



TRABAJO FIN DE MÁSTER EN

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

Evolución Del Diagnóstico Genético Preimplantacional En Reproducción Humana Asistida

Evolution Of Preimplantational Genetic Diagnosis In Assisted Human Reproduction

Autor: Víctor de Frutos Herrero

Tutor: María Gaytán Muñoz

Villaviciosa de Odón, Septiembre 2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Infertilidad	3
Origen genético de la infertilidad	4
Antecedentes previos al PGT en reproducción asistida.....	4
Análisis genético como método de selección del mejor embrión euploide.....	7
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS.....	8
METODOLOGÍA	8
RESULTADOS	9
Diagnóstico genético preimplantacional (PGT)	9
Definición	9
Protocolo general	10
Tipos de biopsias.....	11
Mosaicismo embrionario	13
PGT-SR	15
PGT-A	18
PGT-M.....	22
Perspectivas futuras para el PGT.....	24
Análisis de ADN libre de células en medio de cultivo embrionario.....	25
Blastocentesis.....	26
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31
AGRADECIMIENTOS	32

RESUMEN

La infertilidad es un problema de salud pública que afecta cada día a más individuos y parejas en todo el mundo, en concreto, el aumento de casos de infertilidad de origen genético hace que sea imprescindible la evaluación del factor genético y/o cromosómico. El diagnóstico genético preimplantacional (PGT) es una prueba capaz de identificar embriones sanos, evitando transferir los afectados al útero. Esta técnica ha tenido un creciente desarrollo desde que se empezó a usar en humanos en la última década del siglo XX. Actualmente, se dispone de distintos tipos de PGT, como el diagnóstico genético preimplantacional de anomalías cromosómicas estructurales, el de anomalías cromosómicas numéricas o el de trastornos monogénicos, abreviados como PGT-SR, PGT-A y PGT-M, respectivamente. Los enfoques actuales de PGT se inclinan por la biopsia de trofoectodermo y por plataformas de cribado cromosómico completo, sobre todo de secuenciación masiva del ADN (NGS). No obstante, el uso de estas plataformas de análisis más sensibles trae consigo problemas, como la detección de mosaicismo cromosómico o las aneuploidías parciales entre otros. Las nuevas perspectivas de PGT, como el ADN embrionario en medio de cultivo o la blastocentesis están generando un gran interés por sus posturas menos invasivas; sin embargo, se necesitan más estudios capaces de corroborar su eficacia, aunque el PGT no invasivo de ADN en medio de cultivo tiene resultados muy prometedores. Se requiere una mayor estandarización de los procesos involucrados en estas técnicas, una regulación legal acorde a la época en la que vivimos y recomendaciones éticas sobre el buen uso del PGT.

Palabras clave: Evolución, Diagnóstico genético preimplantacional (PGT), Mosaicismo cromosómico, PGT no invasivo (niPGT), Blastocentesis.

ABSTRACT

Infertility is a public health problem that affects more and more individuals and couples around the world every day. In particular, the increase in cases of genetic origin of infertility makes it essential to evaluate the genetic and/or chromosomal factor. Preimplantation genetic diagnosis (PGT) is a test capable of identifying healthy embryos, avoiding the transfer of affected embryos to the uterus. This technique has undergone increasing development since it began to be used in humans in the last decade of the 20th century. Currently, different types of PGT are available, such as preimplantation genetic diagnosis of structural chromosomal abnormalities, numerical chromosomal abnormalities, or monogenic disorders, abbreviated as PGT-SR, PGT-A and PGT-M, respectively. Current PGT approaches favour trophoctoderm biopsy and comprehensive chromosomal screening platforms, especially massive DNA sequencing (NGS). However, the use of these more sensitive analysis platforms brings along some problems, such as the detection of chromosomal mosaicism or partial aneuploidies among others. New PGT prospects, such as embryonic DNA in spent culture media or blastocentesis are generating great interest for their less invasive approaches; however, more studies capable of corroborating their efficacy are needed, although non-invasive PGT of DNA in spent culture media has very promising results. Greater standardization of the processes involved in these techniques, legal regulation in accordance with the times in which we live, and ethical recommendations on the proper use of PGT are required.

Keywords: Evolution, Preimplantational genetic testing (PGT), Embryo mosaicism, Non-invasive PGT (niPGT), Blastocentesis.

INTRODUCCIÓN

Infertilidad

La infertilidad es una enfermedad que según la organización mundial de la salud (OMS) se define como: “imposibilidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares y sin protección”.

Se estima que la infertilidad afecta a entre el 8 y el 12 % de las parejas en edad reproductiva de todo el mundo, si bien, en algunas regiones como países de África Subsahariana, norte de África, centro y sur de Asia, Oriente medio y Europa central y del este pueden llegar a tasas de infertilidad hasta del 30% (1).

De estos porcentajes, el 50% se debe a factores femeninos, entre el 20-30% a factores masculinos y el 20-30% restante sería el resultado de factores combinados (2). En cuanto a la etiología de la enfermedad podemos citar dos grupos principales:

- Disminución de la fertilidad con la edad en ambos sexos, siendo más marcada en las mujeres, provocando una disminución drástica a partir de los 35 años, asociándose a una reducción de la reserva ovárica y calidad ovocitaria. En hombres, el impacto de la edad acontece a edades más avanzadas, asociándose a un descenso de los parámetros seminales.
- Infertilidad relacionada con enfermedades, la cual puede afectar a ambos sexos o ser específica de un género. Se puede clasificar según la siguiente tabla:

Infertilidad		
Ambos sexos	Femenina	Masculina
Alteraciones estructurales o lesiones del aparato genital Hipogonadismo hipogonadotropo Hiperprolactinemia Trastornos de la función ciliar Fibrosis quística Infecciones Enfermedades sistémicas Enfermedades relacionadas con el estilo de vida	Insuficiencia ovárica prematura Síndrome de ovario poliquístico Endometriosis Fibromas uterinos Pólipos endometriales	Deficiencia testicular Deterioro post-testicular Dificultad en la erección

Tabla 1. Infertilidad relacionada con enfermedades clasificadas por género (1).

- Otros aspectos como la calidad espermática, disruptores endocrinos y la consanguinidad pueden tener relevancia en la infertilidad.

Origen genético de la infertilidad

Muchas de estas causas de la infertilidad tienen un origen multifactorial, entre estos factores podemos destacar la genética. Existen gran cantidad de genes que regulan los procesos biológicos específicos de la reproducción como el desarrollo del aparato genital o la gametogénesis entre muchos otros. La alteración patológica de estos genes podría provocar situaciones de infertilidad, hecho que explicaría que personas con infertilidad sean más propensas a tener defectos genéticos como muchos estudios exponen.

Entre las causas genéticas más habituales de infertilidad se pueden diferenciar dos grupos, dependiendo si la alteración genética o cromosómica está identificada:

- Alteraciones descritas: son causantes directas de la patología de la infertilidad. Pueden ser alteraciones del cariotipo (alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales), alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales, enfermedades monogénicas y enfermedades ligadas al sexo.
- Alteraciones no descritas: abortos de repetición, fallo de implantación, edad materna avanzada y factor masculino severo se asocian a anomalías genéticas y cromosómicas no identificadas.

Por todo esto, la evaluación del factor genético en personas que padecen infertilidad se ha convertido en imprescindible; no solo por su valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico, sino como opción preventiva para la pareja con mayor riesgo genético.

En la actualidad se dispone del PGT (Preimplantacional Genetic Testing) para el estudio del genoma, con técnicas como FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization), aCGH (Comparative Genomic Hybridization Array), aSNP (Single Nucleotide Polymorphism Array), NGS (Next Generation Sequencing). Pero, ¿cómo se ha llegado a lo actual? ¿Cuáles son los antecedentes de estas técnicas?

Antecedentes previos al PGT en reproducción asistida

El desarrollo de las técnicas genéticas en reproducción humana asistida (RHA) no puede comprenderse sin la evolución simultánea de distintas disciplinas científicas como la embriología, la genética, la tecnología y la medicina entre muchas otras.

Estudios tempranos se remontan a 1878 donde se empezaron a realizar estudios de fecundación *in vitro* (FIV) en ovocitos de mamíferos. Más tarde, en 1890, Heape fue pionero mostrando por primera vez una transferencia de embriones de un oviducto de una coneja a otra, demostrando que retomaba el desarrollo y nacían crías vivas. Durante la primera mitad del siglo XX, siguieron los experimentos con animales; entre los que podemos destacar los experimentos de Pincus en la década de 1930, el cuál fue capaz de cultivar ovocitos de coneja hasta la etapa de metafase II. Más tarde, el mismo Pincus con Saunders empezaría a investigar con ovocitos humanos, prediciendo una maduración de estos en un periodo de 12 horas y fallando en esta premisa, lo que los llevo a fallos repetidos de fertilización (3) (4).

