

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

**Comparativa entre dos técnicas de biopsia
embrionaria en Diagnóstico Genético
Preimplantacional: *Pulling-Stretching* y
Flicking. Perspectivas Futuras.**

Autor: Laura de Mingo Colás

Tutoras: M^a Irene Rubio Palacios y Ana Isabel Castillo Varón

Alcobendas, Septiembre 2025

RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE	3
ABSTRACT	4
KEY WORDS	4
LISTADO ABREVIACIONES	5
INTRODUCCIÓN	6
1. Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT)	6
1.1. Definición y e inicios del PGT.....	6
1.2. Indicaciones para la realización de PGT.....	6
1.3. Tipos de PGT.....	7
1.4. Protocolo general PGT	7
1.5. Limitaciones PGT	8
2. Biopsia embrionaria	9
2.1. Método <i>Pulling-stretching</i>	11
2.2. Método <i>Flicking</i>	12
3. Mosaicismo	13
3.1 Clasificación mosaicismo.....	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO	16
METODOLOGÍA	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXO	34

RESUMEN

El diagnóstico genético preimplantacional (PGT), es una técnica que se realiza en algunos tratamientos de reproducción humana asistida para identificar aneuploidías en los embriones antes de transferirlos al útero. Una etapa crítica del PGT es la biopsia embrionaria, donde se extraen entre 5-6 células del trofoectodermo del embrión en estado de blastocisto con ayuda de pulsos láser, mediante dos técnicas convencionales: método *pulling-stretching* (estiramiento y tracción) y método *flicking* (cizalla). En el presente trabajo se realiza una revisión bibliográfica comparando ambas técnicas, analizando el impacto sobre la viabilidad del embrión, la calidad del material genético extraído y la incidencia de mosaicismo, una condición que puede dificultar la interpretación diagnóstica y por ende, la toma de decisiones sobre el destino final de dicho embrión. A través del análisis de estudios recientes y encuestas a embriólogos se concluye que no existen diferencias significativas entre ambas técnicas en cuanto al aumento de tasa de mosaicismo siempre y cuando se siga un protocolo estandarizado. No obstante, factores como mayor número de pulsos láser, cantidad de células extraídas y la experiencia del embriólogo que realiza la técnica pueden influir en los resultados. Además, se presentan nuevas técnicas innovadoras para la realización de biopsia embrionaria (como el método n-Ext) o el uso de pipetas de diseño innovador que podrían representar el futuro y biopsias embrionarias menos invasivas.

PALABRAS CLAVE

Diagnóstico genético preimplantacional, PGT-A; biopsia embrionaria; mosaicismo; método *pulling- stretching*, método *flicking*; tasa de mosaicismo; blastocisto, trofoectodermo, masa celular interna, viabilidad embrionaria; técnicas no invasivas.

ABSTRACT

Preimplantation genetic diagnosis (PGT) is a technique used in some assisted human reproduction treatments to identify aneuploidy in embryos before transferring them to the uterus. A critical stage of PGT is the embryo biopsy, where 5-6 cells are extracted from the trophoectoderm of the embryo at the blastocyst stage with the help of laser pulses, using two conventional techniques: pulling-stretching and flicking. In the present work a bibliographic review is made comparing both techniques, analyzing the impact on the embryo viability, the quality of the genetic material extracted and the incidence of mosaicism, a condition that can hinder the diagnostic interpretation and therefore, the decision making on the final destiny of the embryo. Through the analysis of recent studies and surveys of embryologists, it is concluded that there are no significant differences between both techniques in terms of the increase in the rate of mosaicism if a standardized protocol is followed. However, factors such as the greater number of laser pulses, the number of cells extracted and the experience of the embryologist performing the technique may influence the results. In addition, new innovative techniques for embryo biopsy are presented, such as the n-Ext method or the use of innovative pipettes, that could represent the future and less invasive embryo biopsies

KEY WORDS

Preimplantation genetic diagnosis, PGT-A; embryo biopsy; mosaicism; pulling-stretching method, flicking method; mosaicism rate; blastocyst, trophectoderm, inner cell mass, embryo viability; noninvasive techniques.

LISTADO ABREVIACIONES

NGS: secuenciación de próxima generación

TE: trofoectodermo

MCI: masa celular interna

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

ZP: zona pelúcida

FIV: fecundación in vitro

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides

DP: diagnóstico prenatal

D3: día 3 de desarrollo embrionario

D5: día 5 de desarrollo embrionario

D6: Día 6 de desarrollo embrionario

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

FSH: hormona foliculoestimulante

AR: aborto de repetición

INTRODUCCIÓN

1. Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGT)

1.1. Definición y e inicios del PGT

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP), también conocido como PGT por sus siglas en inglés (*preimplantation genetic test*), es una prueba que se realiza de forma complementaria en algunos tratamientos de reproducción humana asistida con la finalidad de detectar anomalías genéticas en los embriones (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020). El objetivo es identificar los embriones genéticamente sanos antes de transferirlos al útero y evitar así la transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia en aquellas parejas con indicación clínica para ello.

El PGT comenzó como una técnica experimental en la década de 1990 con métodos basados en la PCR, utilizados para la selección del sexo y la detección de enfermedades monogénicas (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020).

Desde su implementación en el año 1990, el PGT ha evolucionado significativamente tanto en el aspecto técnico de la obtención de las muestras (biopsia embrionaria) como en el análisis de estas. Gracias a los avances en biotecnología, se ha mejorado especialmente en los aspectos relacionados con la secuenciación genética (Petch y Crosby 2024).

A pesar de su impacto positivo en la reducción de enfermedades hereditarias, el PGT plantea importantes implicaciones técnicas, éticas, legales y sociales (Ramos Vergara et al. 2018).

1.2. Indicaciones para la realización de PGT

El PGT se aplica a pacientes con diferentes indicaciones. La realización de esta prueba está recomendada cuando al menos uno de los progenitores es portador de alguna enfermedad hereditaria o presenta un cariotipo alterado. Asimismo, se considera en

parejas con antecedentes de un hijo previo enfermo por alguna enfermedad genética, fallos previos en ciclos FIV, fallos repetidos de implantación embrionaria, AR, antecedentes de embarazo aneuploide o cuando los pacientes presentan una edad materna avanzada o un factor masculino severo (Greco et al. 2020).

En cuanto a la selección de sexo, en España sólo está permitida la selección de embriones en aquellos casos en los que la enfermedad genética está ligada a los cromosomas sexuales e implica la transferencia de una enfermedad grave a la descendencia. En algunos casos (como para seleccionar embriones genéticamente compatibles con el tratamiento de un hermano afectado por una enfermedad), para poder realizar el PGT es necesario un informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Asistida que deberá ser presentado ante la autoridad sanitaria pertinente, la cual deberá dar su autorización (Moya González y Ramón Fernández 2018).

1.3. Tipos de PGT

Existen tres tipos de PGT diferentes en función del tipo de análisis que se quiera realizar. **PGT-A**, para la detección de aneuploidías, es decir, permite detectar la existencia de alteraciones numéricas en la dotación cromosómica de los embriones. **PGT-M**, para el diagnóstico de enfermedades monogénicas, pudiéndose detectar la alteración de un gen en concreto en los embriones. Y, por último, **PGT-SR**, para la detección de alteraciones estructurales, que permite examinar la presencia de embriones anómalos en función de si estas alteraciones están equilibradas o no (Zegers-Hochschild et al. 2017).

1.4. Protocolo general PGT

El PGT comprende dos fases; la primera se lleva a cabo en el laboratorio de Fecundación *In Vitro* y es en la que se realiza la biopsia al embrión para extraer de él células sin comprometer su desarrollo. La segunda fase se lleva a cabo en el laboratorio de análisis genético, donde se analizan las células biopsiadas para conocer su estatus cromosómico. Para llevar a cabo todo ello es necesario la realización de un ciclo de fecundación *in vitro* en el que se obtienen los embriones de la paciente que han de ser analizados, describiéndose de forma general los siguientes pasos (Imudia y Plosker 2016):

1. Estimulación ovárica controlada para la obtención del mayor número de ovocitos maduros.
2. Tratamiento de FIV. Según la literatura es aconsejable realizar ICSI para evitar la contaminación por otras células (como sería el caso de espermatozoides alrededor de la zona pelúcida en el caso de fecundación *in vitro* convencional).
3. Cultivo embrionario.
- 4. Biopsia embrionaria.**
5. Criopreservación de los embriones biopsiados.
6. Transporte de la muestra al laboratorio.
7. Amplificación del ADN de la muestra.
8. Análisis del ADN mediante distintas técnicas citogenéticas y moleculares.
9. Desvitrificación y transferencia embrionaria de aquellos genética y/o cromosómicamente normales de manera sincrona al desarrollo del útero, normalmente en un ciclo posterior.

En relación con el objetivo de este trabajo vamos a centrarnos en el análisis de la etapa de biopsia embrionaria.

1.5. Limitaciones PGT

Aunque la técnica del PGT es muy valiosa para identificar los embriones genéticamente viables antes de su transferencia, también presenta una serie de limitaciones como son las siguientes:

- El PGT se trata de un procedimiento invasivo que puede comprometer la viabilidad del embrión. Cabe destacar que requiere de una biopsia embrionaria con sus respectivos pasos: *hatching* o rotura de la zona pelúcida en D3 con láser, y extracción de células del TE en D5, con el riesgo de colapsos y degeneración del embrión. Si bien es cierto que, con las nuevas tecnologías y la realización de biopsia en D5 en vez de en D3, se ha reducido el riesgo de daño al embrión, pero sigue existiendo una pequeña posibilidad de que el embrión no sobreviva al proceso.

- No es sustituto de DP, pues existe la posibilidad de que aparezcan mutaciones *de novo* en alguno de los embriones, y las técnicas de diagnóstico prenatal conllevan sus propios riesgos.
- El hecho de diagnosticar embriones genéticamente normales no conlleva el éxito del ciclo; alguno de los embriones puede que no sobreviva al proceso de biopsia o de criopreservación, obligando a la cancelación del ciclo. Al tener que extraer células del embrión en D5 y mandarlas a analizar genéticamente, es necesario la vitrificación de embriones y ello también implica un ciclo de vitrificación y desvitrificación, de nuevo con sus propios riesgos asociados.
- Se trata de un proceso costoso.

