

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

Análisis Genético Preimplantacional no invasivo y sus posibilidades para detectar mosaicismo. Artículo de revisión.

Autor: Leonor Calvo Fernández

Tutor: Cristina González Ravina

Alcobendas, Septiembre 2022

## Índice

<b>Resumen</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	4
<b>2. Objetivos</b> .....	8
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	9
<b>4. Resultados</b> .....	10
Origen del cfDNA .....	10
Mosaicismo en niPGT .....	11
<b>5. Discusión</b> .....	12
Origen del cfDNA .....	14
Mosaicismo en niPGT .....	15
<b>6. Conclusiones</b> .....	17
<b>7. Referencias</b> .....	18

## Resumen

El estado cromosómico de los embriones se analiza a través del análisis genético preimplantacional con una biopsia de trofoectodermo, si bien esta técnica a pesar de tener numerosas ventajas es altamente invasiva y tienen algunas limitaciones. Por ello en los últimos años se ha investigado una opción no invasiva a través del ADN libre embrionario liberado por el embrión al medio de cultivo. Los estudios que realizan este análisis genético no invasivo han conseguido resultados con altos porcentajes de concordancia entre el ADN libre embrionario y las biopsias de trofoectodermo y masa celular interna, concluyendo que las investigaciones van en el camino correcto para aplicar el análisis no invasivo y que el posible origen del ADN libre embrionario es tanto el trofoectodermo como la masa celular interna. Los mejores resultados en las tasas analizadas fueron conseguidos cuando se modificaba ligeramente la rutina diaria del laboratorio en aspectos como reducir el volumen de la gota, aumentar el tiempo de cultivo y evitar al máximo la contaminación tanto externa como materna. Uno de los mayores problemas dentro de los análisis genéticos es el mosaicismo, que consiste en encontrar varias líneas celulares en un solo embrión. Aplicando el análisis no invasivo para detectarlo se observó que este tipo de análisis puede ser más fiable para predecir el estado cromosómico de la masa celular interna que el análisis invasivo.

Palabras clave: niPGT, MCI, Trofoectodermo, cfDNA, medio de cultivo, mosaicismo

## 1. Introducción

Tradicionalmente, la selección de los embriones de FIV para su transferencia se ha basado en la evaluación morfológica de los mismos, aunque la morfología del embrión no permite determinar con exactitud el estado cromosómico de los mismos<sup>(1)</sup>. De hecho, algunos embriones que presentan una morfología óptima en estadio de blastocisto son aneuploides, lo que significa que atendiendo exclusivamente a su morfología serían elegidos para ser transferidos. Dependiendo del tipo de aneuploidía que presenten, algunos de estos embriones no implantarán, otros lo harán, pero terminarán en aborto y unos pocos darán lugar a recién nacidos con aneuploidías<sup>(2)</sup>. El análisis genético preimplantacional para aneuploidías (PGT-A) se ha propuesto como método para seleccionar los embriones de FIV con mayor potencial de implantación en función de su composición cromosómica<sup>(1)</sup>. La técnica más utilizada consiste en una biopsia invasiva del trofoctodermo seguida de una secuenciación de nueva generación (NGS). Esta técnica requiere de un equipo altamente entrenado de embriólogos ya que es un procedimiento muy complejo e invasivo<sup>(3)</sup>.

Desde hace algunos años, en la mayoría de los centros se recomienda realizar una transferencia electiva de un solo embrión (eSET), en la que el embrión con las mayores oportunidades de supervivencia es elegido para implantar y así reducir los riesgos que implica un embarazo múltiple<sup>(3)</sup>. La transferencia de un embrión euploide está asociada con un aumento de la probabilidad de implantación y una disminución del riesgo de aborto<sup>(1)</sup>, ya que las aneuploidías pueden causar fallo de implantación o aborto temprano, por lo tanto, hay una demanda en aumento de pruebas rutinarias para la selección de embriones euploides a transferir<sup>(3)</sup>.