Durante la segunda mitad del siglo XX, se asentaron muchas de las bases de la embriología y la tecnología de la reproducción asistida. Se realizaron muchos estudios sobre hormonas, surgiendo experimentos iniciales de estimulación ovárica con FSH extraída post-mortem de la glándula pituitaria y más tarde se obtendría FSH urinaria de mujeres menopáusicas. En 1965, Robert Edwards concretó que la maduración del ovocito humano tenía lugar aproximadamente a las 37 horas de la inducción de la ovulación. También hubo avances en el estudio de técnicas de visualización como la laparoscopia, introducida en 1970. En 1978, Robert Edwards y Patrick Steptoe reportaron el primer nacimiento (Louise Brown) después de un tratamiento de FIV. A partir de este momento, se produjo un gran crecimiento de la tecnología de la reproducción humana asistida (3) (4).

Con todo este contexto y con la creciente evolución de la genética, que había tenido un gran acontecimiento en 1953 con el descubrimiento del modelo de doble hélice del ADN por Watson y Crick, empezaron distintos estudios interrelacionando embriología y genética (5).

Así, en 1967, Robert Edwards y Richard Gardner fueron los primeros en idear una prueba genética para el sexado de embriones de conejo. Para ello se utilizó la técnica “Eucryesine 2 GNX” que teñía la cromatina sexual de blastocistos de conejos, la cual se observaba en un microscopio de fluorescencia. Un año más tarde, en 1968, ambos biopsiaron entre 200-300 células de trofoectodermo de distintos embriones de conejo y tiñeron la cromatina sexual, luego el blastocisto se implantó en una coneja y el sexo del feto se confirmó de forma posterior anatómica e histológicamente. Así, este experimento se convirtió en la base del PGT y su aplicación para detectar enfermedades hereditarias (3).

En la década de 1980, se desarrollaron nuevas técnicas de micromanipulación de embriones como ZD (zona drilling), PZD (partial zona dissection), SUZI (subzonal injection of sperm) y

por último ICSI (intracytoplasmic sperm injection) que ha sido la más exitosa, así como distintas formas de biopsiar para obtener células de embriones *in vitro* para futuros análisis genéticos. Además, en 1985, *Saiki et al.* introdujeron la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual resultó en un gran avance para el análisis de enfermedades monogénicas (3) (5).

Más tarde en 1987, Hooper, Monk y Handyside registraron el primer PGD en ratones en un modelo de la enfermedad humana del síndrome de Lesch-Nyhan mediante biopsia de una blastómera de un embrión en fase de escisión (5). En 1990, *Handyside et al.* informaron de embarazos humanos después de realizar diagnóstico genético preimplantacional (PGD) mediante PCR para enfermedades ligadas al sexo (adrenoleucodistrofia y distrofia muscular de Duchenne) y retraso mental ligado al cromosoma X (3) (5).

En 1993, *Griffin et al.* publicarían lo que sería uno de los primeros ensayos de PGD con la técnica FISH para discriminar embriones masculinos, femeninos y con síndrome de Turner. Así, se empezaría a utilizar FISH para pruebas de aneuploidía y translocaciones y PCR para detectar enfermedades monogénicas. Estas técnicas fueron mejoradas en los años posteriores. El FISH empezó a utilizar mezclas de sondas en múltiples rondas para marcar de 5 a 12 pares de cromosomas ofreciéndose su uso a mujeres en edad avanzada, fallos repetidos de implantación y abortos recurrentes, así como para detectar translocaciones recíprocas y Robertsonianas e inversiones. La principal limitación era que no analizaba aneuploidías para los 23 pares de cromosomas. La PCR se utilizó para detectar más variantes patogénicas de enfermedades monogénicas y además, se implantó su uso para analizar el HLA (human leukocyte antigen) de embriones de parejas que deseaban tener un hijo libre de la enfermedad y que pudiese ser donante de células madre para un hijo enfermo anterior (3).

En 1999, tanto el grupo de *Well et al.* como el de *Voullaire et al.* demostraron el uso de CGH en blastómeras humanas para verificar aneuploidías en todos los cromosomas. Esta nueva técnica era capaz de evidenciar aneuploidías parciales, es decir, ganancias o pérdidas de fragmentos de cromosomas que no se identificaban mediante el análisis FISH. Sin embargo, tenía una gran limitación en la época, se necesitaba criopreservar los embriones para que diese tiempo a realizar la técnica (3).

A principios del 2000, se desarrolló una nueva terminología para diferenciar el cribado de aneuploidías (PGS; Preimplantation Genetic Screening) y el diagnóstico de enfermedades monogénicas (PGD; Preimplantation Genetic Diagnosis).

A pesar de su gran potencial, el PGD no tuvo gran repercusión a principios del siglo XXI, debido, en gran parte, a estudios que demostraban tasas más bajas de embarazo y nacidos vivos. Sin embargo, poco después surgieron estudios que sí que demostraban sus beneficios en distintos casos. En 2008, *Wells et al.* publicó un artículo en el que relacionaba la tecnología “array” y el CGH para la detección de aneuploidías en los 23 pares de cromosomas. En 2011 esta tecnología fue validada como aCGH. En los años posteriores, estudios sobre biopsias de embriones concluyeron que la biopsia de trofoectodermo era la que menos daño causaba al embrión. En 2010, se demostraban nuevos métodos para el cribado cromosómico completo como el SNP, QT-PCR y NGS de los que hablaremos en apartados siguientes (3).

Recientemente, la terminología para el diagnóstico genético ha cambiado a PGT, diferenciándose en PGT-A, PGT-M y PGT-SR, para detección de aneuploidías, de enfermedades monogénicas y de alteraciones estructurales, respectivamente.

Análisis genético como método de selección del mejor embrión euploide

Uno de los retos más difíciles en el campo de la reproducción humana asistida es la selección de los embriones más apropiados para transferir. Hasta la fecha, la evaluación morfológica y morfocinética han sido los métodos más usados para la elección del mejor embrión. Sin embargo, en determinadas ocasiones en las que las parejas sufren algún tipo de infertilidad (ya sea por fallos repetidos de implantación (FI), abortos recurrentes (AR), edad materna avanzada (EMA), cromosopatías previas (CP) o factor masculino severo (FMS)) se produce un descenso en la tasa de embarazo debido a un incremento en el número de anomalías genéticas y/o cromosómicas en los embriones, a pesar de tener una morfología normal.

Por ello, en los últimos años, se han desarrollado nuevas tecnologías como el PGT para la selección del embrión con una dotación genética correcta para parejas que padecen casos de infertilidad de origen desconocido o con riesgo aumentado de anomalías genéticas.

Así, el PGT surge como un nuevo método diagnóstico con el objetivo de mejorar los resultados, pudiendo elegir el embrión con mayor potencial de implantación y reduciendo el número de embriones transferidos para conseguir un embarazo.

Además, una de las ventajas de este método de selección genética sería la aplicación de eSET (elección de un único embrión de la cohorte para transferir) disminuyendo el riesgo de embarazo múltiple y los problemas obstétricos y perinatales asociados a este.

HIPÓTESIS

La disminución de la fertilidad en la población debido a diversos factores es un hecho real y actual que atañe a millones de parejas en todo el mundo. En concreto, la infertilidad de origen genético se ha rodeado de un interés generalizado y por ello la realización de una revisión bibliográfica sobre el diagnóstico genético preimplantacional (PGT) analizando la evolución a través de los años, las posturas actuales y las perspectivas futuras tienen gran cabida en la época en la que vivimos.

OBJETIVOS

- Realizar un estudio sobre cómo han evolucionado las técnicas de diagnóstico genético en reproducción humana asistida (RHA).
- Describir los métodos y procedimientos que se utilizan actualmente en el PGT.
- Profundizar en las nuevas técnicas no invasivas de PGT en investigación.
- Discutir las implicaciones clínicas, legales, éticas y futuras del PGT en RHA.

METODOLOGÍA

Se utilizaron las bases de datos Pubmed y Google Scholar para la búsqueda de los artículos originales de investigación y de revisión empleados para la elaboración de esta revisión bibliográfica. Solo se incluyeron trabajos en inglés, intentando que fuesen lo más actuales posibles mediante filtros por año. Para la búsqueda se utilizaron palabras clave como: *prevalence of infertility, genetic infertility, evolution of preimplantation genetic testing (PGT), embryo biopsy, mosaicism, PGT-SR, PGT-A, PGT-M, no invasive PGT, blastocentesis*. Las tablas y las figuras han sido traducidas al español y en algunos casos son de elaboración propia. Las referencias y la bibliografía han sido incluidas mediante el gestor bibliográfico Mendeley.

RESULTADOS

Diagnóstico genético preimplantacional (PGT)

Definición

El PGT se define como una prueba que permite analizar el estatus genético y/o cromosómico de los embriones antes de su implantación en el útero. El objetivo principal es identificar los embriones sanos (euploides) en una cohorte de embriones de la pareja con riesgo de transmitir alguna alteración genética o cromosómica a su descendencia. Otros objetivos son: evitar nacimientos cromosómicamente anormales, reducir el riesgo de aborto espontáneo, incrementar las tasas de éxito en técnicas de reproducción asistida (TRA), reducir el tiempo en conseguir un nacimiento de un niño sano y mejorar la razón coste-eficiencia, al reducir el tiempo y el número de tratamientos de reproducción asistida necesarios para conseguir un recién nacido vivo (6).