Dado que la biopsia es un requisito esencial en el proceso, a lo largo de los años se han ido implementando nuevas técnicas y protocolos para la realización de biopsia embrionaria en cuanto a la obtención de células, amplificación de ADN y en la interpretación de los resultados genéticos. No obstante, este campo continúa avanzando, y en la actualidad se investiga el desarrollo de nuevos métodos menos invasivos que prometen reducir la manipulación del embrión, aumentar la rapidez del procedimiento para minimizar el tiempo que el embrión se encuentra fuera del incubador, a la vez que mejorar su seguridad y la precisión de los resultados genéticos.

2. Biopsia embrionaria

La biopsia embrionaria es una técnica que consiste en la extracción de una o varias células de un embrión en cultivo para analizarlas genéticamente y así seleccionar aquellos embriones transferibles

Existen diferentes tipos de biopsia en función del estadio embrionario pudiendo ser: **biopsia en día 3 de desarrollo embrionario**, donde se extraen una blastómera o dos de un embrión en células y **biopsia de blastocisto (D5-6)**, en la que se obtienen de 5 a 10 células procedentes del TE de un blastocisto (Mercader 2025).

A día de hoy la técnica más extendida es la biopsia de TE de blastocisto (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020) ya que permite un diagnóstico más fiable al disponer de un mayor número de células. El embrión en día 5 cuenta con 2 estructuras bien diferenciadas: el TE, que dará lugar a estructuras como la

placenta y la MCI, que dará lugar al feto, siendo de la primera de donde se extraerán las células para su análisis genético, (Greco et al. 2020).

La biopsia de TE se considera menos invasiva que la biopsia en D3 ya que al tener un mayor número de células en su estructura, el hecho de sustraerle unas cuantas no compromete su viabilidad. Además, en D5 los embriones ya han activado su genoma, por lo que sólo una parte de la cohorte alcanzará este estadio y el análisis de su material genético es mucho más preciso (Zeng, Su, y Li 2018).

No obstante, la biopsia de blastocisto presenta una limitación principal relacionada con el tiempo, ya que llevarla a cabo en este estadio supone un margen de tiempo muy corto para realizar el análisis genético. Como resultado, en la mayoría de los casos es necesario vitrificar los embriones, lo que conlleva el riesgo de que no sobrevivan al proceso de descongelación, aunque cabe destacar que los embriones en estadio de blastocisto presentan una tasa de supervivencia tras congelación equivalente en comparación con los embriones en etapa de división (células) (Lacey et al. 2021). En contrapartida, no se tienen que transferir los embriones euploides en el mismo ciclo, que está enfocado a la estimulación ovárica, sino en un ciclo sustituido para la preparación endometrial, en el que el útero tendrá la mejor recepción posible.

La biopsia embrionaria debe realizarse en un medio tamponado y consta de 3 fases bien diferenciadas:

- Primero, y solo en el caso de que el embrión no haya eclosionado de manera espontánea, se debe realizar una apertura de la ZP, también denominado *assisted hatching* o eclosión asistida para poder acceder a las células. Se puede realizar desde el día 3-4, con el riesgo de que se produzca la salida de lamasa celular interna, o en el mismo momento de la biopsia, buscando un punto que se aleje al máximo posible de la MCI (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020).

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales se puede realizar dicha apertura: perforación química con ácido Tyrode para disolver localmente la ZP; perforación mecánica con una micro aguja y perforación con tecnología láser, mediante el uso de un láser guiado sin contacto (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020). En la actualidad, el láser es la técnica más extendida (Hammadeh 2011).

- Una vez realizada la apertura en la ZP, se procede a la extracción de las células, cuyo material genético será posteriormente analizado. Dicha extracción se puede realizar mediante aspiración y estiramiento combinado con láser, método conocido como *pulling-stretching* o mediante fricción con la pipeta de sujeción, conocido como método *flicking* (Veiga 1997).
- Por último, se procede al depósito de la muestra biopsiada en un tubo de PCR, previamente lavada para eliminar restos de medio de cultivo (Boeckler, Happle, y Lipsker 2006).

2.1. Método *Pulling-stretching*

Una vez el embrión esté sujeto con la pipeta *holding*, se succiona con la pipeta de biopsia el TE extruido a través del orificio practicado con la eclosión asistida, tratando de evitar que colapse y absorbiendo de 5 a 10 células. A continuación, se aplicarán algunos disparos de láser individuales entre las uniones celulares, hasta que las células se separen de forma mecánica (Viñals Gonzalez, 2016) (Figura 1). (Figura 2).

En ocasiones, el exceso de disparos láser puede provocar el endurecimiento de la zona pelúcida o la degeneración del TE, haciendo que todos los disparos láser adicionales sean ineficientes (De Vos y De Munck 2025).

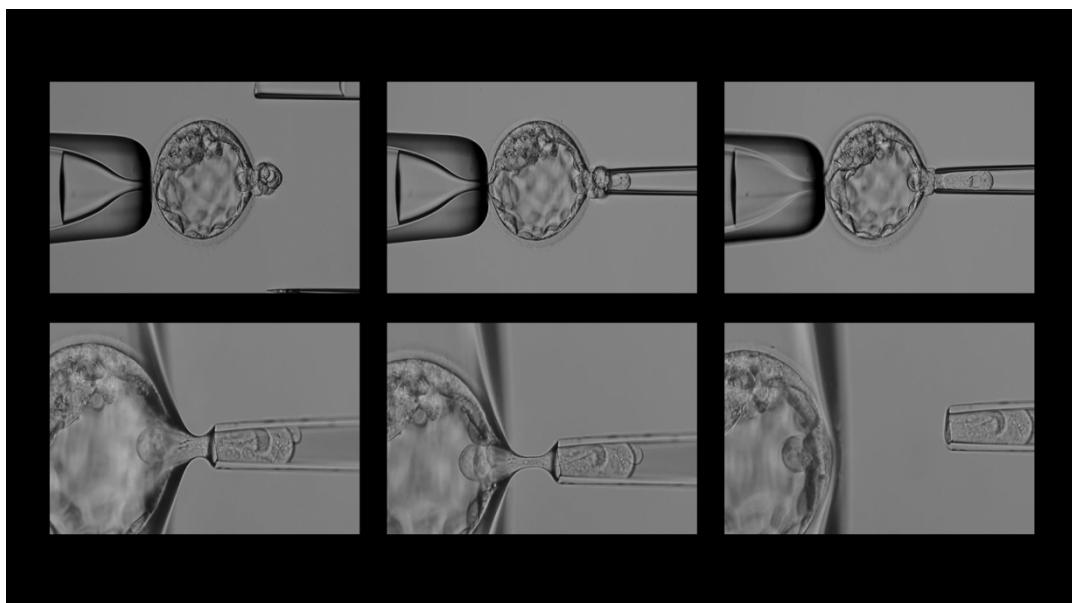


Figura 1. Secuencia de imágenes extraídas del vídeo *Day 5 Embryo Biopsy* (Reproductive Genetic Innovations, 2021)



Figura 2. Blastocisto iniciando *hatching*. Instituto Cefer, sin fecha.

2.2. Método *Flicking*

En este caso se sujetá el embrión con la pipeta *holding* y estirando ligeramente con la pipeta de biopsia se realizará una línea de corte con disparos láser. En ese momento se libera el blastocisto de la sujeción de la *holding*, quedando solo sujeto por la pipeta de biopsia. Se superponen ambas pipetas generando tensión desde la pipeta de biopsia con el movimiento de la pipeta de sujeción o *holding* y con un rápido movimiento (*flick*), como el de una cizalla, la pipeta de biopsia desciende sobre el borde de la de *holding*, ejerciendo una presión mecánica que será suficiente para separar las células del embrión (Viñals Gonzalez, 2016) (Figura 3).

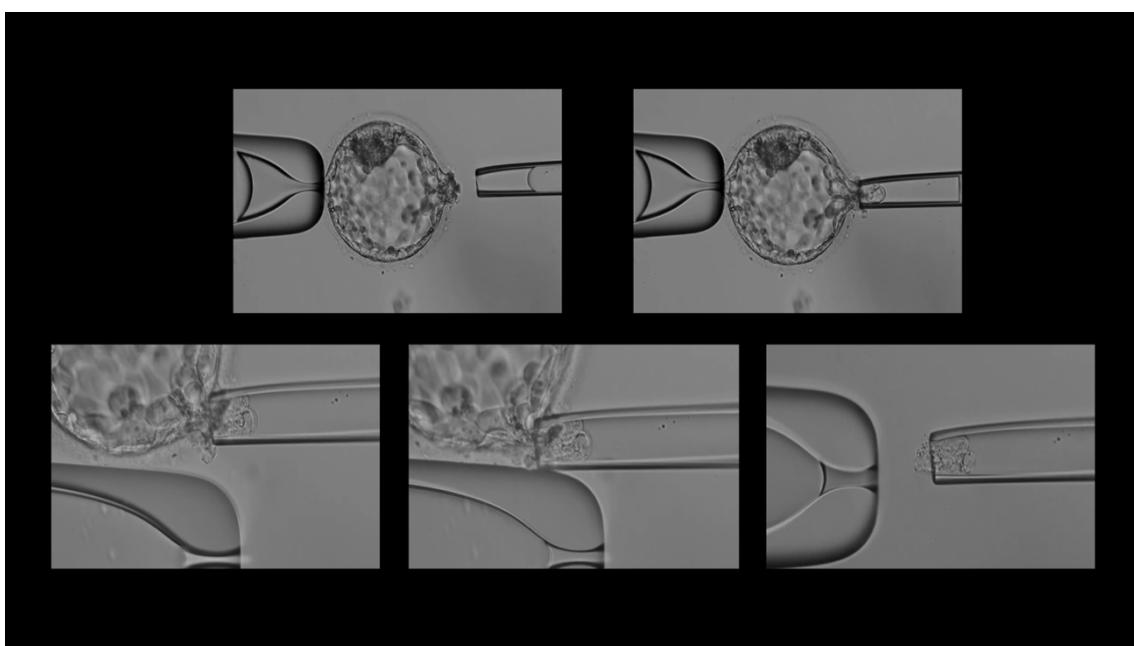


Figura 3. Secuencia de imágenes extraídas del vídeo *Flicking – Human Blastocyst Biopsy Without Laser Assistance* (Reproductive genetic Innovations, 2022)

3. Mosaicismo

El mosaicismo genético se define como la presencia de dos o varias líneas celulares genéticamente diferentes, pero derivadas de un mismo cigoto genéticamente homogéneo, pudiendo afectar a un gen, a un grupo de genes o a cromosomas en su totalidad (Boeckler et al. 2006).

