

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

**DESCRIPCIÓN Y PERSPECTIVAS DEL PGT
NO INVASIVO.**

Autor: ANA CARRILLO MARÍN

Tutor: MARÍA GAYTÁN MUÑOZ

Alcobendas, septiembre 2025

ÍNDICE

1.	<i>RESUMEN</i>	1
2.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
3.	<i>OBJETIVOS</i>	3
4.	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	4
4.1.	PROTOCOLO	4
4.2.	MÉTODOS DE BÚSQUEDA	4
5.	<i>RESULTADOS</i>	5
5.1	ORIGEN DEL MATERIAL GENÉTICO	5
5.2	EFFECTIVIDAD DEL ni-PGT-A	7
5.3	PROTOCOLO DE CULTIVO	9
5.3.1	DÍA DE RECOLECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	10
5.3.2	CONTAMINACIÓN	11
5.3.3	NÚMERO DE LAVADOS EMBRIONARIOS	12
5.3.4	PROTOCOLO PARA EMBRIONES VITRIFICADOS	12
6.	<i>DISCUSIÓN</i>	14
6.1	IMPORTANCIA DE LA UNIFICACIÓN DE PROTOCOLOS	14
6.2	APLICACIÓN CLÍNICA	16
6.2.1	BENEFICIOS	16
6.2.2	LIMITACIONES	17
7.	<i>CONCLUSIONES</i>	19
8.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	21

1. RESUMEN

El PGT (test genético preimplantacional) es la herramienta utilizada en laboratorios de reproducción asistida para la selección de embriones euploides. Tradicionalmente este análisis se lleva a cabo mediante la biopsia de células de su trofectodermo, procedimiento que resulta invasivo y puede comprometer en cierta medida la viabilidad embrionaria. Con el descubrimiento de la presencia de ADN libre en el medio de cultivo embrionario surge un prometedor enfoque para el diagnóstico genético preimplantacional: el niPGT (PGT no invasivo).

El principal objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los avances, eficacia, limitaciones y potencial del niPGT como herramienta de diagnóstico genético, mediante la búsqueda bibliográfica en bases de datos especializadas de artículos originales publicados entre 2018 y 2025.

Los resultados muestran que el ADN libre en el medio procede tanto del trofectodermo como de la masa celular interna, aunque su mecanismo de liberación permanece todavía en estudio. Las altas tasas de informatividad junto con su carácter no invasivo y su fácil accesibilidad, hacen que el niPGT se considere una prometedora alternativa para la evaluación de la ploidía embrionaria. Sin embargo, las discrepancias interestudio, las diferencias entre las tasas de concordancia e informatividad o la contaminación, ponen de manifiesto la necesidad de estandarizar un protocolo para esta técnica, que a día de hoy debido a su falta de precisión y reproducibilidad no se puede considerar una técnica diagnóstica.

El niPGT representa una línea de investigación prometedora. Actualmente su aplicación clínica se limita a complementar la evaluación morfológica para la selección de embriones de cara a la transferencia, pero en un futuro puede suponer un importante avance en países en los que la biopsia embrionaria no esté permitida o en entornos con limitaciones económicas.

2. INTRODUCCIÓN.

Las anomalías genéticas son una de las principales causas de las pérdidas de embarazo, los fallos de implantación y los trastornos congénitos en humanos (Capalbo et al., 2021). Se estima que entre el 50% y el 70% de las perdidas gestacionales del primer trimestre, tanto de embarazos naturales como asistidos por técnicas de reproducción asistida, se deben a las anomalías cromosómicas numéricas. La mayoría de las aneuploidías embrionarias se asocian a errores en

la meiosis I materna, cuya incidencia aumenta progresivamente a partir de los 35 años pudiendo haber hasta un 70% de aneuploidías a partir de los 43 años. (Bakalova, D. N. et al., 2025).

Además de las aneuploidías los embriones pueden verse afectados por reordenamientos cromosómicos y anomalías monogénicas, asociadas a un gen concreto y que pueden ser heredadas de los progenitores o surgir de Novo.

En consecuencia, y con el fin de poder seleccionar los embriones euploides para la transferencia en tratamientos de reproducción asistida, nace el PGT, que permite realizar un análisis genético de los embriones a partir de unas cuantas células para poder descartar los embriones aneuploides. El PGT ha evolucionado a lo largo del tiempo, desde la técnica FISH en los años 90, cuando se analizaban uno o dos blastómeros en día 3. Hasta día de hoy, que mediante la técnica del NGS (Next Generation Secuencing) podemos analizar entre cinco y diez células del trofectodermo obtenidos mediante biopsia embrionaria (Del Collado et al., 2023).

Existen tres tipos de PGT:

- PGT-A (test genético preimplantacional para aneuploidías): detecta si un embrión es euploide o no, es decir, si tiene el numero correcto de cromosomas.
- PGT-M (test genético preimplantacional para alteraciones monogénicas): se evalúan los embriones en busca de anomalías en un solo gen relacionadas con enfermedades específicas.
- PGT-SR (test genético preimplantacional para reordenamientos cromosómicos): detecta embriones que son portadores de desequilibrios cromosómicos estructurales.

La biopsia embrionaria es la técnica utilizada para obtener células del trofectodermo con el fin de obtener material genético embrionario para el análisis. Consiste en la retirada de células del trofectodermo de embriones en día 5/6, se trata de un procedimiento invasivo y se necesitan profesionales formados en esta técnica para poder llevarla a cabo. A pesar de que la biopsia de trofectodermo en día 5/6 es mucho menos perjudicial para el embrión que la biopsia en día 3 (donde se extraen uno o dos blastómeros), la implantación se puede ver afectada por el número de células retiradas (Chow et al., 2024).

En los últimos años, con el propósito de buscar una alternativa a la biopsia embrionaria (procedimiento invasivo), surgen dos nuevas técnicas: el miPGT (PGT mínimamente invasivo) o blastocentesis que requiere la extracción del fluido del blastocele sin necesidad de extraer ninguna parte del embrión y consiste en analizar el ADN libre en este fluido. A pesar de que parece prometedor se especula sobre el posible origen en células necróticas y apoptóticas (al

menos en cierta medida) del ADN libre en este fluido (Bakalova, D. N. et al., 2025). Otra opción dentro de esta técnica es el colapso del embrión para que expulse el contenido del blastocele al medio de cultivo embrionario.

Y el niPGT-A (PGT-A no invasivo), en el que se va a centrar este trabajo, que surge del descubrimiento de la presencia de ADN libre (cfDNA) de origen embrionario en el medio de cultivo, siendo esta la base de la técnica. El fin de esta técnica es conocer la ploidía del embrión sin necesidad de manipularlo, tan sólo analizando el cfDNA libre en el medio de cultivo embrionario. (Figura 1).