El PGT es una alternativa no excluyente al diagnóstico genético prenatal, con la ventaja de que si se detecta alguna anomalía genética el embrión no se transfiere, hecho que, si se produjese en el diagnóstico prenatal, la madre gestante debería de enfrentarse a la difícil decisión de tener que interrumpir su embarazo.

El uso del PGT ha aumentado drásticamente en el siglo XXI, evolucionando rápidamente como método diagnóstico en parejas con riesgo de transmitir enfermedades genéticas y parejas con ciertos problemas de infertilidad que llevan asociados una mayor tasa de embriones aneuploides como puede ser EMA, FI, AR, CP y FMS. Así, esta prueba es capaz de identificar embriones con trastornos monogénicos, con anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, con trastornos mitocondriales, embriones no afectados de una enfermedad compatibles con HLA de un hermano enfermo previo para servir de donante de células madre, incluso para saber el género del embrión o para prevenir la transmisión de genes asociados a enfermedades de aparición tardía o enfermedades curables de riesgo elevado pero no absoluto; estas últimas situándose en áreas éticamente controvertidas (6) (7).

Para la realización de este tipo de análisis genético es de obligatoria necesidad la realización de un ciclo de FIV, implicando la fecundación artificial de los ovocitos mediante la técnica de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI); además de un cultivo embrionario y del uso de una técnica de biopsia de corpúsculo polar o células embrionarias (7).

Protocolo general

Para la realización de PGT es necesario la realización de un ciclo de fecundación *in vitro*, lo que requiere el manejo y manipulación de gametos y embriones. De forma general se pueden describir los siguientes pasos (7):

1. Estimulación ovárica controlada para conseguir el mayor número de folículos maduros, que a su vez permitan la máxima recuperación de ovocitos. Inducción de la ovulación para programar la recolección de ovocitos mediante punción ovárica transvaginal guiada por ecografía.
2. Tratamiento de FIV mediante ICSI y cultivo de embriones. Se prefiere la realización de la técnica de ICSI antes que la FIV convencional, ya que disminuye la probabilidad de contaminación de ADN en el análisis genético del embrión producida por los posibles espermatozoides que quedasen adheridos a la zona pelúcida. Además, la realización de decumulación ovocitaria, requisito para la ICSI, elimina las células del cúmulo disminuyendo la probabilidad de contaminación de ADN por estas.
3. Biopsia embrionaria para obtener muestra biológica para realizar el análisis genético. Esta se puede realizar de los corpúsculos polares, de blastómeras en día 3 o de células de trofoectodermo (TE) en día 5. La práctica actual favorece la biopsia de TE. Se profundizará sobre el tema en el siguiente apartado.
4. Transporte de la muestra al laboratorio donde se realiza el análisis genético en las condiciones idóneas para su mantenimiento y preservación.
5. Amplificación del ADN de la muestra, casi siempre mediante PCR. Una estrategia alternativa es la amplificación del genoma completo.
6. Análisis del ADN mediante distintas técnicas citogenéticas y moleculares dependiendo de qué tipo de PGT se vaya a realizar. Actualmente se utiliza cribado cromosómico completo (CCS) para el análisis de todos los cromosomas. Las distintas técnicas asociadas a cada tipo de PGT se explicarán más adelante.
7. Criopreservación de embriones inmediatamente después de la biopsia. Si se realiza biopsia de TE, se deben de vitrificar los embriones analizados para esperar a los resultados del PGT.
8. Desvitrificación y transferencia embrionaria diferida de embriones genética y/o cromosómicamente normales. Se debe sincronizar el desarrollo del útero con el desarrollo del embrión para una óptima transferencia embrionaria en la ventana de implantación de la mujer.

Tipos de biopsias

La biopsia es un paso crucial mediante el que se obtiene material biológico (que contenga ADN) sobre el que se realiza el análisis genético, en nuestro caso, el PGT. Esta se puede realizar sobre el ovocito en el caso de extraer los corpúsculos polares o extrayendo directamente células del embrión. Ambos procesos comienzan con una abertura de la zona pelúcida, la cual se puede llevar a cabo mediante tres métodos (ruptura mecánica, ruptura química mediante ácido Tyrodes o mediante el uso de un láser). Si bien, el ácido Tyrodes era el método de elección en el pasado, a día de hoy, el método asistido por láser es el enfoque más utilizado debido a su estandarización, reproductibilidad, precisión y rapidez (8).

Un aspecto crítico y muy debatido de la tecnología PGT es el potencial efecto perjudicial que la propia biopsia puede causar sobre el embrión. Para ello, se han propuesto distintas estrategias de biopsia de embriones con el fin de preservar su viabilidad y potencial reproductivo.

- a) Biopsia en fase de escisión: se realiza normalmente en embriones de día 3 de desarrollo con al menos 6 blastómeras. Se abre la zona pelúcida y se usa medio libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} para aflojar la adhesión célula-célula y facilitar la extracción de 1 o 2 blastómeras. La ventaja principal es que no es necesario vitrificar los embriones. Entre las desventajas de esta estrategia encontramos los problemas asociados de analizar una o dos células, pudiendo dar lugar a fallo de amplificación del material genético y el hecho de que el material genético no sea representativo de las demás células del embrión al no poder analizar el mosaicismo embrionario. Además, últimos estudios exponen que la reducción de la masa del embrión debida a la biopsia de blastómeras puede comprometer el desarrollo del embrión y su potencial implantatorio (8).
- b) Biopsia de blastocisto: actualmente es la técnica más usada debido a sus resultados tan exitosos. Consiste en la obtención de 5 a 10 células de TE. Esta biopsia se realiza en día 5-6 de desarrollo embrionario, con medio de cultivo normal y puede hacerse mediante *pulling* o *flicking*. Se pueden encontrar varias ventajas como la reducción mínima de la masa total del embrión, además de la extracción de células que no darán lugar al feto, sino a la placenta. También, el hecho de tener más células para analizar implica que se reduzca la probabilidad de tener un fallo de amplificación del material genético, teniendo más precisión y fiabilidad, pudiendo incluso analizar el mosaicismo embrionario. Otra ventaja importante es que disminuye la cantidad de embriones a analizar debido a que algunos degeneran antes de llegar a blastocisto.

La desventaja más importante que genera este tipo de biopsia reside en el tiempo, ya que se debe vitrificar los embriones a la espera del resultado del análisis genético y por lo tanto planificar una transferencia embrionaria en diferido, la cual mejora la tasa de implantación. Últimos estudios indican que la biopsia de TE no reduce la capacidad de implantación del embrión, además de sugerir que, al estar en una etapa más avanzada del desarrollo, los embriones son más resistentes a la manipulación (8).

- c) Biopsia de corpúsculo polar: esta estrategia es la menos utilizada debido a sus grandes deficiencias, si bien, en países que prohíben el diagnóstico genético de embriones, se puede realizar. Se puede extraer el primer corpúsculo polar que acompaña al ovocito en metafase II, el segundo corpúsculo polar cuando se produce la fecundación o usar ambos para el análisis genético. Tiene grandes desventajas como pueden ser que analiza solo 1 o 2 células, evaluando solamente la contribución materna al genoma del embrión. Así, no puede detectar los defectos genéticos/ cromosómicos de la contribución paterna, ni las alteraciones que puedan darse en las primeras mitosis (8).
- d) Biopsia en estadio de mórula: estrategia que surge de forma experimental como paso intermedio entre la biopsia de blastómero y biopsia de TE. Comparte la necesidad de un tampón libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} para aflojar la adhesión célula-célula que necesitaba un embrión en día 3 y el enfoque de la biopsia de TE de extraer un número mayor de células para tener un análisis genético más sólido con menos fallos de amplificación (8). Esta técnica es meramente experimental y no se realiza en clínica.

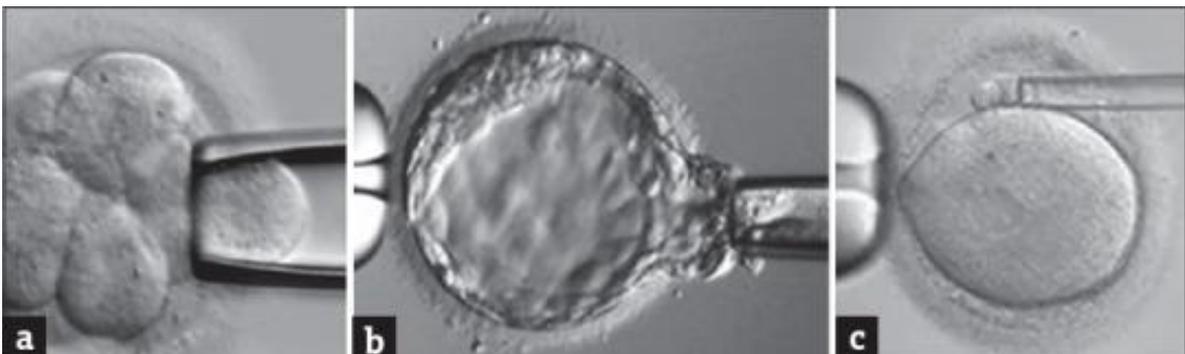


Figura 1. Estrategias de biopsia más utilizadas:

a) Biopsia en etapa de escisión. b) Biopsia de blastocisto. c) Biopsia de corpúsculo polar. (3)

Mosaicismo embrionario

En la actualidad, el cultivo embrionario hasta blastocisto y la biopsia de TE junto con el análisis genético preimplantacional (PGT-A) con plataformas NGS es lo más frecuente. Esto es así, debido a que estas plataformas tienen más sensibilidad que test genéticos anteriores, si bien esta mejora ha conducido a un significativo aumento de diagnósticos clínicos ambiguos. Este sería el caso del mosaicismo cromosómico (9).