El mosaicismo se genera principalmente durante la mitosis postcigótica por mala segregación cromosómica mediante no disyunción o por aberraciones en el centrosoma y el huso mitótico o defectos en la cohesión de las cromátidas.

El mosaicismo es el resultado de errores mitóticos durante el desarrollo del embrión, a diferencia de la aneuploidía completa, que es el resultado de errores meióticos durante la maduración de los gametos.

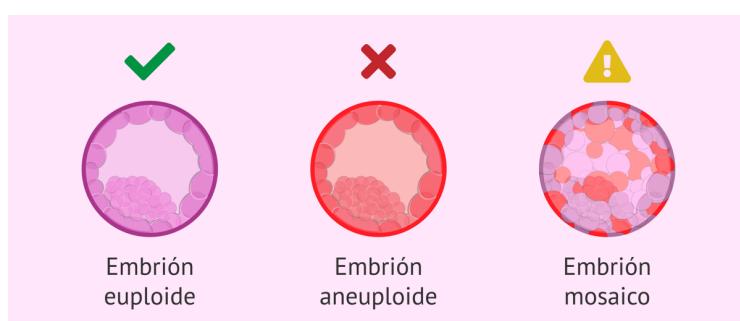


Figura 4. Diferencia entre embriones sanos, alterados y mosaicos
(Reproducción Asistida ORG, 2023)

3.1 Clasificación mosaicismo

En función de la dotación genética de las células embrionarias (Sedó 2018):

- Mosaico aneuploide: el embrión presenta dos o más líneas de células aneuploides sin existencia de células euploides.
- Mosaico diploide-aneuploide: el embrión presenta una línea celular euploide y otra aneuploide. Por lo general se debe a un error mitótico en una célula de un embrión euploide.
- Mosaico ploide: también llamados embriones mixoploides; estos comprenden una mezcla de células con diferentes múltiplos del número de cromosomas haploides

($n = 23$ para humanos). Estos pueden incluir cualquier combinación de haploidía (n), diploidía ($2n$) y poliploidía ($>2n$) dentro del mismo embrión, es decir, dentro del mismo embrión hay células con distintos números de cromosomas.

- Mosaico caótico: presenta alteraciones cromosómicas severas. El embrión presenta múltiples cromosomas afectados y cada célula presenta un conjunto de cromosomas aparentemente aleatorios.

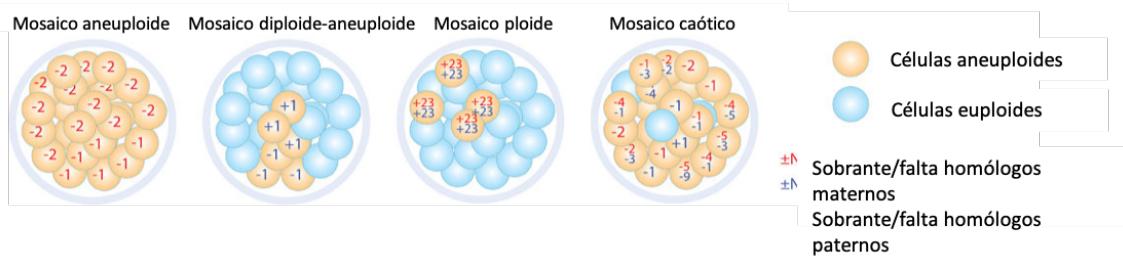


Figura 5. Tipos de embriones mosaicos en función de la dotación genética de las células. Adaptado de McCoy, R.C. et al. (2017).

En función de las líneas celulares implicadas podemos clasificarlo de la siguiente manera (Esfandiari et al. 2016):

- Mosaicismo total: los embriones presentan este patrón tanto en el TE como en la MCI.
- Mosaico MCI: los embriones presentan mezcla de células euploides y aneuploides solo en la MCI.
- Mosaico TE: los embriones presentan mezcla de células euploides y aneuploides solo en el TE.
- Mosaico MCI/TE:
 - Tipo I: los embriones contienen todas las células aneuploides en la MCI y euploides en el TE.
 - Tipo II: los embriones contienen todas las células aneuploides en el TE y euploides en la MCI.

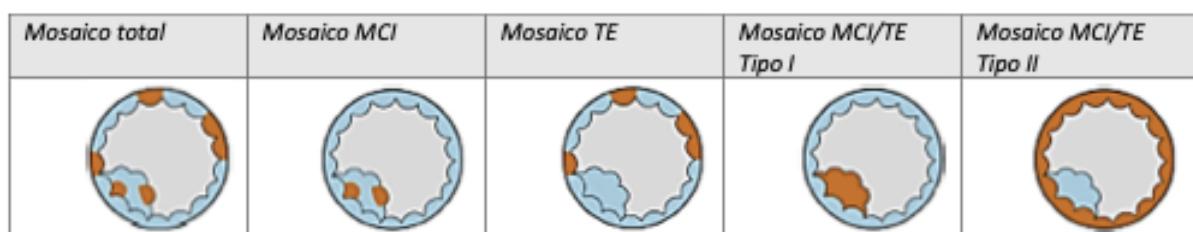


Figura 6. Tipos de mosaicismo según las líneas celulares implicadas. Las células euploides representan en azul y las aneuploides en marrón. Adaptado de Vera- Rodríguez et. al (2017).

Según el grado de mosaicismo, clasificamos a los embriones mosaicos de la siguiente manera:

- Mosaicismo de bajo grado: aneuploidía del 30-50%.
- Mosaicismo de grado alto: aneuploidía del 50-80%.

Algunos estudios, como el de Capalbo et al. o Lledó et al., demuestran que los embriones mosaicos pueden dar lugar a embarazos y recién nacidos vivos sanos, en concreto cuando se transfieren embriones mosaicos de bajo nivel. Sin embargo, otros estudios como el de Victor AR et al. Y Zhang et al. afirman que los embriones mosaicos se asocian con una menor implantación y mayores tasas de aborto espontáneo, lo que complica la decisión de transferencia de embriones. La transferencia de embriones mosaicos es una excepción en aquellas ocasiones en las que no se dispongan de embriones euploides, siempre priorizando la transferencia de embriones mosaicos de bajo grado antes que los de alto grado. Se recomienda asesoramiento genético siempre pre PGT-A y post PGT-A y en caso de lograr gestación se debe realizar un DP (Cram y Leigh 2019).

Con el creciente uso de técnicas de NGS para realizar PGT-A, es cada vez más frecuente encontrar embriones mosaicos. La incidencia reportada de embriones mosaicos varía considerablemente entre laboratorios de análisis genéticos, desde un mínimo del 2% hasta un máximo del 40%. Esto probablemente se debe a las diferencias en la sensibilidad y especificidad de las plataformas de análisis utilizadas y los puntos de corte aplicados para la interpretación de los datos, especialmente en la clasificación de embriones en mosaico de bajo grado. También podría deberse a otros factores relacionados con la técnica de biopsia o al número de células biopsiadas (Rodrigo et al. 2020).

En algunos estudios, al analizar otras partes del embrión después de encontrar mosaicismo en el TE, se ha visto que en muchos casos ese mosaicismo no aparece en las demás muestras, como en el ICM (Popovic et al. 2018; Victor et al. 2019; Wu et al., s. f.). Aunque esto podría explicarse por la presencia de un mosaicismo de bajo grado localizado en una zona específica del embrión, algunos investigadores han planteado que, en realidad, el embrión no presenta mosaicismo y que el resultado podría deberse a errores generados por la técnica utilizada. A este fenómeno se le conoce como mosaicismo artefactual o técnico (Capalbo et al. 2016; Goodrich et al. 2017; Popovic et al. 2020).

En este sentido, la calidad y precisión en la obtención de la biopsia de TE se ha relacionado con la posible aparición de mosaicismo artefactual (ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group et al. 2020; ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group et al. 2020). La Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGDIS) ha advertido que una técnica deficiente, ya sea por daño celular excesivo o por biopsias con escaso número de células, puede alterar los resultados cromosómicos. Así, la experiencia del embriólogo y el uso controlado del láser, incluyendo el número de pulsos aplicados, se consideran una posible fuente de mosaicismo técnico (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society [PGDIS], 2021).

HIPÓTESIS

El método de realización de la biopsia mediante técnicas convencionales como *pulling-stretching* o, *flicking* así como de nuevas técnicas como el método de extrusión n-Ext y pipetas innovadoras, influye en la calidad del material genético obtenido, la viabilidad embrionaria y los resultados del PGT.

OBJETIVO

Comparar, a través de la revisión de la literatura científica, como impacta el tipo realizado de biopsia de blastocisto en la tasa de mosaicismo embrionario, la calidad del material genético obtenido, la viabilidad embrionaria y los resultados del PGT. Se analizarán las técnicas convencionales de *pulling-stretching*, *flicking* y otras nuevas que tienen proyección de futuro como método de extrusión n-Ext y pipetas innovadoras para la realización de biopsia.

METODOLOGÍA

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica utilizando bases de datos como Pubmed, SciELO o Web of Science, Fertility and Sterility y artículos publicados en revistas como ESRHE o ASEBIR, seleccionando artículos originales de investigación que informasen sobre las dos técnicas de biopsia de blastocistos, tanto por separado como en conjunto. Además, se incluyeron estudios sobre nuevas técnicas de biopsia de embriones con potencial impacto en el futuro. Para garantizar la actualidad de la información, se aplicaron filtros por año de publicación seleccionando preferentemente los artículos más recientes siempre que fuera posible, desde el 2019 hasta la actualidad.

