



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

“DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL NO INVASIVO”



AUTORA:

Verónica Villar García

TUTOR:

Vicente Badajoz Liébana

JUNIO 2022

ÍNDICE

1- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Infertilidad y Técnicas de Reproducción Asistida.....	1
1.2 Diagnóstico genético preimplantacional.....	3
1.2.1 Tipos de biopsia.....	4
1.2.2 Evaluación de las diferentes técnicas de diagnóstico molecular.....	7
1.2.3 Indicaciones y limitaciones del PGT.....	9
1.2.4 Problemas asociados al fenómeno del mosaicismo.....	10
1.2.4 Futuro del PGT.....	12
1.3 Diagnóstico genético preimplantacional no invasivo.....	15
2- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS.....	18
3- MATERIALES Y METODOLOGÍAS.....	19
4- RESULTADOS.....	20
5- DISCUSIÓN.....	36
6- CONCLUSIONES.....	48
7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aCGH: Matriz de Hibridación Genómica Comparada

ADN-BF: ADN embrionario presente en el fluido del blastocele

ADNg: ADN genómico

ADNmt: ADN mitocondrial

cf- DNA: ADN libre de células

CP: Corpúsculo polar

DGP: Diagnóstico Genético Preimplantacional

FISH: Hibridación In Situ con Fluorescencia

FIV: Fecundación *in vitro*

ICSI: Microinyección Intracitoplasmática de espermatozoides

MCI: Masa Celular Interna

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGT: *Preimplantation Genetic Testing* (Diagnóstico genético Preimplantacional)

PGT-A: Diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías

PGT-M: Diagnóstico genético preimplantacional para enfermedades monogénicas

PGT-SR: Diagnóstico genético preimplantacional para anomalías estructurales

niPGT: *Non Invasive Preimplantation Genetic Testing* (Diagnóstico genético preimplantacional no invasivo)

SCM: Medio de cultivo utilizado por embriones

SET: Transferencia embrionaria única

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

TE: Trofoectodermo

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

ZP: Zona pelúcida

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad y Técnicas de Reproducción Asistida

La infertilidad es una enfermedad que se caracteriza por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares sin protección o por el deterioro de la capacidad reproductiva de una persona, ya sea como individuo o con su pareja (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Se estima que afecta al 8-12% de las parejas en edad reproductiva, pudiendo alcanzar el 30% en diferentes países del sur y el centro de Asia, Oriente Medio, África o Europa central y oriental (Vander & Wyns., 2018).

Uno de los principales factores relacionados con la infertilidad es la edad materna, ya que existe una disminución importante de la fertilidad femenina a medida que aumenta la edad de la mujer. Este efecto se observa desde los 35 años de edad, pero se dispara a partir de los 38 años, de forma que el porcentaje de pérdida de fertilidad aumenta rápidamente pasando de ser el 20% a los 38 años, al 50% a los 41 años y al 90% a los 45 años. Esto se puede explicar porque el envejecimiento es responsable del agotamiento de los ovocitos y del deterioro de su calidad, el reclutamiento prematuro de los folículos, el aumento de los trastornos ovulatorios, la reducción de la frecuencia de la ovulación o el deterioro de la fase lútea (Vander & Wyns., 2018).

Debido a los cambios socio-culturales de las últimas décadas, la edad a la que las mujeres tienen su primer hijo es cada vez mayor, lo que está provocando un aumento en las tasas de infertilidad junto con otros factores como la pérdida de calidad del semen, el aumento de la exposición a disruptores endocrinos o la presencia de enfermedades que afectan a la función reproductora. Todo ello, unido a la aparición de los nuevos modelos de familia, lleva a que cada vez sean más las mujeres y parejas que recurren a las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) (Vander & Wyns., 2018).

Las TRA son aquellos procedimientos mediante los cuales se manipulan los gametos y embriones *in vitro* con fines reproductivos (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017), es decir, con el objetivo de conseguir un embarazo que dé lugar a un recién nacido sano. Existen múltiples causas que pueden reducir las tasas de éxito de las TRA, pero una de las principales es la presencia de anomalías genéticas en el embrión. Dichas alteraciones

son comunes en los embriones humanos y muchas veces están relacionadas con el envejecimiento del gameto femenino. Las anomalías genéticas pueden ser de diferentes tipos, como son las alteraciones numéricas o estructurales de los cromosomas, las enfermedades monogénicas o aquellas ligadas a los cromosomas sexuales (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020).

Las aneuploidías son alteraciones genéticas causadas por la presencia de un número anormal de cromosomas en una célula (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Las trisomías son las aneuploidías detectadas con mayor frecuencia (61,2 %), seguidas de las triploidías (12,4 %), la monosomía X (10,5 %), las tetraploidías (9,2 %) y las anomalías cromosómicas estructurales (4,7 %) (Soler *et al.*, 2017). A lo largo de los años se ha comprobado que las alteraciones en el número de cromosomas son las más comunes en los embriones humanos (Rubio *et al.*, 2020), estando presente en al menos el 20% de los casos. Las aneuploidías tienen lugar cuando los cromosomas no segregan correctamente en la división celular (Yeung *et al.*, 2019) y pueden dar lugar a fallos de implantación y abortos recurrentes. No obstante, aunque en muchas ocasiones los embriones aneuploides no son compatibles con la vida y no llegan a dar lugar a un embarazo clínico, también es posible que el embarazo transcurra con normalidad y termine con el nacimiento de un niño enfermo (Navarro-Sánchez *et al.*, 2022).

Como se puede observar en la **Figura 1**, la tasa de aneuploidías aumenta con la edad materna debido al incremento de los defectos de recombinación meiótica que se producen a medida que aumenta la edad de la mujer, pudiendo llegar a afectar al 80% de los embriones y al 50% de los embarazos (Rubio *et al.*, 2020; Navarro-Sánchez *et al.*, 2022). Dado que las aneuploidías constituyen una de las causas más importantes de fracaso de las TRA (Greco *et al.*, 2020) se han desarrollado diferentes herramientas para tratar de no transferir un embrión cromosómicamente afectado. Durante años se ha realizado una evaluación morfológica o morfocinética de los embriones con el fin de tratar de identificar aquellos con una dotación aneuploide porque se pensaba que los embriones afectados tenían más probabilidades de experimentar un desarrollo anormal. Sin embargo, se ha comprobado que los embriones morfológicamente normales también pueden tener anomalías cromosómicas (Yeung *et al.*, 2019). Por ello, se han desarrollado diferentes técnicas como el diagnóstico genético preimplantacional (DGP o PGT), que permite

detectar de forma precisa la presencia de alteraciones genéticas y cromosómicas en los embriones antes de que éstos sean transferidos al útero materno.

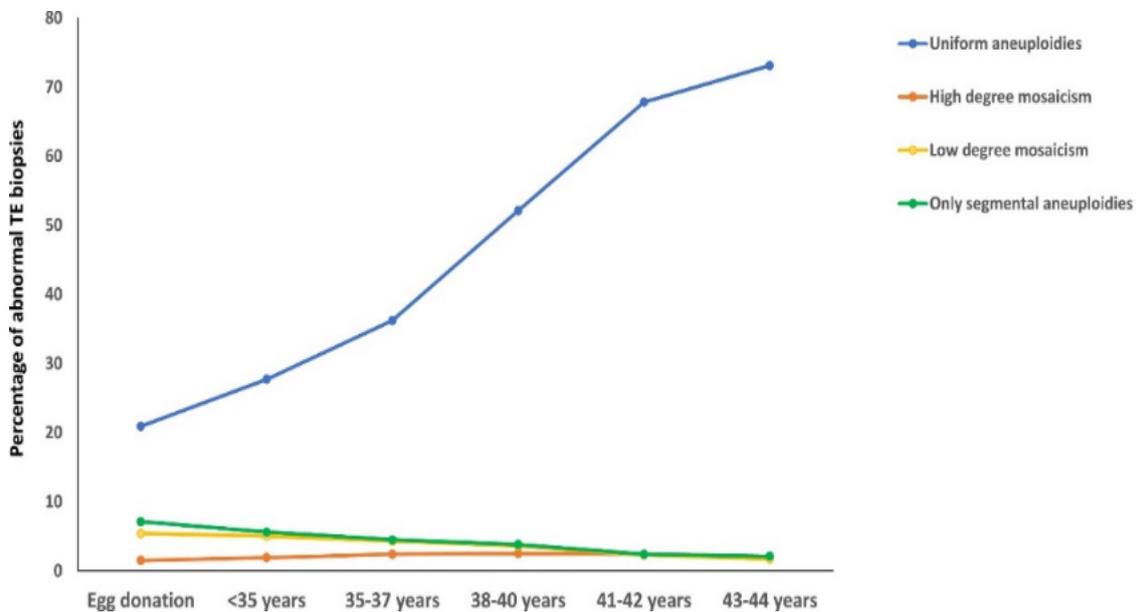


Figura 1. Incidencia de los distintos tipos de anomalías cromosómicas presentes en los embriones en función de la edad de la madre (Navarro-Sánchez et al., 2022).

1.2 Diagnóstico genético preimplantacional

El diagnóstico genético preimplantacional es una prueba que permite analizar el ADN de los ovocitos o embriones para detectar la presencia de anomalías genéticas, cromosómicas o para la tipificación de HLA (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020). Habitualmente se conoce como DGP, aunque también es habitual llamarlo PGT debido a sus siglas en inglés (Preimplantation Genetic Testing).

Existen diferentes tipos de PGT en función de la anomalía que se pretenda detectar:

- El DGP-A, más conocido como PGT-A, se utiliza para la detección de aneuploidías (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020).
- El DGP-M o PGT-M, se emplea para detectar la presencia de defectos monogénicos (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020).

- El DGP-SR o PGT-SR, permite determinar los reordenamientos estructurales cromosómicos (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020).

La principal ventaja del PGT es que permite conocer el estatus genético o cromosómico de un embrión antes de que sea transferido al útero materno, es decir, antes de que se produzca la implantación. Por tanto, es una herramienta de prevención que permite identificar los embriones que no presentan determinadas anomalías genéticas o cromosómicas con el fin de que éstos sean descartados y no se transfieran. Permite seleccionar de forma objetiva el mejor embrión para transferir (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020; Greco *et al.*, 2020).

Para realizar un PGT es necesario llevar a cabo un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) en el cuál se fecundarán los ovocitos mediante microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), se cultivarán los embriones y se realizará una biopsia de corpúsculo polar, de células embrionarias o de trofoectodermo (TE), que se combinará con un análisis genético de las células obtenidas.

1.2.1 Tipos de biopsia

Desde la aparición del PGT, la técnica y el momento de biopsia han ido evolucionando, pasando por las siguientes etapas:

- Biopsia del Corpúsculo Polar (CP):

Los CPs son subproductos originados en las divisiones meióticas que experimentan los ovocitos que no tienen potencial reproductivo. La biopsia de CP es una técnica invasiva que se puede realizar mediante la extracción del primer CP del ovocito, del segundo CP de los ovocitos fertilizados 16 horas después de la realización de la ICSI o de ambos CPs (Greco *et al.*, 2020).

Es el tipo de biopsia menos realizado actualmente, debido a que solo proporciona información genética materna y a que permite el análisis de poco ADN, ya que este procede únicamente de 1 o 2 células. No permite detectar los defectos genéticos o cromosómicos de origen paterno ni las anomalías que pueden producirse en las divisiones mitóticas. Además, implica que se biopsien innecesariamente ovocitos que podrían no

llegar a fertilizarse o no alcanzar la etapa de blastocisto. No obstante, presenta la ventaja de que no requiere la criopreservación de los embriones, ya que desde el momento de la biopsia hasta el de la transferencia embrionaria hay tiempo suficiente para la realización del estudio genético. Esta técnica también es útil en algunos países en los que no está permitida la biopsia de embriones (Brouillet *et al.*, 2020; Greco *et al.*, 2020).

- Biopsia de blastómeros:

Este tipo de biopsia se realiza cuando el embrión está formado por unas 6 u 8 células y se encuentra en estadio de escisión, es decir, aproximadamente 3 días después de la fecundación. Para llevarla a cabo es necesario hacer una apertura de la zona pelúcida (ZP) utilizando ácido Tyrodes o pulsos láser y emplear un medio libre de calcio y magnesio con el fin de debilitar las uniones celulares para poder extraer 1 o 2 células del embrión sin arrastrar el resto. La biopsia de dos células permite obtener un resultado más preciso, pero puede afectar al desarrollo del embrión debido a que supone la extracción de aproximadamente el 30% de su masa (Greco *et al.*, 2020).

Esta técnica presenta las ventajas de que informa de la contribución materna y paterna y de que es compatible con la transferencia de embriones en fresco en estadio de blastocisto. No obstante, también supone que se biopsien innecesariamente muchos embriones que no llegarán al estadio de blastocisto y que no podrán ser transferidos (Brouillet *et al.*, 2020; Greco *et al.*, 2020).

- Biopsia de TE:

Es la técnica más utilizada actualmente. Se realiza el día 5 o 6 de desarrollo embrionario, es decir, cuando el embrión se encuentra en estadio de blastocisto. En este momento, en el embrión se distinguen por un lado la masa celular interna (MCI), que dará lugar a los tejidos fetales, y por otro lado el TE, que dará lugar a tejidos extraembrionarios como la placenta (Greco *et al.*, 2020).

Consiste en la extracción de 4-6 células del TE del blastocisto con la ayuda de pulsos láser, tal y como se puede observar en la **Figura 2**. Para ello, algunos profesionales realizan una eclosión asistida de los embriones en día 3 o 4 con el objetivo de que en el

momento de la biopsia estos hayan comenzado a eclosionar y las células se puedan extraer más fácilmente (Greco *et al.*, 2020).

Las principales ventajas de la biopsia de TE son que implica la extracción de células que darán lugar a tejidos extraembrionarios y no están involucradas en la formación del feto y que permite realizar un análisis más preciso que otras técnicas, lo que se debe a que el embrión ya habrá activado su genoma y a que el procedimiento posibilita la extracción de un mayor número de células sin afectar en gran medida al desarrollo embrionario. Por otro lado, presenta la desventaja de que no es compatible con la transferencia de embriones en fresco porque no permite que los resultados se obtengan con tiempo suficiente para transferir el embrión en el mismo ciclo, por lo que aquellos blastocistos que sean biopsiados tendrán que ser criopreservados. Hay que tener en cuenta que para realizar una biopsia de TE los blastocistos deben cumplir unas determinadas características morfológicas, es posible que los que sean de peor calidad no puedan someterse a esta técnica (Greco *et al.*, 2020).

Aunque numerosos estudios han demostrado que la biopsia de TE apenas perjudica el desarrollo del embrión, en algunos casos se ha observado que aumenta las tasas de fallo de implantación, de aborto y el riesgo de preeclampsia (Chen *et al.*, 2021). Se han realizado muy pocos estudios en humanos para comprobar si la práctica de esta técnica afecta negativamente al desarrollo a largo plazo del futuro individuo, pero estudios realizados en animales han encontrado que la biopsia puede afectar al desarrollo neurológico y al desarrollo suprarrenal (Wu *et al.*, 2014; Kimelman *et al.*, 2018; Shitara *et al.*, 2021).