El mosaicismo cromosómico se define como la presencia de distintas líneas celulares en un mismo embrión. A diferencia de lo que ocurre en los errores meióticos, que conllevan una herencia uniforme en todas las células del embrión, el mosaicismo se debe principalmente a errores en la mitosis tras la fecundación dando lugar a líneas celulares genéticamente distintas (Figura 2). Además, es importante recalcar que distintivamente de los errores meióticos, los errores mitóticos no aumentan en consonancia con la edad de la mujer (9) (10).

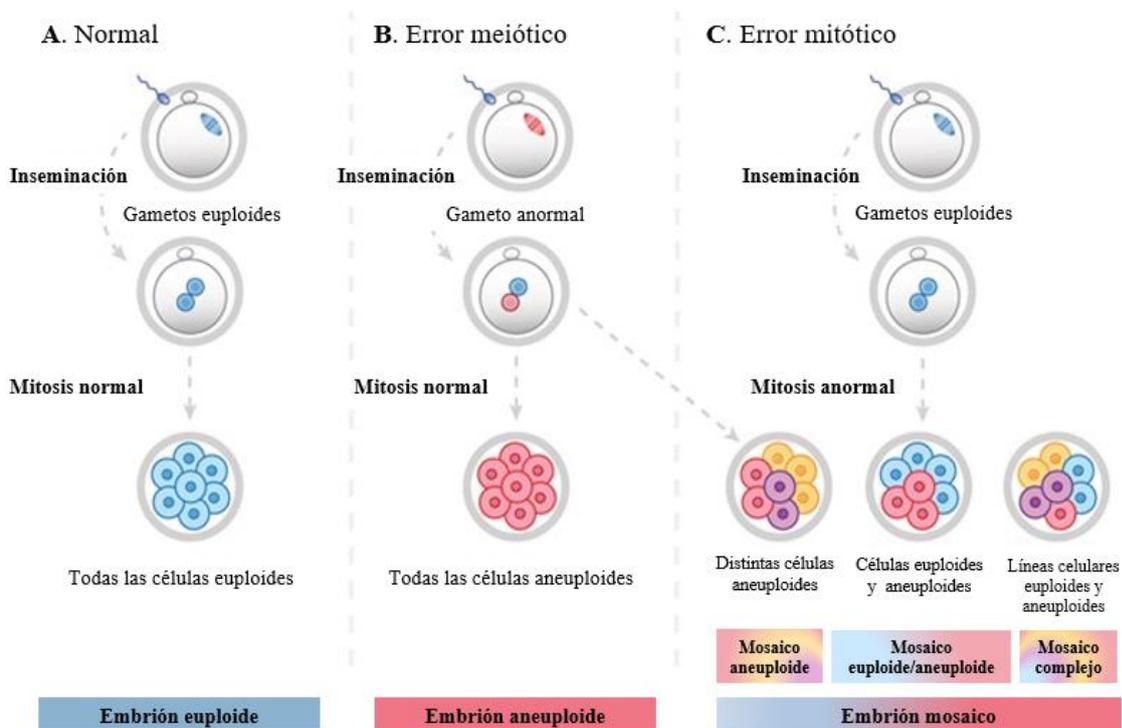


Figura 2. Clasificación de embriones humanos basada en su estatus cromosómico.

A) Embrión euploide, no hay errores en las divisiones. B) Embrión aneuploide completo, el error proviene de un gameto (error en la meiosis). C) Embriones mosaico debido a errores en las mitosis.

Entre los eventos que conducen al mosaicismo se observa que durante la mitosis se puede producir la no disyunción mitótica que conduce a anomalías cromosómicas complementarias (ganancias y pérdidas recíprocas) o también puede darse un retraso en la anafase que conduce a monosomías, sin trisomías recíprocas. Estas dos premisas son confirmadas mediante FISH y CCS. Otro motivo son las roturas cromosómicas que podrían producir anomalías estructurales,

como se ha comprobado utilizando aCGH. Por último, el mosaicismo puede originarse a partir de un rescate de la euploidía en una población aneuploide, pasando de trisomías o monosomías a valores normales de cromosomas, si bien esto puede llevar a disomía uniparental (UPD) si ambos cromosomas homólogos derivan de un progenitor produciendo problemas con la impronta (9).

En cuanto a la prevalencia de mosaicismo en embriones humanos hay poco consenso, ya que depende de la plataforma analítica, del número de células de la muestra, sin olvidar la variabilidad de parámetros y factores del laboratorio junto con la manipulación y aspectos del cultivo embrionario (9). Por ejemplo, plataformas NGS son capaces de detectar niveles bajos de mosaicismo (20%), mientras que otras como aCGH sólo lo detectan si está presente en grados más altos (>40-50%) (10). Para conocer la prevalencia es fundamental diferenciar dos conceptos: el primero se refiere a la frecuencia de embriones mosaico en la cohorte y el segundo al grado de mosaicismo por cada embrión mosaico. Se estima que la prevalencia de mosaicismo varía entre el 2% y el 13% por blastocisto según análisis por NGS de embriones con una única biopsia de TE, como indican algunos estudios como el de *Katz-Jaffe et al.* en el que analizaron 16.352 embriones con biopsia de TE reportando un 3% de embriones mosaico, sin embargo, en otros estudios encuentran tasas de mosaicismo mayores (9).

Si bien, muchos de estos estudios están de acuerdo en que, a medida que avanza el desarrollo embrionario, se reduce el mosaicismo, diagnosticándose en menos del 2% en muestras prenatales y menos del 0,2% en recién nacidos vivos. Esto lleva a pensar en la hipótesis de la autocorrección mediante apoptosis de las células anormales para producir una descendencia normal, hecho que se ha comprobado en ratones (9) (10).

Como ya sabemos, el PGT-A se basa en analizar la constitución cromosómica del embrión, pero esto es relativo, porque la realidad es que solo analiza los cromosomas de las células biopsiadas del TE y extrapolamos los resultados al resto del embrión. Y dado que cualquier célula del embrión puede dividirse erróneamente, es posible que las células anormales puedan estar dispuestas en el TE, en la masa celular interna (MCI) o en ambos, sin poder tener la certeza de que esos resultados son ciertos. Si bien, existen estudios en los que afirman que el hecho de tener un diagnóstico aneuploide de cromosoma completo en TE hace que sea muy probable que la MCI también sea aneuploide (10), estos datos no están demostrados con aneuploidías parciales o embriones mosaico. Por lo tanto, una de las preocupaciones clínicas es la de clasificar embriones como inadecuados siendo perfectamente viables y pudiendo tener la

capacidad de llegar a ser un recién nacido vivo sano. Aunque aún los datos son limitados, estudios actuales surgieron que la transferencia de embriones mosaico pueden dar lugar a RNV sanos, puntualizando que estos tienen tasas de embarazo más bajas (menor tasa de implantación y mayor tasa de aborto) en comparación con embriones euploides (9).

Por lo tanto, la transferencia de blastocistos mosaicos requiere una consideración cuidadosa con un buen asesoramiento genético, por ello recientemente diversos estudios proponen un sistema de priorización en función de la gravedad de la anomalía (por ejemplo, que afecte a los cromosomas 13, 16, 18, 21, X e Y sería motivo de descarte) y en función del grado de mosaicismo, aunque las justificaciones están siendo muy cuestionadas (9).

PGT-SR

PGT-SR (Test genético preimplantacional para la detección de alteraciones estructurales) surge como una categoría principal de PGT para parejas en las que uno o los dos miembros son portadores de alguna alteración cromosómica estructural. La principal indicación para su realización es la presencia de un cariotipo anormal previamente diagnosticado, preferiblemente con cariotipo de alta resolución (550-800 bandas). Así, esta prueba genética es capaz de identificar embriones afectados por el reordenamiento cromosómico estructural de embriones que no lo presentan, diagnosticándose antes de su implantación y evitando su transferencia al útero (6).

Existen distintos tipos de reordenamientos cromosómicos estructurales como: translocaciones recíprocas y robertsonianas, inversiones paracéntricas y pericéntricas, inserciones, deleciones, duplicaciones y anillamientos (Figura 3). Todas estas anomalías cromosómicas heredables pueden producir una descendencia afectada con distintos síndromes y enfermedades, siendo de gran relevancia clínica para estos pacientes su identificación. Sin embargo, no podemos olvidar que estas alteraciones pueden producirse “*de novo*” (6).