La utilización del análisis genético preimplantacional para aneuploidías presenta numerosas ventajas, pero también algunas limitaciones. Por un lado, entre las ventajas del PGT-A se encuentran un aumento en la tasa de nacidos vivos en la primera transferencia de embriones, una mayor tasa de gestación, y una reducción del tiempo para concebir, del número de transferencias requeridas, y menores tasas de abortos, de embarazos múltiples y de costes. Estas ventajas son especialmente relevantes en los casos de edad materna avanzada<sup>(2)</sup>. Adicionalmente, el eSET favorecido por el uso del PGT-A también ha permitido reducir la morbilidad materna y neonatal asociada con los embarazos múltiples<sup>(1)</sup>. Sin embargo, el PGT-A no está exento de limitaciones, debidas principalmente al método en sí mismo, invasivo y complejo, que algunos autores han relacionado con una reducción en la calidad del embrión y una potencial causa de fallo de implantación<sup>(3)</sup>. Además, recientemente se ha descubierto que está ligada con un aumento significativo de la preeclampsia y los trastornos hipertensivos entre las madres<sup>(2)</sup>.

Los procedimientos con biopsias en embriones preimplantacionales conllevan desafíos técnicos y de viabilidad del embrión además de criticismo de que embriones viables puedan ser descartados. Un método no invasivo para detectar aneuploidías en el embrión preimplantacional podría evitar los desafíos técnicos de la biopsia<sup>(4)</sup>. Existe un gran interés por encontrar opciones no invasivas para identificar las anomalías genéticas en los embriones preimplantacionales. Idealmente una opción no invasiva presentaría las ventajas del PGT-A invasivo, pero sin las desventajas de la manipulación del embrión y la biopsia<sup>(2)</sup>.

Opciones alternativas al análisis genético preimplantacional invasivo son la morfocinética, (aunque hasta la fecha esta técnica no ha mostrado una buena capacidad para predecir aneuploidías), o la blastocentesis, proceso que requiere de la aspiración del fluido del blastocele y por tanto de manipulación del embrión<sup>(2)</sup>.

Con todos los métodos de análisis invasivo hay dilemas éticos y por tanto la comunidad científica está decantándose por desarrollar e implementar un PGT no invasivo (niPGT)<sup>(3)</sup>. Una de las líneas de desarrollo consiste en un método innovador basado en la obtención de muestras de material genético del medio de cultivo (SCM)<sup>(5)</sup>. En 2016 se realizaron los primeros estudios para ver si el ADN libre embrionario (cfDNA) liberado por el embrión al medio de cultivo se podría usar para determinar el contenido cromosómico del embrión y demostraron que a partir del SCM del blastocisto se había detectado con éxito aneuploidía embrionaria similar a la detección con biopsia de trofoectodermo<sup>(2)</sup>. El cfDNA es una fracción del material genético encontrado en el medio de cultivo del embrión que puede ser rápidamente aislado y secuenciado, produciendo un resultado que ha demostrado alta concordancia con PGT-A invasivo en muchos estudios. Cuando se realiza niPGT-A, se reducen los costes ya que no se requiere un láser ni tampoco profesionales altamente entrenados, lo que lo hace mucho más rentable<sup>(3)</sup>. Se ha observado que el cfDNA embrionario podría ser amplificado correctamente en embriones de buena y mala calidad, sugiriendo que el cfDNA expulsado podría reflejar status de ploidía general del embrión<sup>(2)</sup>.

El compartimento o compartimentos donde se origina el cfDNA sigue sin estar claro; tanto el trofoectodermo (TE) como la masa celular interna (ICM) son fuentes potenciales, pero existen retos a la hora de examinar los mecanismos que subyacen a la secreción de cfDNA en el medio<sup>(2)</sup>. Un estudio observó que la concordancia de la ploidía del cfDNA embrionario con el trofoectodermo y la ICM eran similares, lo que sugiere que el cfDNA embrionario podría originarse en los dos compartimentos del embrión humano<sup>(4)</sup>. Otras fuentes propuestas de origen de cfDNA son, la apoptosis durante el desarrollo preimplantacional que puede tener un papel debido a la rápida transformación del embrión, pero se han observado cantidades similares de cfDNA de embriones con diferente grados morfológicos y similar

tamaño de amplificación de fragmentos de ADN, sugiriendo que apoptosis y necrosis no eran el único mecanismo para la liberación de ADN; y los corpúsculos polares, con los que existe un peligro de contaminación del ADN sobre todo cuando el medio de cultivo a analizar es recogido en día 5 en vez de día 6<sup>(2)</sup>.