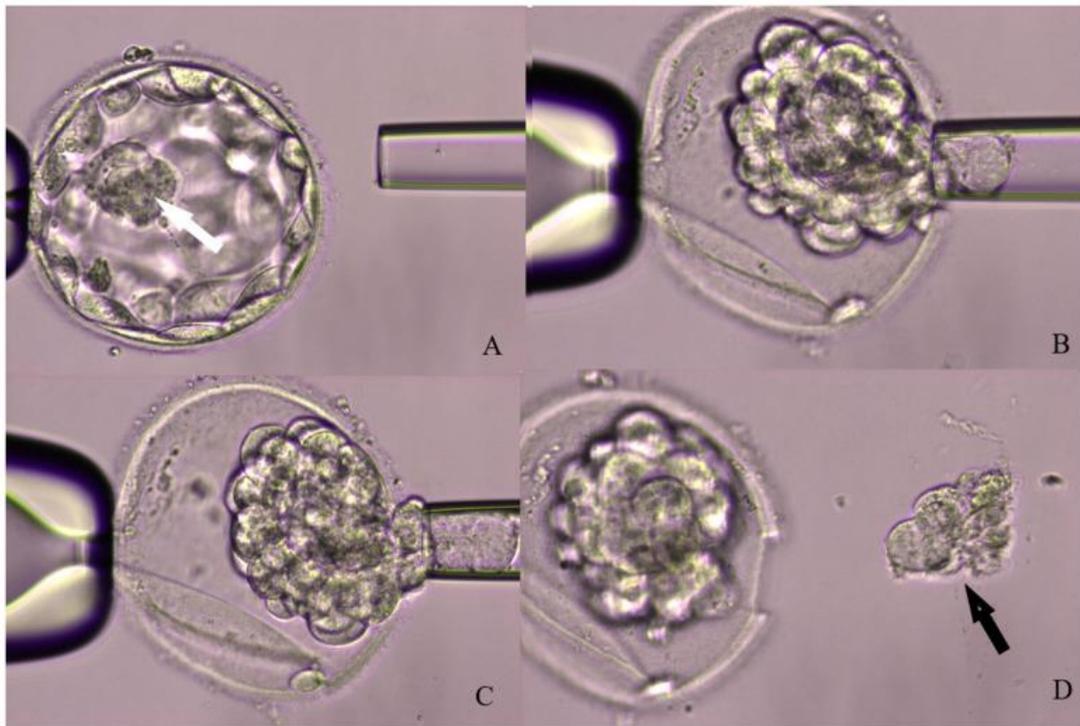


Figura 2. Pasos a seguir para realizar una biopsia de TE con ayuda de pulsos láser. A) En primer lugar se debe colocar el blastocisto de forma que la MCI se encuentre lo más alejada posible del sitio de la biopsia y se debe sujetar con la aguja de Holding. B) Con ayuda de un láser se realiza un agujero en la ZP del blastocisto y se aspiran suavemente las células del TE con una pipeta de biopsia. C y D) Se extrae un pequeño grupo de células del TE del embrión y se transfieren a un tubo para su análisis genético (Greco *et al.*, 2020).

1.2.2 Evolución de los diferentes tipos de diagnóstico molecular

Una vez que se ha obtenido la muestra de células procedentes del ovocito o del embrión se realiza un estudio molecular que permitirá conocer la dotación genética o cromosómica de las células biopsiadas. A lo largo de los años se han utilizado diferentes técnicas para realizar estos estudios genéticos pasando por la Hibridación in situ con fluorescencia (FISH), la PCR, la hibridación genómica comparada (aCGH), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o la secuenciación de nueva generación (NGS). Todas ellas presentan una serie de ventajas y de limitaciones. No obstante, la técnica más utilizada actualmente es la NGS (Chen *et al.*, 2020).

El análisis mediante FISH presenta la desventaja de que únicamente permite detectar 5 cromosomas simultáneamente y de que tiene una baja sensibilidad. Por otro lado, la qPCR requiere cuatro sondas por cada uno de los cromosomas a analizar y permite detectar el número de copias de cada cromosoma. Presenta la ventaja de que es una técnica rápida, barata y con un alto rendimiento. Sin embargo, al igual que ocurre con el FISH, no permite detectar mosaicismo, aneuploidías segmentarias, disomía uniparental o translocaciones desequilibradas (Chen *et al.*, 2020; Greco *et al.*, 2020).

Las técnicas de análisis mediante matrices requieren un paso previo de amplificación de todo el genoma (WGA). El aCGH permite detectar variaciones en el número de copias, algunos casos de mosaicismo, aneuploidías segmentarias y translocaciones desequilibradas de los 24 cromosomas al comparar el ADN del material biopsiado con el de una muestra control (Greco *et al.*, 2020;9) mientras que las matrices SNP permiten detectar algunos casos de mosaicismo, aneuploidías segmentarias, el origen parental de las aneuploidías, translocaciones desequilibradas, disomía parental y poliploidía. Sin embargo, no se utilizan con mucha frecuencia debido a su alto coste y a su protocolo complejo (Chen *et al.*, 2020).

La técnica más popular actualmente es la que está basada en la NGS, ya que presenta un alto rendimiento, bajo coste, posibilidad de automatización, precisión y es capaz de detectar aneuploidías cromosómicas, mosaicismo, triploidías y aneuploidías segmentarias (Chen *et al.*, 2020). Permite realizar una lectura directa de los fragmentos de ADN secuenciados y cuantificarlos, de forma que tiene la capacidad de detectar aneuploidías, deleciones e inserciones de tamaños medianos y trastornos monogénicos, por lo que permite realizar simultáneamente PGT-A y PGT-M. El protocolo de secuenciación por NGS tiene 5 pasos principales: procesamiento de la muestra, análisis de la calidad inicial, preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis de datos. Antes de la secuenciación es necesario amplificar el genoma (Chen *et al.*, 2020; ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020; Greco *et al.*, 2020).

Actualmente lo más habitual es realizar PGT mediante el cultivo de los embriones hasta que se encuentren en estadio de blastocisto, la realización de una biopsia de células del TE y el análisis molecular mediante NGS. El tipo de PGT más utilizado es el que permite detectar la presencia de aneuploidías (PGT-A).

1.2.3 Indicaciones y limitaciones del PGT

El PGT garantiza, en la medida de lo posible, la transferencia de embriones euploides, por lo que aumenta la seguridad de las TRA y reduce el tiempo de espera hasta conseguir un embarazo (Greco *et al.*, 2020). Las principales indicaciones que existen actualmente para realizar PGT en un ciclo de FIV son:

- Edad materna avanzada: a medida que aumenta la edad materna y se produce un descenso de la reserva ovárica se experimenta un aumento significativo de la presencia de anomalías cromosómicas en ovocitos, de manera que a partir de dichos gametos se obtendrán embriones anómalos (Greco *et al.*, 2020).
- Abortos recurrentes: se considera que una pareja o mujer ha tenido abortos recurrentes tras dos o más abortos espontáneos consecutivos antes de las 20 semanas de gestación. Dado que las aneuploidías embrionarias pueden ser la causa de los abortos espontáneos, el PGT está indicado en el tratamiento de estos pacientes, especialmente en aquellos casos en los que algunos de los abortos previos tenían cariotipo alterado (Greco *et al.*, 2020).
- Fallos de implantación recurrentes: un fallo de implantación recurrente se define como la ausencia de saco gestacional en ecografía tras 5 o más semanas desde la transferencia embrionaria después de al menos 3 transferencias de embriones de alta calidad o de 10 transferencias de embriones de calidad variable. Diferentes estudios muestran que las aneuploidías embrionarias pueden ser la principal causa de fallos de implantación (Greco *et al.*, 2020).
- Infertilidad por factor masculino: los pacientes con cariotipo anormal, factor masculino severo, deleciones del cromosoma Y, varicocele, tratamientos previos de quimioterapia o con edad avanzada tienden a producir espermatozoides con un complemento cromosómico desequilibrado. Por todo ello, el PGT-A está indicado en casos con azoospermia, oligoastenoteratozoospermia severa, Síndrome de Klinefelter o microdeleciones del cromosoma Y, ya que estos varones presentan mayor riesgo de que se hayan producido fallos en las divisiones meióticas que se experimentan durante la espermatogénesis (Greco *et al.*, 2020).
- Pacientes con alto riesgo de transmitir a su descendencia anomalías genéticas cromosómicas o monogénicas (Greco *et al.*, 2020).

- Pacientes de buen pronóstico sometidos a transferencia embrionaria única (SET) o con ciclos de ovodonación con el fin de aumentar las tasas de embarazo clínico y reducir el tiempo necesario para que se produzca la gestación, minimizando el riesgo de embarazo gemelar y múltiple (Greco *et al.*, 2020).

Por otro lado, el PGT presenta una serie de limitaciones porque es un procedimiento invasivo que puede comprometer la viabilidad del embrión. Actualmente, tiene unos porcentajes de supervivencia muy altos, de aproximadamente el 90%, pero realizar una biopsia a los embriones o a los ovocitos siempre implica un riesgo. Además, dado que actualmente la biopsia se practica en estadio de blastocisto, conlleva que no se pueda realizar una transferencia en fresco y que haya que criopreservar los embriones para que sean transferidos en otro ciclo, lo que se conoce como transferencia en diferido. Ocasionalmente puede haber fallos en la amplificación del genoma de las células biopsiadas o en el análisis genético, dando lugar a resultados no concluyentes. Además, siempre hay que tener en cuenta los problemas derivados del mosaicismo (ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group *et al.*, 2020; Greco *et al.*, 2020).

1.2.4 Problemas asociados al fenómeno del mosaicismo

El mosaicismo es un fenómeno que se caracteriza por la presencia de diferentes líneas celulares en un mismo embrión. Su origen es poscigótico y está relacionado con errores mitóticos que tienen lugar después de la fertilización (Greco *et al.*, 2020). Existen diferentes tipos de mosaicismo en función del tipo de células que se ven involucradas y del momento en el que se produce el error en la mitosis. La tasa de mosaicismo aumenta cuanto antes ocurre el error mitótico, disminuye con la edad materna y puede variar en función de la técnica de análisis utilizada (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017; Greco *et al.*, 2020).

En la **Figura 3** se pueden observar los 4 tipos diferentes de embriones mosaicos en estadio de blastocisto en función del linaje celular afectado:

- Mosaico total: existen células euploides y aneuploides en el TE y en la MCI (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017).

- Mosaico MCI: las células mosaico se encuentran confinadas en la MCI (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017).
- Mosaico TE: las células mosaico se encuentran confinadas en el TE (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017).
- Mosaico MCI/TE: tiene lugar cuando el blastocisto presenta todas las células de la MCI aneuploides y todas las células del TE euploides o viceversa (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017).

La existencia de diferentes tipos de mosaicismo, combinada con otros factores, hace que sea realmente complicado diagnosticar un embrión mosaico mediante PGT. Esto se debe a que en estos casos las células que se obtienen mediante la biopsia pueden no ser representativas de todo el embrión y dar lugar a un diagnóstico erróneo (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017; Huang *et al.*, 2019).

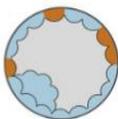
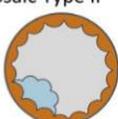
Mosaicism type	Possible TE biopsy	Diagnoses accuracy
Total Mosaic 	 Euploid	Misdiagnosis
	 Mosaic	Accurate
	 Aneuploid	Misdiagnosis
ICM Mosaic 	 Euploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)
TE Mosaic 	 Euploid	Misdiagnosis
	 Mosaic	Accurate
	 Aneuploid	Misdiagnosis
ICM/TE Mosaic Type I 	 Euploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)
ICM/TE Mosaic Type II 	 Aneuploid	Misdiagnosis (Mosaicism never detectable)

Figura 3. Tipos de mosaicismo que se pueden observar en blastocistos en función del linaje celular afectado, posibles resultados de biopsias de TE y del diagnóstico genético asociados a cada tipo de mosaico (Vera-Rodriguez & Rubio., 2017).

Por tanto, aunque las pruebas genéticas preimplantacionales mediante biopsia de TE constituyen una técnica rutinaria y fiable en las clínicas de reproducción asistida, presentan una serie de limitaciones. Son técnicas invasivas que pueden reducir la seguridad de las TRA afectando al desarrollo del embrión y a las tasas de implantación, solo se pueden realizar en embriones que cumplen determinadas características, requieren mucha experiencia y no superan las limitaciones impuestas por el fenómeno del mosaicismo, que da lugar a falsos positivos y falsos negativos porque únicamente implica el análisis de unas pocas células del TE, no de las células de la MCI, que dan origen al feto (**Figura 4**) (Huang *et al.*, 2019).

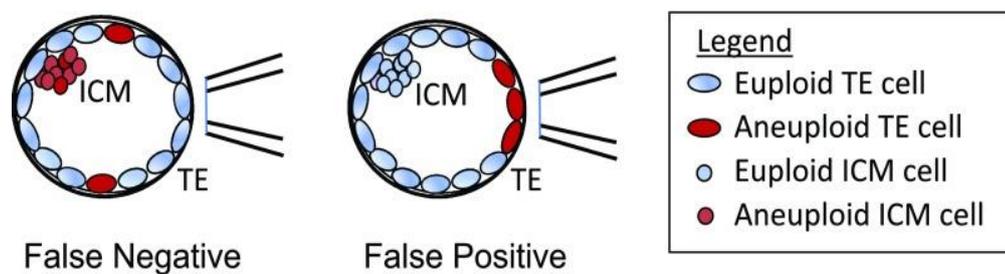


Figura 4. Representación de los posibles falsos positivos y falsos negativos que pueden resultar de un análisis genético de células embrionarias obtenidas por biopsia de TE de embriones mosaico (Huang *et al.*, 2019).

1.2.5 Futuro del PGT

A pesar de que el PGT ha ido evolucionando a lo largo de los años hasta alcanzar unas tasas de éxito realmente altas (alrededor del 90%), todos los métodos explicados previamente se basan en la extracción de células de ovocitos y embriones a partir de las cuales obtener muestras de material genético. En cualquier caso, se trata de técnicas invasivas que pueden afectar al desarrollo embrionario y comprometer su viabilidad. Además, presentan un alto coste e implican contar con equipos de micromanipulación y de láser muy sofisticados, con una alta disponibilidad de tiempo y con personal altamente especializado. Todo esto ha provocado que durante los últimos años se haya tratado de desarrollar nuevas pruebas menos invasivas con las cuáles se pueda realizar PGT. Este es el caso de la blastocentesis o el diagnóstico genético preimplantacional no invasivo

(niPGT) (Leaver & Wells., 2020). Estas técnicas deben cumplir dos requisitos para garantizar la obtención de diagnósticos precisos:

- Permitir el aislamiento y análisis del ADN de la muestra obtenida de forma fiable (Leaver & Wells., 2020).
- Demostrar que el ADN obtenido es representativo del embrión (Leaver & Wells., 2020).

Si ambos requisitos se cumplen, las nuevas técnicas de PGT menos invasivas pueden aportar un enfoque más simple, seguro, accesible y económico (Brouillet *et al.*, 2020; Leaver & Wells., 2020).

Como se ha explicado previamente, para que el embrión alcance el estadio de blastocisto es necesario que sus células se diferencien en células de la MCI y del TE. Además, se tiene que formar una cavidad llena de líquido conocida como blastocele (Greco *et al.*, 2020).

En 2013 Palini *et al.* descubrieron que hay ADN embrionario en el fluido del blastocele (ADN-BF) y que éste puede amplificarse y analizarse dando lugar a una nueva técnica de PGT conocida como blastocentesis. Desde entonces, también se ha demostrado la posibilidad de determinar el sexo del embrión directamente a partir del ADN-BF con el fin de detectar los embriones masculinos con alto riesgo de heredar trastornos ligados al sexo (Palini *et al.*, 2013).

La blastocentesis es un procedimiento mínimamente invasivo. Como se puede observar en la **Figura 5**, consiste en la aspiración del fluido del blastocele de un embrión, dejándole colapsado, mediante la utilización de una pipeta de ICSI con la que se perfora el TE con cuidado de no dañar la MCI (Leaver & Wells., 2020). Debe realizarse en blastocistos expandidos para que se pueda recolectar un volumen suficiente de fluido blastocélico (Brouillet *et al.*, 2020).



Figura 5. Aspiración del fluido del blastocele de un blastocisto expandido de día 5 mediante la técnica de la blastocentesis (Palini *et al.*, 2013).