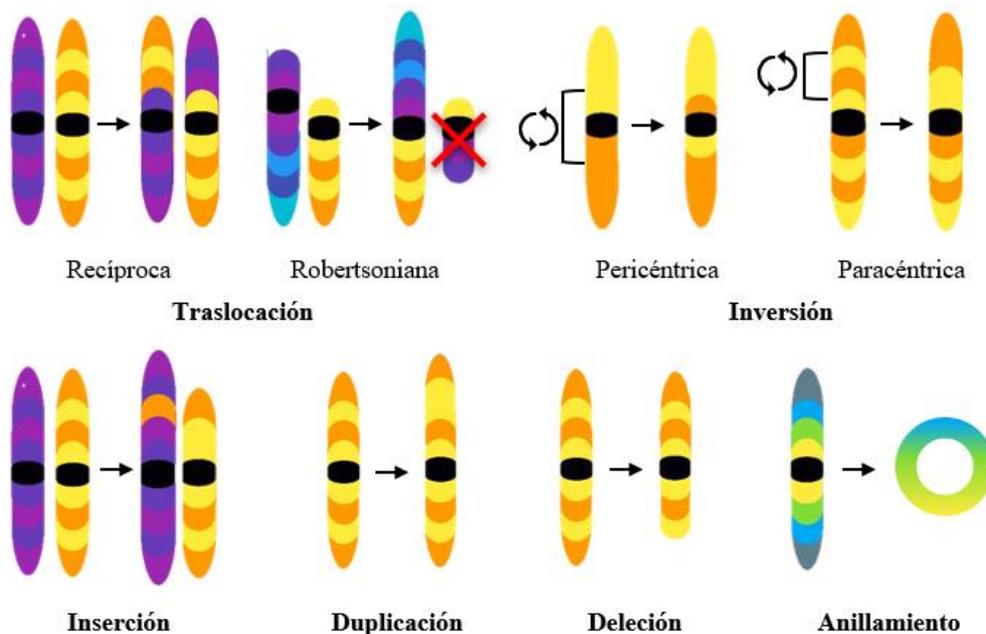


Figura 3. Clasificación de los distintos tipos de reordenamientos cromosómicos estructurales.
(Figura de elaboración propia)

Para la realización de PGT-SR se utilizan distintas técnicas citogenéticas y moleculares como son: FISH, aCGH, aSNP, NGS. La obtención de ADN embrionario se puede realizar a partir de biopsia de blastómero en etapa de escisión (día 3), o más comúnmente, de biopsia de TE en etapa de blastocisto (día 5, 6). El PGT-SR en corpúsculos polares se aplica menos y para el análisis se necesitan los dos corpúsculos para inferir de forma indirecta los ovocitos con desequilibrio cromosómico (6).

PGT-SR mediante FISH:

El uso de esta tecnología se basa en la hibridación de sondas de ADN específicas marcadas con distintos fluorocromos con el ADN diana de las células del embrión. Una vez hibridadas, mediante un microscopio de fluorescencia, las sondas nos permiten observar loci cromosómicos involucrados en reordenamientos estructurales. Esta técnica se usa para reordenamientos cromosómicos heredables, aunque también se puede utilizar para la determinación del sexo en embriones con enfermedad ligada al cromosoma X (cuando no se pueda aplicar PGT-M para la mutación directa de la enfermedad). FISH es aceptable para reordenamientos que involucren pequeños fragmentos o regiones subteloméricas siempre y cuando se incluyan suficientes sondas específicas como para detectar todas las variantes esperadas del reordenamiento cromosómico. El tiempo mínimo empleado son 4 horas por cada ronda de hibridación. Plataformas CCS con mayor resolución y que analizan todos los cromosomas simultáneamente han hecho que el uso de FISH decaiga significativamente (6).

Limitaciones:

FISH no distingue entre cariotipo normal o equilibrado, no detecta UPD, no detecta mosaicismo y una gran desventaja es que solo evalúa un número limitado de cromosomas debido al pequeño número de fluorocromos que se pueden observar al mismo tiempo. Además, al basarse en un diagnóstico por visualización de señales fluorescentes, podemos encontrar problemas técnicos como: la pérdida de ADN o la superposición de fluorescencia de distintas sondas (6).

PGT-SR mediante matrices (aCGH y aSNP):

Una matriz (en inglés array) es una superficie en la que se han adherido fragmentos de ADN conocidos (sondas) y sobre la cual nuestro ADN muestra y un ADN de referencia compiten por hibridar. Las sondas corresponden a regiones cromosómicas específicas que queremos analizar distribuidas en puntos discretos. Cada punto da un color, resultado de la proporción de fluorescencia de los dos colores tras la hibridación. Esta proporción se evalúa de forma automatizada mediante software informático y resulta en información relativa a ganancias o pérdidas cromosómicas si las hubiese. Se considera un enfoque más fiable para PGT-SR que el FISH, ya que analiza muchos más puntos de medida para cada segmento del reordenamiento. Actualmente, se utilizan dos plataformas de este tipo: la primera aCGH, que se basa en oligonucleótidos, proporcionando una resolución de 5-10 Mb y la segunda aSNP, basada también en oligonucleótidos con una resolución de 2,4-5 Mb. Para el uso de estas tecnologías se necesita primero amplificar el ADN; para lo que actualmente se usa WGA (amplificación del genoma completo), que a su vez puede ser de distintos tipos dependiendo de la cobertura genómica, tasas de error y rendimiento que se busque (DOP-PCR, MDA, MALBAC) (6) (11).

Se puede utilizar aCGH para el análisis de corpúsculos polares, pero se necesitan ambos para la detección de reordenamientos cromosómicos desequilibrados, resultados de la división meiótica del ovocito. También es posible la realización a partir de biopsias unicelulares de blastómero, aunque presenta un incremento de ruido de fondo y artefactos. Sin embargo, es en la biopsia de TE donde se obtiene un diagnóstico más confiable mediante esta prueba genética. En cuanto al diagnóstico mediante aSNP para PGT-SR, este no se basa en la detección de los cromosomas reales, sino en inferir el cariotipo a partir de los haplotipos del ADN de la biopsia. En esta prueba es necesario un ADN de referencia de un pariente de primer orden con el reordenamiento. Los datos se procesan después de leer la matriz SNP mediante análisis computacionales y bioinformática utilizando algoritmos para el genotipado y el haplotipado (6).

Limitaciones:

No se pueden detectar segmentos de reordenamiento cromosómico por debajo de la resolución de la plataforma. En concreto, aCGH no distingue un cariotipo normal o equilibrado, ni UPD, ni origen parental; en cambio, aSNP mediante el genotipado y haplotipado con ADN de referencias, sí que puede (12). Ambos son capaces de detectar mosaicismo, pero son menos sensibles que las plataformas NGS (6).

PGT-SR mediante NGS:

Esta plataforma nos permite la lectura directa de fragmentos de ADN secuenciados y su cuantificación. Esto nos permite analizar el ADN muestra evidenciando la presencia de reordenamientos cromosómicos. La secuenciación mediante NGS comprende distintos pasos como: procesamiento de la muestra (lisis celular y amplificación), preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis de datos mediante software informáticos. Prácticamente todo el proceso está automatizado, lo que conlleva una reducción de los errores y los costes. Además, al tener una mejor resolución, es capaz de discriminar fragmentos más pequeños que las técnicas anteriores. NGS puede evaluar el mosaicismo embrionario cuando está por encima del 20% (6).

Limitaciones:

NGS estándar sin genotipado no puede detectar cambios de ploidía, no discrimina embriones normales de los que tienen reordenamiento equilibrado, no detecta mosaicismo cromosómico por debajo del 20% y no es capaz de detectar anomalías estructurales por debajo de su resolución definida (microdeleciones y microduplicaciones) (6).

PGT-A

PGT-A (test genético preimplantacional para la detección de aneuploidías) surge como categoría principal de PGT para parejas con problemas reproductivos/ de infertilidad, pero sin antecedentes genéticos (cariotipo normal). Esta prueba busca seleccionar embriones con un complemento cromosómico normal (euploide) y descartar los embriones anormales (aneuploides). Así, en teoría, esto debería de mejorar las tasas de embarazo en RHA. Sin embargo, los primeros estudios publicados discutían este hecho, exponiendo su ineficacia y en

algunos casos incluso diciendo que eran perjudiciales para el ciclo de la paciente. Si bien, numerosos estudios recientes exponen que el uso de nuevas técnicas de biopsia mucho menos traumáticas, como la de TE, las novedosas plataformas de análisis genético mucho más sensibles que permiten analizar todos los cromosomas y los protocolos tan eficientes de vitrificación, hacen de PGT-A una herramienta eficaz para mejorar los resultados reproductivos en FIV (10)(12). Esto ha provocado un aumento generalizado del interés por el PGT-A como podemos observar en EE.UU, donde se estima que el 40% o más de los ciclos incorporan PGT-A en la práctica clínica. Sin embargo, esto contrasta con los pocos ECA (ensayo clínico aleatorizado) de biopsia de TE y PGT-A con plataformas CCS que se han realizado hasta la fecha. La mayoría exponen un aumento en la tasa de implantación, disminución en la tasa de aborto y aumento de las tasas de embarazo en curso (10). Hay que destacar un ensayo controlado aleatorio multicéntrico global realizado en 2017 que compara la transferencia de un solo embrión (SET) de embriones evaluados con PGT-A con una plataforma NGS y biopsia de TE y embriones evaluados por su morfología. Este estudio se llevó a cabo en 4 países, 9 laboratorios de genética asociados a 34 clínicas con un total de 588 pacientes con edad media de 34 años. En contraste con los estudios anteriores, no hubo diferencias en la tasa de embarazo en curso (46,9% PGT-A vs 45,9% morfología); sin embargo, un análisis por subgrupos reveló que las pacientes de entre 35-40 años tenían una tasa de embarazo en curso del 50,8% PGT-A frente al 37,2% por evaluación morfológica con tasas de aborto espontáneo del 8,2% y del 11%, respectivamente (13). Otro estudio más reciente de 2019, afirma lo mismo (Tabla 2) (14).