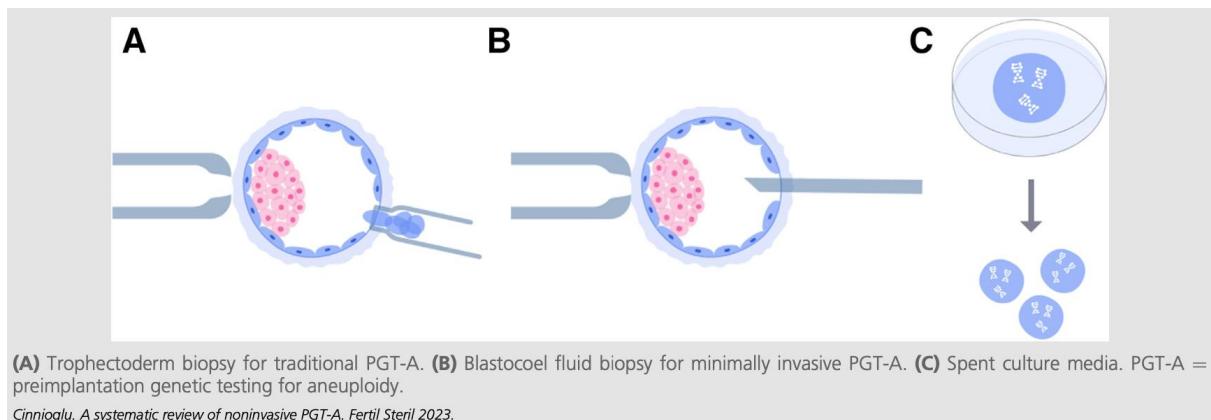


Figura 1. Tres formas de obtener DNA para realizar PGT: biopsia de trofectodermo, blastocentesis y a través del medio de cultivo embrionario. (Cinnioglu et al., 2023).

3. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica enfocada en evaluar los progresos, beneficios y posibles aplicaciones de la técnica de PGT no invasivo.

Además, como objetivos secundarios:

- Hacer una valoración sobre la efectividad del método en comparación con la biopsia embrionaria, analizando el grado de concordancia entre ambos y como varia con los diferentes protocolos
- Revisar los protocolos usados en los distintos estudios y valorar las mejores condiciones para un protocolo efectivo (condiciones de cultivo, día de recogida del medio, numero de lavados y condiciones para evitar la contaminación).
- Discutir las posibles aplicaciones de la técnica y su utilidad en el campo de la reproducción asistida.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Este trabajo consiste en una revisión bibliográfica cuya finalidad es valorar y analizar los avances, utilidades y aplicaciones del análisis genético preimplantacional no invasivo de DNA libre en medio de cultivo embrionario como herramienta en los tratamientos de reproducción asistida.

4.1. PROTOCOLO.

El primer paso a seguir en la búsqueda bibliográfica fue establecer los criterios de inclusión de los estudios:

- estudios originales o revisiones publicadas entre 2018 y 2025.
- En inglés o castellano.
- Centrados en:
 - Descripción de la técnica de niPGT-A.
 - Información sobre el origen del material genético libre en el medio.
 - Comparación de niPGT-A con otra técnica (PGT-A, miPGT en líquido de blastocito...).
 - Protocolos de niPGT-A.

Tras la búsqueda inicial, se realizó una primera criba tras la lectura de títulos y resúmenes. Posteriormente, se procedió a la lectura completa de los estudios valorando su estructura, metodología y relevancia científica. Para finalizar, los estudios se clasificaron temáticamente en varias categorías para facilitar y estructurar el desarrollo del trabajo.

4.2. MÉTODOS DE BÚSQUEDA.

Tras establecer los criterios de inclusión, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en el motor de búsqueda PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/>), utilizando su modalidad de búsqueda avanzada. Para optimizar la precisión de los resultados, se emplearon operadores booleanos (“AND”, “OR” y “NOT”), combinando estratégicamente distintas palabras clave relacionadas con el tema de estudio. Las principales palabras clave utilizadas fueron: “non invasive PGT”, “NICS”, “embryo”, “aneuploidy”, “spare culture medium”, “blastocyst”, “cell free DNA”, “PGT-A”, “PGT-SR” y “PGT-M”.

5. RESULTADOS.

5.1 ORIGEN DEL MATERIAL GENÉTICO.

La presencia de material genético liberado por el embrión en el medio de cultivo es la base de la técnica de niPGT-A. Actualmente, el mecanismo por el cual el embrión libera este material sigue siendo la principal incógnita.

El primer obstáculo a superar fue determinar si el cfDNA presente en el medio de cultivo es de origen embrionario. Vera-Rodriguez et al. (2018) realizaron un estudio en el que cuantificaron la cantidad de cfDNA presente en muestras de medio de cultivo que habían estado en contacto con embriones y en las que no, con el fin de ver si el material genético presente en las muestras de medio era realmente de origen embrionario. Observaron que las muestras en las que se habían cultivado embriones la cantidad de ADN en 20 µl era de 6.7 pg mientras que en las muestras de control la cantidad de ADN era de 1.4 pg siendo esta diferencia estadísticamente significativa, indicando que el origen del material genético encontrado en el medio de cultivo es principalmente de origen embrionario.

Posteriormente, Chen et al. (2021) llevaron a cabo un estudio basándose en las diferencias en los patrones de metilación entre las células de origen materno (cúmulo), los blastómeros y los corpúsculos polares y observaron que el cfDNA presente en el medio de cultivo tenía origen en los 3 tipos celulares. En otro estudio Rubio et al. (2020) concluyen que el cfDNA presente en el medio de cultivo tiene origen en células del trofectodermo y de la masa celular interna basándose en el alto grado de concordancia entre el cfDNA, el trofectodermo y la masa celular interna (87.5% y 84.4% respectivamente).

La siguiente incógnita es el mecanismo mediante el cual el embrión libera el ADN, punto respecto al cual hay varias teorías.

La primera sugiere que el origen del cfDNA proviene de células apoptóticas (figura 2) originadas por mecanismos de autocorrección embrionarios (Handayani et al., 2023). La segunda teoría sitúa el origen del cfDNA en vesículas extracelulares (VE) (figura 2). Las VE son partículas compuestas por una bicapa lipídica que contienen moléculas señalizadoras, como ADN genómico, además de mRNA, miRNA, proteínas... Estas vesículas son liberadas por el embrión durante todo el estadio preimplantacional, son generadas en la membrana plasmática y son capaces de atravesar la zona pelúcida y quedar almacenadas en el medio de cultivo. Se analizó la ploidía de 7 embriones detenidos en día 3 y se comparó con la ploidía de las VE

contenidas en el medio de cultivo y observaron una concordancia tanto en los embriones euploides como en los aneuploides, con un pequeño apunte, las VE contenían un mayor número de aneuploidías que los embriones (Handayani et al., 2023).