Desde que se descubrió la existencia del ADN-BF, se han realizado numerosos estudios en los que se ha llegado a la conclusión de que, aunque esta técnica presenta las ventajas de ser menos invasiva para el blastocisto y de requerir menor formación del personal y menor gasto, es complicado aislar y amplificar el ADN-BF obtenido porque es de mala calidad, está degradado y se encuentra en una baja cantidad en el fluido del blastocele. Además, se sospecha que podría existir contaminación materna y que dicho ADN podría provenir de células que están experimentando procesos de necrosis y apoptosis, lo que podría afectar a la fiabilidad y representatividad del diagnóstico. Por todo esto, porque los protocolos aún no están estandarizados y dado que la técnica no tiene suficiente reproducibilidad, actualmente la blastocentesis apenas tiene aplicación clínica, puesto que puede dar lugar a errores diagnósticos (Chen *et al.*, 2020; Leaver & Wells., 2020; Chen *et al.*, 2021).

Recientemente se ha demostrado la presencia de ADN libre de células (cf-DNA) en los medios utilizados para el cultivo de los embriones de FIV (SCM) que podría ser utilizado para realizar un niPGT. Esta técnica es realmente prometedora y presenta numerosas ventajas. A diferencia del PGT convencional y de la blastocentesis, el niPGT es un procedimiento completamente no invasivo (**Figura 6**). Además, la recolección del

cf-DNA es muy sencilla y no requiere una formación específica previa, reduce la carga de trabajo de un laboratorio y no afecta al desarrollo embrionario (Brouillet *et al.*, 2020).

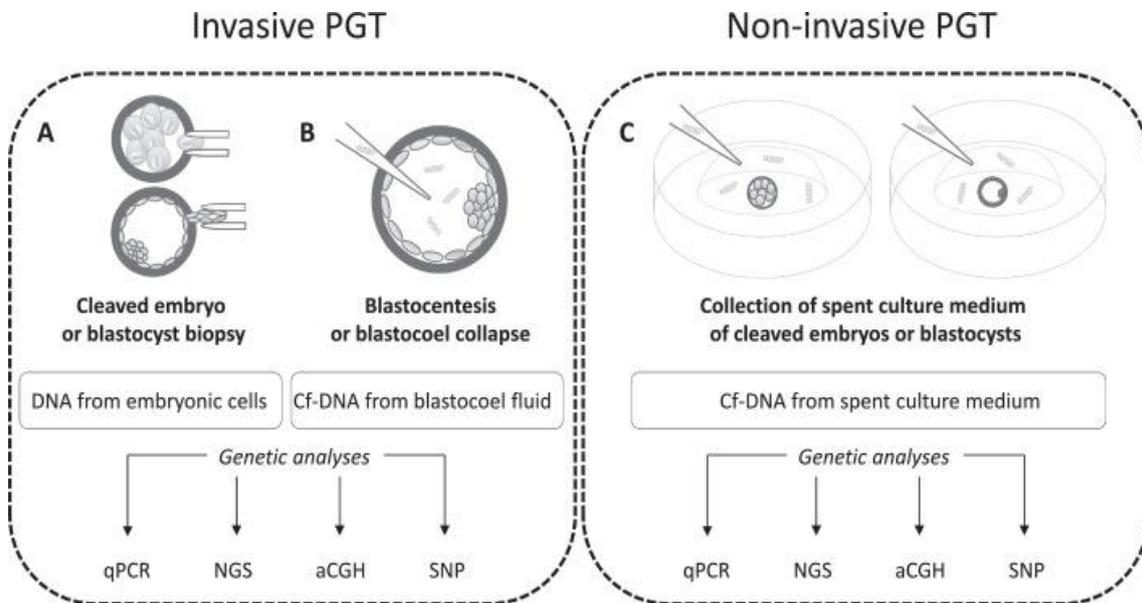


Figura 6. Tipos de PGT y análisis genéticos que se pueden realizar en cada caso (Brouillet *et al.*, 2020).

1.3 Diagnóstico genético preimplantacional no invasivo

El niPGT es una técnica que permite conocer el estatus cromosómico de un embrión mediante el análisis del ADN libre de células (cf-DNA) presente en el medio de cultivo en el que se ha desarrollado (SCM). Como el cf-DNA se puede aislar y secuenciar fácilmente, puede aportar un resultado indicativo del estado embrionario (Tomic *et al.*, 2022).

El cf-DNA se descubrió en 2013, cuando Stigliani *et al.* se plantearon la posibilidad de que la fragmentación embrionaria debería provocar la liberación de ADN genómico (ADNg) o mitocondrial (ADNmt) al medio de cultivo. Por ello, realizaron un estudio con el objetivo de comprobar si hay cf-DNA en el SCM. Descubrieron que en el SCM de los embriones humanos de día 2 y 3 se podía detectar ADN genómico (ADNg) y mitocondrial (ADNmt) libre y que éste podría ser utilizado para estudiar el estatus cromosómico de un embrión. También encontraron una correlación positiva entre la liberación de ADN y la

fragmentación de los embriones, de forma que se planteó que el cf-DNA podría ser un marcador de la calidad del embrión porque se encuentra en mayor cantidad en los medios de los embriones que se dividen peor y morfológicamente parecen de mala calidad. Además, se llegó a la conclusión de que los fragmentos son desechos citoplasmáticos que surgen durante el proceso de escisión (Stigliani *et al.*, 2013).

El origen del cf-DNA aún es desconocido. En primer lugar, se planteó que podría ser liberado a partir de células apoptóticas. Dado que las células aneuploides son más propensas a la apoptosis que las células euploides, el cf-DNA procedente de estas células debería dar lugar a más resultados aneuploides que la biopsia del TE, lo que podría reducir la fiabilidad de la técnica no invasiva. De hecho, se sugirió que los blastocistos con un TE aneuploide podrían presentar una mayor concentración de cf-DNA por los mecanismos embrionarios que existen para corregir las aneuploidías (Magli *et al.*, 2019; Navarro-Sánchez *et al.*, 2022). Esto parece ser así en el caso del ADN-BF, pero no en el del cf-DNA que es secretado al medio de cultivo, de forma que diferentes estudios sugieren que el cf-DNA del SCM puede proceder tanto de la MCI como del TE (Navarro-Sánchez *et al.*, 2022; Vera-Rodriguez *et al.*, 2018; Rubio *et al.*, 2020). Además, recientemente se ha comprobado que la apoptosis y la necrosis no son los únicos mecanismos liberadores de cf-DNA, ya que todos embriones liberan ADN al medio de cultivo durante su desarrollo, aunque los mecanismos involucrados en este proceso no están claros (Navarro-Sánchez *et al.*, 2022; Kuznyetsov *et al.*, 2020).

No obstante, a la hora de analizar el cf-DNA para realizar un niPGT hay que tener en cuenta que el cf-DNA del SCM no tiene únicamente origen embrionario, sino que existen otras posibles fuentes como es el caso de la contaminación de los corpúsculos polares, que siguen presentes en aproximadamente el 33% de los blastocistos, de las células del cúmulo o contaminaciones externas. Por tanto, es necesario minimizar al máximo este tipo de contaminación manipulando los medios en condiciones de asepsia para asegurar que no se contaminen y tratar de reducir al máximo la contaminación materna decumulando muy bien los ovocitos con el fin de que solo se analice el cf-DNA de origen embrionario (Navarro-Sánchez *et al.*, 2022). También se ha comprobado que la cantidad de ADNmt libre en el SCM depende de la duración del proceso de expansión del embrión y aumenta cuando hay colapsos en estadio de blastocisto. Además, se ha

demostrado que hay menos ADNmt en los medios procedentes de blastocistos que implantaron con éxito (Kobayashi *et al.*, 2020; Navarro-Sánchez *et al.*, 2022).

El hecho de que el cf-DNA pueda amplificarse con éxito en embriones de distinta calidad sugiere que realmente podría reflejar el estado cromosómico de un embrión. Como cada vez hay más pruebas que respaldan el origen embrionario del cf-DNA del SCM y dado que parece que este no procede únicamente de células apoptóticas y necróticas, el niPGT se presenta como una técnica realmente interesante y prometedora con muchas ventajas frente al PGT invasivo convencional. Numerosos investigadores han realizado diferentes estudios con el fin de comprobar la credibilidad de los resultados obtenidos mediante esta técnica comparándola con los que se obtienen mediante la biopsia de TE, que han demostrado ser consistentes y fiables (Navarro-Sánchez *et al.*, 2022).

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

A pesar de que las técnicas de PGT convencionales son una herramienta imprescindible a la hora de seleccionar los embriones que van a ser transferidos al útero materno, todas ellas constituyen procedimientos invasivos y presentan numerosas limitaciones. Esto ha llevado a la aparición de nuevas técnicas de PGT entre las cuales destaca el niPGT mediante el análisis del cf-DNA presente en el SCM. Esta metodología presenta los beneficios de ser una prueba no invasiva, sencilla y económica, cuyo empleo contribuiría al aumento del porcentaje de éxito de las TRA y a la reducción del tiempo hasta la consecución del embarazo. No obstante, aún se trata de una técnica muy novedosa, desconocida y poco estandarizada, por lo que no se realiza en la enorme mayoría de las clínicas.

Dadas las ventajas que puede ofrecer el niPGT, en el presente trabajo se pretende realizar una revisión bibliográfica del estado actual de dicha técnica con el fin de resolver la siguiente pregunta de investigación: ¿El niPGT está preparado para sustituir a las técnicas de PGT convencionales? Además, se han perseguido los siguientes objetivos secundarios:

- Comparar la concordancia de los resultados obtenidos con el PGT no invasivo y la biopsia de TE.
- Comparar el PGT no invasivo y la valoración morfológica de los embriones para la selección de los mejores embriones para transferir.
- Estudiar las aplicaciones clínicas del niPGT.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍAS

Para realizar la revisión bibliográfica se ha llevado a cabo una búsqueda exhaustiva de aquellos artículos de investigación y revisiones disponibles en la base de datos PubMed que están relacionados con la situación actual del niPGT. Se han incluido aquellos trabajos que están redactados en inglés y que han sido publicados desde el año 2016 hasta la actualidad. No obstante, se ha incorporado bibliografía adicional a partir de la utilizada por las publicaciones que se consideraron relevantes para el presente estudio.

También se han visualizado diferentes Webinars complementarios impartidos por expertos en la materia y ofrecidos por la empresa Igenomix.

Las palabras claves utilizadas para realizar la búsqueda bibliográfica fueron: niPGT-A, *mosaicism*, *blastocentesis*, cfDNA, *preimplantation genetic testing*, *cell free DNA* y *spent embryo culture media*.

4. RESULTADOS

Tras el descubrimiento realizado por Stigliani *et al.* en 2013, numerosos grupos de investigación se han interesado en la posible aplicación clínica del ADN libre liberado al SCM. Por ello, han realizado diferentes trabajos para comprobar la fiabilidad y eficacia del niPGT comparando los resultados obtenidos mediante el análisis del cf-DNA frente a los obtenidos por biopsia de TE, el método de PGT más utilizado actualmente, el estudio del embrión completo u otras técnicas de PGT convencionales.

En la **Tabla I**, que se encuentra al final del presente apartado, se puede observar un resumen de los resultados obtenidos hasta la fecha. No obstante, a continuación, se explican los trabajos más relevantes para la evolución del niPGT. En los estudios se han utilizado distintos protocolos, tipos de análisis genético y se han comparado múltiples técnicas con el fin de descubrir el mejor protocolo a seguir para obtener el porcentaje de concordancia más alto.

En 2016 se publicaron los primeros estudios en los que trataron de comprobar si era posible realizar un cribado genético preimplantacional utilizando técnicas de diagnóstico no invasivas (Shamonki *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016). Shamonki y colaboradores fueron los primeros que se interesaron por estas técnicas, aunque sus resultados no fueron muy prometedores, ya que obtuvieron una tasa de concordancia entre la biopsia de TE y la prueba no invasiva del 3,5%. No obstante, destaca el estudio realizado por el grupo de investigación de Xu. En este trabajo compararon los resultados obtenidos a partir del análisis del cf-DNA del SCM con los de un análisis cromosómico a partir de los blastocistos completos. Los embriones fueron fertilizados mediante ICSI y se vitrificaron en día 3. Posteriormente, se desvitrificaron y se colocaron individualmente en un medio de cultivo fresco, donde se desarrollaron hasta día 5, cuando se recogieron las muestras de SCM. Tras ello, se analizaron dichos medios y los embriones completos mediante MALBAC-NGS utilizando una plataforma Illumina (**Figura 7**) (Xu *et al.*, 2016).

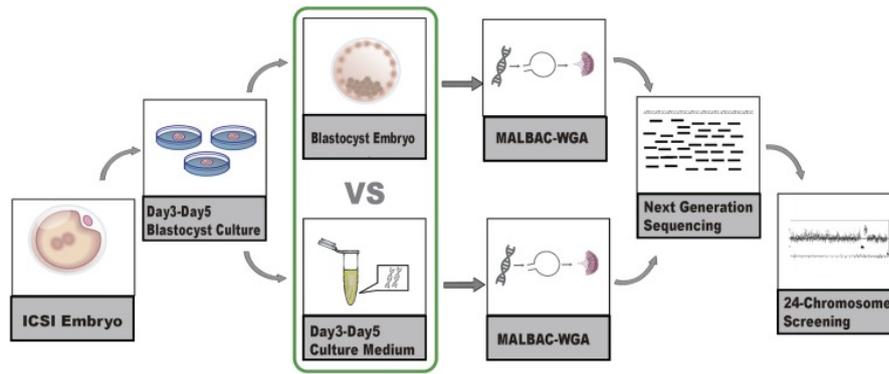


Figura 7. Protocolo a seguir para realizar el cribado cromosómico no invasivo de los embriones (Xu *et al.*, 2016).

Obtuvieron resultados de las 42 muestras y observaron que la concordancia entre las dos técnicas fue del 85,7%. La especificidad de la prueba fue del 84%, la sensibilidad del 88,2%, el valor predictivo negativo (VPN) fue 91,3% y el valor predictivo positivo (VPP) fue del 78,9% (Xu *et al.*, 2016). En la **Figura 8** se pueden observar algunos resultados del estudio.

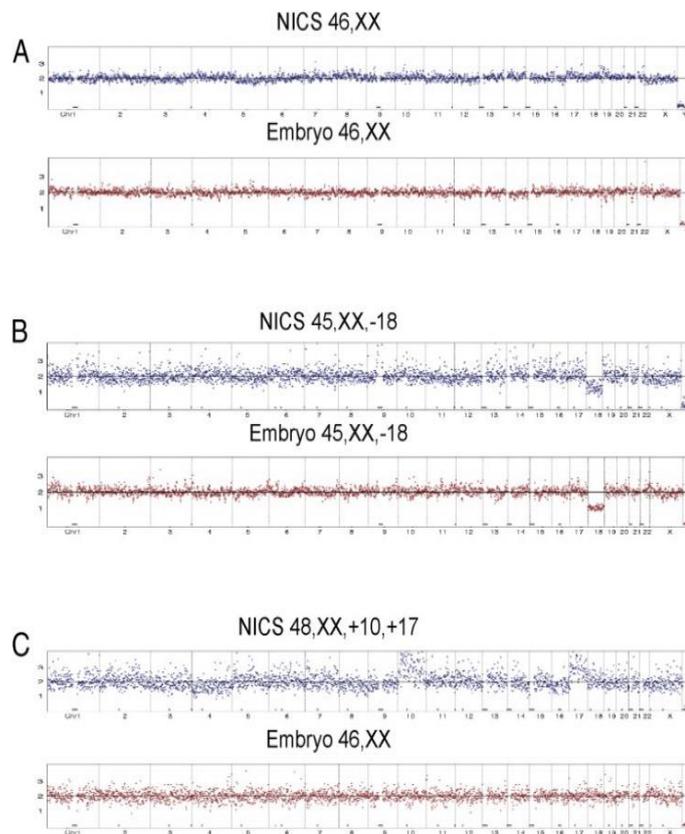


Figura 8. Ejemplos de resultados del cribado cromosómico de los embriones comparando la técnica no invasiva y el análisis de los blastocistos completos. En la figura A se puede observar un resultado

concordante que indica que se trata de un embrión euploide. La figura B también muestra un resultado concordante de un embrión que presenta una pérdida en el cromosoma 18. Por último, la Figura C muestra resultados discrepantes, de forma que el análisis del embrión completo identifica un embrión normal mientras que la prueba no invasiva muestra ganancias en los cromosomas 10 y 17 (Xu *et al.*, 2016).