	25-34 años		35-37 años		38-40 años	
	PGT-A	Control	PGT-A	Control	PGT-A	Control
Resultados	N=152	N=168	N=80	N=89	N=42	N=56
β-HCG Negativo, n (%)	46 (30,3)	53 (31,5)	22 (27,5)	37 (41,6)	12 (28,6)	22 (39,3)
β-HCG Positivo, n (%)	106 (69,7)	115 (68,5)	58 (72,5)	52 (58,4)	30 (71,4)	34 (60,7)
Aborto bioquímico, n (%)	14 (9,2)	10 (6,0)	11 (13,8)	9 (10,1)	4 (9,5)	7 (12,5)
Aborto espontáneo, n (%)	17 (11,2)	14 (8,3)	5 (6,3)	10 (11,2)	5 (11,9)	6 (10,7)
Embarazo en curso a las 20 semanas de gestación, n (%)	75 (49,3)	89 (53,0)	42 (52,5)	33 (37,1)	20 (47,6)	21 (37,5)

Tabla 2. Resultados de pacientes con selección embrionaria mediante PGT-A vs Morfología en distintos rangos de edad (14).

La selección embrionaria mediante PGT-A muestra un aumento significativo en la tasa de embarazo en curso a las 20 semanas de gestación entre los 35 años y los 40 años. Mientras que en edades <35 años, no encontramos diferencias. Control = selección embrionaria por morfología.

Estudios de este tipo suscitan que se abra el debate sobre si se debe realizar PGT-A a todas las pacientes o simplemente centrarse en algunas indicaciones en las que las ventajas del uso de esta técnica está demostrado, como pueden ser: EMA, FI, AR, FMS y CP (15).

Para la realización de PGT-A existen distintas plataformas analíticas, cada una con sus ventajas y limitaciones entre las que podemos destacar FISH, q-PCR, aCGH, aSNP, NGS.

PGT-A mediante FISH:

Esta técnica está en desuso debido a que solo es capaz de analizar 5 cromosomas por ronda de hibridación. Además, la sensibilidad y el número de sondas utilizadas es muy baja, no pudiendo analizar mosaicismo. Se sugieren mejores enfoques CSS para el PGT-A (6) (12).

PGT-A mediante q-PCR:

De forma general, esta técnica requiere de 4 sondas por cromosoma para examinar los 24 tipos de cromosomas, es decir, 96 sondas. Entre las ventajas, se encuentra que tiene bajos costes y un tiempo de análisis corto, pudiendo transferir embriones en fresco. Sin embargo, tiene muchas deficiencias como que no detecta mosaicismo cromosómico, aneuploidías segmentarias, UPD y tiene una resolución bastante mala en comparación con otros enfoques (12).

PGT-A mediante matrices:

El primer paso para la realización de técnicas basadas en matrices es la amplificación del genoma mediante WGA. Como ya hemos comentado antes, existen distintos enfoques para matrices:

- aCGH utiliza cromosomas bacterianos artificiales (BACs), bibliotecas de cromosomas y oligonucleótidos específicos para proporcionar una identificación precisa de la variación en el número de copias de los cromosomas. Con una resolución aceptable, es capaz de detectar mosaicismo (pero con una sensibilidad menor que NGS), aneuploidías segmentarias y translocaciones desequilibradas. Las limitaciones principales son que no distingue poliploidía, reordenamientos equilibrados, UPD, ni el origen parental de la aneuploidía (12).
- aSNP utiliza marcadores SNP y sondas específicas para la variación en el número de copias de los cromosomas. Esta técnica se usa menos en clínica, debido a su alto coste y protocolo complejo; sin embargo, se ha considerado un enfoque preciso para la confirmación de otras plataformas. Tiene algunas ventajas como el hecho de poder identificar mosaicismo cromosómico, aneuploidías segmentarias, el origen parental de la aneuploidía, la UPD, reordenamientos cromosómicos desequilibrados y equilibrados y la poliploidía (12).

PGT-A mediante NGS:

En la actualidad, NGS es la plataforma CCS que más se utiliza para PGT-A debido a su alto rendimiento, su alta resolución, su capacidad para detectar mosaicismo cromosómico de bajo grado y aneuploidías parciales. Además, puede realizar PGT-A y PGT-M simultáneamente. Existen distintos sistemas NGS con distintas tecnologías como pueden ser: MiSeq (Illumina), VeriSeq (Illumina) con un protocolo de alta resolución para genotipado y detección de trastornos monogénicos o Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM™). Además, otros sistemas derivados de los anteriores están en auge, como por ejemplo NGS de baja densidad, el cual es más rápido y menos costoso, pero en contraposición, puede perder características del NGS estándar (no detectar mosaicismo, translocaciones desequilibradas...). Como comentábamos en PGT-SR con NGS, es fundamental la amplificación del genoma. Si bien, lo normal es realizar un protocolo WGA, actualmente están surgiendo nuevas técnicas que utilizan la amplificación dirigida del genoma, aplicando luego NGS (se le denomina tNGS) teniendo algunas ventajas como un mayor rendimiento en los sitios de los cromosomas amplificados, favoreciendo el estudio de regiones de interés, además de una disminución en el coste (12).

Plataforma CCS	qPCR	aCGH	aSNP	WGA NGS	tNGS	NGS de baja densidad	PMG NGS
Aneuploidía de cromosomas completos	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sondas	96	~2.700	~32.000	~700.000	2.000-3.000	10.000	50.000 o más
Tiempo de respuesta mínimo	(4h)	(9-30h)	(24h)	(15-24h)	(19-24h)	(<15h)	(3-10h)
Transferencia de embriones frescos	Sí	Sí/No	No	No	Sí/No	Sí	Sí
Resolución (Mb)	20	~6-10	~6	~1-3	SD	SD	SD
Mosaicismo (% de detección)	No	Sí (40-60%)	Sí (~50%)	Sí (20-80%)	No	No	Sí
Aneuploidía segmental	No	Sí	Sí	Sí	No/Sí	No	Sí
Traslocación desequilibrada	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí
Traslocación normal VS equilibrada	No	No	Posible	No	No	No	No
Poliploidía	Sí/No	No	Sí	Sí/No	Sí	No	Sí/No
Disomía uniparental (UPD)	No	No	Sí	Sí/No	No	No	Sí/No
PGT-A y PGT-M simultáneos	Sí	Sí/No	Sí	Sí	Sí	SD	Sí
ADN mitocondrial	Sí	SD	SD	Sí	Sí	Sí	Sí
Coste	2	4	5	3	1	2	3

Tabla 3. Comparación entre las distintas plataformas CCS para el estudio genético preimplantacional (PGT) (12). Coste: siendo 1 el menor coste y 5 el más alto. SD: Sin datos.

PGT-M

PGT-M (Test genético preimplantacional para la detección de anomalías monogénicas) surge como una categoría principal de PGT para parejas con riesgo de descendencia con trastornos monogénicos, es decir, enfermedades causadas por cambios en la secuencia de un gen. El objetivo principal de esta prueba es seleccionar embriones que no contengan la variante génica que causa la patología y poder transferir estos embriones al útero materno.

Esta prueba, en teoría, va a estar disponible para cualquier trastorno monogénico cuyo locus específico causante de la enfermedad se haya identificado; si bien, la indicación para su uso está restringida a la legislación del país, siendo lo más común usarlo para enfermedades graves para las que no existe tratamiento. PGT-M es capaz de analizar variantes patogénicas en ADN nuclear y mitocondrial. Además, su uso se extiende a pruebas para tipificar el HLA o a pruebas de exclusión para enfermedades de aparición tardía, ambas planteando preocupaciones éticas. Las indicaciones más comunes son enfermedades monogénicas con patrón de herencia autosómico recesivo (fibrosis quística, hemoglobinopatías hereditarias), autosómico dominante (neurofibromatosis, distrofia miotónica de tipo I, enfermedad de Huntington y síndromes de cáncer hereditario) y ligadas al cromosoma X (hemofilia, distrofia muscular de Duchenne y síndrome del cromosoma X frágil). Para enfermedades monogénicas del ADNmt se usa PGT-M para seleccionar embriones con una carga de mitocondrias afectadas con la variante causante del trastorno por debajo del umbral de expresión clínica (16) (17).