Aunque en una revisión bibliográfica no se realizan encuestas, se ha decidido añadir un anexo con el sondeo elaborado, que constó de preguntas muy concretas para estimar la tendencia y opiniones en el uso de las técnicas de biopsia por parte de los embriólogos en la práctica habitual. La encuesta se realizó de forma interna durante los meses de mayo a julio de 2025 a los embriólogos de diferentes clínicas IVI de España con el fin de evaluar la práctica clínica habitual, el nivel de complejidad percibido y las preferencias en la aplicación de las distintas técnicas de biopsia embrionaria, así como su impacto en la viabilidad y calidad del embrión. La encuesta fue completamente anónima. Se distribuyó vía correo electrónico y en ella participaron un total de 18 embriólogos. Las preguntas realizadas fueron las siguientes: ¿Cuál es la técnica de elección?; ¿Cuál de las técnicas necesita de mayor entrenamiento/habilidad?; ¿Cuál de las técnicas tiene un menor impacto sobre la viabilidad del embrión?; ¿Cuál de ellas hace que colapse con más facilidad?; ¿Cuál de ellas conlleva un mayor riesgo de degeneración de ADN y por tanto de necesidad de rebiopsiar o una ausencia de resultados?

Para la búsqueda bibliográfica se utilizaron palabras clave como *preimplantation genetic testing* (PGT), *embryo biopsy*, PGT-A, PGT-M, PGT-SR, y *no invasive PGT*. Las tablas y las figuras han sido traducidas al español y, en algunos casos, son de elaboración propia.

Las referencias y la bibliografía fueron gestionadas mediante Zotero.

RESULTADOS

Factores técnicos de la biopsia y posible afectación a la tasa de mosaicismo.

Los resultados de estudios más recientes realizados sobre la relación entre las técnicas embrionarias y la presencia o no de mosaicismo se exponen a continuación.

En 2019, el grupo de Scarica y colaboradores llevaron a cabo un estudio retrospectivo observacional con el objetivo de analizar la relación entre los factores técnicos implicados en la biopsia de TE y la incidencia de mosaicismo en embriones analizados mediante PGT-A como la técnica utilizada, la intensidad del láser, la cantidad de disparos láser la calidad del embrión. Se incluyeron 449 biopsias de TE, utilizando técnicas de micromanipulación y posterior análisis genético mediante NGS. Los resultados indicaron que ninguno de los factores analizados presenta diferencias estadísticas significativas en relación con la incidencia de mosaicismo. El estudio demostró que mientras se realice la biopsia embrionaria en un laboratorio con condiciones óptimas y embriólogos experimentados no hay ningún factor que afecte a la incidencia de tasa de mosaicismo.

Ferrer Robles y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo observacional en 2019 para evaluar la influencia de diferentes factores técnicos y morfológicos en la biopsia de TE en estadio de blastocisto y su impacto en los resultados de diagnóstico y tasas de implantación en el contexto del PGT. Se incluyeron 211 blastocistos biopsiados y analizados mediante NGS. Los resultados indicaron que el 96% de las muestras obtuvieron un diagnóstico genético, con un 47.5% de embriones aneuploides, 16.3% mosaicos y 36.1% euploides. Se observó una mayor incidencia de mosaicismo en embriones cuando al hacer la biopsia había un mayor número de disparos láser y un mayor número de células extraídas. El estudio concluyó que la biopsia de blastocisto es un procedimiento complejo en el que múltiples factores pueden impactar la precisión diagnóstica y la seguridad embrionaria. Se destacó la importancia de optimizar la técnica para minimizar el daño al embrión y mejorar la tasa de implantación.

En 2020, el Instituto Bernabeu presentó un estudio, liderado por Leyre Herrero, en el Congreso Europeo de Fertilidad (ESHRE) para investigar cómo dos técnicas de biopsia embrionaria (*pulling* y *flicking*) afectan a los resultados genéticos y al éxito de los ciclos de PGT-A. La biopsia se realiza para extraer células del TE del blastocisto y analizarlas

genéticamente, con el objetivo de detectar si el embrión es cromosómicamente normal, anormal o mosaico. El estudio analizó 499 embriones y comparó dos métodos: el *pulling*, que utiliza más disparos de láser, y el *flicking*, que necesita menos disparos. Los resultados mostraron que los embriones biopsiados con *pulling* tuvieron una mayor tasa de mosaicismo, pero los mosaicos eran de menor gravedad, lo que significa que afectaban a menos cromosomas. A pesar de que los mosaicos obtenidos con ambas técnicas implantaron con tasas similares, los mosaicos de bajo grado (procedentes de *pulling*) tuvieron una tasa de implantación casi igual a la de los embriones normales, aunque las diferencias no fueron significativas. El estudio concluyó que un mayor número de disparos de láser (más de 4) puede aumentar la tasa de mosaicismo, pero dado que los mosaicos eran simples, estos embriones tuvieron un éxito de implantación similar al de los embriones normales.

En 2021, Noró Pi y colaboradores realizaron un estudio observacional y retrospectivo para evaluar la influencia de dos técnicas de biopsia de TE en estadio de blastocisto sobre los resultados del diagnóstico de aneuploidías. El estudio incluyó 2.614 embriones, que fueron biopsiados en etapa de blastocistos de días 5, 6 o 7 de desarrollo. Se compararon dos métodos de biopsia: *flicking* y *pulling*, en los cuales se registraron variables como el número de células biopsiadas, el número de pulsos láser aplicados y la calificación morfológica del embrión. El análisis de aneuploidías se realizó mediante NGS. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la edad materna, el número de células biopsiadas, el número de pulsos láser aplicados, la calidad embrionaria ni la tasa de muestras no amplificadas o degradadas entre los dos grupos. Además, en cuanto al diagnóstico genético, la tasa de mosaicismo global fue similar en ambos grupos (25.17% vs 26.61%), y las proporciones de embriones euploides, aneuploides, diploides-mosaicos y aneuploide-mosaico fueron también comparables. En los embriones clasificados como diploides-mosaicos, las características genéticas, como el número de cromosomas implicados y el grado de mosaicismo, fueron similares entre ambas técnicas. El estudio concluyó que no existen diferencias significativas entre las técnicas de *flicking* y *pulling* en cuanto a la tasa de mosaicismo ni en las características genéticas de los embriones, cuando se realizan bajo una metodología estandarizada, controlando los pulsos láser y la integridad de las células biopsiadas durante el proceso.

En 2022, Coll L. y colaboradores llevaron a cabo un estudio prospectivo con el objetivo de investigar si la prevalencia de mosaicismo en los ciclos de PGT-A está vinculada con la técnica de biopsia de TE empleada (ya sea el número de pulsos de láser o las técnicas de *flicking* frente a *pulling*) o con el tiempo transcurrido entre la biopsia y el entubado. Este estudio se realizó entre mayo de 2019 y mayo de 2021 utilizando NGS para analizar las biopsias. Se analizaron variables como la incidencia de mosaicismo en relación con el tipo de técnica de biopsia, el tiempo entre la biopsia y el entubado, el tiempo desde el entubado hasta la amplificación y el número de pulsos de láser. También se examinó cómo estas variables podrían influir en los resultados clínicos de los blastocistos euploides transferidos. Los resultados mostraron que ninguna de las variables analizadas estuvo asociada con la prevalencia de mosaicismo ni en relación con el embarazo clínico. El análisis estadístico reveló que no hubo diferencias en la prevalencia de mosaicismo entre los blastocistos biopsiados con más de 3 pulsos de láser frente a 3 o menos, ni entre las técnicas de *flicking* y *pulling*. En resumen, el estudio sugiere que, siempre que los procedimientos de biopsia y entubado se realicen siguiendo altos estándares de calidad, no hay una técnica que aumente la posibilidad de generar mosaicismo artefactual. Por lo tanto, las biopsias deben realizarse sin importar la metodología utilizada, siempre con el objetivo de minimizar la manipulación del blastocisto.

Efectividad de las distintas técnicas de biopsia.

Con la aparición de las diferentes técnicas de biopsia en blastocisto, aparecieron los primeros estudios que comparaban la efectividad de una técnica y otra.

En 2019, Montalvo Pallès y colaboradores realizaron un estudio prospectivo observacional para analizar los efectos de dos técnicas de biopsia de TE (*pulling* y *flicking*) sobre la viabilidad y el potencial reproductivo de los embriones en el contexto de PGT. El estudio incluyó 52 blastocistos biopsiados entre noviembre de 2018 y abril de 2019, que fueron vitrificados, diagnosticados como euploides, y posteriormente desvitrificados para su transferencia. Se evaluaron variables como la tasa de supervivencia a la desvitrificación, las tasas de embarazo, implantación y aborto. Los embriones biopsiados mediante *pulling* lograron una mayor tasa de supervivencia a la vitrificación, aunque no estadísticamente significativa. Sin embargo, mostraron una tasa de embarazo e implantación significativamente superior en comparación con los

embriones biopsiados mediante *flicking*. No se observaron diferencias en las tasas de aborto. El estudio concluyó que, aunque se necesita una mayor muestra para confirmar los resultados, la técnica de *pulling* parece ser menos invasiva y podría ser preferible para mejorar las tasas de implantación y reducir el daño al embrión.

En 2020, Abeyta y colaboradores realizaron un estudio prospectivo para analizar los efectos de dos técnicas de biopsia de blastocistos (*pulling* y *flicking*) sobre la calidad del ADN y los resultados de PGT-A. El estudio incluyó 140 blastocistos, de los cuales 73 fueron biopsiados utilizando la técnica *pulling* y 67 con la técnica *flicking*. Los embriones fueron biopsiados por un único embriólogo en un centro de fertilidad, y los resultados fueron analizados en un laboratorio genético mediante NGS. Se evaluaron variables como la tasa de éxito en la amplificación de ADN y la tasa de resultados válidos. Los resultados mostraron que la técnica *pulling* produjo un 98.6% de resultados válidos, mientras que la técnica *flicking* presentó un 94.0%, siendo la tasa de "sin resultado" significativamente mayor en la técnica *flicking* (6%) en comparación con la técnica *pulling* (1.4%). Sin embargo, ambas técnicas obtuvieron tasas similares de blastocistos euploides (54.8% para *pulling* y 54.2% para *flicking*). El estudio concluyó que, aunque ambas técnicas produjeron tasas de euploides similares, la técnica *pulling* resultó ser más fiable, con menos fallos en los resultados genéticos, posiblemente debido a un menor daño a las células durante el proceso de biopsia. Cabe destacar que en la técnica *pulling* se emplearon más pulsos láser aunque de manera controlada, mientras que en la técnica *flicking* se utilizaron menos disparos láser pero con un control menos preciso. Los autores sugirieron que la técnica *pulling* podría ser preferible para obtener resultados más consistentes y reducir el daño celular en el contexto de la PGT-A.