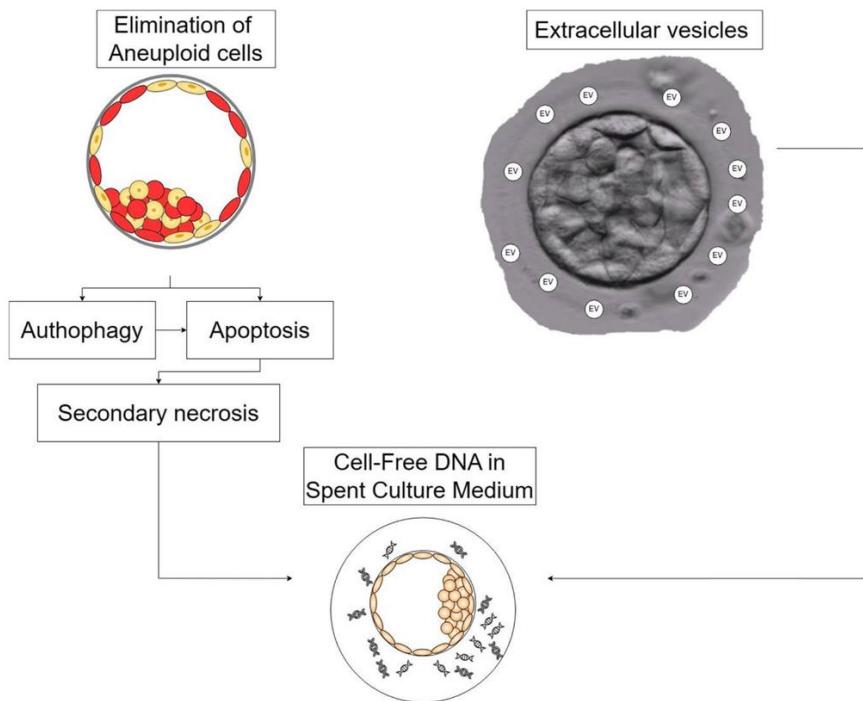


Figura 2: representacion de mecanismos de liberación de cfDNA al medio de cultivo embrionario (Handayani et al., 2023).

La tercera teoría plantea que el mecanismo de liberación del cfDNA está relacionado con el mecanismo mediante el cual se crean protrusiones nucleares. Se ha estudiado que el aumento de la presión intracavitaria del blastocele provoca un cambio en la forma del núcleo de las células del trofectodermo de una forma esférica a una forma ovalada (Figura 3). La marcación del núcleo con SPY650-DNA posibilitó la observación de las dinámicas nucleares y de la formación de protrusiones. El seguimiento de estas protrusiones permitió ver que se liberaban al citoplasma produciendo estructuras de ADN citoplasmático (cytDNA) (Figura 4) (Domingo-Muelas et al., 2023).

Se cree que estas estructuras (cytDNA) podrían ser el origen del cfDNA, aunque el mecanismo de liberación al medio de cultivo necesita estudios adicionales.

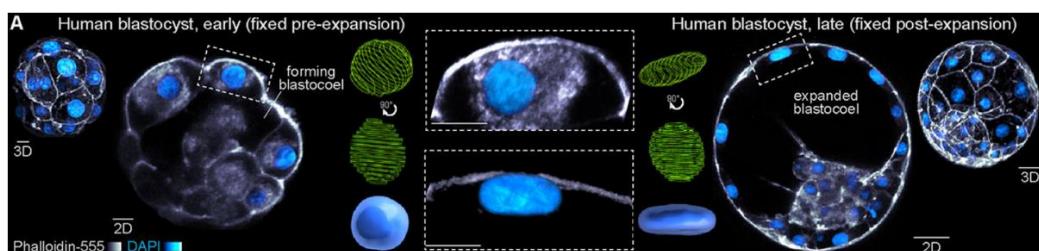


Figura 3: cambio de forma en el nuclo de ccelas del trofodermo debido a la expansion del blastocisto (Domingo-Muelas et al., 2023).

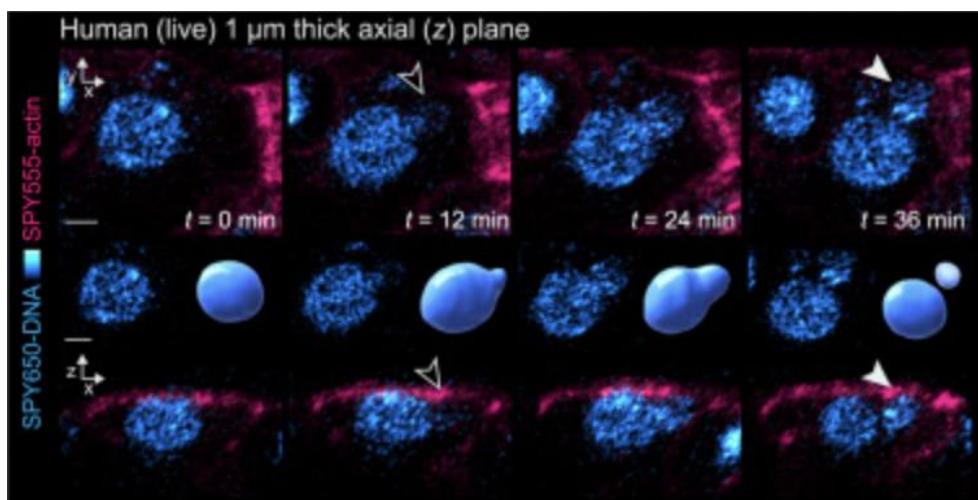


Figura 4: formacion de la protusion nuclear y liberacion al citoplasma. (Domingo-Muelas et al., 2023).

5.2 EFECTIVIDAD DEL ni-PGT-A.

El objetivo principal del niPGT-A es la distinción entre embriones euploides y aneuploides. Con el fin de comprobar la eficacia del protocolo y de la técnica de niPGT-A, se realiza un análisis que consiste en comparar los resultados obtenidos a partir de la biopsia de trofodermo con los del medio de cultivo (Figura 5). Aunque en algunos casos, también se utilizan los blastocistos completos como referencia, no solo la biopsia de trofodermo. Una mayor concordancia entre los resultados obtenidos mediante niPGT-A y la biopsia de trofodermo (o el gold standard que se utilice) indicará una mayor fiabilidad de la técnica.

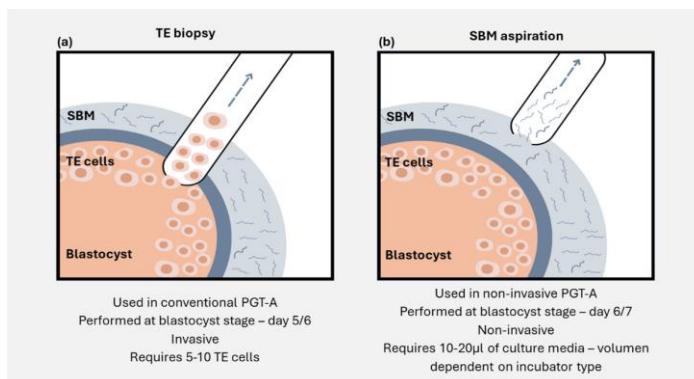


Figura 5: diferencias entre la biopsia de trofodermo y la recolección de medio de cultivo (Bakalova, D. N. et al., 2025).

Bakalova et al. (2025) enumera los siguientes parámetros analizados en dichos estudios:

- Grado de informatividad de la muestra, que indica el porcentaje de muestras de medio de cultivo que nos dan información válida (que pueden ser amplificadas).
- Concordancia de ploidía entre el medio de cultivo y la muestra de referencia (habitualmente la biopsia de trofectodermo) (Figura 6a y 6b).
- Tasa de falsos negativos, es decir, aquellos casos en los que el análisis del medio de cultivo indica euploidía mientras que la muestra de referencia muestra aneuploidía (Figura 6d).
- Tasa de falsos positivos, cuando el medio de cultivo indica aneuploidía, pero la muestra de referencia es euploide.