En el estudio más grande realizado hasta la fecha se obtuvieron unos resultados que demuestran la potencial aplicabilidad del análisis de cfDNA a los laboratorios de FIV, ya que se observó consistencia con los resultados entre los diferentes centros; diferentes medios de cultivo, secuencial y continuo; diferentes porcentajes de suplemento de albumina sin efectos significativos sobre la precisión de los resultados del cfDNA embrionario<sup>(4)</sup>. Por lo tanto, un acercamiento no invasivo eficiente puede ofrecer los beneficios de un PGT-A invasivo, como la mejora de nacidos vivos en la primera transferencia, la reducción de las tasas de abortos y embarazos múltiples y la disminución de los tiempos hasta conseguir embarazo, todo ello sin las desventajas asociadas a la manipulación del embrión y la biopsia<sup>(4)</sup>.

Uno de los grandes problemas dentro de las técnicas de análisis genético es el mosaicismo, un fenómeno donde existen varias líneas celulares en un solo embrión. Esto crea la posibilidad de que las células biopsiadas no contengan la información genética que represente al material genético completo del embrión<sup>(3)</sup>. El mosaicismo surge por segregación mitótica incorrecta después de la fecundación y aumenta con el dimorfismo en la etapa de cleavage, pero no con el avance de la edad materna. La tasa de mosaicismo embrionario puede variar en función de una serie de factores, incluyendo el estadio del embrión en el momento de la biopsia, así como la técnica de detección cromosómica utilizada<sup>(1)</sup>.

En fases tempranas del desarrollo del embrión preimplantacional, el mosaicismo es muy prevalente (aprox. 30%), pero su prevalencia parece caer en picado durante la fase tardía del embarazo. El mosaicismo fetal verdadero es predominante solo en el 0,4% de los fetos y mosaicismo en recién nacidos vivos se ha estimado en <0.2%<sup>(3)</sup>. El mosaicismo puede dar lugar a resultados obstétricos adversos, como la restricción del crecimiento intrauterino y la insuficiencia placentaria, dependiendo del cromosoma implicado. Los embriones de FIV han mostrado una tasa de implantación, una tasa de embarazo clínico y una tasa de nacidos vivos significativamente menores tras la transferencia de embriones en mosaico en comparación con los euploides, también ha demostrado estar asociada a un mayor riesgo de aborto espontáneo en múltiples estudios. Por tanto, la transferencia de embriones en mosaico sólo debe considerarse en situaciones en las que no se disponga de embriones euploides para la transferencia y después de un asesoramiento genético exhaustivo que haga hincapié en las pruebas de diagnóstico prenatal (CVS o amniocentesis) y en la discusión de opciones alternativas, incluida la reproducción por terceros<sup>(1)</sup>.

Los embriones diagnosticados como mosaico según el análisis del trofotodermo pueden ser totalmente euploides, totalmente aneuploides, mosaicos para una línea celular euploide y una línea celular aneuploide, o mosaicos para dos o más líneas celulares anormales diferentes. Los resultados de una biopsia de TE son un excelente predictor del estado cromosómico de todo el embrión en embriones diploides o aneuploidía cromosómica completa. Sin embargo, el valor predictivo de la biopsia de TE se reduce significativamente en caso de mosaicismo embrionario<sup>(1)</sup>.

Recientemente se han comenzado a realizar estudios para valorar el grado de mosaicismo capaz de detectarse con pruebas de niPGT bajo la hipótesis de que cfDNA es más exacto que la biopsia de trofotodermo para detectar embriones en mosaico, ya que el material genético que es liberado al medio de cultivo procede tanto de la ICM como del TE<sup>(5)</sup>. Por lo tanto, en este trabajo nuestro objetivo es proporcionar un resumen de los resultados obtenidos en niPGT y más concretamente los obtenidos para detección de mosaicismo con esta técnica.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es analizar la información existente sobre el análisis genético preimplantacional no invasivo y determinar si es posible detectar mosaicismo con la forma actual de análisis genético no invasivo.

Los objetivos secundarios son investigar los conocimientos actuales sobre el origen del ADN libre de embrionario, las limitaciones de la técnica de análisis genético preimplantacional no invasivo y valorar si es necesario cambiar algún aspecto en la forma actual de trabajo en el laboratorio para su implementación.



### 3. Materiales y métodos

Para la búsqueda de la bibliografía se han utilizado las bases de datos “PubMed” y “Google académico” utilizando los siguientes descriptores y sus combinaciones: “Mosaic embryos”, “mosaicism”, “niPGT”, “cell-free DNA”, “cfDNA”, origin cfDNA”, “SCM”. También se obtuvo información de la bibliografía derivada de los artículos leídos. Todos los artículos se encuentran en revistas de Quartile Q1 o Q2 y son recientes (se han publicado en estos últimos 5 años), ya que este tema de investigación ha sido fuente de enorme interés y numerosos avances recientemente.