NUEVAS TÉCNICAS

Como se ha podido comprobar, la biopsia embrionaria es un método invasivo que implica la manipulación del embrión pudiendo dañar las células del mismo. Existe una tendencia a pensar que los diferentes métodos de biopsia embrionaria podrían tener un impacto en la tasa de mosaicismo y complejidad del mismo (Coll et al. 2022). Es por esto que a día de hoy se están investigando nuevas técnicas de biopsia embrionaria no invasiva.

En nuevo estudio realizado por Mizobe et al. (2022), se compara una nueva técnica de biopsia de TE (para cualquier estadio de blastocisto, que consiste en un nuevo método de

extracción llamado método n-Ext, frente al método de biopsia embrionaria convencional mediante la apertura de la ZP y absorción. Las biopsias realizadas con el método n-Ext pueden realizarse sin necesidad de realizar HA en día 3 de desarrollo, incluso en blastocistos que aún no han iniciado *hatching* a la hora de realizar la biopsia. Para realizar la biopsia con este método, primero se deben sujetar los embriones con la pipeta de sujeción para generar una pequeña apertura en la ZP mediante láser, a poder ser en una zona con mayor número de células del TE. A través de la pipeta de biopsia se inyecta medio de cultivo en el espacio perivitelino con el objetivo de desprender las células de la superficie interna de la zona pelúcida. Posteriormente la apertura se amplía mediante disparos láser hasta alcanzar el diámetro de la pipeta de biopsia aproximadamente. Para terminar, se inyecta más medio de cultivo en el espacio perivitelino para extruir las células del TE a través de la apertura en la que las cuales fueron separadas del embrión siguiendo el método *flicking*.

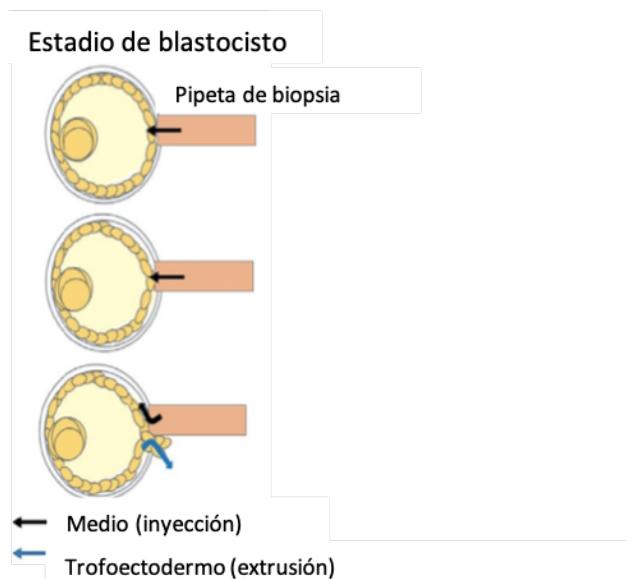


Figura 7. Ilustración del método n-Ext en estadio de blastocisto. Adaptado de Mizobe et al. (2022).

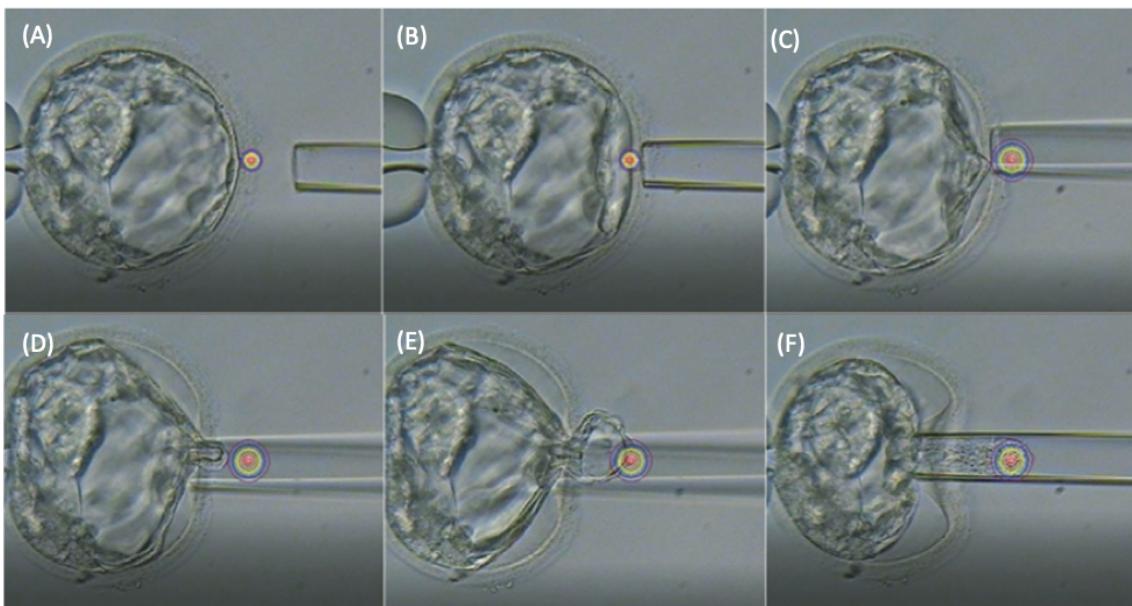


Figura 8. Aplicación real del método n-Ext. (A) Disparo de láser para crear una pequeña apertura en la ZP. (B) Inyección de medio de cultivo a través de la apertura para agrandar el espacio perivitelino. (C) aumento de la apertura con irradiación láser. (D) inyección de medio en la apertura para separar las células del TE de la superficie interna de la ZP. (E) Extrusión de las células del TE. (F) Succión de las células del TE extruido para posterior biopsia. Adaptado de Mizobe et al. (2022).

Para realizar dicho estudio, los ovocitos recuperados tras la punción se inseminaron, se cultivaron y tras confirmar la fecundación y llegados los embriones a D5, se procedió a la realización de la biopsia mediante los dos métodos de apertura de ZP. A unos se les realizó *hatching* en día 3, y a otros, se les aplicó el método n-Ext.

Mediante un análisis estadístico se identificaron diferentes hallazgos que se exponen a continuación. La nueva técnica demostró ser efectiva para la obtención de células en blastocistos en diferentes estadios, pudiéndose ampliar la cantidad de embriones aptos para el PGT. Los embriones biopsiados con el método n-Ext presentaron tasas de supervivencia similares a aquellas obtenidas mediante biopsia convencional, sugiriendo que el nuevo procedimiento no compromete la viabilidad embrionaria y conserva la capacidad de desarrollo tras su manipulación. Y, por último, la aplicación del método n-Ext permitió minimizar el daño sobre las células extraídas obteniendo una mejora en la calidad de las muestras, facilitando el análisis genético.

Otro estudio realizado por Xue et al. (2023), presenta un método novedoso de biopsia de TE, realizado en blastocistos de diferentes estadios en ausencia de pulsos láser, pero utilizando micropipetas de diseño innovador. En concreto, la biopsia de TE convencional se realiza utilizando pipetas cuyo extremo es plano y afilado. En este estudio la pipeta de sujeción que se utilizó tenía un plano inclinado en la superficie de la pared exterior de su extremo de apertura, lo que hace que ayude a la pipeta de biopsia a que entre en contacto con la pipeta de sujeción con mayor estabilidad, evitando que resbale durante el desprendimiento de las células que se van a biopsiar. Además, el diseño de la pipeta de biopsia consta de una estructura estrecha en el interior que ayuda a atrapar los fragmentos desprendidos para evitar la pérdida de muestra. Los resultados que se obtuvieron en este estudio muestran que las micropipetas de diseño innovador facilitan el desprendimiento de las células del TE mediante un único proceso de deslizamiento directo, eliminando el daño térmico causado por los pulsos laser. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tiempo empleado entre el método *flicking* convencional y el método *flicking* directo utilizado en este estudio, siendo este último significativamente menor. Además, la estructura innovadora de la pipeta de biopsia mostró una tasa de perdida de muestra significativamente reducida (100%) en comparación con el método convencional (18%), además de obtener una tasa de supervivencia del 100% y una tasa de amplificación del ADN del 99.5%.

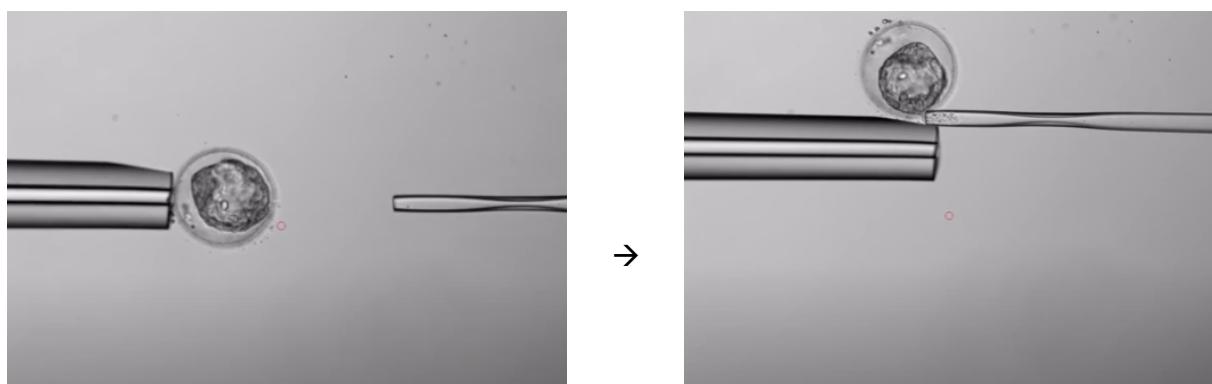


Figura 9. Pipetas utilizadas en el estudio de Xue et al. (2023).