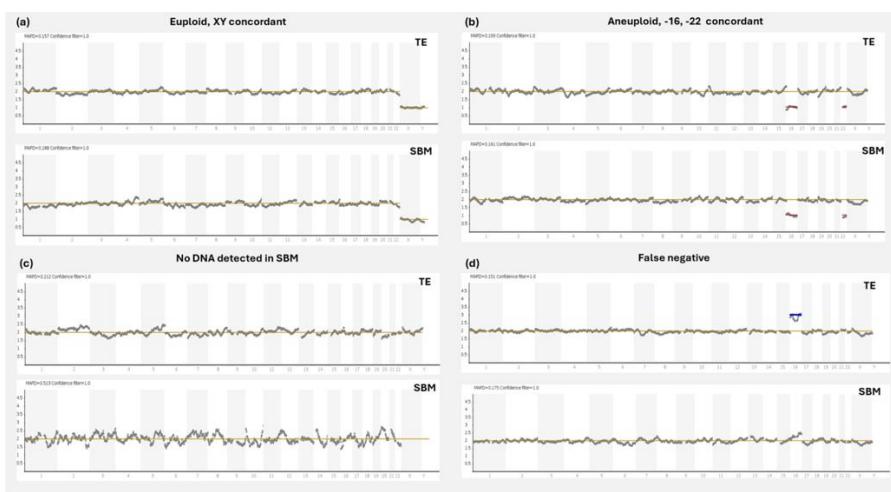


Figura 6: análisis por NGS de la concordancia entre medio de cultivo embrionario y biopsia de trofectodermo. a) concordancia entre el medio de cultivo embrionario y biopsia de trofectodermo: perfil euploide masculino; b) concordancia entre el medio de cultivo embrionario y biopsia de trofectodermo: perfil aneuploide con perdidas en los cromosomas 16 y 22; c) discordancia entre el medio de cultivo embrionario y biopsia de trofectodermo: medio de cultivo embrionario no informativo, falta de cromosomas sexuales; d) falso negativo, discordancia entre el medio de cultivo embrionario y biopsia de trofectodermo: la biopsia de trofectodermo muestra una ganancia en el cromosoma 16 mientras que el medio de cultivo embrionario no (Bakalova, D. N. et al., 2025).

El grado de informatividad y la tasa de amplificación del genoma de las muestras varía entre estudios, por lo general es más bajo en las muestras de medio de cultivo embrionario que en las de biopsia de trofectodermo debido a la diferente concentración de material genético de cada muestra (Huang et al., 2019; Rubio et al., 2019; Nguyen et al., 2025).

La tasa de concordancia en la ploidía del embrión entre la biopsia de troflectodermo y el medio de cultivo embrionario varía entre diferentes estudios en un rango aproximado de 63.6% a 81.8% (Nguyen et al., 2025; Sialakouma et al., 2021). Este rango es bastante amplio, lo que indica que no siempre hay una concordancia clara y directa entre la biopsia de troflectodermo y

el medio de cultivo embrionario. Esta variación podría deberse, en gran medida, a la amplia variedad de protocolos seguidos en los diferentes estudios.

Con el fin de unificar esta variabilidad de resultados Rubio et al. (2020) llevaron a cabo un estudio en 8 centros de reproducción asistida en 4 continentes (unificando protocolos de cultivo y de recogida del medio) e incluyendo 1301 blastocitos, obtuvieron una tasa de concordancia en la ploidía del embrión del 78.2%.

Chow et al. (2024) comparan la eficacia del niPGT-A en medio de cultivo de embriones obtenidos por FIV (fecundación in vitro) y por ICSI (microinyección intracitoplasmática de espermatozoides) en relación con la biopsia de trofectodermo y no obtuvieron una diferencia significativa entre los embriones procedentes de FIV e ICSI.

Otros tipos de estudios utilizan como valor de referencia el embrión competente, Huang et al. (2019) obtuvo una tasa de concordancia en la ploidía del embrión de 93.7% y unas tasas de informatividad de la biopsia de trofectodermo y de medio de cultivo del 96.1% y el 92.3% respectivamente.

5.3 PROTOCOLO DE CULTIVO.

En los diferentes estudios, cada laboratorio lleva a cabo su propio protocolo de cultivo, (todavía no hay un protocolo estandarizado para esta técnica). Dentro de los diferentes protocolos de cultivo utilizados, se siguen algunos estándares (Bakalova, D. N. et al., 2025).:

- Una decumulación exhaustiva previa al ICSI para eliminar todas las células del cúmulo y evitar contaminación materna o posterior al FIV para evitar la contaminación materna y paterna.
- Cultivo embrionario individual, para evitar la contaminación cruzada.
- Extensión en el tiempo del cultivo embrionario (la mayoría de los cultivos se extienden a día 6).

Por lo general el protocolo que se sigue conlleva el cultivo estándar del embrión de cada laboratorio hasta día 3-4, en ese mismo día se realizan una serie de lavados al embrión y se cambia el medio. El embrión permanece en la gota de cultivo individual hasta día de la recolección del medio de cultivo que suele ser el día 5-6 (Figura 7).

La variabilidad de los resultados reside principalmente en el número de lavados que se le realizan al embrión, el día de la recogida del medio y la contaminación.

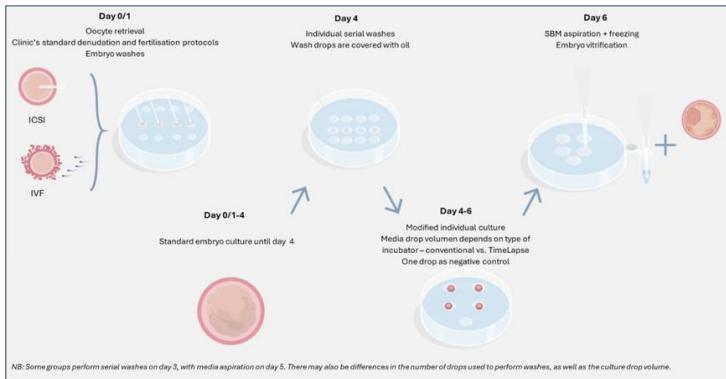


Figura 7: cultivo embrionario para la recogida del medio de cultivo para niPGT-A (Bakalova et al., 2025).

5.3.1 DÍA DE RECOLECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Se ha observado que a medida que avanza el tiempo de cultivo del embrión, aumenta la liberación de moléculas al medio. Teniendo esto en cuenta, podría esperarse que un mayor tiempo de cultivo conlleva una mayor concentración de moléculas de cfDNA para analizar y por tanto una mayor informatividad. La mayoría de estudios reportan que la extensión del cultivo hasta día 6 aumenta la concentración de cfDNA en el medio de cultivo haciendo que aumente la tasa de amplificación y de concordancia (Bakalova et al., 2025). (Figura 8).