Uno de los mayores retos del PGT-M es la mínima cantidad de ADN de la muestra, para la cual se necesitan técnicas muy sensibles de amplificación del ADN. Las biopsias unicelulares (corpúsculo polar o blastómero) o las biopsias de TE (5-10 células) se someten a una amplificación del genoma dirigida, o bien, a una WGA para luego analizarse mediante plataformas como PCR multiplex, aSNP o NGS, principalmente. Cada plataforma con sus ventajas y limitaciones. El principio en que se basan estos métodos es el haplotipado, es decir, la determinación del grupo de alelos dentro de un segmento genético en un único cromosoma que se hereda de forma conjunta. Por lo que, los marcadores genéticos localizados cerca del gen de interés (el causante del trastorno monogénico) son genotipificados en muestras de ADN de la pareja y familiares de primer orden con ese estatus genético conocido. Los marcadores genéticos encontrados son informativos y flanquean el locus de interés permitiendo la discriminación de los haplotipos parentales que son utilizados para las pruebas clínicas. Los

haplotipos comunes con la variante patogénica se denominan haplotipo de alto riesgo o mutante, mientras que los haplotipos sin la variante se denominan de bajo riesgo o salvaje (16) (17).

Para la realización de PGT-M, el proceso se tiene que subdividir en dos partes:

- Análisis preclínico de informatividad y segregación. En este paso se definen los marcadores informativos específicos a partir del ADN de la pareja y familiares cercanos. Pueden ser marcadores de repetición en tándem cortos (STR) o el genotipado de marcadores SNP, así establecen el haplotipo que segrega con la variante patogénica.
- Análisis genético del embrión con las plataformas nombradas anteriormente. Identifican el haplotipo de los embriones mediante los marcadores informativos y la detección de la variante causante de la enfermedad. Así, son capaces de seleccionar los embriones no afectados del trastorno monogénico (16).

Limitaciones:

La baja cantidad de ADN (sobre todo cuando tenemos una célula) se relaciona con mayor riesgo de fallo de amplificación del ADN, contaminaciones externas o la pérdida de uno de los dos alelos (ADO), en el que uno de los alelos de una muestra heterocigótica se amplifica mientras que el otro no, pasando desapercibido (16).

Por último, comentar, que no solo existen enfermedades relacionadas con cambios en genes únicos. En la actualidad, numerosos estudios ponen de manifiesto las enfermedades poligénicas que involucran a muchos genes y factores, por lo que poco a poco irán apareciendo test capaces de analizar el conjunto de esas variantes. Así, en el futuro existirá el PGT-P, definiéndolo como una prueba genética preimplantacional que predice el riesgo de enfermedades poligénicas (17).

Perspectivas futuras para el PGT

El PGT ha evolucionado significativamente a lo largo del siglo XXI, sobre todo en dos aspectos como son las plataformas de análisis genético/cromosómico, mucho más sensibles (plataformas CCS) y las técnicas de biopsias (actualmente biopsia de TE).

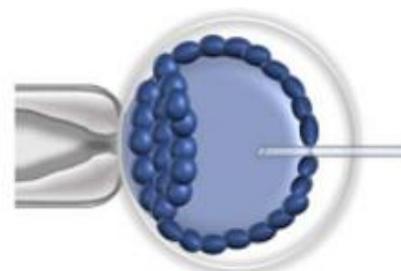
Sin embargo, surgen tres problemas principales en el PGT actual como son (18):

- La técnica de la biopsia requiere de equipos especializados y personal muy cualificado, incrementando considerablemente el costo del proceso.
- La biopsia es una técnica invasiva que puede producir un posible daño afectando a la viabilidad del embrión.
- El mosaicismo y su impacto en la precisión del diagnóstico al analizar únicamente 5-10 células de TE.

Recientemente, se ha descubierto que existe ADN libre de células (ADNlc) en medios de cultivo de embriones (SCM; de sus siglas en inglés “*Spent Culture Media*”) y en el líquido del blastocelo, generando un gran interés en el desarrollo de métodos no invasivos de PGT (niPGT) (Figura 4). Parte de este ADNlc podría ser liberado como consecuencia de procesos de muerte celular en el embrión, como la apoptosis y la necrosis, ambos relacionándose con la fragmentación del ADN. Entonces, si el ADN que se libera fuera principalmente de células aneuploides, en teoría, podría haber mayor riesgo de diagnósticos falsos positivos de aneuploidía. Por ello, estudios actuales buscan comprobar si este ADNlc representa una fuente fiable de información sobre el estatus genético embrionario, lo que generaría enfoques menos invasivos, más simples y seguros de PGT (12) (18).



Medio de cultivo embrionario



Blastocentesis

Figura 4. Nuevos enfoques no invasivos o mínimamente invasivos para obtener ADNlc para PGT (niPGT) (18).

Análisis de ADN libre de células en medio de cultivo embrionario

Como ya se sabe, el embrión está rodeado por la zona pelúcida, una membrana glicoproteica con un alto grado de permeabilidad capaz de permitir el paso de macromoléculas y por supuesto ácidos nucleicos. Durante los últimos años, varias publicaciones han investigado gran variedad de componentes secretados por los embriones en el medio de cultivo (denominándolo secretoma). Se pueden encontrar metabolitos, interleucinas y microARN entre otros, considerándose la medición de ciertas moléculas como valor predictivo de competencia embrionaria. Además, existe evidencia científica de que estos medios de cultivo albergan ADN, incluso más que el secretado en el interior del blastocele. Esto abre la posibilidad de utilizar este ADNlc como fuente para realizar diagnósticos genéticos preimplantacionales puramente no invasivos (niPGT). Se ha informado de la detección de ADN nuclear y ADN mitocondrial en medios de cultivo de embriones a partir del día 2-3 de desarrollo; si bien, se han descrito altas tasas de contaminación de ADN externo, sobre todo ADN materno, siendo un motivo a considerar en PGT con ADNlc en SCM (18).

En 2018, el grupo de Carmen Rubio realizó un estudio en el que se comprobó la presencia de ADNlc en medios de cultivo con embriones frente a la ausencia en medios de cultivo sin embriones (control), siendo lo que se esperaba. La presencia de este ADNlc permitió el diagnóstico cromosómico (PGT-A), a la vez que se biopsiaba el TE y se correlacionaban los resultados. Sin embargo, encontraron una correlación del 30,4% y una discordancia del 67%, atribuyendo los resultados discordantes a un alto porcentaje de ADN materno contaminante. Esto les llevó a diseñar y optimizar el protocolo para reducir las contaminaciones y obtener mejores resultados (19).

En 2019, este mismo grupo publicó un trabajo en el que correlacionaron 115 biopsias de TE con su respectivo SCM de cada embrión. Los criterios de inclusión fueron: pacientes de entre 32-46 años que se sometieron a un PGT-A con indicaciones de EMA, AR o FI. En cuanto a los resultados, la tasa de concordancia total para la ploidía y el sexo del embrión fue del 78,8%, siendo significativamente mayor para muestras en las que el embrión estuvo en cultivo hasta día 6/7 frente a embriones en los que se recolectaba el medio en día 5 (84% vs 63%, respectivamente); confirmándose que existe mayor presencia de ADNlc en medios de cultivo de embriones en etapas de desarrollo más avanzadas, previas a la implantación. La sensibilidad fue del 94,5% y la especificidad del 71,7%. Una parte muy importante fue que la tasa de amplificación del ADNlc se encontraba entre el 80-100%. Para la obtención de estos resultados,

el estudio optimizó el protocolo sugiriendo algunos cambios como: lavado minucioso en día 4, cultivo en 10 µl de medio a partir de día 4 (para concentrar el ADNlc) y recolección del medio de cultivo en día 5, 6 o 7. No se realizó eclosión asistida (*assisted hatching*) para que el proceso fuera totalmente no invasivo (20).

Con estos resultados prometedores, en 2020, se organizó un estudio prospectivo multicéntrico en ocho centros repartidos por todo el mundo. Se analizaron 1301 blastocistos en día 6/7 que se sometieron a PGT-A y nuevamente se correlacionaron los resultados entre el análisis de SCM y biopsias de TE. La correlación entre todos los centros fue del 78,2%, aunque algunos centros llegaron a tasas de 86,3% (21).

Aunque estos resultados son muy prometedores, es necesario seguir estudiando y trabajando en este nuevo enfoque. Aún, los porcentajes siguen estando por debajo de los que se esperaría de una prueba diagnóstica; si bien, una de las ventajas de esta prueba no invasiva es que podría no necesitar una indicación previa, ya que el medio que se desecha de rutina podría analizarse y servir como un parámetro más de selección embrionaria. Además, respecto al mosaicismo, es probable que esté mejor representado en este tipo de muestras debido a que el ADNlc que se analiza es secretado de todas las partes del embrión y no solo se analizan 5-10 células de TE.

Blastocentesis

Durante la formación de blastocistos, las células embrionarias se diferencian en masa celular interna (MCI) y trofoectodermo (TE). Esto ocurre debido a la formación de un gradiente iónico trans-trofoectodermo promovido por la Na^+/K^+ ATPasa que impulsa el agua a través de canales transmembrana (acuaporinas), llevando a la formación del blastocele (18).

El descubrimiento en el blastocele de ADNlc embrionario capaz de amplificarse y analizarse ha generado un gran interés como alternativa al PGT invasivo en el que es necesario una biopsia, mientras que la obtención del líquido del blastocele sería mínimamente invasivo.