También realizaron un cribado cromosómico no invasivo de 3 embriones de un paciente con una translocación equilibrada t(14;15) (q22;24). En 2 de los 3 embriones se detectaron anomalías cromosómicas, mientras que el otro fue transferido y dio lugar a un recién nacido sano. Los dos blastocistos afectados se recolectaron y lisaron para comparar el resultado obtenido con el del análisis del embrión completo y se obtuvieron los mismos resultados (Xu *et al.*, 2016).

En 2017 Feichtinger *et al.* realizaron un estudio muy similar a los dos anteriores, con la diferencia de que evaluaron la concordancia del análisis cromosómico de los CPs y del estudio del cf-DNA, obteniendo una concordancia del 72,2% (Feichtinger *et al.*, 2017).

En 2018 el grupo de investigación de Vera-Rodríguez *et al.*, investigó el origen y la composición del cf-DNA presente en los SCM con el fin de saber si realmente representaba el estatus cromosómico del embrión.

Utilizaron 113 embriones humanos que se fertilizaron mediante ICSI. El día 3 de desarrollo embrionario trasladaron los embriones a un medio de cultivo fresco y les sometieron a eclosión asistida. El día 5 realizaron las biopsias de TE, vitrificaron los embriones y recolectaron el medio de cultivo en el que se habían desarrollado desde el día 3. Como se explica en la **Figura 9**, realizaron diferentes pruebas a partir de las muestras obtenidas.

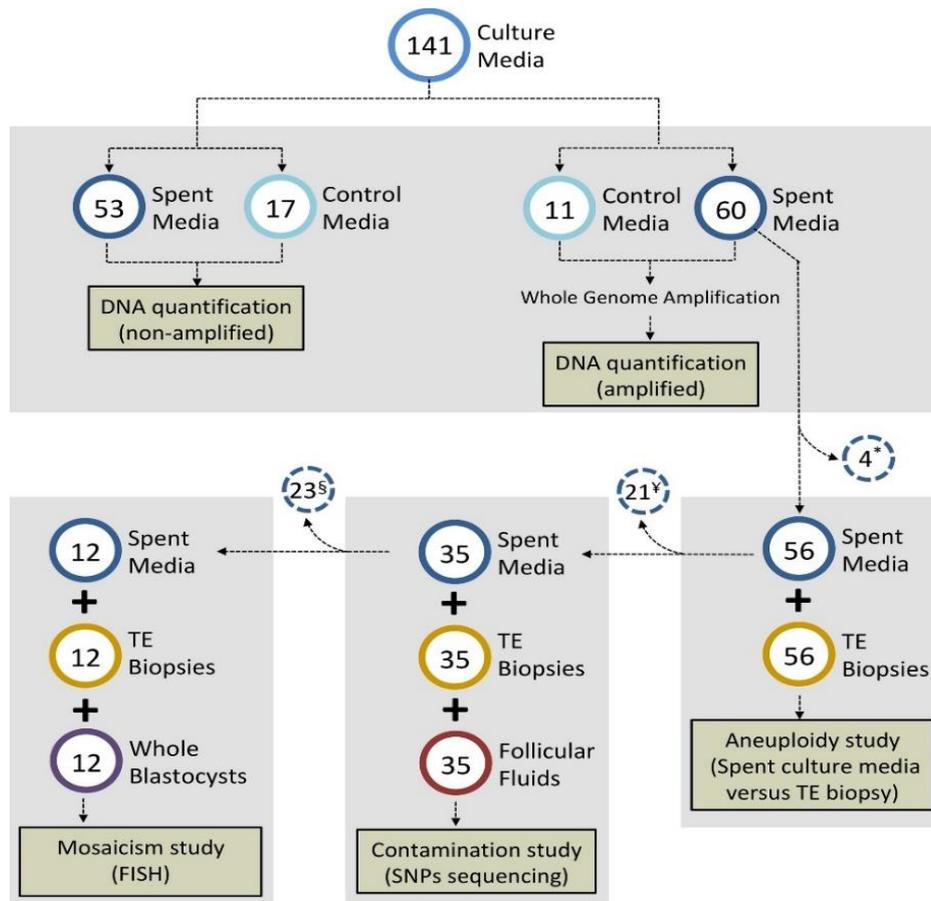


Figura 9. Esquema representativo del estudio. Los medios de cultivo recolectados se clasificaron en función de si habían sido amplificados, diferenciando las muestras de SCM y las muestras control. Además, el diagrama de flujo refleja que se utilizaron otras muestras además de los SCM para realizar las diferentes pruebas, como es el caso de biopsias de TE para el estudio de aneuploidías, biopsias de TE y fluidos foliculares para el estudio de contaminación materna, y biopsias de TE y blastocistos completos para el estudio de mosaicismo (Vera-Rodríguez *et al.*, 2018).

En este trabajo analizaron 28 gotas de medio de cultivo como controles. Estas habían sido mantenidas en las mismas condiciones que el SCM con la diferencia de que no estuvieron en contacto con embriones. Como se puede comprobar en la **Figura 10**, observaron diferencias significativas entre la cantidad mediana de ADN de los medios de cultivo utilizados y las muestras de control. Además, estas diferencias permanecieron después de la amplificación. Por otro lado, no se vieron diferencias entre la cantidad de cf-DNA entre embriones de distinto sexo ni entre embriones euploides y aneuploides (Vera-Rodríguez *et al.*, 2018).

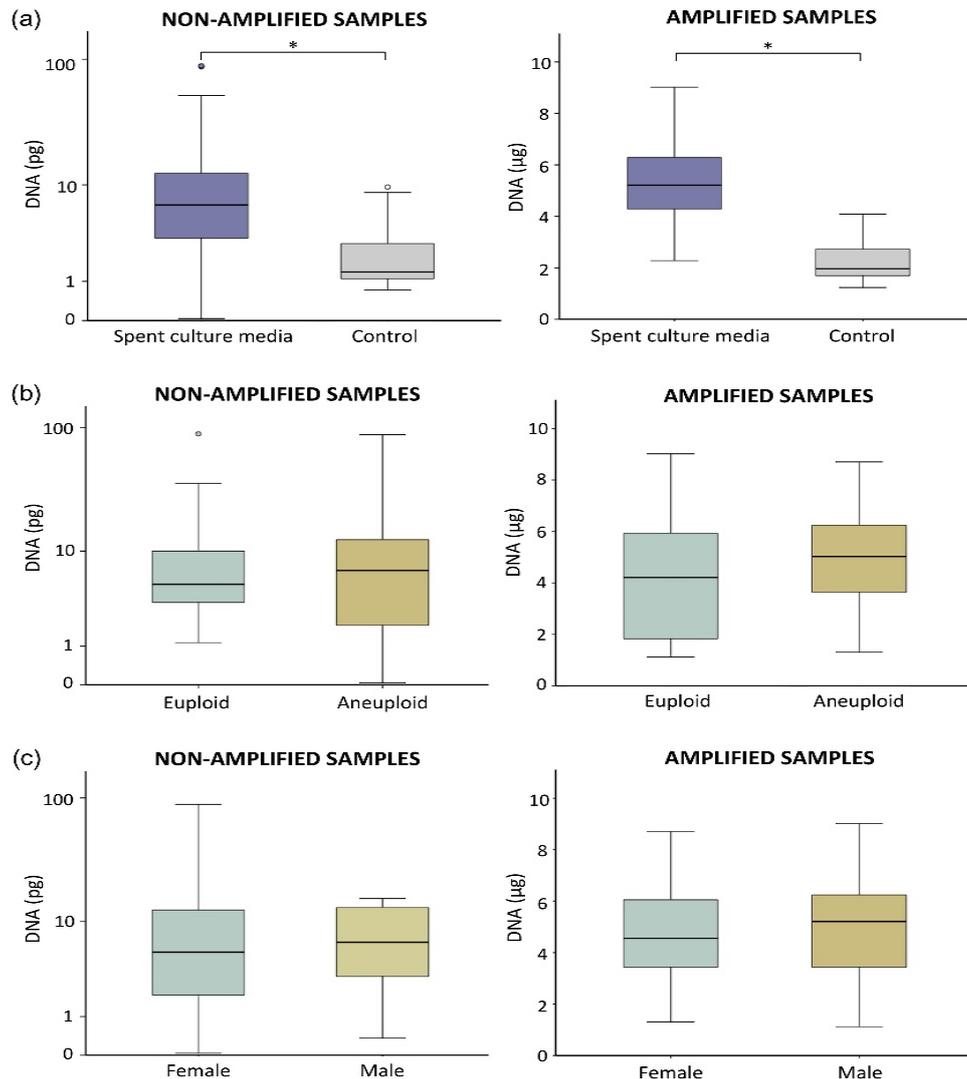


Figura 10. Representación mediante diagramas de cajas del resultado del estudio de cuantificación de cf-DNA en SCM y en muestras control (A), en SCM de embriones euploides y aneuploides (B) y en SCM de embriones femeninos y masculinos (C) (Vera-Rodríguez *et al.*, 2018).

Emplearon 56 embriones para comparar el resultado del estudio cromosómico del cf-DNA de los medios de cultivo embrionarios y la biopsia de TE y observaron que la concordancia entre las dos técnicas fue del 30,4%. Se realizó secuenciación por SNP de muestras de SCM, líquido folicular y biopsia de TE para conocer el origen del cf-DNA del medio. Gracias a ello, comprobaron que la proporción de ADN embrionario presente en el SCM variaba entre el 0 y el 100%, con una mediana del 8%, siendo mayor en las muestras concordantes y menor en aquellas muestras con alta contaminación materna.

Por otro lado, la contaminación materna fue significativa en todas las muestras, variando entre el 86% del cf-DNA de origen materno y el 94%, lo que podría explicar la baja tasa de concordancia obtenida (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018).

Por último, se analizaron mediante FISH 12 blastocistos. 11 de ellos presentaban un patrón en mosaico y en el 75% de los casos los resultados del análisis del cf-DNA y del ADN del TE concordaban, de forma que mostraron resultados aneuploides para el TE y para el cf-DNA (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018).

En 2018 también se realizaron dos trabajos diferentes para comprobar si el análisis mediante NGS del cf-DNA aislado del SCM combinado con el análisis de ADN-BF podría usarse de forma fiable para realizar un cribado genético preimplantacional mínimamente invasivo (Kuznyetsov *et al.*, 2018.; Li *et al.*, 2018).

Kuznyetsov y colaboradores emplearon 47 embriones que fertilizaron mediante ICSI. 28 de los embriones estaban criopreservados en blastocisto porque se les había realizado anteriormente un PGT-A mediante biopsia de TE y habían resultado ser aneuploides, mientras que 19 fueron fertilizados y cultivados individualmente hasta el día 4, cuando se transfirieron a un nuevo medio de cultivo en el que se desarrollaron hasta el blastocisto. Tras ello, realizaron una biopsia de TE a los embriones en fresco y colapsaron los 47 blastocistos mediante pulsos láser para que el fluido del blastocele fuera liberado y se mezclara con el medio de cultivo. Finalmente, los embriones se vitrificaron y el medio de cultivo se congeló hasta su análisis. En este estudio, además de realizar el análisis genético de las muestras de medio de cultivo y fluido de blastocele de los embriones, también analizaron los blastocistos completos que habían sido desvitrificados (**Figura 11**) (Kuznyetsov *et al.*, 2018).

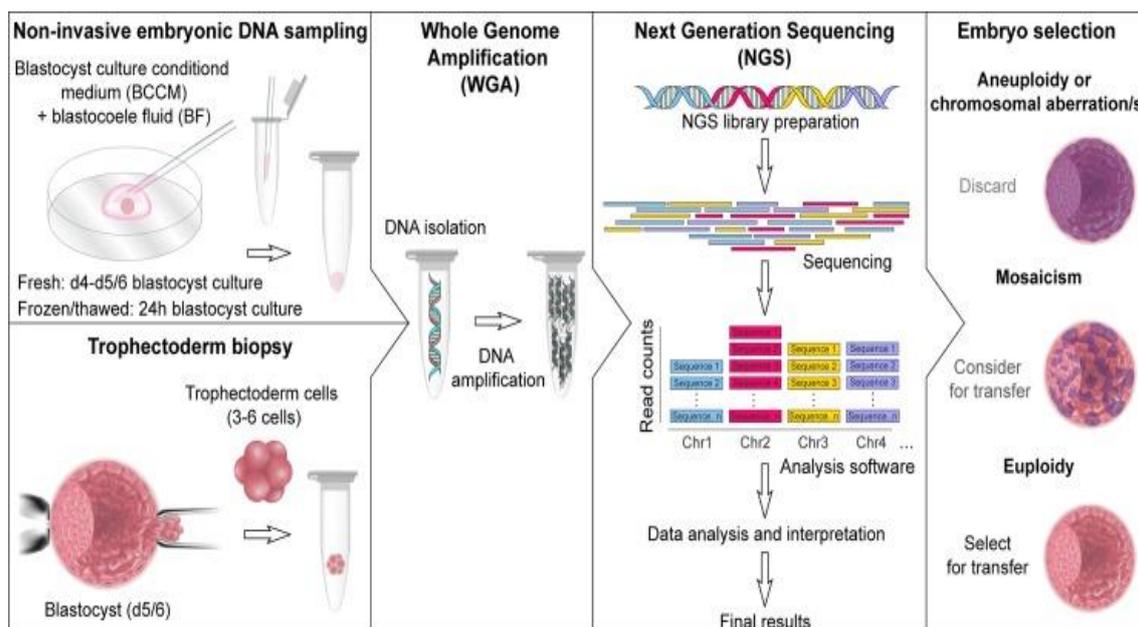


Figura 11. Esquema representativo del procedimiento seguido para la realización de las pruebas genéticas (Kuznyetsov *et al.*, 2018).

Pudieron trabajar con el 100% de las muestras. En el caso de los embriones desvitrificados la tasa de concordancia entre los resultados del análisis del SCM frente a la biopsia del TE fue del 87,5% y frente al análisis del embrión completo del 96,4%. Por otro lado, la concordancia entre la biopsia de TE y el análisis cromosómico de todo el embrión fue del 91,7%. Con los embriones en fresco observaron que la tasa de concordancia entre el análisis del medio de cultivo y la biopsia de TE fue del 100%. También comprobaron que el método no invasivo era capaz de detectar translocaciones desequilibradas (Kuznyetsov *et al.*, 2018).

A pesar de que los resultados obtenidos en el estudio anterior fueron muy optimistas (Kuznyetsov *et al.*, 2018), en el grupo de Li *et al.* también utilizaron una técnica similar, pero obtuvieron resultados mucho menos prometedores. En el 27,5% de los casos, se obtuvieron discrepancias entre la biopsia de TE y el embrión, en el 50% hubo resultados diferentes entre el análisis del cf-DNA y el del embrión completo y en el 55% había diferencias entre la biopsia de TE y el cf-DNA (Li *et al.*, 2018).

En 2019 Huang *et al.* utilizaron 52 embriones vitrificados que habían sido previamente sometidos a PGT mediante biopsia de TE. Los blastocistos fueron desvitrificados y cultivados individualmente en microgotas durante 24h. Tras ello, recolectaron el SCM y analizaron tanto el cf-DNA como todo el embrión mediante NGS (**Figura 12**) (Huang *et al.*, 2019).