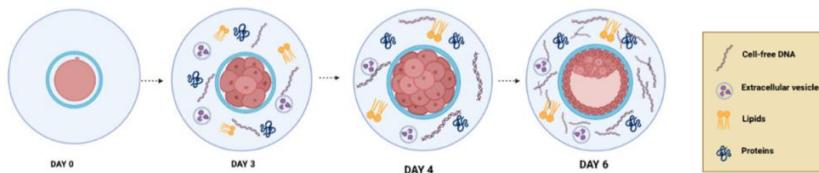


Figura 8: diferencias concentracion de DNA en el medio de culivo embrionario entre el día 3 y el día 6 (Del Collado et al., 2023)

En un estudio en el que se analizó el medio de cultivo de 68 blastocistos, Kang et al. (2024) obtuvieron una tasa de amplificación tras la recolección en día 6 (100%) mucho mayor que en día 5 (75%). Resultados similares obtuvo el grupo de Chow et al., (2024), donde la tasa de concordancia entre la biopsia y el medio de cultivo es mucho mayor cuando el medio se recoge en día 6 (85%) en vez de en día 5 (60%).

La principal preocupación frente a la extensión del cultivo hasta día 6 reside en la perdida de calidad embrionaria y potencial de implantación del embrión.

Según Del Collado et al. (2023) está ampliamente probado que la transferencia de embriones en día 5 brinda desenlaces reproductivos más favorables. En contraposición, Banti et al. (2025)

estudiaron los posibles efectos negativos de la extensión del cultivo embrionario hasta día 6, comparándolo con los beneficios obtenidos de ello en referencia al niPGT-A, concluyendo: “no encontramos efectos perjudiciales por prolongar el cultivo. Es decir, el grado de expansión y la calidad morfológica de los embriones fue al menos igual, si no mejor, tras el cultivo prolongado hasta día 6” (p.8).

5.3.2 CONTAMINACIÓN.

Evitar la contaminación de las muestras de medio de cultivo es esencial para garantizar la eficacia del análisis, ya que el medio de cultivo sin contaminación tiene tasas de concordancia mucho más altas con la biopsia de trofectodermo (73.9%) (Chen et al., 2021).

Se han detectado dos tipos de contaminación del medio de cultivo: materna y exógena.

Chen et al. (2021) mediante un análisis scBS-seq (secuenciación por bisulfito de célula única) que permite analizar patrones de metilación, hallaron el origen de la contaminación materna. Analizaron 191 medios de cultivo basándose en los patrones de metilación de los posibles componentes del medio de cultivo, los cuales son diferentes entre sí, en las células del blastocisto los niveles de metilación muy bajos ya que tras la fecundación se produce una desmetilación de todo el genoma, en los corpúsculos polares y en las células del cúmulo los niveles de metilación muy altos. A través de estos patrones observaron que entre los medios de cultivo que habían analizado 95 habían sufrido contaminación por células del cúmulo. También realizaron un análisis en los medios de cultivo no contaminados con células del cumulo con el fin de evaluar la presencia de contaminación por parte de los corpúsculos polares. Observaron que en un tercio de las muestras existía esta contaminación.

La contaminación por parte de los corpúsculos polares implica una complicación en la técnica del niPGT-A ya que son más difíciles de eliminar que las células del cúmulo que se eliminan en la decumulación.

Bakalova et al. (2025) habla de contaminación exógena proveniente de plásticos o de los propios medios de cultivo. Otra fuente de contaminación exógena son los propios embriólogos y técnicos que manipulan las muestras.

Las estrategias para minimizar la contaminación se abordan en el apartado: discusión.

5.3.3 NÚMERO DE LAVADOS EMBRIONARIOS.

Entre los días 3-4 de cultivo se realizan una serie de lavados al embrión con el fin de eliminar cualquier posible contaminación ya sea materna, paterna o externa. Para ello, este se transfiere a una gota de medio fresco y se va añadiendo y aspirando medio alrededor del embrión con el fin de efectuar el lavado.

Chow et al., (2024) comparan dos métodos de lavado embrionario: el método secuencial, que consiste en realizar lavados en 5 gotas de medio para posteriormente transferirlos a una gota de medio de cultivo, y el método en un solo paso el cual consiste en realizar un solo lavado en una gota de medio y posteriormente transferir el embrión a la gota de medio de cultivo donde permanecen hasta día 5 o 6. Observaron que con ambos métodos se obtenían tasas de amplificación similares, pero las tasas de concordancia entre la biopsia de trofectodermo y el medio de cultivo fueron superiores en el método secuencial que las observadas en el método en un solo paso.

La investigación realizada por Kang et al. (2024) se centra en el método secuencial y evalúa el efecto del número de lavados embrionarios en los resultados del análisis de medio de cultivo. Dividieron la muestra en 2 grupos: NICS 1 en el cual los embriones se sometieron a tres lavados y NICS 2 en el cual los embriones se sometieron a diez lavados. Posteriormente, los embriones fueron transferidos a una gota de cultivo individual y cultivados hasta día 5 o 6, momento en el que se recoge la muestra de cultivo y se hace la biopsia de trofectodermo. Usando la biopsia de trofectodermo como referencia detectaron que la tasa de concordancia era mucho mayor en el grupo sometido a diez lavados (73.5%) que en grupo sometido a tres lavados (43.5%).

5.3.4 PROTOCOLO PARA EMBRIONES VITRIFICADOS.

Hasta ahora hemos hablado del protocolo de niPGT-A para embriones no vitrificados, los cuales nos permiten alargar el tiempo de recolección del medio durante todo su cultivo para obtener la mayor concentración de cfDNA posible. Por lo que surge la pregunta: ¿Es posible realizar niPGT-A en embriones vitrificados?

La principal preocupación radica en la forma en la que pueda afectar a la viabilidad del embrión dos ciclos de vitrificación y desvitrificación. Lo que implica una primera vitrificación del embrión y su posterior desvitrificación para recultivarlo y recoger la muestra de medio de

cultivo seguida de una segunda vitrificación y desvitrificación previa a la transferencia embrionaria.

Algunos estudios reportan una tasa de aborto más elevada en los grupos expuestos a doble vitrificación comparada con aquellos expuestos a un único ciclo. A pesar de ello no observaron diferencias en los resultados neonatales. En contraste, otro grupo dentro del mismo artículo de revisión, tras analizar retrospectivamente resultados clínicos de 694 transferencias, no encontró diferencias en la tasa de embarazo entre los embriones con doble vitrificación y aquellos con vitrificación simple (Bakalova et al., 2025).

Ardestani et al. (2024) realizaron un experimento con el fin de determinar el tiempo de cultivo óptimo tras la desvitrificación para que los embriones pudieran liberar el cfDNA necesario para el análisis al medio. Analizaron el medio de cultivo de 135 blastocistos y sus blastocistos correspondientes (congelados en días 5 y 6), con ciclos de PGT-A (N=73) y sin ciclos de PGT-A (N=62) y obtuvieron sus tasas de informatividad y de concordancia. Tras la desvitrificación, los blastocistos se sometieron a lavados seriados (con el fin de minimizar la contaminación, tanto materna como externa) y se transfirieron individualmente a una gota de medio. Los grupos en los que se dividió el trabajo son los siguientes: blastocistos en día 5 cultivados 8 horas (día 5 corto), blastocistos en día 5 cultivados 24 horas (día 5 largo) y blastocistos en día 6 cultivados 8 horas (día 6 corto) (Figura 9). Las tasas de informatividad fueron notablemente más bajas en el grupo de día 5 corto que en los otros dos. Entre los cuales no había diferencias significativas. En cuanto a las tasas de concordancia, tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los 3 grupos: día 5 corto (90.5%), día 5 largo (93.6%) y día 6 corto (92.3%).