## 4. Resultados

El primer estudio realizado con un tamaño muestral elevado, posiblemente el mayor estudio hasta la fecha se publicó en 2020 por Rubio y colaboradores<sup>(4)</sup>. En él, se analizaron 1301 blastocistos, y los resultados obtenidos de los análisis de cfDNA presentaron un 78,2% de concordancia con las correspondientes biopsias de trofoectodermo, variando entre el 72,5% y el 86,3%, sin diferencias significativas. La sensibilidad por centro osciló entre el 76,5% y el 91,3% y la especificidad del 64,7% al 93,3%. La tasa de falsos negativos fue del 8,3% y la tasa de falsos positivos fue del 12,4%<sup>(4)</sup>.

En otro estudio reciente, se analizaron diferentes aspectos del análisis preimplantacional no invasivo en función del día de recolección del medio de cultivo. La tasa de concordancia de ploidía entre las muestras de SCM y biopsia de TE fue del 72,6% en el D5 y del 84,8% en el D6. La sensibilidad y la especificidad fueron en 83,6% y 52,9% en el grupo del día 5, y en 90,9% y 65,7 en el grupo del día 6, respectivamente. La tasa de falsos negativos en D5 fue del 10,5% y la de falsos positivos del 16,8%, mientras que en el D6 la tasa de falsos negativos fue del 6,8% y la de falsos positivos del 8,2%<sup>(6)</sup>.

Un estudio cuyo objetivo fue validar niPGT, de los 31 blastocistos incluidos en los análisis la tasa de concordancia general fue del 67,7%, esta tasa en las muestras de ICSI fue de 73,3% y en FIV de 62,5%. La sensibilidad y especificidad fue de 57,9% y 83,3% respectivamente. La tasa de concordancia sin tener en cuenta los embriones detenidos fue de 58,3%<sup>(7)</sup>.

### Origen del cfDNA

El posible origen del ADN libre embrionario es desconocido, algunos autores proponen que este procede tanto del trofoectodermo como de la masa celular interna, otros apoyan la teoría de que tiene una procedencia apoptótica. Diferentes estudios han comparado sus resultados con los obtenidos analizando el trofoectodermo y/o la masa celular interna y han obtenido los siguientes resultados. En un estudio compararon la biopsia de TE con el cfDNA y obtuvieron una tasa de concordancia del 30,4%, una contaminación materna parcial del 30,4%, una contaminación materna total del 30,4% y un 8,9% de muestras de SCM no informativas, concluyendo que el origen del cfDNA era apoptótico<sup>(8)</sup>. En otro estudio en el que no solo analizaron el trofoectodermo sino también la masa celular interna comparándola con el cfDNA, obtuvieron que, de los 81 blastocistos analizados, la ploidía era concordante tanto con la biopsia del TE como con la ICM (87,5% y 84,4%, respectivamente)<sup>(4)</sup>. Y en otro trabajo más reciente, considerando la ICM como referencia, la tasa de concordancia para el cfDNA fue del 86,1% y para la biopsia de TE fue del 89,6%, sin diferencias estadísticas<sup>(9)</sup>.

## Mosaicismo en niPGT

El mosaicismo es uno de los grandes problemas en los análisis genéticos ya que se desconoce si las células analizadas son representativas de todo el embrión o hay más de una línea celular presente en este. Gracias a investigaciones se sabe que hay una gran posibilidad de que el origen del cfDNA analizado pertenezca tanto a la ICM como a él TE y por tanto el cfDNA sea una buena representación de la carga cromosómica completa del embrión. Los siguientes dos artículos analizaron el mosaicismo con niPGT y obtuvieron los siguientes resultados.

En un estudio reanalizaron 26 blastocistos, 23 presentaban aneuploidías y 3 mosaicismo. Teniendo en cuenta un umbral de mosaicismo del 70%, la tasa de concordancia comparando el ICM con los otros factores, fue de 69,2% con la biopsia de TE, 88,5% con la rebiopsia de TE y 80,8% con el SCM. Cuando se analizaban solo los 23 aneuploides no hubo diferencias significativas en las tasas de concordancia, pero cuando se compararon los resultados de los 3 mosaicos si hubo diferencias significativas ya que no encontraron concordancia entre la ICM y la biopsia de TE, pero si con la rebiopsia de TE y el medio de cultivo<sup>(10)</sup>. En otro estudio reanalizaron 39 SCM, 41 blastocistos completos y 39 TE previamente categorizados como mosaicos, el 87,5% de los blastocistos mostraron resultado euploide en el análisis del blastocisto completo. Con un umbral de mosaicismo del 50%, la tasa de concordancia comparando el blastocisto completo con el SCM y la rebiopsia de TE fue de 87,2% y 85%, respectivamente. La especificidad del SCM fue de un 84,8% sobre la ploidía general y la sensibilidad del niPGT fue de 83,3% en la ploidía global<sup>(5)</sup>.