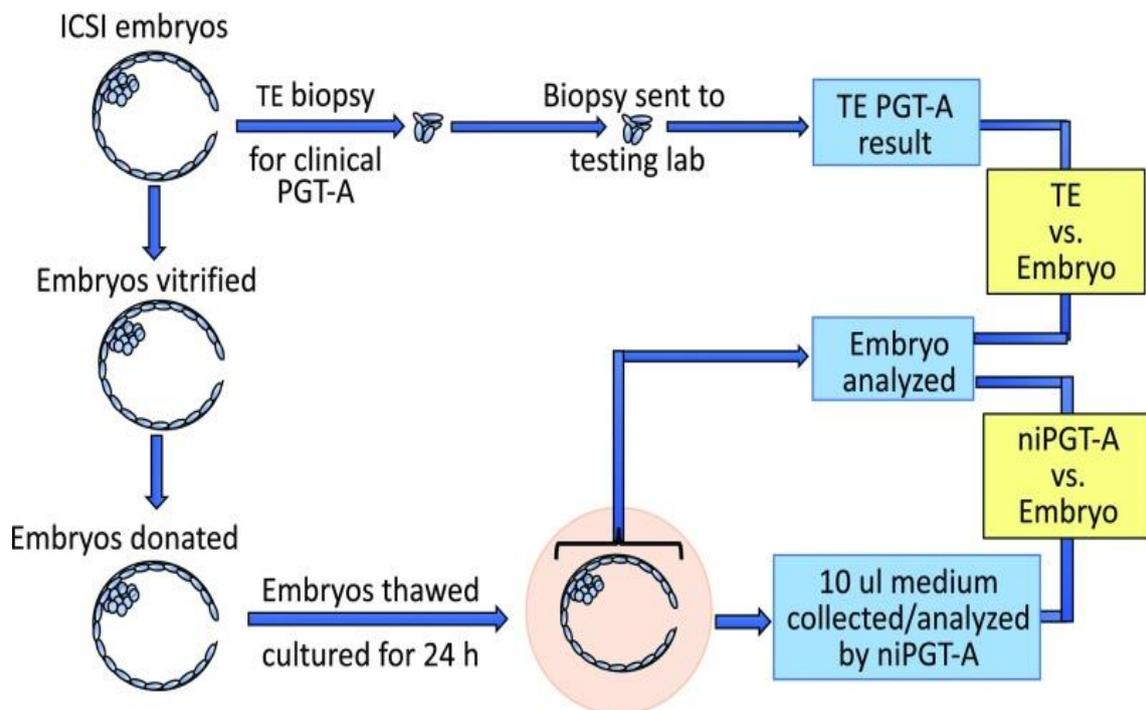


Figura 12. Esquema representativo del protocolo seguido para realizar el análisis genético a partir de las diferentes muestras (Huang *et al.*, 2019).

En este estudio todas las muestras amplificaron con éxito, pero solo el 92,3% dieron resultados informativos (Huang *et al.*, 2019). El trabajo destaca porque para obtener unos resultados más fiables, los investigadores establecieron un umbral de mosaicismo para el niPGT-A que fue del 60%, ya que, como refleja la **Figura 13**, en este valor el resultado de falsos negativos fue del 0% y la de falsos positivos era mínima (Huang *et al.*, 2019).

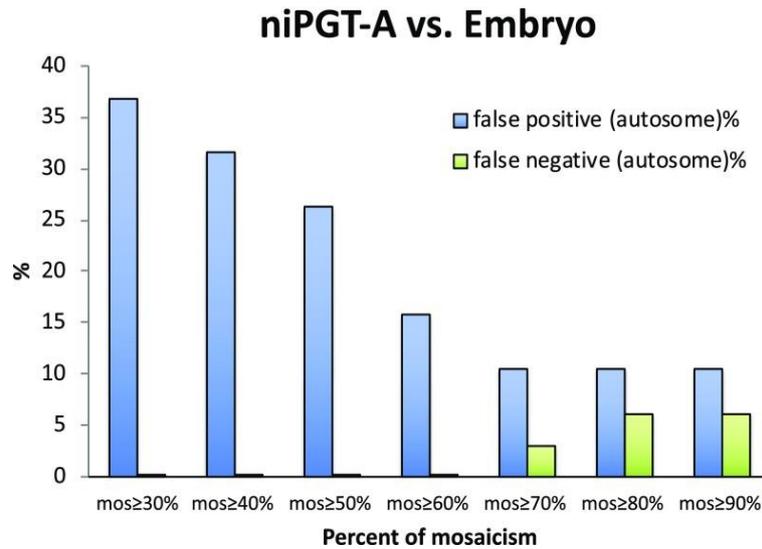


Figura 13. Tabla que refleja la tasa de falsos positivos y falsos negativos obtenidos mediante niPGT-A en función del porcentaje de mosaicismo (Huang *et al.*, 2019).

Obtuvieron una concordancia del 93,8% entre los resultados del niPGT-A y del embrión completo y del 82% entre los resultados de la biopsia del TE y del embrión completo. No se observaron falsos negativos, el porcentaje de falsos positivos fue del 20% mediante niPGT-A y del 50% mediante biopsia del TE y el VPP fue del 91,7% mediante niPGT-A y del 78% mediante biopsia de TE. Por otro lado, la sensibilidad de ambas técnicas fue del 100% y la especificidad fue del 80% por el análisis del medio de cultivo y del 50% mediante la biopsia de TE. Además, se observó que el niPGT-A fue capaz de detectar mosaicismo en un embrión a pesar de que esto no fue posible mediante la biopsia de TE (Huang *et al.*, 2019).

En otro trabajo publicado el mismo año con 168 embriones emplearon un umbral de mosaicismo del 30% y obtuvieron una concordancia del 62,1% para los cromosomas autosómicos y del 82,4% para los cromosomas sexuales (Yeung *et al.*, 2019).

Rubio *et al.* investigaron si el cf-DNA del medio de cultivo es representativo del estatus cromosómico de los embriones y estimaron la concordancia entre la biopsia de TE y el cf-DNA del medio de cultivo (Rubio *et al.*, 2019).

Utilizaron 115 blastocistos fertilizados por ICSI que en día 4 fueron lavados y transferidos individualmente a gotas de 10 microlitros de medio fresco para minimizar la cantidad de medio, lo que permite aumentar la concentración de cf-DNA y reducir el porcentaje de ADN degradado. Realizaron una biopsia de TE en día 5, 6 o 7 de desarrollo según la morfología embrionaria y recogieron y congelaron el medio de cultivo de los embriones. Obtuvieron resultados informativos para el 99,1% de las muestras de biopsia de TE y para el 94,8% de las de medio de cultivo. Además, observaron que las tasas de informatividad de las muestras de cf-DNA aumentaron significativamente los días 6 y 7 respecto al día 5. Finalmente, la tasa de concordancia entre las dos técnicas fue del 78,7%, siendo significativamente mayor para las muestras de día 6/7 que para las de día 5. La sensibilidad fue del 94,5% y la especificidad del 71,7% (Rubio *et al.*, 2019).

En el mismo estudio se transfirieron 29 embriones que eran euploides según los resultados obtenidos por las biopsias de TE, diferenciando un grupo en el que el resultado de la biopsia y del niPGT concordaban y un grupo en el que la biopsia indicaba que los embriones eran euploides mientras que el niPGT determinaba que eran aneuploides. La tasa de implantación de aquellos embriones que eran euploides según las dos técnicas fue del 52,9% mientras que la de los embriones que eran euploides según la biopsia de TE pero aneuploides según el análisis del medio de cultivo fue del 16,7%. No se observaron abortos espontáneos en aquellos casos en los que tanto la biopsia de TE como el medio de cultivo mostraron resultados euploides (Rubio *et al.*, 2019).

Dados los resultados de dicho trabajo, en 2020 se realizó un estudio multicéntrico internacional dirigido por Rubio y colaboradores en el que participaron 8 centros de FIV. El objetivo era evaluar la concordancia y reproducibilidad de las pruebas no invasivas realizadas a partir del análisis de cf-DNA presente en SCM y la biopsia de TE convencional con el fin de valorar la aplicación clínica del niPGT-A.

Utilizaron 1301 blastocistos humanos procedentes de ovocitos frescos que fueron fertilizados mediante ICSI o FIV y se cultivaron siguiendo los protocolos habituales de cada laboratorio hasta el día 4, cuando se transfirieron individualmente a gotas de medio de cultivo fresco de 10 microlitros. El día 6 o 7 de desarrollo recolectaron el medio de

cultivo de los embriones y lo congelaron. Las muestras se analizaron mediante NGS y los resultados se compararon con los obtenidos mediante biopsia de TE. Se obtuvieron resultados informativos para 866 muestras (**Tabla II**) y la tasa de concordancia entre las biopsias TE y cf-DNA fue del 78,2%, variando del 72,5 % al 86,3 % en diferentes centros (Rubio *et al.*, 2020).

Tabla II. Tabla que muestra los resultados de concordancia entre las biopsias de TE y el cf-DNA, de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo obtenidos en los diferentes centros participantes en el estudio (Rubio *et al.*, 2020).

Statistical measures	Center 1	Center 2	Center 3	Center 4	Center 5	Center 6	Center 7	Center 8	Total
Concordance	75.6	77.1	81.8	86.3	84.2	85.0	72.5	77.0	78.2
Sensitivity	80.5	84.8	88.2	86.7	91.3	76.7	76.5	78.9	81.7
Specificity	69.9	72.7	85.2	87.5	80.0	93.3	64.7	78.1	77.4
PPV	83.7	66.9	79.0	74.3	87.5	92.0	81.3	65.1	75.0
NPV	65.2	88.0	92.0	94.0	85.7	80.0	57.9	87.7	83.6

cfDNA, cell-free DNA; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; TE, trophectoderm.
Rubio. Embryonic cell-free DNA released to the spent blastocyst media. Am J Obstet Gynecol 2020.

También realizaron biopsias de la MCI de 81 embriones aneuploides donados para la investigación. Obtuvieron resultados informativos en el 97,5% de las biopsias de TE, el 90,1% de las muestras de cf-DNA y el 90,1 % de las biopsias de MCI. La concordancia observada entre el cf-DNA y la biopsia del TE fue del 87,5% y con la MCI del 84,4% mostrando que el cf-DNA embrionario proviene tanto del TE como de la MCI. Se comprobó que aquellos casos discordantes se debían al mosaicismo o a la contaminación materna (Rubio *et al.*, 2020).

Este trabajo permitió observar como variaban los porcentajes de concordancia entre las diferentes técnicas en función de la edad materna, las técnicas de fertilización, las condiciones de cultivo y de los profesionales que realizaran la técnica demostrando que los resultados del niPGT-A eran similares entre los distintos centros, lo que tiene importantes implicaciones para la aplicación clínica de la técnica, ya que se puede aplicar en diferentes laboratorios que utilicen un protocolo específico (Rubio *et al.*, 2020). Los resultados de algunas de estas pruebas se pueden observar en la **Figura 14**.

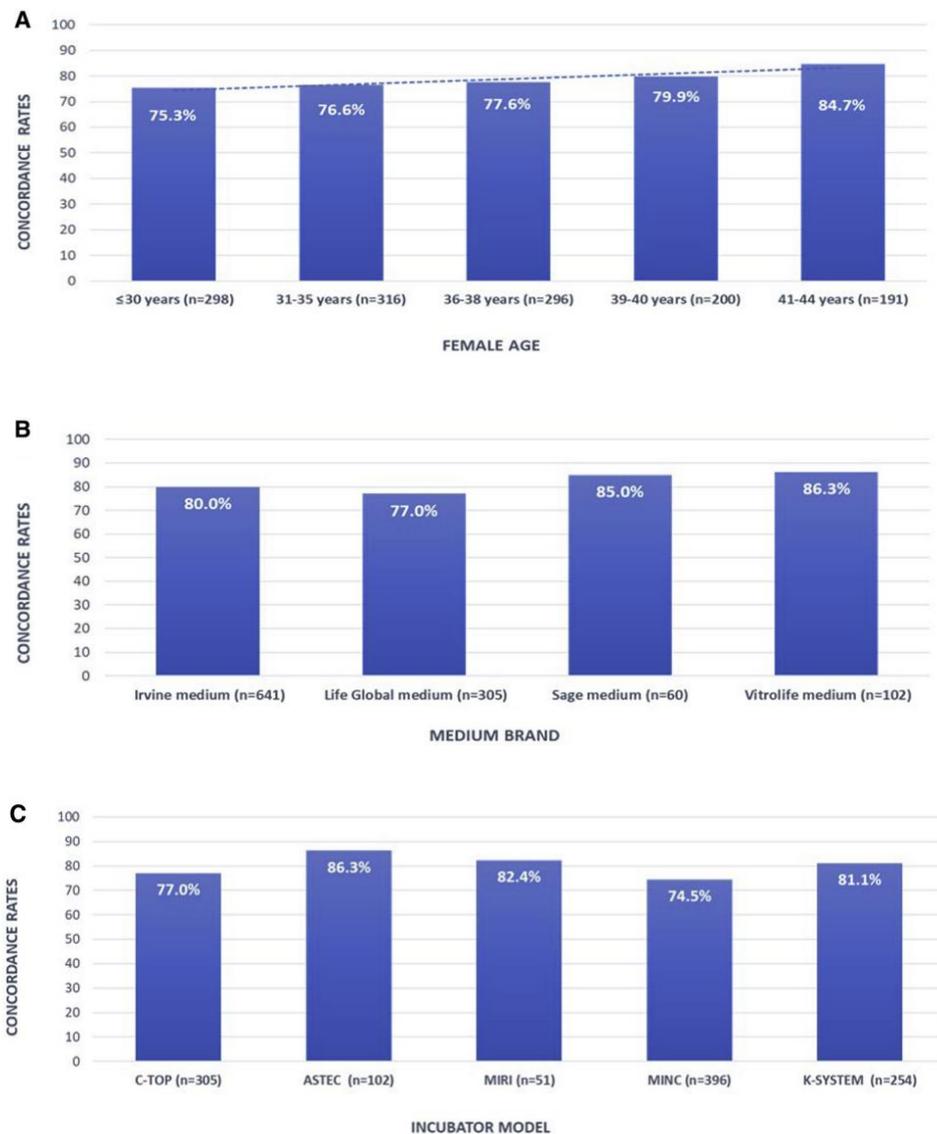


Figura 14. A) Tabla representativa de las tasas de concordancia de las distintas técnicas en función de la edad materna. No se observaron diferencias significativas, pero sí una tendencia al incremento de la tasa de concordancia a medida que aumenta la edad de la mujer. B) Tabla representativa de las tasas de concordancia de las distintas técnicas en función de las diferentes marcas de medio de cultivo. No se encontraron diferencias significativas. C) Tabla representativa de las tasas de concordancia de las distintas técnicas en función de los diferentes modelos de incubadora. No se encontraron diferencias significativas (Rubio *et al.*, 2020).

En 2021 se realizaron varias investigaciones para valorar si el niPGT estaba preparado para utilizarse rutinariamente como prueba capaz de detectar la presencia de

aneuploidías en los embriones (Gombos *et al.*, 2021; Lledo *et al.*, 2021; Shitara *et al.*, 2021) y valorar la fiabilidad de la técnica con embriones mosaico estableciendo un umbral de mosaicismo del 50% (Li *et al.*, 2021). También comenzó a valorarse la posibilidad de utilizarlo para identificar los embriones portadores de defectos monogénicos (Ou *et al.*, 2022).

Shitara y colaboradores utilizaron 20 blastocistos que se desvitrificaron y se expusieron a ácido Tyrodes con el fin de eliminar la ZP antes de realizar la biopsia de TE. En día 6 los investigadores realizaron una biopsia de TE a todos los embriones, recogieron y analizaron el SCM. En este caso, los embriones biopsiados se cultivaron hasta el día 10 de desarrollo, de forma que se evaluaron morfológicamente los embriones cada 24 horas y se tomaron muestras de aquellos que pararon su desarrollo en día 8 o en día 9 y de aquellos que llegaron a día 10 (Shitara *et al.*, 2021).