Estas tasas de informatividad y concordancia indican que es necesario extender 24 horas el cultivo de embriones desvitrificados de día 5 y 8 horas el de embriones desvitrificados de día 6 para obtener la concentración de cfDNA necesaria para una tasa de informatividad optima.

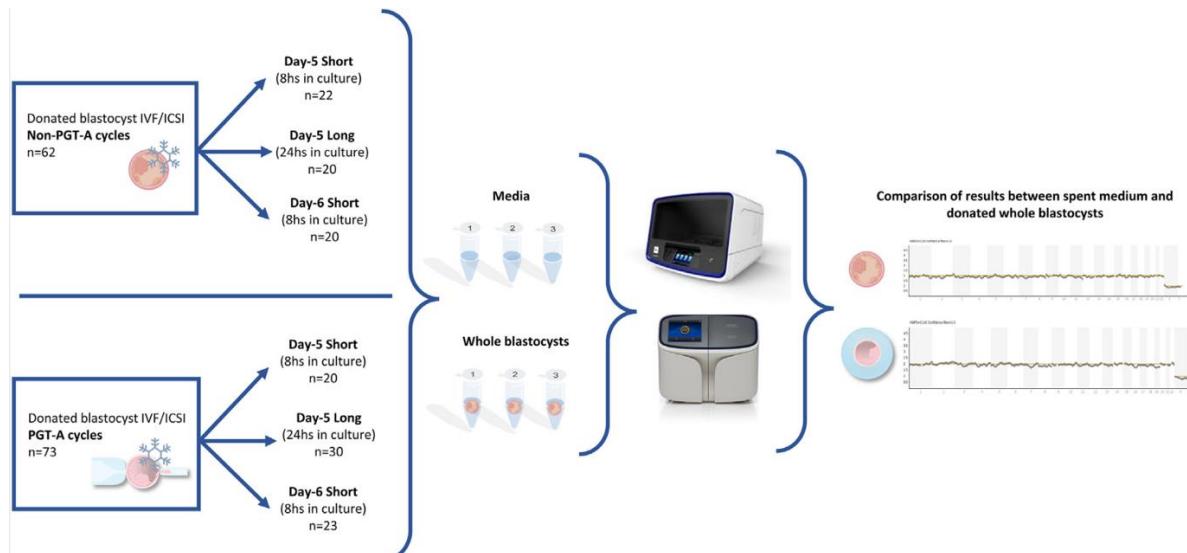


Figura 9: “Diseño experimental: blastocistos donados, tanto de ciclos sin PGT-A como con PGT-A, fueron cultivados durante 8 o 24 horas según el día de vitrificación. Se secuenciaron el medio de cultivo y los blastocistos completos, y se compararon los perfiles” (Ardestani et al., 2024).

6. DISCUSIÓN.

6.1 IMPORTANCIA DE LA UNIFICACIÓN DE PROTOCOLOS.

El descubrimiento del cfDNA en el medio de cultivo embrionario ha abierto la puerta al desarrollo de estrategias no invasivas de análisis genético preimplantacional. Hoy en día el mayor desafío de la técnica de niPGT-A es la heterogeneidad de resultados reportados entre los diferentes estudios publicados. Esta variabilidad interestudio, parece estar estrechamente relacionada con las diferencias en los protocolos empleados, lo que pone de manifiesto la necesidad de establecer procedimientos estandarizados que favorezcan la reproducibilidad y la fiabilidad de la técnica.

En base a los resultados recopilados en este trabajo y a pesar de que algunas de ellas se emplean en la gran mayoría de trabajos, planteamos algunas propuestas de cara a la estandarización de un protocolo:

En cuanto al momento de recogida del medio, el principal debate radica en determinar si la muestra de medio de cultivo debe recogerse en día 5, momento en el que se ha probado que la tasa de informatividad es mucho menor debida a la menor concentración de cfDNA (Kang et al., 2024), o en día 6 cuando dicha tasa de informatividad es mucho mayor (Bakalova et al., 2025), pero de acuerdo con algunos estudios la calidad embrionaria y la tasa de implantación se ven negativamente afectados (Del Collado et al., 2023). En contraste, Banti et al. (2025) reportaron que la calidad de los embriones no empeora, sino que incluso puede llegar a mejorar su potencial implantatorio en día 6. Considerando estos datos, la recogida de medio de cultivo

para un protocolo estandarizado de niPGT debería realizarse preferentemente en el día 6, si bien son necesarios más estudios comparativos para comprobar su impacto en los resultados clínicos.

Otro de los puntos controversiales dentro del protocolo es la contaminación. Se sabe que los principales focos de contaminación son de origen materno, por células del cumulo principalmente y por los corpúsculos polares (Chen et al., 2021) y exógena, proveniente de plásticos, medios y trabajadores que manipulen las muestras. Con el fin de minimizar la contaminación deberían implementarse las siguientes prácticas:

- La primera consiste en una decumulación exhaustiva, ya sea previa al ICSI o posterior al FIV, con el fin de eliminar cualquier resto de células del cumulo y espermatozoides.
- La segunda práctica es la realización de lavados embrionarios seriados, tres o cuatro días después de la fecundación, con el objetivo de eliminar cualquier resto de contaminación que pudiera estar adherida al ovocito, junto con un cambio de medio para descartar cualquier posible contaminación que hubiera presente en el mismo. Chow et al., (2024) demostraron que los lavados seriados son más eficaces que en un solo paso, obteniendo tasas de concordancia superiores. En consonancia con este trabajo, Kang et al. (2024) evaluaron la eficacia de realizar diez lavados frente a tres, obteniendo tasas de concordancia considerablemente más altas en las muestras que los embriones sometidos a diez lavados. En vista de estos resultados, la opción más eficaz es realizar diez lavados seriados a los embriones en día tres o cuatro, seguidos de su transferencia a un medio de cultivo fresco que se mantendrá hasta la recogida de la muestra en día seis.
- En tercer lugar, se debe establecer un protocolo de trabajo que permita minimizar la presencia de contaminantes externos, el cual incluya el uso de guantes, mascarilla, manipulación de las muestras en una cabina de flujo laminar y la previa desinfección del espacio de trabajo y esterilización con luz ultravioleta (Ardestani et al., 2024).
- Por ultimo y con el fin de monitorizar los niveles de contaminación en el medio de cultivo se debe añadir un control negativo para cada paciente. Este control se realiza mediante la adición de una gota de cultivo al lado de las que contienen los embriones, pero sin entrar en contacto con ellos. Si al analizar esta gota junto con el resto de muestras de medio de cultivo no se detecta ADN en ella, se presupone que los resultados del resto de muestras no se ven afectados por contaminación (Bakalova et al., 2025).

No obstante, aunque estas prácticas preventivas se fundamentan en los estudios incluidos en este estudio, es necesario profundizar en su evaluación con futuras investigaciones.

