles al manipular tubos de PCR. Los tubos de conservación con el medio recolectado pueden ser conservados a -20°C por 2 semanas o a -80°C por 3 meses.