Las muestras se amplificaron (WGA) y analizaron mediante NGS. Obtuvieron resultados informativos del 95% de las muestras de biopsia de TE y de cf-DNA y del 85% de las muestras de los embriones de cultivo largo. De los embriones que llegaron a día 10, el 77,8% eran euploides según la biopsia de TE, el 80% según el niPGT-A y el 87,5% según el análisis de la muestra completa, debido a que los embriones aneuploides presentan un desarrollo deficiente. La tasa de concordancia entre la biopsia de TE y el niPGT-A fue del 55,6% para cromosomas autosómicos y del 94,4% para cromosomas sexuales, la tasa de concordancia entre la biopsia de TE y las muestras completas de los embriones fue del 43,8% para los cromosomas autosómicos y la del niPGT-A y la muestra completa fue del 56,3%. Observaron mayor precisión diagnóstica mediante niPGT-A gracias a la medida de la sensibilidad, especificidad, PPV, tasa de falsos positivos y de falsos negativos, lo que respalda la importancia de perfeccionar la metodología del niPGT-A (Shitara *et al.*, 2021).

En el grupo de investigación de Lledo realizaron 2 tipos de análisis genéticos diferentes a muestras de biopsias de TE y de cf-DNA de medio de cultivo utilizado por 92 embriones y no observaron diferencias significativas en la concordancia de las dos técnicas, que fue del 74,6% y del 72,3% (Lledo *et al.*, 2021).

Por otro lado, se publicó un estudio con 41 blastocistos mosaicos que valoraba el potencial del niPGT en aquellos casos en los que el resultado de la biopsia de TE era de embrión mosaico. En este trabajo establecieron un umbral de mosaicismo del 50% y la tasa de concordancia entre las dos técnicas fue del 85% (Li *et al.*, 2021).

Gombos y colaboradores realizaron un estudio con 542 embriones para desarrollar un método basado en la NGS que permitiera realizar de forma rutinaria pruebas genéticas preimplantacionales no invasivas. Este trabajo destaca porque se analizó el medio utilizado por los embriones hasta el día 3 de desarrollo, cuando fueron sometidos a eclosión asistida y transferidos a otros medios frescos, con el fin de poder conocer los resultados del niPGT-A a tiempo para poder realizar una transferencia en fresco. Posteriormente, los embriones se transfirieron con una tasa de embarazo del 34%. Se analizaron los medios de todos los embriones que habían resultado en abortos espontáneos y un número equivalente de medios de embriones del grupo de recién nacidos sanos y observaron que en los SCM de los embriones que dieron lugar a un embarazo exitoso había menos cf-DNA de origen embrionario que en aquellos embriones que dieron lugar a un aborto. Además, se detectaron aneuploidías en los análisis de los medios del 75% de los embriones que dieron lugar a aborto y no en aquellos que resultaron en recién nacidos sanos. Por tanto, demostraron que es posible obtener los resultados de niPGT en 48 horas a partir de medios de cultivo de embriones de día 3, lo que muestra que las técnicas no invasivas podrían utilizarse en transferencias en fresco (Gombos *et al.*, 2021).

Se planteó la posibilidad de si el niPGT podría utilizarse para detectar enfermedades monogénicas presentes en los embriones. Para comprobarlo compararon la tasa de detección de beta-talasemia mediante el uso de PGT, medio de cultivo usado por embriones que contenía fluido del blastocele y medio de cultivo usado sin fluido del blastocele. Los embriones se fertilizaron mediante ICSI y fueron trasladados individualmente a gotas de 25 microlitros de medio fresco el día 3 de desarrollo. El día 5

o 6 de desarrollo realizaron una biopsia de TE a 59 blastocistos que dividieron en 2 grupos (**Figura 15**) de forma que el grupo A contaba con 26 embriones que se sometieron a un procedimiento para liberar el fluido del blastocele al medio de cultivo mientras que el grupo B contaba con 33 embriones que no fueron sometidos a ningún proceso adicional. Finalmente, recogieron 20 microlitros de los medios de cultivo de los embriones y realizaron el estudio genético de las muestras obtenidas. Para ello amplificaron el ADN mediante WGA y después lo analizaron por Sanger y NGS (Ou *et al.*, 2022).

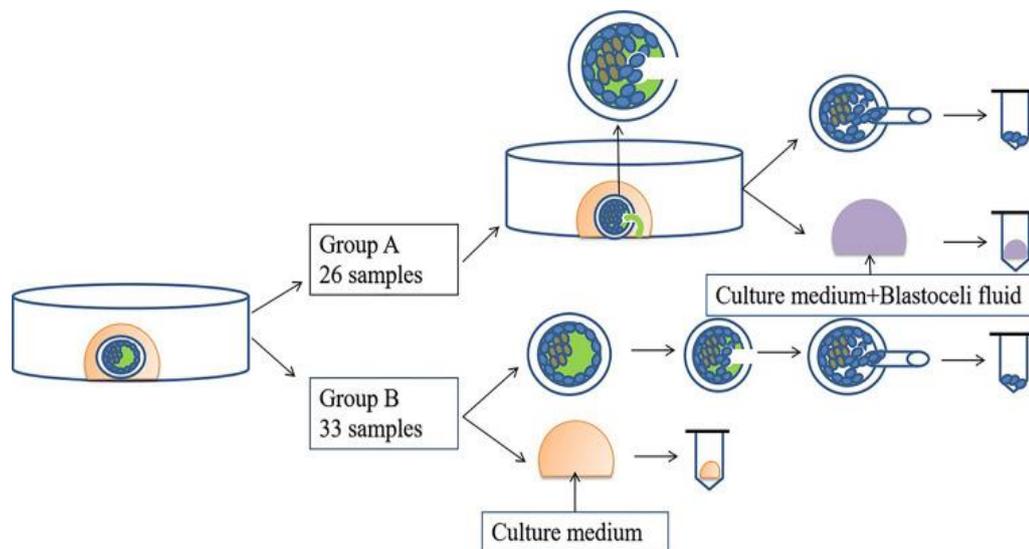


Figura 15. Esquema del protocolo seguido para realizar el estudio (Ou *et al.*, 2022).

Por último, la tasa de concordancia para la detección de la mutación de la alfa-talasemia fue del 73,1% en los embriones del grupo A y del 45,5% en los del grupo B (Ou *et al.*, 2022).

Otros estudios valoraron el niPGT como estrategia para priorizar los embriones a transferir. Siguieron protocolos similares y se obtuvieron tasas de concordancia entre el análisis cromosómico de las muestras de biopsia de TE y del cf-DNA del 81,8% (Sialakouma *et al.*, 2021) y del 71,43 % (Kulmann *et al.*, 2021), entre el análisis del embrión completo y el cf-DNA del 78,1% y entre las 3 técnicas del 72,5% (Chen *et al.*, 2021).

Tabla I. Resumen de los resultados obtenidos por distintos grupos en relación con el niPGT.

Estudio	Técnica de análisis genético utilizada	Técnicas de PGT comparadas	Concordancia (%)
Shamonki <i>et al.</i> , 2016	aCGH	niPGT y biopsia de TE	3,5
Xu <i>et al.</i> , 2016	MALBAC-WGA + NGS	niPGT y blastocistos completos	85,7
Feichtinger <i>et al.</i> , 2017	aCGH	niPGT y biopsia CP	72,2
Vera-Rodriguez <i>et al.</i> , 2018	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	30,4
	FISH		75
Kuznyetsov <i>et al.</i> , 2018	WGA + NGS	niPGT + BF-DNA y biopsia de TE	87,5-100
		niPGT + BF-DNA y blastocistos completos	96,4
Li <i>et al.</i> , 2018	WGA + NGS	niPGT + BF-DNA y biopsia de TE	72,5
		niPGT + BF-DNA y blastocistos completos	50
Huang <i>et al.</i> , 2019	WGA + NGS	niPGT y blastocistos completos	93,8
Yeung <i>et al.</i> , 2019	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	62,1 (crm autosómicos) 82,4 (crm sexuales)
Rubio <i>et al.</i> , 2019	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	78,7
Rubio <i>et al.</i> , 2020	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	78,2 -87,5
		niPGT y biopsia MCI	84,4
Shitara <i>et al.</i> , 2021	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	55,6 (crm autosómicos) 94,4 (crm sexuales)
Sialakouma <i>et al.</i> , 2021	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	81,8 (crm autosómicos) 100% (crm sexuales)
Kulmann <i>et al.</i> , 2021	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE	71,43
Lledo <i>et al.</i> , 2021	WGA + NGS (NICS)	niPGT y biopsia de TE	74,6
	WGA + NGS (Veriseq)		72,3
Chen <i>et al.</i> , 2021	WGA+ NGS	niPGT, biopsia de TE y blastocistos completos	72,5
		niPGT y blastocistos completos	78,1
Li <i>et al.</i> , 2021	WGA + NGS	niPGT y biopsia de TE (embrión mosaico)	85
Ou <i>et al.</i> , 2022	WGA + Sanger/ NGS	niPGT y biopsia de TE	45,5- 73,1

5. DISCUSIÓN

El futuro de la medicina está en las biopsias líquidas, aquellos procedimientos que consisten en analizar muestras de fluidos corporales que representan a los tejidos de los que proceden y presentan determinadas células circulantes, ácidos nucleicos libres de células (cf-DNA o cf-RNA) o vesículas extracelulares que pueden ser analizados y funcionan como marcadores específicos de determinadas enfermedades (**Figura 16**).

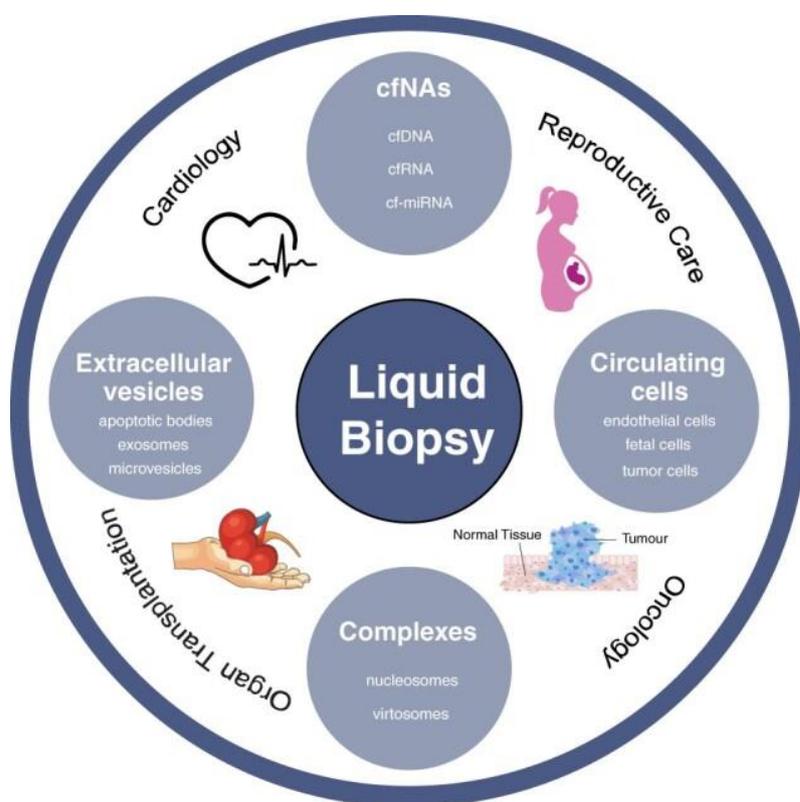


Figura 16. Esquema ilustrativo de las aplicaciones de la biopsia líquida y de los componentes analizables presentes en los fluidos corporales (Schobers *et al.*, 2021).

Estas técnicas tienen aplicaciones en muchos ámbitos de la medicina como es el caso de la Reproducción Asistida, ya que el análisis de ácidos nucleicos libres de células ha permitido numerosos descubrimientos como es el caso del niPGT o de la presencia de ADN libre de origen fetal en sangre materna, de forma que su análisis constituye una prueba prenatal no invasiva (Scalici *et al.*, 2014; Khalife *et al.*, 2021; Schobers *et al.*, 2021).

Como se ha ido viendo a lo largo del presente trabajo, el diagnóstico genético preimplantacional no invasivo mediante el análisis del ADN libre de células presente en el medio de cultivo en el que se han desarrollado los embriones es una técnica novedosa, prometedora, con aplicaciones clínicas muy interesantes y que está evolucionando rápidamente.

Muchos grupos de investigación han publicado estudios en los que valoraban su fiabilidad comparando el niPGT con la técnica de PGT más utilizada hoy en día, la biopsia de TE, o con otras técnicas como la biopsia de CP o el análisis de embriones completos. A pesar de que los resultados obtenidos en los distintos trabajos han ido mejorando a lo largo de los años, las tasas de concordancia entre las diferentes técnicas han sido enormemente variables. Lo más probable es que estas discrepancias se deban a que en cada estudio se ha seguido un protocolo distinto, se han analizado diferentes volúmenes de medio de cultivo, se ha sometido a los embriones a distintos procedimientos como es el caso de la vitrificación o de la eclosión asistida y se han utilizado tiempos de cultivo variables. Además, se han empleado distintos criterios para definir la tasa de concordancia (Li *et al.*, 2018; Rubio *et al.*, 2020). Esto refleja la importancia de optimizar un protocolo que permita obtener los resultados más fiables posible mediante niPGT antes de comenzar a realizar esta técnica en los laboratorios de reproducción asistida.

Los estudios también han contribuido al aumento de los conocimientos existentes respecto al origen del cf-DNA presente en los medios de cultivo de los embriones. Se ha demostrado que, a lo largo de su desarrollo, los embriones liberan ADN al SCM (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018). Según los conocimientos existentes hasta la fecha, el cf-DNA de origen embrionario presente en el SCM (ADNg o ADNmt) procede de células que experimentan procesos de necrosis y apoptosis, aunque se cree que deben existir otros mecanismos de liberación. Dado que tanto las células aneuploides como las euploides sufren estos procesos y que se ha observado que existe la misma cantidad de cf-DNA en medios de embriones euploides y aneuploides, el cf-DNA parece provenir de ambos tipos de células. Además, en diferentes trabajos se ha demostrado que el cf-DNA es representativo tanto del TE como de la MCI (Rubio *et al.*, 2020). De hecho, estudios realizados en animales demuestran que la proporción de células apoptóticas es mayor en la MCI que en el TE, de forma que, según estos trabajos, el cf-DNA proviene tanto del

TE como de la MCI y podría reflejar el estatus cromosómico de los blastocistos mejor que la biopsia de TE (Bolton *et al.*, 2016; Vera-Rodriguez *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2020; Shitara *et al.*, 2021; Sialakouma *et al.*, 2021). No obstante, hay que tener en consideración que el genoma embrionario no está representado de manera uniforme en los medios de cultivo, ya que mediante un análisis SNP se ha visto que la proporción de ADN embrionario en los medios varía entre el 0 y el 100%, con una mediana del 8% (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018). Además, es cierto que en algunos estudios se ha comprobado que hay menos cf-DNA en los medios de cultivo de aquellos embriones que se desarrollan peor o que dan lugar a abortos (Stigliani *et al.*, 2013; Gombos *et al.*, 2021).

En la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha los ovocitos en metafase II son decumulados y fertilizados por ICSI y el día 3 o 4 de desarrollo los embriones se trasladan individualmente a gotas de medio de cultivo fresco, en las que se desarrollan hasta el día 5 o 6, cuando se encuentran en estadio de blastocisto y se puede realizar la biopsia de TE. Por tanto, lo más habitual es que el cf-DNA analizado provenga de los medios de cultivo utilizados por los embriones del día 3 o 4 al día 5 o 6. No obstante, también se han realizado estudios con embriones desvitrificados que han sido cultivados durante periodos de tiempo inferiores y los resultados han sido igualmente exitosos (Xu *et al.*, 2016; Kuznyetsov *et al.*, 2018; Shitara *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). Se ha visto que es posible analizar el ADN libre del SCM en el que se desarrollan los embriones hasta el día 3 para conocer los resultados del estudio genético a tiempo para realizar una transferencia en fresco de los blastocistos, de forma que no fuera necesario criopreservarlos (Gombos *et al.*, 2021). En algunos estudios también se realiza eclosión asistida a los embriones en día 3 para facilitar la futura biopsia y la liberación de ADN al medio (Shamonki *et al.*, 2016; Feichtinger *et al.*, 2017; Yeung *et al.*, 2019). Se ha demostrado que trasladar los embriones individualmente a microgotas con un volumen mínimo de medio de cultivo aumenta la concentración de ADN libre en la muestra y, si esto se realiza preferentemente en día 4, reduce el porcentaje de ADN degradado en el medio (Rubio *et al.*, 2019). También se ha comprobado que si los embriones se cultivan hasta los días 6 o 7 el resultado es mejor que cuando se cultivan hasta día 5, lo que podría deberse a que a medida que aumenta el tiempo de cultivo del embrión en el SCM,

incrementa la cantidad de cf-DNA. (Rubio *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2020; Lledo *et al.*, 2021).