Por último, cabe mencionar las propuestas de cara a la estandarización del protocolo de niPGT-A para embriones vitrificados, donde el tiempo de cultivo tras la desvitrificación es de vital importancia no solo para permitir la liberación de una cantidad cfDNA suficiente al medio, sino para que el embrión no pierda calidad y viabilidad de cara a la transferencia. Se ha estimado que los tiempos óptimos para alcanzar un equilibrio entre ambas condiciones es de 24 horas para los embriones descongelados de día cinco y 8 horas para los embriones descongelados de día 6 (Ardestani et al., 2024). Sin embargo, un estudio más detallado de estos tiempos es esencial antes de su implementación.

6.2 APLICACIÓN CLÍNICA.

6.2.1 BENEFICIOS.

La principal ventaja que representa el niPGT-A radica en su carácter no invasivo, reduciendo los riesgos asociados a la biopsia embrionaria. A pesar de que actualmente no se puede considerar una técnica diagnóstica, se presenta como una alternativa prometedora al PGT-A convencional, con aplicaciones potenciales que podrían transformar el campo de la evaluación genética embrionaria.

Hoy en día, la evaluación del potencial de desarrollo e implantación embrionaria se basa principalmente en la valoración morfológica o morfocinética. Sin embargo, a pesar de que es un procedimiento eficaz, presenta una elevada subjetividad y a menudo se presentan discrepancias entre embríologos. Además, no es un indicador fiable de la dotación cromosómica del embrión, lo que puede conducir a la exclusión de embriones con una dotación cromosómica euploide que son erróneamente considerados no aptos para la implantación. La implementación del niPGT-A como herramienta complementaria a la morfocinética para la priorización de embriones en la transferencia brinda un punto de vista objetivo sobre la ploidía embrionaria, lo que implica una mayor fiabilidad en la selección de los embriones transferidos. Además, podría reducir el número de embriones descartados por su morfología dando oportunidad a más embriones de ser transferidos. Sun et al. (2024) desarrollaron un estudio en el que comparaban los resultados clínicos de embriones transferidos evaluados mediante niPGT-A, PGT-A o sus características morfológicas. Obtuvieron una mayor tasa acumulada de nacidos vivos en aquellos embriones evaluados mediante niPGT-A que en aquellos solo evaluados morfológicamente, demostrando que la aplicación del niPGT-A supone un avance para la priorización embrionaria en la transferencia.

Por otro lado, también podría representar una alternativa a la rebiopsia embrionaria. En ocasiones, tras realizar la biopsia embrionaria y el correspondiente PGT, los resultados no son concluyentes o informativos. En estos casos la solución es desvitrificar el embrión para realizar una segunda biopsia y volver a vitrificarlo en un segundo ciclo. Guarneri et al. (2024) estudiaron el efecto que tiene una doble biopsia sobre la tasa de embarazo clínico, obteniendo unas tasas significativamente menores en aquellas transferencias de blastocistos sometidos a doble biopsia en comparación con aquellos que solo fueron sometidos a una. Por ello, una posible alternativa a la rebiopsia es la realización de niPGT-A en embriones con resultados no informativos en la primera biopsia con el fin de evitar una segunda biopsia. Además, con el fin de evitar la desvitrificación y segunda vitrificación, el medio de cultivo embrionario podría recogerse antes de realizar la primera biopsia embrionaria y almacenarse hasta la obtención del resultado de dicha biopsia.

El PGT-A implica un elevado coste tanto de equipamiento como de personal, ya que requiere un microscopio invertido equipado con un láser, además de embriólogos específicamente formados en la realización de biopsias embrionarias. Esto hace que el coste de la técnica sea inalcanzable para clínicas o zonas con recursos limitados. En este sentido, el niPGT-A surge como alternativa que elimina los costes de material y personal necesarios para la biopsia, permitiendo el acceso a técnicas de evaluación genética a una población más amplia.

En algunos países la manipulación embrionaria está sujeta a una legislación muy estricta o incluso está prohibida. Por ejemplo, en Alemania, la legislación recientemente ha permitido la realización de la biopsia embrionaria para su aplicación en PGT-M, práctica que también se lleva a cabo en muchos países nórdicos (Bakalova et al., 2025). En otros países como Italia y Francia, la biopsia embrionaria está permitida bajo condiciones muy estrictas y con autorizaciones específicas. En este contexto, la aplicación de niPGT-A constituye una alternativa no invasiva y viable.

6.2.2 LIMITACIONES.

La principal limitación del niPGT-A es que, actualmente, no se puede considerar una técnica diagnóstica debido a que su precisión, reproducibilidad y fiabilidad son todavía insuficientes, así como su falta de concordancia con la técnica de referencia (PGT-A) y a la variabilidad de resultados entre laboratorios. Estas limitaciones derivan principalmente de la falta de estandarización de la técnica y de la interpretación de resultados. Partiendo de esto, podemos

señalar varias limitaciones que afectan al uso y aceptación de la técnica niPGT-A en la práctica diaria.

El riesgo de contaminación de la muestra por células maternas es muy elevado y en algunos casos, difícil de identificar, sobre todo en embriones femeninos. A ello añadimos la contaminación por factores externos, como material de laboratorio, medios o personal, la cual también es muy común. Como se ha discutido en el apartado de estandarización del protocolo, es de vital importancia aplicar medidas para evitar estos procesos de contaminación del medio con el fin de hacer un análisis lo más preciso y fiable posible. No obstante, la identificación y cuantificación de la contaminación son a menudo muy laboriosas e implican la secuenciación de perfiles o, como en el estudio de Vera-Rodriguez et al. (2018), el análisis de perfiles de metilación de los diferentes tipos celulares. Esta barrera técnica supone una limitación para la interpretación de resultados y la toma de decisiones clínicas.

El análisis de muestras e interpretación de resultados es variable entre los diferentes estudios y, actualmente no hay guías clínicas que lo regulen. De acuerdo con Bakalova et al. (2025), el análisis de resultados del niPGT-A debería realizarse mediante algoritmos personalizados que tengan en cuenta las características del cfDNA y adapten los valores umbrales de aneuploidía con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad, permitiendo poder compararlos de forma fiable con la técnica de referencia (biopsia de trofectodermo). Como demostró Huang et al. (2019), variaciones en los valores umbrales para la detección de mosaicismo modificaban las tasas de concordancia en la ploidía entre el medio de cultivo embrionario y la biopsia de trofectodermo.

La variabilidad en la interpretación de resultados sumada a la ausencia de protocolos estandarizados, dificulta significativamente la comparación entre estudios y contribuye a la generación de resultados no informativos. Por ello, es necesario continuar investigando, son necesarios más ensayos clínicos aleatorizados con muestras poblacionales más amplias ya que actualmente los datos disponibles son muy limitados. Todo ello es imprescindible para establecer un protocolo efectivo que permita definir tiempos de cultivo seguros y beneficiosos tanto para el embrión como para la recogida de medio.

Otro desafío en la interpretación de resultados es el mosaicismo embrionario, un fenómeno en el cual coexisten dos o más líneas celulares genéticamente diferentes en el embrión, pudiendo

permanecer confinadas al trofectodermo, la masa celular interna o a ambas (Bakalova et al., 2025). Algunos estudios indican que los embriones con mosaicismo de bajo y medio grado (20%-50% de células aneuploides) presentan un potencial de desarrollo equivalente al de los embriones totalmente euploides (Capalbo et al., 2021). Por el contrario, los embriones de alto grado de mosaicismo, expresan comportamientos más cercanos a los embriones completamente aneuploides (Capalbo et al., 2021). Por ello, es de vital importancia el poder analizar y distinguir los diferentes grados de mosaicismo en embriones.