DISCUSIÓN

Los embriones se seleccionan en función de su morfología, teniendo en cuenta el número de células, tamaño, disposición, etc. Sin embargo, no se ha demostrado que la morfología embrionaria tenga una correlación directa con la dotación cromosómica de las células. Las técnicas como el DGP permiten distinguir aquellos libres de patología genética pero para llevar a cabo el procedimiento hay una serie de pasos invasivos que pueden alterar el potencial de desarrollo y supervivencia del embrión. A partir de los resultados obtenidos en la revisión bibliográfica podemos realizar una reflexión crítica sobre la efectividad y repercusiones de las técnicas implicadas en la biopsia embrionaria: *pulling-stretching* y *flicking*. Ambos métodos son ampliamente utilizados en el contexto clínico de PGT, sin embargo, todavía no se ha determinado con claridad cuál de las dos técnicas proporciona mejores resultados, lo que demuestra la complejidad del procedimiento y la influencia de numerosos factores. Una de las sospechas en la comunidad científica era que el tipo de técnica elegida podría tener repercusión sobre el grado de mosaicismo.

A partir de los estudios revisados, se demuestra que variables como el número de células extraídas, la técnica utilizada, la experiencia del embriólogo, el número de pulsos láser, la zona donde se dan los disparos láser o el momento del procesamiento post-biopsia puede influir de forma directa o indirecta en la tasa de mosaicismo detectada.

En primer lugar, estudios como los de Scarica et al. (2019) y Coll et al. (2022) concluyen que no existe una diferencia significativa entre las técnicas de biopsia, o entre variables como el número de disparos láser, la intensidad del mismo o el número de células extraídas en relación con la incidencia de mosaicismo embrionario siempre y cuando las condiciones sean óptimas. Esto sugiere que siempre que se trabaje bajo protocolos estandarizados, no existe riesgo de producir un aumento en la tasa de mosaicismo embrionario.

Sin embargo, otras investigaciones como las de Ferrer Robles et al. (2019) y Herrero et al. (2020) han reportado que un mayor número de disparos láser en las biopsias embrionarias y una extracción de mayor número de células pueden provocar un aumento en la tasa de mosaicismo detectado. No obstante, en estos casos, el grado de mosaicismo detectado fue de bajo grado en su mayoría. Cabe destacar que este tipo de embriones

mosaico mostraron tasas de implantación comparables con las de embriones euploides, sugiriendo que no todo los embriones mosaico deberían ser descartados. En este caso, el aumento de incidencia de mosaicismo embrionario podría deberse a otros factores como la precisión al realizar la técnica.

En cuanto a la comparación entre las técnicas de biopsia embrionaria, *pulling* y *flicking*, los resultados obtenidos son parcialmente contradictorios. Mientras estudios como los de Noró et al (2021) o Coll et al. (2022) no demuestran que existan diferencias significativas entre ambas técnicas en cuanto a la incidencia de tasa de mosaicismo, otros estudios como los de Montalvo Pallès et al. (2019) y Abeyta et al. (2020), indican que la técnica *pulling* podría asociarse, aunque no de forma significativa con mejores tasas de implantación y mejor calidad diagnóstica. Esto podría explicarse porque la técnica *pulling* requiere movimientos más suaves y controlados, además de poseer un mayor control sobre la aplicación de pulsos láser en las uniones celulares provocando un menor daño celular, sugiriendo que no solo debe importar la cantidad de disparos si no cómo y dónde se aplican.

Según la encuesta realizada entre los embriólogos de distintas clínicas IVI en España (incluida como anexo) hay una valoración que parece tener relevancia: la elección de la técnica de biopsia depende en gran medida del día de desarrollo embrionario. En general, los embriones en día 5 presentan una estructura más rígida, lo que hace más adecuada la técnica *pulling*, mientras que los embriones en día 6 son más laxos, por lo que se prefiere utilizar la técnica *flicking*. Esto se debe a que, en embriones más laxos, al estirar con *pulling* las células no se separan con facilidad. Esto podría explicar la mayor incidencia de embriones mosaico en aquellos biopsiados mediante la técnica *flicking*: en este caso la mayor incidencia de mosaicismo podría deberse a la calidad del embrión *per sé* y no debido a la técnica utilizada. Si hay que esperar a D6 para poder realizar la biopsia al embrión es porque este presenta un ritmo de desarrollo mas tardío, con características morfológicas menos óptimas, lo que a menudo indica una menor competencia embrionaria. Además, hay otro motivo puramente técnico que también influye en la técnica de elección y es que en embriones *hatched*, (aquellos que ya han salido completamente de la ZP) no es posible sujetarlos con la pipeta *holding* sin riesgo de colapso, manipulación excesiva, o rotura, por lo que en estos casos se recurre directamente a la técnica *flicking*.

En algunos casos, puede iniciarse la biopsia con la técnica *pulling* y, debido a factores que el embriólogo debe valorar en tiempo real, cambiar posteriormente a la técnica *flicking*. Por ejemplo, si durante el estiramiento con *pulling* el embrión se desplaza en exceso, existe el riesgo de desprenderlo completamente de la zona pelúcida. En tal situación, se detiene la tracción, se aspiran algunas células adicionales para no aplicar más disparos láser sobre las mismas y se realiza una línea de corte con el láser antes de proceder a la separación final mediante la técnica *flicking*. Esta estrategia busca minimizar el daño celular, ya que repetir los disparos sobre las mismas uniones intercelulares podría comprometer la integridad del ADN de la muestra. Estudios previos como el de Montalvo Pallès et al. (2019) apoyan esta valoración y sugieren que el *pulling* debería ser la primera opción siempre y cuando sea factible, y cambiar a técnica *flicking* cuando si es necesario.

Una de las principales limitaciones de la biopsia embrionaria es que se trata de un método invasivo en el que la gran mayoría de embriones sobreviven al proceso de biopsia, pero existe una pequeña posibilidad de que el embrión no sobreviva al proceso de biopsia o al de vitrificación y desvitrificación. Otra gran limitación es la existencia de un diagnóstico erróneo de mosaicismo. Además, se trata de una técnica compleja en el que el embriólogo requiere de gran entrenamiento. De esta manera los estudios presentados como el método n-Ext y el uso de pipetas innovadoras demuestran beneficios relevantes en cuanto a la eficiencia y seguridad embrionaria, permitiendo realizar biopsias sin la necesidad de hacer hatching previo o sin el uso de pulsos laser evitando la degeneración celular y el riesgo de colapso del embrión y el aumento de estabilidad al realizar la biopsia. Además, las tasas de supervivencia embrionaria y la calidad del ADN extraído son mejores respecto a las técnicas convencionales. Cabe destacar que el método n-Ext, la extracción de células se llevó a cabo mediante *flicking*, previamente señalada en otros estudios de mayor riesgo. Sin embargo, en este caso no se observaron los mismos resultados, lo que sugiere que el aumento de tasa de mosaicismo no se debe a la técnica si no en cómo se aplica el procedimiento. Esto refuerza la importancia del entrenamiento del embriólogo y la estandarización de los protocolos.

Como conclusión, hay evidencias de que no existen diferencias significativas en la tasa de mosaicismo cuando se comparan ambas técnicas de biopsia embrionaria, no obstante, parece que el *flicking* es más brusco y podría causar mayor daño celular que la estrategia de *pulling*, donde la técnica es más suave. Además, existe una tendencia que indica que

el control del procedimiento, la limitación del número de células extraídas y la minimización del daño celular son factores determinantes para reducir la incidencia de mosaicismo, mejorar la fiabilidad diagnóstica y optimizar los resultados clínicos. La elección del método de biopsia debe estar basada en la experiencia del laboratorio, el entrenamiento del personal, y la valoración individual del embrión. Finalmente, los estudios más recientes sobre nuevas técnicas no invasivas, como el método n-Ext o el uso de pipetas de diseño innovador sin láser, apuntan hacia una futura evolución del campo que podría minimizar los riesgos asociados a la biopsia convencional. Estos métodos, aunque prometedores, requieren aún una validación más extensa en la práctica clínica para determinar si pueden sustituir o complementar las técnicas actuales.

CONCLUSIONES

1. No se observan diferencias significativas en la tasa de mosaicismo al comparar las técnicas de biopsia *pulling-stretching* y *flicking* siempre y cuando se sigan los procedimientos estandarizados. El aumento de tasa de mosaicismo depende de la calidad del embrión, no de la técnica utilizada
2. La elección de una técnica u otra debe adaptarse a las características y el estadio de desarrollo del embrión, pudiendo modificarse durante el procedimiento si el embriólogo así lo considera, para minimizar al máximo el daño embrionario.
3. La cantidad e intensidad de disparos láser no está estandarizada y dependerá de las características del embrión.
4. La técnica *pulling* es más suave y controlada, además, los disparos láser se dan en las uniones celulares de manera precisa, por lo que parece dañar menos al embrión.
5. La técnica *flicking* es más brusca, requiere de gran entrenamiento por parte del personal y podría causar más daño embrionario.
6. El objetivo principal de la biopsia es minimizar la manipulación del embrión, obtener un diagnóstico correcto, asegurar su supervivencia y no afectar a su potencial implantatorio, independientemente de la técnica utilizada.
7. Nuevas tecnologías como el método n-Ext o el uso de pipetas innovadoras sin láser prometen una biopsia más eficiente y menos invasiva, aunque su uso generalizado necesita estudios multicéntricos y seguimiento a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

Abeyta, M. J., Lin, C., Pardo, D. M., Schoolcraft, W. B., & Swain, J. E. (2020). IMPACT OF BLASTOCYST BIOPSY TECHNIQUE ON DNA QUALITY AND PGT-A RESULTS. *Fertility and Sterility*, 114(3), e427. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.1241>

Benavent Martínez, M., Escribá Suárez, M., Miret Lucio, C., Costa Borges, N., Calderón, G., Teruel López, J., & Crespo Simó, J. (2019). *Impacto de las técnicas de biopsia de trofoblasto (pulling y flicking) en la integridad de las células biopsiadas y en los resultados de PGT-A* [Comunicación póster P-002]. *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 24(2), 120–282. X Congreso ASEBIR, Cáceres. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Rienzi, L., Scott, R., & Treff, N. (2017). Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(3), 492–498. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew250>

Cram, David; Leigh, Don (2019). *UPDATED PGDIS RECOMMENDATIONS FOR REPLACEMENT OF MOSAIC EMBRYOS*. *Reproductive BioMedicine Online*, 39(), e11–e12. doi:10.1016/j.rbmo.2019.04.032

Coll, L., Parriego, M., Carrasco, B., Rodríguez, I., Boada, M., Coroleu, B., Polyzos, N. P., Vidal, F., & Veiga, A. (2022). The effect of trophectoderm biopsy technique and sample handling on artefactual mosaicism. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 39(6), 1333–1340. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02453-9>

De Vos, A., & De Munck, N. (2025). Trophectoderm Biopsy: Present State of the Art. *Genes*, 16(2), 134.