## 5. Discusión

El niPGT proporciona información sobre el estatus cromosómico del embrión usando el medio de cultivo en el que se desarrolla el embrión. Esta técnica puede aportar un amplio acceso a los análisis de genética embrionaria y evitar muchas consideraciones éticas y legales<sup>(2)</sup>.

Un estudio de enorme interés es el realizado por Rubio y colaboradores en 2020<sup>(4)</sup>. Este estudio se diferenció de los anteriores ya que no se realizó ningún tipo de manipulación previa del embrión, es decir, se recolectó el medio de cultivo con embriones con la zona pelúcida intacta. Las tasas de concordancia superaron el 86% cuando se controlaron todos los pasos definidos en el laboratorio durante el proceso de cultivo para minimizar el impacto de la contaminación materna y del operador. Por lo tanto, el centro con los mejores porcentajes demuestra que resultados óptimos se pueden conseguir si se siguen de forma estricta los pasos definidos para minimizar la contaminación externa y materna, permitiendo además una mayor reproducibilidad entre centros<sup>(4)</sup>. Esto supuso un gran avance acercando la posibilidad de implantar el niPGT-A en las clínicas como técnica de rutina.

Otros estudios evaluaron la combinación de SCM más el líquido de blastocele. Si bien es un método mínimamente invasivo, este enfoque no proporcionó ninguna ventaja: no se observó ningún beneficio por colapsar el blastocisto para recuperar el líquido del blastocele, ya que el uso del líquido del blastocele en combinación con el SCM no proporcionó mejores resultados que el análisis del medio por sí mismo<sup>(2)</sup>.

Aunque el niPGT-A no implica manipulación del embrión, sí que conlleva algunos cambios necesarios en la rutina diaria del laboratorio, sin ningún efecto perjudicial para el embrión. Debido a la baja concentración de cfDNA liberada al medio de cultivo y con el fin de aumentarla se ha observado en diferentes estudios que es altamente recomendable disminuir el volumen de la gota, aumentar el tiempo en el medio de cultivo y disminuir la contaminación (externa y de las células del cumulo)<sup>(2)</sup>. Los estudios sobre niPGT que adaptaron estos cambios a su rutina fueron aquellas que consiguieron altas tasas de concordancia como por ejemplo Rubio y colaboradores en 2020<sup>(4)</sup> con una de concordancia del 78,2%, llegando al 86,3% cuando se controlaban al máximo todos los factores. Mientras que estudios como la de Tsai y colaboradores en 2022<sup>(7)</sup> donde estas adaptaciones no son aplicadas, obtuvieron tasas de concordancia menores, del 67,7%. En cuanto a estas adaptaciones a realizar en el flujo de trabajo, los volúmenes pequeños no parecen afectar al desarrollo del embrión y tanto cultivo único como secuencial se pueden usar sin tener que interferir en los resultados. Por otro lado, se observó que cuanto más tiempo está el embrión en el medio de cultivo mejores son los resultados obtenidos, de hecho, las tasas de informatividad y concordancia eran más elevadas para los embriones de D6<sup>(2)</sup>. Rubio y colaboradores<sup>(4)</sup>