Actualmente, la única forma de detectar mosaicismo embrionario es a través de la realización de la biopsia embrionaria y PGT-A convencional (Bakalova et al., 2025), en ocasiones, ni siquiera mediante esta técnica se puede detectar este mosaicismo, representando una barrera para el análisis genético preimplantacional y un desafío aún mayor para el niPGT-A, el cual no permite detectar el mosaicismo ni sus distintos grados de forma fiable.

Las limitaciones técnicas y de interpretación previamente mencionadas no solo afectan negativamente a la fiabilidad del niPGT-A, sino que plantean importantes cuestiones éticas sobre su uso en la selección embrionaria y la comunicación de resultados a los pacientes. Aunque los datos obtenidos mediante niPGT-A son prometedores y presentan un nuevo camino dentro del campo de la evaluación genética de embriones, a día de hoy son incompletos y poco fiables, suponiendo un riesgo a la hora de tomar decisiones clínicas basadas en estos resultados.

7. CONCLUSIONES.

El niPGT-A presenta una alternativa prometedora para la evaluación genética de embriones gracias a su carácter no invasivo, lo que implica ventajas en términos de viabilidad embrionaria, así como beneficios tanto económicos como sociales. No obstante, su aplicación clínica como técnica diagnóstica está limitada principalmente por la falta de resultados concluyentes y la ausencia de estandarización tanto del protocolo como de la interpretación de dichos resultados, lo que genera una variabilidad notable de resultados interestudio. Por el momento una alternativa viable para su aplicación en la clínica es su uso como herramienta complementaria a la morfocinética en la priorización de embriones para la transferencia.

El avance hacia su implementación como técnica diagnóstica estará condicionado por la realización de ensayos clínicos aleatorizados con un tamaño muestral adecuado, que impulsen el desarrollo de un protocolo estandarizado que garantice su reproducibilidad.

Como conclusión, el desarrollo de esta prometedora línea de investigación que marca el niPGT-A, determinará su posible implementación como técnica de evaluación y diagnóstico genético embrionario, siempre que se logre superar sus limitaciones técnicas y éticas actuales.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ardestani, G., Banti, M., García-Pascual, C. M., Navarro-Sánchez, L., Van Zyl, E., Castellón, J. A., Simón, C., Sakkas, D., & Rubio, C. (2024). Culture time to optimize embryo cell-free DNA analysis for frozen-thawed blastocysts undergoing noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Fertility And Sterility*, 122(3), 465-473. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.04.037>
2. Bakalova, D. N., Navarro-Sánchez, L., & Rubio, C. (2025). Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing. *Genes*, 16(5), 552. <https://doi.org/10.3390/genes16050552>
3. Banti, M., Bishtawi, M. A., Van Zyl, E., Kafetzis, D., & Griffin, D. K. (2025). Evaluating non-invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (niPGT-A) from spent culture medium: prolonged embryo culture to day 6 increases informativity without negatively impacting quality and live birth rates. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-025-03564-9>
4. Capalbo, A., Poli, M., Rienzi, L., Girardi, L., Patassini, C., Fabiani, M., Cimadomo, D., Benini, F., Farcomeni, A., Cuzzi, J., Rubio, C., Albani, E., Sacchi, L., Vaiarelli, A., Figliuzzi, M., Findikli, N., Coban, O., Boynukalin, F. K., Vogel, I., . . . Simón, C. (2021). Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial. *The American Journal Of Human Genetics*, 108(12), 2238-2247. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.11.002>
5. Chen, Y., Gao, Y., Jia, J., Chang, L., Liu, P., Qiao, J., Tang, F., Wen, L., & Huang, J. (2021). DNA methylome reveals cellular origin of cell-free DNA in spent medium of human preimplantation embryos. *Journal Of Clinical Investigation*, 131(12). <https://doi.org/10.1172/jci146051>
6. Chow, J. F. C., Lam, K. K. W., Cheng, H. H. Y., Lai, S. F., Yeung, W. S. B., & Ng, E. H. Y. (2024). Optimizing non-invasive preimplantation genetic testing: investigating culture conditions, sample collection, and IVF treatment for improved non-invasive PGT-A results. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, 41(2), 465-472. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-03015-3>
7. Cinnioglu, C., Glessner, H., Jordan, A., & Bunshaft, S. (2023). A systematic review of noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Fertility And Sterility*, 120(2), 235-239. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.06.013>

8. Del Collado, M., Andrade, G. M., Gonçalves, N. J. N., Fortini, S., Perecin, F., & Carriero, M. M. (2023). The embryo non-invasive pre-implantation diagnosis era: how far are we? *Animal Reproduction*, 20(2). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2023-0069>
9. Domingo-Muelas, A., Skory, R. M., Moverley, A. A., Ardestani, G., Pomp, O., Rubio, C., Tetlak, P., Hernandez, B., Rhon-Calderon, E. A., Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C. M., Bissiere, S., Bartolomei, M. S., Sakkas, D., Simón, C., & Plachta, N. (2023). Human embryo live imaging reveals nuclear DNA shedding during blastocyst expansion and biopsy. *Cell*, 186(15), 3166-3181.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.06.003>
10. Guarneri, C., Reschini, M., Pinna, M., Perego, L., Sanzani, E., Somigliana, E., Sorrentino, U., Cassina, M., Zuccarello, D., & Ciaffaglione, M. (2024). The impact of a second embryo biopsy for preimplantation genetic testing for monogenic diseases (PGT-M) with inconclusive results on pregnancy potential: results from a matched case-control study. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, 41(5), 1173-1179. <https://doi.org/10.1007/s10815-024-03078-w>
11. Handayani, N., Aubry, D., Boediono, A., Wiweko, B., Sirait, B., Sini, I., Polim, A. A., Dwiranti, A., & Bowolaksono, A. (2023). The origin and possible mechanism of embryonic cell-free DNA release in spent embryo culture media: a review. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, 40(6), 1231-1242. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02813-z>
12. 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 trophectoderm biopsy. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 116(28), 14105-14112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907472116>
13. Kang, X., Wen, M., Zheng, J., Peng, F., Zeng, N., Chen, Z., Wu, Y., & Sun, H. (2024). Influence of the number of washings for embryos on non-invasive preimplantation chromosome screening results. *Frontiers In Endocrinology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1363851>
14. Nguyen, H. T. T., Luu, T. T. M., Đô, L. T., Nguyen, T. C., Nguyen, D. T. N., Ho, T. T. M., Giang, H., Dao, T. T. H., Huynh, B. G., Ho, T. M., & Vuong, L. N. (2025). Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidy using cell-free DNA in blastocyst culture medium. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-025-03510-9>
15. Rubio, C., Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C. M., Ocali, O., Cimadomo, D., Venier, W., Barroso, G., Kopcow, L., Bahçeci, M., Kulmann, M. I. R., 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 trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 223(5), 751.e1-751.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.04.035>
16. 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 trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertility And Sterility*, 112(3), 510-519. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.038>
17. 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. <https://doi.org/10.21873/invivo.12645>
18. 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. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey028>