Esfandiari, N., Bunnell, M. E., & Casper, R. F. (2016). Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(11), 1439–1444. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0797-yc>

ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali, G., Coticchio, G., Bronet, F., Celebi, C., Cimadomo, D., Goossens, V., Liss, J., Nunes, S., Sfontouris, I., Vermeulen, N., Zakharova, E., & De Ryck, M. (2020). ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human reproduction open*, 2020(3), hoaa020. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa020>

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), hoaa017. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa017>

Ferrer Robles, E., Muñoz Soriano, P., Antequera Durán, V., Ferrer Buitrago, M., Calatayud Lliso, C., & Ruiz Jorro, M. (2019). *Desarrollo del procedimiento de validación de la biopsia de trofoblasto en el sistema de calidad del laboratorio de embriología* [Comunicación oral CO-003]. En *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 24(2), 64–119. X Congreso ASEBIR, Cáceres. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR)

Goodrich, D., Xing, T., Tao, X., Lonczak, A., Zhan, Y., Landis, J., Zimmerman, R., Scott, R. T., Jr, & Treff, N. R. (2017). Evaluation of comprehensive chromosome screening platforms for the detection of mosaic segmental aneuploidy. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 34(8), 975–981. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0924-4>

Gonzalez, X. V. (2016, 5 mayo). *Flicking vs Pulling: Methods for Blastocyst Biopsy*. <https://www.linkedin.com/pulse/flicking-vs-pulling-methods-blastocyst-biopsy-xavier-gonzalez-gonzalez/>

Herrero L., Aparicio M., Cascales L., Ortiz JA., Castillo JC., García-Ajofrín C., Ten J., Bernabéu R. (2020). Is mosaicism rate and characteristics influenced by the method of trophectoderm-biopsy technique employed in PGT-A cycles? Genetic results and reproductive outcome after pulling versus flicking. European Fertility Congress (ESHRE).

Imudia, A. N., & Plosker, S. (2016). The Past, Present, and Future of Preimplantation Genetic Testing. *Clinics in laboratory medicine*, 36(2), 385–399. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2016.01.012>

Lacey, L., Hassan, S., Franik, S., Seif, M. W., & Akhtar, M. A. (2021). Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), CD001894. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001894.pub6>

McCoy R. C. (2017). Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. *Trends in genetics : TIG*, 33(7), 448–463. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.001>

Mizobe, Y., Kuwatsuru, Y., Kuroki, Y., Fukumoto, Y., Tokudome, M., Moewaki, H., Watanabe, M., Iwakawa, T., & Takeuchi, K. (2021). A novel trophectoderm biopsy technique for all blastocyst stages. *Reproductive medicine and biology*, 21(1), e12418. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12418>

Montalvo Pallés, V., Novo Bruña, S., Castelló Zupanc, C., & López-Teijón Pérez, M. (2019). *Pulling vs Flicking. Impacto en la viabilidad embrionaria de la técnica de micromanipulación utilizada para la biopsia*. En *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 24(2), [Comunicación oral CO-009]. X Congreso ASEBIR, Cáceres. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Petch, S.; Crosby, D. Updates in preimplantation genetic testing (PGT). *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2024, 2024, 102526. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2024.102526>

PGDIS. PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos 2021. 2021.

https://pgdis.org/pgd_position.html. Accessed 16 Jul 2025

Popovic, M., Dheedene, A., Christodoulou, C., Taelman, J., Dhaenens, L., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Van den Abbeel, E., De Sutter, P., Menten, B., & Heindryckx, B. (2018). Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing?. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(7), 1342–1354. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey106>

Popovic, M., Dhaenens, L., Boel, A., Menten, B., & Heindryckx, B. (2020). Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma. *Human reproduction update*, 26(3), 313–334. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz050>

Ramos-Vergara, Paulina, Porte-Barreaux, Ignacio, & Santos-Alcántara, Manuel J.. (2018). APORTES ÉTICOS Y JURÍDICOS PARA LA DISCUSIÓN SOBRE EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL. *Persona y Bioética*, 22(1), 103-120. <https://doi.org/10.5294/pebi.2018.22.1.8>

R. Noró Pi, E. García Guixé, E. Toro Toro, R. Dasí Crespo, C. Giménez Sevilla, M. Sandalinas Alabert. (2021). *State of the art en biopsia de blastocisto: el método de biopsia (pulling o flicking) depende del embrión y no influye en el diagnóstico genético*. [Comunicación póster P-027]. *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 26(2), 120–246. XI Congreso ASEBIR, Toledo. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Rodrigo, L., Clemente-Císcar, M., Campos-Galindo, I., Peinado, V., Simón, C., & Rubio, C. (2020). Characteristics of the IVF Cycle that Contribute to the Incidence of Mosaicism. *Genes*, 11(10), 1151. <https://doi.org/10.3390/genes11101151>

Scarica, C., Montalvo Pallés, V., Novo Bruña, S., Castelló Zupanc, C., & López-Teijón Pérez, M. (2019). *Factores técnicos de la biopsia de trofoblasto y su relación con el mosaicismo* [Comunicación oral CO-026]. *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 24(2), 64–119. X Congreso ASEBIR, Cáceres. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Simopoulou, M., Sfakianoudis, K., Maziotis, E., Tsoulou, P., Grigoriadis, S., Rapani, A., Giannelou, P., Asimakopoulou, M., Kokkali, G., Pantou, A., Nikoletos, K., Vlahos, N., & Pantos, K. (2021). PGT-A: who and when? A systematic review and network meta-analysis of RCTs. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 38(8), 1939–1957. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02227-9>

Victor, A. R., Griffin, D. K., Brake, A. J., Tyndall, J. C., Murphy, A. E., Lepkowsky, L. T., Lal, A., Zouves, C. G., Barnes, F. L., McCoy, R. C., & Viotti, M. (2019). Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophectoderm biopsy and blastocyst. *Human reproduction (Oxford, England)*, 34(1), 181–192. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey327>

Veiga, A., Sandalinas, M., Benkhaliha, M., Boada, M., Carrera, M., Santalo, J., Barri, P. N., & Menezo, Y. (1997). Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. In *Zygote* (Vol. 5).

Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 2017 May;107(5):1107-1112. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.019. Epub 2017 Apr 19. PMID: 28433370.

Wu, L., Jin, L., Chen, W., Liu, J. M., Hu, J., Yu, Q., Ren, X. L., Huang, B., & He, H. (2021). The true incidence of chromosomal mosaicism after preimplantation genetic testing is much lower than that indicated by trophectoderm biopsy. *Human reproduction (Oxford, England)*, 36(6), 1691–1701. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab064>

Xue, S., Gao, Y., Wang, R., Yang, D., Peng, Q., & Li, D. (2023). An innovative design for trophectoderm biopsy without laser pulses: A step-by-step demonstration. *Fertility and Sterility*, 120(5), 1076-1078. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.07.010>

Yang, D., Feng, D., Gao, Y., Sagnelli, M., Wang, X., & Li, D. (2020). An effective method for trophectoderm biopsy using mechanical blunt dissection: a step-by-step demonstration. *Fertility and sterility*, 114(2), 438–439. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.05.035>

Zeng, M., Su, S., & Li, L. (2018). Comparison of pregnancy outcomes after vitrification at the cleavage and blastocyst stage: a meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(1), 127–134. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1040-1>

ANEXO

Encuesta sobre la técnica de biopsia seleccionada en la práctica habitual y opiniones sobre los motivos de su elección.

Para obtener información sobre la técnica de biopsia mas empleada en la práctica habitual se llevó a cabo una encuesta en el personal. Se obtuvieron 18 respuestas y los resultados fueron los siguientes:

1. ¿Cuál es la técnica de elección?

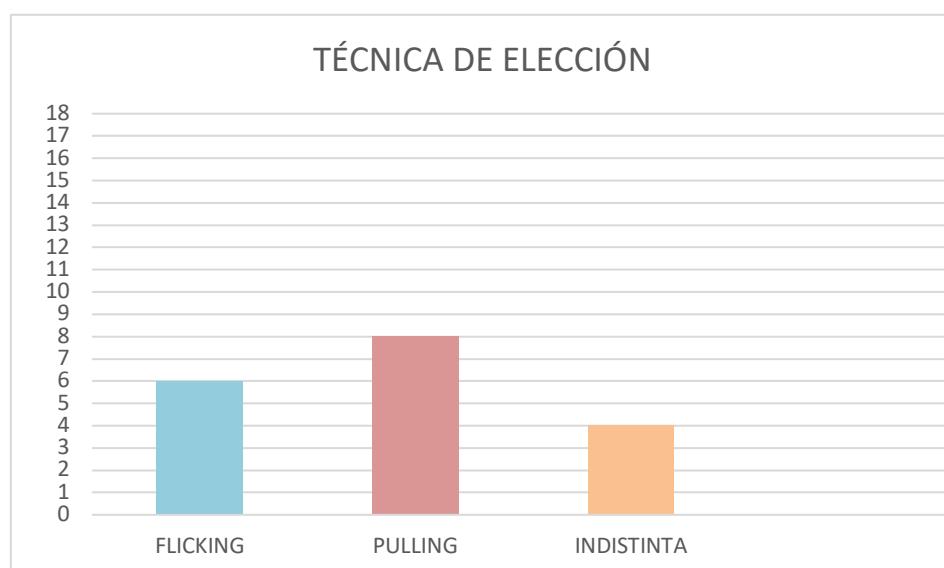


Figura 10. Diagrama de barras de las respuestas obtenidas en la encuesta sobre la técnica de elección.