también consiguieron buenas tasas en su estudio de 2020 debido a que optimizaron el protocolo de recolección a día 6/7 y concluyeron que niPGT-A podría aplicarse en embriones de D6, embriones de buena calidad y embriones lentos (a los que les beneficiaría esta estrategia si son cromosómicamente normales), siempre y cuando estén en estadio de blastocisto. Recientemente un estudio comprobó las diferencias entre recolectar el cultivo en D5 y D6 y obtuvo unas tasas de concordancia mayores en D6 (84.8%), muy parecidas a las obtenidas por Rubio y colaboradores en 2020<sup>(4)</sup> (tasas de concordancia entre 72,5% y 86,3%), en comparación con D5 (72,6%), el resto de las tasas fueron mejores en D6 con respecto a D5<sup>(6)</sup>. También se observó que el SCM en contacto con el embrión de D3 a D5 tiene una mayor tasa de no informatividad y un aumento en la presencia de ADN degradado que puede interferir con los resultados<sup>(2)</sup>. El último factor a tener en cuenta en el niPGT-A es la contaminación externa y materna, es esencial que el medio se maneje en condiciones estériles para prevenir contaminación exterior con ADN exógeno y una buena decumulación para evitar la contaminación materna, asegurando que solo cfDNA embrionario es analizado, este es uno de los mayores retos. Por lo tanto, una manipulación cuidadosa del embrión es crítica para asegurar resultados precisos en SCM<sup>(2)</sup>.

En otro trabajo realizado recientemente, se intentó validar el niPGT-A manteniendo el flujo de trabajo existente y rutinario del laboratorio de FIV, es decir sin implementar las adaptaciones en el flujo de trabajo sugeridas previamente. En este caso, no se realizó ICSI de forma rutinaria, no se redujo la cantidad de medio de cultivo utilizado y no se cultivaron ni se extendió hasta el día 6/7 el tiempo de cultivo para obtener más cfDNA embrionario. Debido a los resultados obtenidos, no recomendarían la aplicación de niPGT-A en entornos clínicos rutinarios con fines de diagnóstico. Sin embargo, sugieren que el niPGT-A pueda aplicarse en la clínica como un método adicional para priorizar los embriones y aumentar la probabilidad de seleccionar de forma no invasiva embriones euploides, es decir, ser un posible apoyo al análisis morfológico<sup>(7)</sup>. Por lo tanto, para aplicar niPGT con fines diagnósticos y teniendo en cuenta estas adaptaciones al flujo de trabajo, antes de incluir un acercamiento no invasivo a la rutina, cada laboratorio debería realizar un estudio de validación para poder implementar las modificaciones requeridas en el protocolo de cultivo de embriones y confirmar que la viabilidad del embrión no está comprometida, además de obtener unas tasas de concordancia elevadas sin la presencia de contaminación<sup>(2)</sup>.

En cuanto a la reproducibilidad, Rubio y colaboradores en 2020<sup>(4)</sup> comprobó que esta si podía conseguirse entre diferentes laboratorios siempre y cuando se cumpliesen los protocolos necesarios para garantizar el acercamiento no invasivo en las condiciones óptimas de trabajo y de cultivo. En este estudio tampoco encontraron diferencias significativas entre la sensibilidad y especificidad entre el cfDNA de hombres y mujeres, de ICSI y FIV, tampoco encontraron que las características del paciente, la estimulación ovárica, el medio de cultivo y la calidad del blastocisto afectaran a las tasas de

informatividad y concordancia<sup>(4)</sup>. En cuanto al modo de fecundación, tanto ICSI como FIV pueden ser realizados con seguridad mientras que los ovocitos y cigotos estén bien decumulados en sus respectivos tiempos y así evitar la contaminación materna. Por otro lado, al comparar incubadores con time-lapse y convencionales se observaron que las tasas de concordancia eran similares entre estos siempre y cuando los pozos donde se localicen los embriones sean independientes, es decir, sin estar conectados, para una correcta recolección del SCM del embrión a analizar. Además, se comprobó que la plataforma NGS no afectaba a los resultados, aunque estos pueden variar según los parámetros establecidos en cada laboratorio ya que la concordancia de la ploidía depende mucho de los umbrales usados por mosaicismo, por ello se necesita establecer un umbral apropiado para definir un cromosoma como anormal ya que, los criterios aplicados a las biopsias de trofoectodermo y SCM pueden variar<sup>(2)</sup>.

### Origen del cfDNA

La base del análisis genético preimplantacional no invasivo es el análisis de cfDNA que se encuentra en el medio de cultivo. El origen de este cfDNA actualmente se desconoce, aunque hay diversas teorías, están aquellas que defienden un origen apoptótico y aquellas que defienden que el origen tiene una procedencia embrionaria, es decir, que proviene de los compartimentos del embrión (trofoectodermo y/o masa celular interna). Un artículo que apoya la teoría del origen apoptótico es el de Vera y colaboradores en 2018<sup>(8)</sup> ya que en sus análisis obtuvieron altos niveles de contaminación y una tasa de concordancia con la biopsia de trofoectodermo baja. Una explicación que le dan a estos resultados es que al recoger el SCM en D5 la proporción de ADN embrionario fuera menor y que si hubieran recogido este SCM más tarde la proporción de ADN embrionario con respecto al ADN materno se incrementará, ya que el número de células embrionarias aumenta exponencialmente con el desarrollo<sup>(8)</sup>. Esta posible explicación que proponían encaja con conclusiones de artículos posteriores en donde, y como ya se ha comentado en este trabajo, se ha observado que es aconsejable para unos mejores resultados aumentar el día de recolección a D6/7 y, además, para reducir la contaminación materna, decumular con gran precisión.