Diferentes grupos de investigación demostraron que, si se libera el fluido del blastocite para que este se mezcle con el medio de cultivo, aumenta la cantidad final de ADN libre en la muestra que va a ser analizada, reduciendo los fallos de amplificación e incrementando la fiabilidad del análisis (Kuznyetsov *et al.*, 2018), aunque otros investigadores no observaron esta ventaja (Li *et al.*, 2018).

El estudio multicéntrico realizado en 2020 en el que se buscaba determinar la concordancia entre el análisis cromosómico del cf-DNA y de la biopsia de TE es el más importante de los que se han realizado hasta ahora debido a su alto tamaño muestral y a que ha sido realizado simultáneamente en 8 centros diferentes. Tiene una enorme importancia, ya que utiliza diferentes condiciones de cultivo y fue completamente no invasivo (Rubio *et al.*, 2020). Ha demostrado que los diferentes protocolos de estimulación ovárica, el uso de distintos tipos de medios de cultivo o de incubadores y la calidad del embrión no afectan a la precisión de los resultados del niPGT. En este trabajo se obtuvo una alta tasa de concordancia media entre los diferentes centros entre la biopsia de TE y el niPGT (78,2%) (Rubio *et al.*, 2020).

En otro estudio se demostró que la concordancia entre la biopsia de TE y el niPGT tampoco depende de la técnica de análisis cromosómico utilizada (Lledo *et al.*, 2021).

Diferentes profesionales han llegado a la conclusión de que lo más habitual es que los falsos negativos obtenidos mediante niPGT se deban a la presencia de contaminación materna en la muestra procedente de células del cúmulo (Xu *et al.*, 2016; Feichtinger *et al.*, 2017; Kuznyetsov *et al.*, 2018; Sialakouma *et al.*, 2021). Debido a ello, se ha intentado optimizar un protocolo capaz de evitar al máximo la contaminación de las muestras con cf-DNA de origen materno o de otras fuentes. Es fundamental denudar los ovocitos con cuidado de eliminar lo máximo posible las células del cúmulo y, tras ello, lavarlos en diferentes gotas de medio fresco. También es recomendable que los ovocitos sean fertilizados mediante ICSI para evitar al máximo que la muestra se contamine por ADN de origen paterno procedente de los espermatozoides (Sialakouma *et al.*, 2021). No

obstante, también se puede realizar niPGT mediante FIV convencional, aunque en este caso seguramente haya que tener esto en cuenta a la hora de realizar el análisis genético y mantener una serie de precauciones.

Por otro lado, el origen de los falsos positivos parece explicarse por el fenómeno del mosaicismo (Xu *et al.*, 2016; Kuznyetsov *et al.*, 2018), aunque también podría deberse a que la proporción de cf-DNA de origen embrionario no es la misma en todos los medios de cultivo (Vera-Rodriguez *et al.*, 2018). Algunos estudios han tratado de solucionar el problema derivado del mosaicismo estableciendo un umbral de mosaicismo, es decir, un valor máximo a partir del cual el estudio cromosómico es capaz de detectar aneuploidías a partir del análisis del cf-DNA a pesar del mosaicismo, obteniendo mejores resultados (Huang *et al.*, 2019). No obstante, el valor óptimo en el que establecer el umbral de mosaicismo no está claro, ya que mientras algunos investigadores han decidido que debe ser del 30% (Yeung *et al.*, 2019) otros lo sitúan en el 50% (Li *et al.*, 2021) o en el 60% (Huang *et al.*, 2019).

También se ha planteado la posibilidad de ir más allá y utilizar esta técnica para identificar aquellos embriones con anomalías monogénicas o cromosómicas estructurales. En diferentes estudios se ha demostrado que la prueba no invasiva es capaz de detectar translocaciones equilibradas (Xu *et al.*, 2016) y desequilibradas (Kuznyetsov *et al.*, 2018) en los embriones. También se ha comprobado que en el futuro podría utilizarse para detectar enfermedades monogénicas, lo que sería de especial interés para pacientes de alto riesgo que tienen embriones que por sus características morfológicas no pueden ser biopsiados para realizar PGT-M (Ou *et al.*, 2022; Rogers *et al.*, 2021). Además, se ha visto en algunos estudios que la tasa de detección de una mutación monogénica mediante niPGT es mayor si se combina el análisis del ADN-BF con el del cf-DNA del medio de cultivo en el que se han desarrollado los embriones (Ou *et al.*, 2022).

Hasta ahora, la elección del orden de transferencia embrionaria ha dependido de criterios morfológicos o morfocinéticos en aquellos casos en los que no se realizaba PGT.

La evaluación morfológica de los embriones presenta las ventajas de ser una técnica rápida y no invasiva, pero se ha demostrado que no hay una relación significativa entre el estatus cromosómico de los embriones y su desarrollo morfológico, por lo que no evita transferir aquellos embriones con anomalías cromosómicas (Navarro-Sánchez *et al.*, 2022; Tomic *et al.*, 2022; Schobers *et al.*, 2021).

El niPGT-A es más fiable que la morfología embrionaria a la hora de seleccionar el mejor embrión para transferir, de forma que podría utilizarse para priorizar el orden de transferencia de una cohorte embrionaria, permitiendo acortar el tiempo hasta la consecución de un embarazo y evitar los inconvenientes derivados de las técnicas invasivas (Yeung *et al.*, 2019). De hecho, se podría establecer un sistema de puntuación basado en la probabilidad de que un determinado embrión presente anomalías cromosómicas que permitiera priorizar la transferencia de unos embriones frente a otros (Chen *et al.*, 2021). En un estudio explicado en el apartado anterior se comprobó que cuando se transferían embriones que eran euploides según la biopsia de TE y el análisis del cf-DNA la tasa de implantación era más alta que cuando los resultados de ambas técnicas discrepaban y que no había casos de abortos espontáneos, mientras que cuando se transfirieron embriones euploides según la biopsia de TE y aneuploides según la prueba no invasiva las tasas de embarazo se redujeron significativamente y se dieron casos de abortos espontáneos (Rubio *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que el análisis cromosómico del cf-DNA presente en el medio de cultivo utilizado por los embriones sería muy útil como prueba complementaria a la biopsia de TE para garantizar la transferencia de embriones euploides.

Son varios los investigadores que defienden que el niPGT-A tiene el potencial de superar a la biopsia de TE (Kuznyetsov *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Shitara *et al.*, 2021). Es evidente que esta técnica presenta ventajas importantes como que no es invasiva, requiere menos experiencia por parte de los embriólogos, es más económica y accesible. No obstante, es necesaria la realización de más estudios para seguir mejorando el protocolo a seguir, comprender mejor el origen del cf-DNA y los mecanismos involucrados en su liberación (Rubio *et al.*, 2020).

El niPGT podría ser especialmente interesante para aquellos pacientes en los que no está indicado realizar PGT-A porque *a priori* parecen fértiles, la mujer no tiene edad avanzada, no tienen abortos espontáneos previos o fallos de implantación etc, ya que podría utilizarse como método de selección embrionaria (Kulmann *et al.*, 2021). Lo mismo ocurre con aquellos pacientes que solo cuentan con blastocistos aneuploides o mosaicos porque el niPGT podría utilizarse como una herramienta complementaria para diagnosticar un mosaico y decidir si transferirlo o no (Chen *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

Es fundamental que los profesionales que se dispongan a realizar un análisis genético del cf-DNA presente en el medio de cultivo utilizado por embriones tengan en cuenta que la forma en la que se manipula el embrión durante su desarrollo es extremadamente importante, ya que afecta a la cantidad y calidad del cf-DNA y a su origen, de manera que es imprescindible eliminar al máximo las posibles fuentes de contaminación materna y trabajar en condiciones de asepsia (Rubio *et al.*, 2020; Rubio *et al.*, 2019). Además, el volumen del medio de cultivo con el que se trabaja es mínimo, puesto que se ha visto que cuanto más reducido sea, mejor es el desarrollo del embrión debido a que aumenta la concentración de determinados factores autocrinos que el embrión libera al medio y que contribuyen a que alcance la etapa de blastocisto. No obstante, para numerosos embriólogos trabajar con volúmenes tan pequeños puede suponer un desafío, afectando al éxito de dicha prueba. También se ha visto que la cantidad de cf-DNA presente en el SCM aumenta con los días de desarrollo embrionario, dando resultados más fiables. Puede suponer un inconveniente el hecho de que sea muy recomendable cultivar los embriones hasta día 6, ya que esto se refleja en un aumento del tiempo de trabajo y puede comprometer las instalaciones del centro (Rubio *et al.*, 2020). Además, es habitual que los embriones en día 6 se encuentren totalmente eclosionados, lo que puede complicar el proceso de vitrificación reduciendo sus tasas de éxito, que son excelentes en aquellos casos en los que el embrión está rodeado por la ZP.

Todos estos descubrimientos han permitido que la empresa Igenomix haya creado y comercializado un test basado en el niPGT conocido como EMBRACE (Embryo Analysis of Culture Environment) que clasifica los embriones en función de su estatus

cromosómico (Igenomix; 2019). Para que los resultados obtenidos por EMBRACE sean fiables se ha optimizado el siguiente protocolo (**Figura 17**):

1. Denudación del ovocito (día 0) o del cigoto (día 1) en función de la técnica de fertilización utilizada.
2. Lavado de los ovocitos o cigotos denudados individualmente en 6 gotas de 20 microlitros de medio de cultivo fresco.
3. Cultivo del día 0 al día 4, cuando el embrión se encuentre en estadio de mórula.
4. Lavado de las mórulas de forma individual en 6 gotas de 20 microlitros de medio de cultivo fresco.
5. Cultivo individual de los embriones en 10 microlitros de medio de cultivo hasta el día 6 o 7 ($\geq 40h$).
6. Vitrificación de los embriones en estadio de blastocisto.
7. Recolección del medio de cultivo utilizado por los embriones entre el día 4 y el día 6 o 7 con ayuda de una pipeta automática y entubado de las muestras.
8. Congelación a $-20^{\circ}C$ de las muestras de medio de cultivo al menos durante 12 horas.
9. Envío de la muestra a Igenomix para la realización del análisis cromosómico.

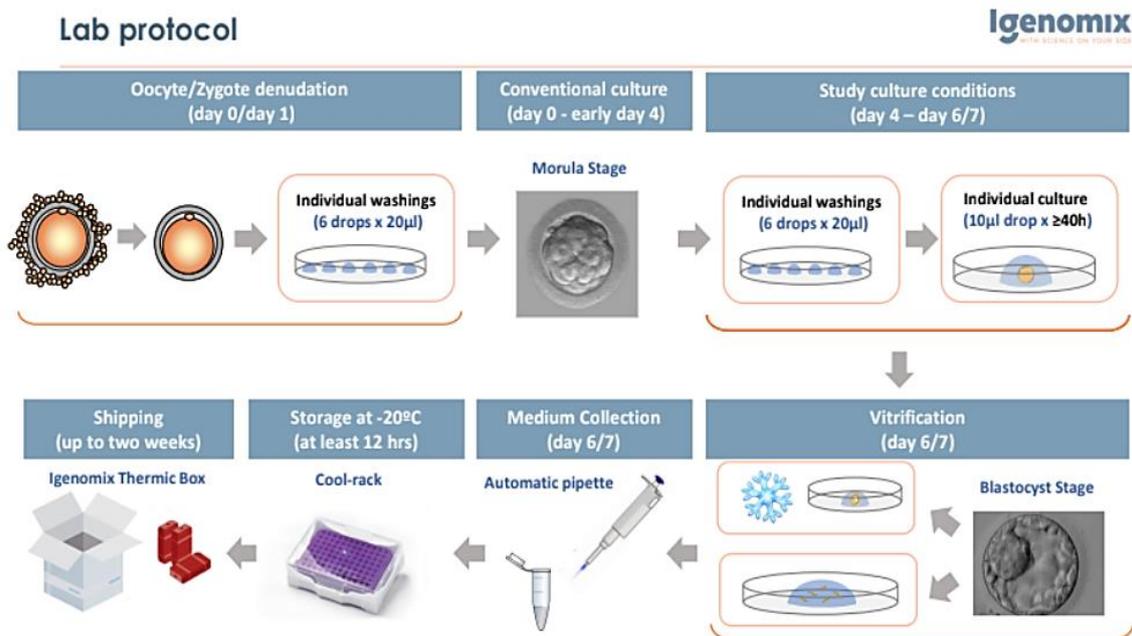


Figura 17. Protocolo de laboratorio a seguir para realizar EMBRACE (Igenomix; 2019).

EMBRACE permite que a cada muestra de medio de cultivo se le asigne una puntuación basada en las probabilidades que hay de que el embrión que se ha desarrollado en ese medio sea euploide. Por tanto, aquellas muestras que obtengan la puntuación más alta se transferirán antes que el resto (Igenomix; 2019).

Tras el análisis la empresa envía a la clínica un informe que recoge los resultados del test, entre los que se incluye el resultado del niPGT-A y el orden de prioridad en el que se recomienda transferir los embriones utilizados (Igenomix; 2019).

EMBRACE es una prueba no invasiva, objetiva, eficaz, segura, económica y accesible para un mayor número de pacientes. Presenta las mismas limitaciones que el resto de técnicas de niPGT, como la alta probabilidad de contaminación de la muestra, que la muestra de medio de cultivo se debe recoger el día 6 o 7 de desarrollo embrionario, aumentando las posibilidades de que los embriones eclosionen y compliquen los procesos de vitrificación y transferencia, y que ocasionalmente la calidad o la cantidad del cf-DNA de la muestra de medio de cultivo puede ser baja impidiendo la realización de la prueba genética, por lo que en algunos casos puede ser necesario realizar una biopsia de TE para asegurar los resultados del estudio (Igenomix; 2019).

A pesar de todo ello, ya se está realizando EMBRACE en numerosos laboratorios de reproducción asistida porque ha demostrado ser capaz de dar el mejor orden en el que se deben transferir los embriones en función de su análisis cromosómico. Gracias a esto, reduce el tiempo hasta la consecución de un embarazo y de un recién nacido sano en casa. Esta técnica está indicada para los pacientes con abortos de repetición o fallos de implantación recurrentes, pero es de especial interés en los casos en los que una mujer o pareja es de alto riesgo y cuenta con embriones que no se pueden biopsiar o en aquellos en los que simplemente se quiere reducir el número de transferencias embrionarias que son necesarias para lograr un embarazo (Igenomix; 2019).

Actualmente Igenomix está organizando un estudio en el que participarán, al menos, 8 centros de todo el mundo con el objetivo de comprobar si el niPGT-A mejora las tasas de embarazo evolutivo en la primera SET de un ciclo en comparación con la valoración morfológica de los embriones.

En mi opinión, el futuro del niPGT es realmente esperanzador y creo que las biopsias líquidas van a marcar un antes y un después en la medicina. Se trata de una técnica que presenta muchísimos beneficios porque permite eliminar el riesgo asociado a las biopsias, es relativamente sencilla, por lo que a diferencia de lo que ocurre con las técnicas de PGT convencionales, puede ser realizada por embriólogos con menos experiencia y también es económica, lo que facilitará que muchos de los pacientes dubitativos con indicación de PGT decidan realizar niPGT. El hecho de que además de económica no sea una prueba invasiva, hará que muchas parejas que, en principio no tienen recomendación de PGT, se planteen realizarlo para mejorar conseguir antes el ansiado recién nacido sano en casa.