En relación con la primera pregunta, referida a la técnica de elección, se obtuvieron un total de 18 respuestas. De estas, **8 embriólogos (44,4 %) manifestaron preferencia por la técnica *pulling***, mientras que **6 embriólogos (33,3 %) optaron por la técnica *flicking***. Por su parte, **4 participantes (22,2 %) no mostraron inclinación hacia ninguna de las dos técnicas**.

2. ¿Cuál de las técnicas necesita de mayor entrenamiento/habilidad?

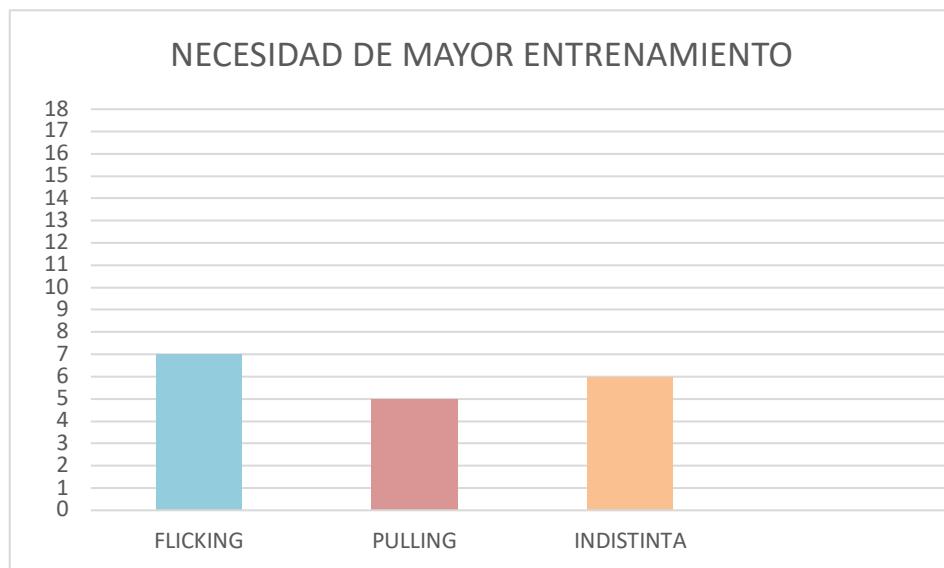


Figura 11. Diagrama de barras de las respuestas obtenidas en la encuesta sobre la técnica que necesita mayor entrenamiento.

En cuanto a la percepción de la complejidad técnica, **7 embriólogos (38,9 %)** señalaron que la técnica *flicking* requiere un mayor entrenamiento, mientras que **5 embriólogos (27,8 %)** consideraron que la técnica *pulling* demanda más habilidad. Por su parte, **6 participantes (33,3 %)** opinaron que ambas técnicas requieren un nivel de entrenamiento equivalente.

3. ¿Cuál de las técnicas tiene un menor impacto sobre la viabilidad del embrión?

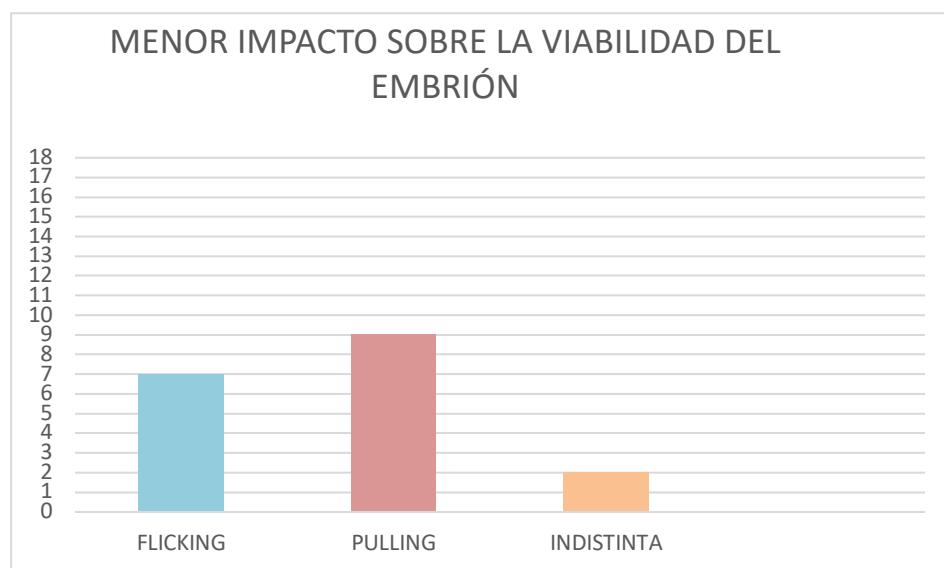


Figura 12. Diagrama de barras de las respuestas obtenidas en la encuesta a la pregunta de la técnica que tiene un menor impacto sobre la viabilidad del embrión.

Respecto al impacto sobre la viabilidad embrionaria, **7 embriólogos (38,9 %)** señalaron que la técnica *flicking* se asocia a un menor efecto negativo, mientras que **9 embriólogos (50,0 %)** consideraron que la técnica *pulling* resulta menos perjudicial, siempre que se limite el número de disparos de láser aplicados al embrión. Finalmente, **2 participantes (11,1 %)** manifestaron que no existe diferencia significativa entre ambas técnicas.

4. ¿Cuál de ellas hace que colapse con mas facilidad?

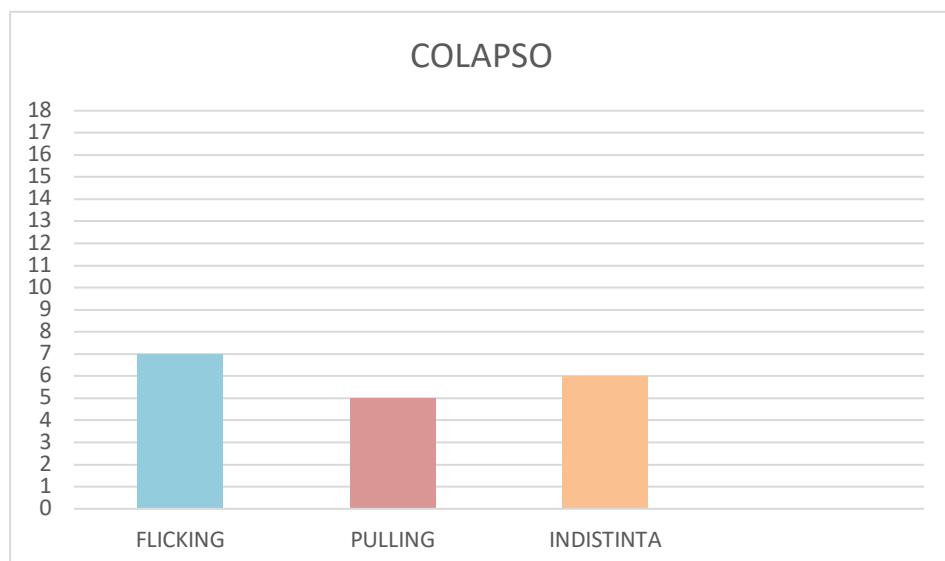


Figura 13. Diagrama de barras de las respuestas obtenidas en la encuesta sobre la técnica que hace que el embrión colapse con mas facilidad.

Respecto a la tendencia al colapso embrionario, **7 embriólogos (38,9 %)** consideraron que la técnica *flicking* favorece con mayor frecuencia este fenómeno, mientras que **5 embriólogos (27,8 %)** indicaron que es la técnica *pulling* la que lo provoca con más facilidad. Por último, **6 participantes (33,3 %)** no identificaron diferencias relevantes entre ambas técnicas.

5. ¿Cuál de ellas conlleva un mayor riesgo de degeneración de ADN y por tanto rebiopsia o ausencia de resultados?

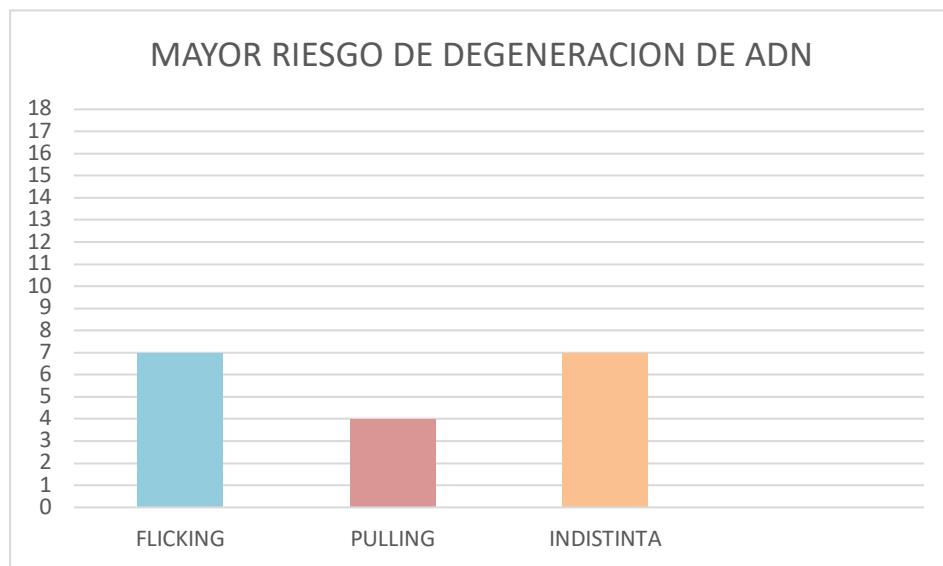


Figura 14. Diagrama de barras de las respuestas obtenidas en la encuesta sobre la técnica que genera mayor riesgo de degeneración del ADN en el embrión.

En relación con el riesgo de degeneración del ADN y la consiguiente necesidad de rebiopsia o posibilidad de ausencia de resultados, **7 embríólogos (38,9 %) consideraron que no existe diferencia entre las técnicas (*indistinta*), 7 participantes (38,9 %) señalaron la técnica *flicking* como la que conlleva mayor riesgo, 4 embríólogos (22,2 %) indicaron la técnica *pulling*, y 7 participantes (38,9 %) opinan que el riesgo depende de la calidad del embrión.**