Otros artículos defienden la procedencia embrionaria del cfDNA, aunque el/los compartimento/s (TE o/y ICM) de donde se origina sigue sin estar claro. Si se tienen en cuenta las distintas adaptaciones necesarias para un análisis no invasivo, en un estudio se observó que la concordancia de la ploidía del cfDNA embrionario con el TE y la ICM eran similares, lo que sugiere que el cfDNA embrionario podría originarse en los dos compartimentos del embrión humano<sup>(4)</sup>. Otro estudio reciente coincide con estos resultados, llegando a la conclusión de que el cfDNA embrionario liberado al medio de cultivo proporciona información de la constitución cromosómica general del blastocisto, como sugieren las altas tasas de concordancia de ploidía entre la ICM y el cfDNA. Esto apoya el uso de niPGT-A como una alternativa a otros métodos invasivos de detección de aneuploidías que requieren una biopsia<sup>(9)</sup>.

## Mosaicismo en niPGT

El desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de la PGT-A, como la secuenciación de nueva generación (NGS), ha conducido a un aumento de los informes de mosaicismo embrionario<sup>(1)</sup>. Las aneuploidías cromosómicas pueden originarse tanto por errores mitóticos como meióticos, los errores mitóticos dan lugar a embriones en mosaico<sup>(8)</sup>. Este origen mitótico ha sido demostrado basándose en las bajas tasas de concordancia del análisis de biopsias o la investigación de la frecuencia de aneuploidías segmentarias de ovocitos y embriones en diferentes etapas de desarrollo<sup>(5)</sup>. En el caso de los errores mitóticos postcigóticos, que dan lugar a líneas celulares con diferentes cariotipos dentro de un mismo embrión, los resultados de una biopsia de TE se utilizan para inferir el estado cromosómico de la ICM y, dado que no todas las células están afectadas por la aneuploidía, esto puede llevar a un diagnóstico erróneo del embrión como aneuploide cuando en realidad contiene una ICM euploide. Los hallazgos de una biopsia de TE son un excelente predictor del estado cromosómico de todo el embrión en embriones diploides o aneuploidía cromosómica completa. Sin embargo, el valor predictivo de la biopsia de TE se reduce significativamente en caso de mosaicismo embrionario que incluya anomalías segmentarias<sup>(1)</sup>. Todos los artículos coinciden en que el umbral de mosaicismo debe fijarse cuidadosamente para clasificar los embriones como euploides, aneuploides y mosaicos<sup>(10)</sup>.

En varios estudios se analizaron embriones previamente categorizados como mosaico por PGT, estos estudios no son completamente no invasivos ya que en estos embriones se realizó además una rebiopsia y en muchos casos una liberación del líquido del blastocele con lo cual sería más un método mínimamente invasivo con futuro a conseguir ser un método no invasivo. Observaron que el niPGT usando medio de cultivo puede ser más fiable para predecir los cariotipos de la ICM que el PGT en embriones mosaicos, ya que el PGT puede no predecir con precisión el verdadero estado cromosómico de la ICM. Esto podría explicarse por un mecanismo de autocorrección en los embriones en mosaico, por el que las células en mosaico del embrión en fase de cleavage pueden incorporarse a las células del TE pero no a las células de la ICM, otra posible explicación podría ser la propia manipulación de la biopsia ya que se ha observado que el mosaicismo puede ser el resultado de la manipulación con láser, acompañada de daño celular y pérdida de ADN celular, lo que posteriormente puede conducir a un sesgo en la construcción de la biblioteca<sup>(10)</sup>. Los resultados de las muestras de las rebiopsias en embriones mosaico mostraron que muchos eran euploides. Esto ocurre solo en los mosaicos de bajo grado, en los que en la rebiopsia y análisis del SCM fueron identificados como euploides, en los mosaicos de alto grado, la biopsia era bien representativa de los cromosomas anormales. Se ha sugerido que el niPGT podría ser un enfoque más preciso para predecir las configuraciones cromosómicas del embrión propiamente

dicho en comparación con la rebiopsia de TE. Además, el ADN libre de células en el SCM mostró una gran capacidad de detección tanto a nivel de un solo cromosoma como de la ploidía global<sup>(5)</sup>.