Sin embargo, las clínicas que quieran comenzar a realizar niPGT tienen que tener muy en cuenta una serie de consideraciones. Para realizarla es recomendable aumentar el tiempo de cultivo hasta día 6 y se requiere vitrificar los embriones, por lo que el laboratorio debe contar con el tiempo necesario, las instalaciones adecuadas para ello (incubadores, tanques de almacenamiento) y con buenas tasas de éxito en programas de vitrificación y desvitrificación. También es necesario lavar a los embriones y cambiarlos de medio de cultivo en día 3 o 4, en función del protocolo. Aunque esto puede parecer insignificante, es necesario dedicar tiempo para realizarlo y también implica un aumento del gasto en medios de cultivo, placas etc. Se ha planteado que puede suponer una dificultad trabajar con gotas de medio de cultivo de un volumen tan pequeño, pero los embriólogos están acostumbrados a lavar y decumular los ovocitos en microgotas, por lo que, en mi opinión, con el adiestramiento necesario esto no debería suponer un reto adicional. Hay que mantener muchísimas precauciones para evitar al máximo contaminar con ADN el medio de cultivo. A día de hoy ya se trabaja en cabinas de flujo laminar y se intenta que las condiciones sean lo más estériles posible, pero para realizar niPGT todos estos aspectos deben cuidarse al máximo porque la contaminación podría alterar el resultado del estudio. También hay que decumular muy bien los ovocitos para evitar que haya contaminación materna porque no se hayan eliminado bien las células del cúmulo. Lo más habitual ya es realizar ICSI a aquellos embriones a los que se les van a realizar pruebas genéticas para evitar la contaminación paterna por la posible presencia de ADN de las cabezas de los espermatozoides que quedan adheridos a la ZP cuando se realiza una FIV convencional. En principio, esto sería igual en el caso del niPGT y no tendría

por qué suponer un desafío excepto en el caso de aquellas clínicas que no realicen PGT. De todas formas, se ha comprobado que también es posible practicar un niPGT si se ha realizado FIV, pero es necesario decumular muy bien después de la fecundación.

Considero que, dados los inconvenientes expuestos y los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación, esta técnica aún no está preparada para sustituir a la biopsia de TE y utilizarse de forma exclusiva como herramienta de diagnóstico, aunque en el futuro podría llegar a superar a las técnicas convencionales de PGT. No obstante, ha demostrado ser eficaz como herramienta de cribado capaz de determinar de forma objetiva el mejor orden en el que se deben transferir los embriones de una paciente en función de su condición genética o cromosómica. Opino que esta aplicación del niPGT puede ser realmente interesante para aquellas parejas que no tienen un riesgo alto de transmitir una determinada anomalía genética o cromosómica a su descendencia, ya que contribuiría a conocer lo que se puede esperar de cada embrión, a que las mujeres se quedaran embarazadas lo antes posible y a que los embarazos siguieran un curso normal, dando lugar a un recién nacido sano. Además, la combinación de esta técnica con la biopsia de TE garantizaría aún más la transferencia de embriones euploides y podría ayudar a tomar la decisión de si transferir embriones mosaicos.

También me parece muy importante que los pacientes que acudan a esta técnica y decidan realizar EMBRACE sean correctamente asesorados, de forma que logren comprender que lo que se les ofrece no es un diagnóstico como tal, sino que la prueba indica la probabilidad que hay de que un determinado embrión sea euploide y, basándose en ello, el orden en el que se recomienda transferir los embriones.

Siempre que se trabaje con un protocolo optimizado como es el caso del de Igenomix (EMBRACE) y que el laboratorio esté preparado para ello, considero que la técnica es suficientemente eficaz y fiable, por lo que es muy recomendable ofrecérsela a los pacientes. No obstante, no debe reemplazar a la biopsia de TE, especialmente en los casos de alto riesgo.

Es necesario que los diferentes grupos sigan investigando para que los protocolos se sigan optimizando hasta alcanzar las mejores tasas de concordancia entre la biopsia de TE y el niPGT. Además, también es interesante que se desarrolle la posible aplicación del

niPGT como herramienta para detectar la presencia de enfermedades monogénicas y de alteraciones cromosómicas estructurales en los embriones, ya que en este aspecto aún queda mucho trabajo por realizar.

6. CONCLUSIONES

A pesar de que hace menos de 10 años desde que se descubrió que era posible desarrollar una técnica de niPGT basado en el análisis de cf-DNA presente en el SCM, el tema ha sido objeto de tanto interés que se han publicado numerosos estudios en los que se buscaba comprobar si esta técnica es eficaz. Para ello, se han seguido distintos protocolos para encontrar el procedimiento más óptimo, se han obtenido diferentes resultados y se ha llegado a distintas conclusiones en cuanto a la posible aplicación de dicha técnica y a si esta está suficientemente preparada como para ser implementada.

Según los resultados expuestos:

- En los últimos trabajos publicados se han observado altas tasas de concordancia entre el análisis del cf-DNA del SCM y la biopsia de TE o el estudio del blastocisto completo, demostrando que el niPGT es una técnica fiable.
- La valoración morfológica de los embriones no es indicativa de su estatus genético o cromosómico por lo que el niPGT constituye una herramienta más objetiva para elegir el orden de transferencia de una cohorte embrionaria.
- Se ha comprobado la presencia de ADN libre de células en el medio de cultivo utilizado por los embriones cuyo análisis permite realizar un diagnóstico genético preimplantacional no invasivo. Sin embargo, a pesar de los resultados expuestos, el niPGT no está preparado para sustituir a las técnicas convencionales de PGT, pero es una técnica muy interesante que podría aplicarse para priorizar el orden de transferencia embrionaria y para cambiar las metodologías utilizadas actualmente para la selección de embriones a transferir en los laboratorios de FIV.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolton, H., Graham, S., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo, E., Voet, T., & Zernicka-Goetz, M. (2016). Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nature communications*, 7, 11165.
- Brouillet, S., Martinez, G., Coutton, C., & Hamamah, S. (2020). Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reproductive biomedicine online*, 40(6), 779–796.
- Chen, H. F., Chen, M., & Ho, H. N. (2020). An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 59(4), 489–495.
- Chen, L., Sun, Q., Xu, J., Fu, H., Liu, Y., Yao, Y., Lu, S., & Yao, B. (2021). A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing *in vitro* Fertilization Embryos for Implantation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 708322.
- ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen, E., Rubio, C., Christopikou, D., Dimitriadou, E., Gontar, J., Goossens, V., Maurer, M., Spinella, F., Vermeulen, N., & De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. *Human reproduction open*, 2020(3).

- Feichtinger, M., Vaccari, E., Carli, L., Wallner, E., Mädler, U., Figl, K., Palini, S., & Feichtinger, W. (2017). Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reproductive biomedicine online*, 34(6), 583–589.
- Gombos, K., Gálik, B., Kalács, K. I., Gödöny, K., Várnagy, Á., Alpár, D., Bódis, J., Gyenesei, A., & Kovács, G. L. (2021). NGS-Based Application for Routine Non-Invasive Pre-Implantation Genetic Assessment in IVF. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2443.
- Greco, E., Litwicka, K., Minasi, M. G., Cursio, E., Greco, P. F., & Barillari, P. (2020). Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4381.
- Hammond, E. R., McGillivray, B. C., Wicker, S. M., Peek, J. C., Shelling, A. N., Stone, P., Chamley, L. W., & Cree, L. M. (2017). Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and sterility*, 107(1), 220–228.
- Huang, L., Bogale, B., Tang, Y., Lu, S., Xie, X. S., & Racowsky, C. (2019). Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophoctoderm biopsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(28), 14105–14112.
- Igenomix (2019). *EMBRACE: Embryo Analysis of Culture Environment*. <https://www.igenomix.eu/genetic-solutions/embrace/>
- Khalife, D., Abu-Musa, A., Khalil, A., & Ghazeeri, G. (2021). Towards the selection of embryos with the greatest implantation potential. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 41(7), 1010–1015.

- Kimelman, D., Confino, R., Confino, E., Shulman, L. P., Zhang, J. X., & Pavone, M. E. (2018). Do patients who achieve pregnancy using IVF-PGS do the recommended genetic diagnostic testing in pregnancy?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(10), 1881–1885.
- Kobayashi, M., Kobayashi, J., Shirasuna, K., & Iwata, H. (2020). Abundance of cell-free mitochondrial DNA in spent culture medium associated with morphokinetics and blastocyst collapse of expanded blastocysts. *Reproductive medicine and biology*, 19(4), 404–414.
- Kulmann, M., Riboldi, M., Martello, C., Bos-Mikich, A., Frantz, G., Dutra, C., Donatti, L. M., Oliveira, N., & Frantz, N. (2021). First Baby Born in Brazil after Simultaneous Diagnosis through Non-Invasive and Conventional PGT-A. Primeiro bebê nascido no Brasil após diagnóstico simultâneo por PGT-A não-invasivo e convencional. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*, 43(11), 878–882.
- Kuznyetsov, V., Madjunkova, S., Antes, R., Abramov, R., Motamedi, G., Ibarrientos, Z., & Librach, C. (2018). Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PloS one*, 13(5).
- Kuznyetsov, V., Madjunkova, S., Abramov, R., Antes, R., Ibarrientos, Z., Motamedi, G., Zaman, A., Kuznyetsova, I., & Librach, C. L. (2020). Minimally Invasive Cell-Free Human Embryo Aneuploidy Testing (miPGT-A) Utilizing Combined Spent Embryo Culture Medium and Blastocoel Fluid-Towards Development of a Clinical Assay. *Scientific reports*, 10(1), 7244.
- Leaver, M., & Wells, D. (2020). Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics?. *Human reproduction update*, 26(1), 16–42.

- Li, H., Wu, C., Gu, X., & Xiong, C. (2012). A novel application of cell-free seminal mRNA: non-invasive identification of the presence of germ cells or complete obstruction in men with azoospermia. *Human reproduction*, 27(4), 991–997.
- Li, P., Song, Z., Yao, Y., Huang, T., Mao, R., Huang, J., Ma, Y., Dong, X., Huang, W., Huang, J., Chen, T., Qu, T., Li, L., Zhong, Y., & Gu, J. (2018). Preimplantation Genetic Screening with Spent Culture Medium/Blastocoel Fluid for in Vitro Fertilization. *Scientific reports*, 8(1), 9275.
- Li, X., Hao, Y., Chen, D., Ji, D., Zhu, W., Zhu, X., Wei, Z., Cao, Y., Zhang, Z., & Zhou, P. (2021). Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Human reproduction*, 36(7), 2020–2034.
- Lledo, B., Morales, R., Ortiz, J. A., Rodriguez-Arnedo, A., Ten, J., Castillo, J. C., Bernabeu, A., Llacer, J., & Bernabeu, R. (2021). Consistent results of non-invasive PGT-A of human embryos using two different techniques for chromosomal analysis. *Reproductive biomedicine online*, 42(3), 555–563.
- Magli, M. C., Albanese, C., Crippa, A., Tabanelli, C., Ferraretti, A. P., & Gianaroli, L. (2019). Deoxyribonucleic acid detection in blastocoelic fluid: a new predictor of embryo ploidy and viable pregnancy. *Fertility and sterility*, 111(1), 77–85.
- Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C., Rubio, C., & Simón, C. (2022). Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reproductive biomedicine online*, S1472-6483(22)00070-0. Advance online publication.
- Ou, Z., Deng, Y., Liang, Y., Chen, Z., & Sun, L. (2022). Improved Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Beta-Thalassemia Using Spent

Embryo Culture Medium Containing Blastocoelic Fluid. *Frontiers in endocrinology*, 12, 793821.

- Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M., & Bulletti, C. (2013). Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive biomedicine online*, 26(6), 603–610.
- Rogers, A., Menezes, M., Kane, S. C., Zander-Fox, D., & Hardy, T. (2021). Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Conditions: Is Cell-Free DNA Testing the Next Step?. *Molecular diagnosis & therapy*, 25(6), 683–690.
- Rubio, C., Rienzi, L., Navarro-Sánchez, L., Cimadomo, D., García-Pascual, C. M., Albricci, L., Soscia, D., Valbuena, D., Capalbo, A., Ubaldi, F., & Simón, C. (2019). Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertility and sterility*, 112(3), 510–519.
- Rubio, C., Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C. M., Ocali, O., Cimadomo, D., Venier, W., Barroso, G., Kopcow, L., Bahçeci, M., Kulmann, M., López, L., De la Fuente, E., Navarro, R., Valbuena, D., Sakkas, D., Rienzi, L., & Simón, C. (2020). Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *American journal of obstetrics and gynecology*, 223(5), 751.
- Scalici, E., Traver, S., Molinari, N., Mullet, T., Monforte, M., Vintejou, E., & Hamamah, S. (2014). Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Human reproduction*, 29(12), 2661–2669.
- Schobers, G., Koeck, R., Pellaers, D., Stevens, S., Macville, M., Paulussen, A., Coonen, E., van den Wijngaard, A., de Die-Smulders, C., de Wert, G., Brunner, H. G., & Zamani Esteki, M. (2021). Liquid biopsy: state of reproductive medicine and beyond. *Human reproduction*, 36(11), 2824–2839.

- Shamonki, M. I., Jin, H., Haimowitz, Z., & Liu, L. (2016). Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertility and sterility*, *106*(6), 1312–1318.
- Shitara, A., Takahashi, K., Goto, M., Takahashi, H., Iwasawa, T., Onodera, Y., Makino, K., Miura, H., Shirasawa, H., Sato, W., Kumazawa, Y., & Terada, Y. (2021). Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy. *PLoS one*, *16*(2).
- Sialakouma, A., Karakasiliotis, I., Ntala, V., Nikolettos, N., & Asimakopoulos, B. (2021). Embryonic Cell-free DNA in Spent Culture Medium: A Non-invasive Tool for Aneuploidy Screening of the Corresponding Embryos. *In vivo*, *35*(6), 3449–3457.
- Soler, A., Morales, C., Mademont-Soler, I., Margarit, E., Borrell, A., Borobio, V., Muñoz, M., & Sánchez, A. (2017). Overview of Chromosome Abnormalities in First Trimester Miscarriages: A Series of 1,011 Consecutive Chorionic Villi Sample Karyotypes. *Cytogenetic and genome research*, *152*(2), 81–89.
- Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human reproduction*, *28*(10), 2652–2660.
- Tomic, M., Vrtacnik Bokal, E., & Stimpfel, M. (2022). Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy and the Mystery of Genetic Material: A Review Article. *International journal of molecular sciences*, *23*(7), 3568.

- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, 62, 2–10.
- Vera-Rodriguez, M., & Rubio, C. (2017). Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertility and sterility*, 107(5), 1107–1112.
- Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., Mercader, A., Meseguer, M., Blesa, D., Moreno, I., Valbuena, D., Rubio, C., & Simon, C. (2018). Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human reproduction*, 33(4), 745–756.
- Wu, Y., Lv, Z., Yang, Y., Dong, G., Yu, Y., Cui, Y., Tong, M., Wang, L., Zhou, Z., Zhu, H., Zhou, Q., & Sha, J. (2014). Blastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice. *Cellular and molecular life sciences*, 71(9), 1761–1774.
- Xu, J., Fang, R., Chen, L., Chen, D., Xiao, J. P., Yang, W., Wang, H., Song, X., Ma, T., Bo, S., Shi, C., Ren, J., Huang, L., Cai, L. Y., Yao, B., Xie, X. S., & Lu, S. (2016). Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), 11907–11912.
- Yeung, Q., Zhang, Y. X., Chung, J., Lui, W. T., Kwok, Y., Gui, B., Kong, G., Cao, Y., Li, T. C., & Choy, K. W. (2019). A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-

generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(8), 1609–1621.

- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I.D., Simpson, J.L., van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Human Reproduction*, 32(9),1786-1801.
- Zeng, Y., Lv, Z., Gu, L., Wang, L., Zhou, Z., Zhu, H., Zhou, Q., & Sha, J. (2013). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) influences adrenal development and response to cold stress in resulting mice. *Cell and tissue research*, 354(3), 729–741.