Li y colaboradores en el artículo de 2021<sup>(5)</sup> llegaron a la conclusión de que el niPGT es una opción viable para analizar los blastocistos recultivados, esta viabilidad diagnóstica lo hace aplicable no sólo a los blastocistos con mosaicismo, sino también a aquellos embriones sin resultado de ADN amplificado.



## 6. Conclusiones

Actualmente el PGT es la prueba gold standard pero debido a su carácter invasivo se realizan cada vez más investigaciones en dirección a un niPGT. Estudios recientes han demostrado que haciendo pequeños cambios en el flujo de trabajo como, reducir el volumen de la gota, aumentar el tiempo de cultivo y evitar la contaminación tanto externa como materna, se consiguen altas tasas de concordancia entre el cfDNA y el trofoectodermo, así como entre el cfDNA y la ICM, por lo que el origen del cfDNA puede proceder de ambos compartimentos, aunque también se valora su posible origen apoptótico. Se ha cuestionado que el hecho de aplicar estos cambios en el flujo de trabajo implique que deje de ser una técnica completamente no invasiva, pero se ha demostrado que esos pequeños cambios no tienen efecto sobre el embrión. Además, esta técnica tiene como valor añadido su posible reproducibilidad entre centros, algo de enorme valor para su aplicación en clínicas. Aunque todavía hacen falta más estudios para considerar su uso en sustitución del PGT convencional, no se descarta su utilización como apoyo al análisis morfológico para categorizar los embriones y así aumentar la probabilidad de seleccionar de forma no invasiva embriones euploides.

En cuanto al mosaicismo, principal problema que presenta el análisis genéticos preimplantacional, hay muy pocos estudios que hayan investigado el mosaicismo en niPGT pero entre los que han realizado una primera aproximación, se ha observado que aun no siendo completamente no invasivos, el niPGT es una opción viable para analizar los blastocistos recultivados, para predecir mejor el estado cromosómico de la ICM que el PGT en embriones mosaico y para predecir las configuraciones cromosómicas del embrión en comparación con la rebiopsia del trofoectodermo. Aun así, se necesitan muchos más estudios enfocados en la detección de mosaicismo con niPGT para establecer su eficacia con exactitud.

## 7. Referencias

- (1) Abhari S, Kawwass JF. Pregnancy and neonatal outcomes after transfer of mosaic embryos: A review. *J Clin Med*. 2021;10(7):1369.
- (2) Navarro-Sánchez L, García-Pascual C, Rubio C, Simón C. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. *Reprod Biomed Online*. 2022;44(5):817–28.
- (3) Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy and the mystery of genetic material: A review article. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7).
- (4) Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(5):751.e1-751.e13.
- (5) Li X, Hao Y, Chen D, Ji D, Zhu W, Zhu X, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Hum Reprod*. 2021;36(7):2020–34.
- (6) Biricik A, Bianchi V, Lecciso F, Surdo M, Bavaro I, Manno M, et al. P-563 The effect of embryo culture time on concordance rates between invasive and non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (niPGT-A) in spent culture media (SCM) analysis. *Hum Reprod*. 2022;37(Supplement\_1).
- (7) Tsai N-C, Chang Y-C, Su Y-R, Lin Y-C, Weng P-L, Cheng Y-H, et al. Validation of non-invasive preimplantation genetic screening using a routine IVF laboratory workflow. *Biomedicines*. 2022;10(6).
- (8) Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, Martinez S, Navarro R, Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018;33(4):745–56.
- (9) Navarro Sánchez L, Ocali O, García Pascual CM, Mamede Andrade G, Castelló Salom D, Lai F, et al. P-551 High concordance of the embryonic cell-free DNA with the inner cell mass: impact of blastocyst quality, patient age and mode of fertilization. *Hum Reprod*. 2022;37(Supplement\_1).
- (10) Chen J, Jia L, Li T, Guo Y, He S, Zhang Z, et al. Diagnostic efficiency of blastocyst culture medium in noninvasive preimplantation genetic testing. *F S Rep*. 2021;2(1):88–94.