Al proceso de extracción de líquido del blastocele se le denomina blastocentesis. Para llevar a cabo esta técnica, una pipeta ICSI perfora el trofoectodermo por la parte opuesta a la MCI y se aspira el máximo líquido del blastocele, dejando el embrión completamente colapsado. Numerosos estudios exponen que la pérdida del líquido del blastocele no debería ser perjudicial para el blastocisto, ya que el colapso y la reexpansión de la cavidad es un fenómeno natural que

se observa antes de la eclosión embrionaria. Además, describen que el vaciado del blastocele puede ser incluso ventajoso si el blastocisto va a ser vitrificado debido a que disminuye el riesgo de formación de cristales de hielo y el daño celular que producirían (18).

Existen dos requisitos principales para el uso de esta técnica: el primero es poder aislar, amplificar y analizar el ADN para evitar la posibilidad de no tener diagnóstico y, en segundo lugar, que el ADN que analicemos sea representativo del embrión. En el primero de los casos, se han encontrado serias dificultades para aislar y amplificar el ADNlc del líquido del blastocele, relacionándose con una mala calidad y una mínima cantidad de ADNlc (18).

Distintos estudios han intentado evaluar la capacidad del ADNlc del interior del blastocele para PGT-M; sin embargo, no han podido demostrar tasas de amplificación suficientes, variando entre el 27-78%. En cuanto a los resultados de concordancia, los resultados de los estudios sugieren que los productos generados después de la amplificación de muestras de blastocentesis muestran una cobertura genética similar a las biopsias de blastómeras, siendo susceptibles de análisis posteriores mediante PCR para trastornos monogénicos, pudiendo representar la genética del embrión a nivel de nucleótido. No obstante, estos estudios tienen un tamaño muestral muy limitado y están restringidos por la baja tasa de amplificación de la muestra (18).

Para el estudio de aneuploidías cromosómicas (PGT-A) también se ha estudiado extraer ADNlc mediante blastocentesis. Encontramos estudios muy prometedores de *Gianaroli L y Magli MC et al.* en el que analizan la correlación entre biopsias de TE y muestras de blastocentesis de 256 blastocistos usando WGA y aCGH para el CCS. En relación a la tasa de amplificación, fue del 71% en las muestras de ADNlc en blastocele. Las tasas de concordancia de ploidía y por cromosoma único fueron de 93,6% y 96%, respectivamente, mientras que la tasa de concordancia cromosómica completa fue significativamente más baja (66,3%). Sin embargo, otros grupos han intentado replicar estos resultados teniendo resultados contradictorios (18).

En resumen, esta metodología no está indicada para su uso clínico debido a sus deficiencias técnicas. Se necesitan más investigaciones para obtener protocolos estandarizados capaces de optimizar el muestreo, la amplificación y el análisis del ADNlc del líquido del blastocele, así como la verificación de que el ADN es representativo del embrión.

DISCUSIÓN

A lo largo de las últimas dos décadas se han ido introduciendo importantes avances en el ámbito de la reproducción humana asistida y en concreto, en el análisis genético preimplantacional (PGT), convirtiéndolo en un procedimiento clínico bien establecido, preciso y seguro. Además, la aplicación de nuevas plataformas de CCS ha permitido un aumento en la estandarización y uniformidad de los resultados entre los diferentes laboratorios genéticos.

En la época en la que vivimos existe un mayor conocimiento y concienciación de la población sobre el riesgo de transmitir enfermedades genéticas o síndromes cromosómicos a sus descendientes y, por lo tanto, la demanda de los distintos tipos de PGT está en auge.

Así, el PGT puede ser más agradable que someterse durante el embarazo a pruebas invasivas de diagnóstico prenatal como las biopsias coriales o la amniocentesis con su riesgo implícito de aborto o en el caso de detectar anomalías genéticas/ cromosómicas enfrentarse a la difícil decisión de una interrupción voluntaria del embarazo.

Sin embargo, la realización de PGT nunca va a ser 100% fiable y, por ello, se recomienda que se tenga como opción el diagnóstico prenatal como confirmación de los resultados del PGT, sobre todo en casos de transferencia de embriones mosaicos.

La tendencia actual de estas pruebas genéticas/ cromosómicas es la biopsia de 5-10 células de TE, seguido de un proceso de amplificación del genoma y una plataforma CCS, preferiblemente con tecnología NGS.

Por otro lado, el uso de estas nuevas plataformas diagnósticas más sensibles ha hecho que surjan hallazgos genéticos adicionales a la condición estudiada, como pueden ser trastornos monogénicos no esperados, mosaicismo cromosómico o aneuploidías parciales, planteando distintas posibilidades en el asesoramiento genético de la pareja y en la política del laboratorio en torno a la transferencia embrionaria.

Una de las preocupaciones éticas más importantes en este tipo de pruebas genéticas con plataformas de secuenciación masiva del ADN es que se obtiene mucha más información de la que se está buscando, surgiendo dudas a la hora de revelar esa información genética. Se sabe que con plataformas NGS se puede saber la posición exacta de cada uno de los nucleótidos y, por lo tanto, saber que condición génica tiene el embrión. Esto genera debate por la posible utilización de estas técnicas como programas de eugenesia al tratar de eliminar las variantes

patogénicas y no solo intentar prevenirlas, como está estipulado en muchos países. Prevenirlas sería descartar los embriones afectados por la enfermedad mientras que los portadores que no van a cursar con la patología deben de usarse para la transferencia embrionaria.

Sin embargo, el uso no regulado de estas tecnologías puede plantear problemas éticos aún mayores que el descartar embriones portadores que no desarrollarían la enfermedad, como podría ser la selección de características que puedan considerarse deseables, como rasgos físicos o psíquicos (como la inteligencia entre otras).

En cuanto al marco legal del PGT, depende mucho del país. Hay países en los que está prohibido o muy restringido el uso de estas prácticas (Malta, Letonia, Lituania e Italia), en otros se llevan a cabo pero con indicaciones legales y de sociedades científicas (España, Inglaterra) y en otros en los que no hay regulación legal implícita (China, Israel, India, incluso EE.UU).

En España, se acepta para los supuestos referidos en la *Ley 14/2006 del 26 de mayo, sobre Técnicas De Reproducción Asistida* y para cualquier otra finalidad que no esté recogida en la ley, pero que sea aprobada por la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA). En EE.UU, no existe regulación específica para el PGT. La elección de la técnica es tomada por las parejas asesoradas por un médico y, en muchos casos, mediante contratos con entidades privadas; aunque, es cierto, que periódicamente se emiten recomendaciones por parte de la ASRM (American Society for Reproductive Medicine).

Una de las soluciones encontradas por parejas que residen en países que limitan el uso de estas técnicas es viajar a países extranjeros que permiten el acceso a estos tratamientos, hecho que suscita una inquietud a pacientes sin recursos económicos suficientes para optar a estas alternativas reproductivas. No obstante, cada vez más compañías privadas y sistemas sanitarios públicos abogan por cubrir los problemas de infertilidad y tratar el origen genético de esta mediante PGT.

Sin duda, en un futuro, tendrá lugar la regulación legal de estas técnicas en los distintos países y posiblemente organizaciones globales como la OMS, especifiquen recomendaciones de buenas prácticas.

Respecto a los nuevos enfoques no invasivos o mínimamente invasivos de PGT, como el análisis de ADNlc en medio de cultivo o la blastocentesis, es pronto para afirmar su uso como prueba diagnóstica clínica. Esto se debe a que los estudios presentan resultados muy dispares entre sí, la mayoría con tamaños muestrales pequeños y tasas de concordancia por debajo de lo que se esperaría de una prueba diagnóstica. Se necesitan más estudios, capaces de optimizar los

protocolos de aislamiento y amplificación del ADNlc, además de comprobar que es una fuente fiable del estatus genético del embrión.

Sin embargo, los últimos estudios de ADNlc en medio de cultivo son bastante prometedores, teniendo altas tasas de concordancia con biopsias de TE. Aunque de momento no sirvan como diagnóstico preciso, pueden ayudar a la hora de seleccionar embriones junto a otros parámetros embrionarios (morfológicos, morfocinéticos, tecnologías -ómicas...).

Por último, para la aplicación y el uso responsable de estas técnicas, cada día más comunes, es necesaria la colaboración entre trabajadores clínicos, científicos y responsables políticos que establezcan las directrices y recomendaciones ideales para su manejo.

CONCLUSIONES

- Desde su inicio en 1990 hasta la fecha, ha habido un incremento exponencial en el desarrollo y la evolución de las técnicas de análisis genético preimplantacional (PGT).
- La biopsia de TE y las plataformas CCS, sobre todo NGS, son los enfoques que mayores ventajas aportan siendo los más usados en la actualidad para la realización de PGT.
- Estudios recientes de PGT no invasivo en medio de cultivo embrionario son muy prometedores, mientras que la técnica de la blastocentesis cuenta con ciertas limitaciones.
- Se necesita una extensa estandarización de los procesos involucrados en el PGT y una clara regulación legal para su uso responsable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62(February):2–10.
2. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Dec 12;13(1).
3. Parikh FR, Athalye AS, Naik NJ, Naik DJ, Sanap RR, Madon PF. Preimplantation genetic testing: Its evolution, where are we today? *J Hum Reprod Sci.* 2018;11(4):306–14.
4. Fasouliotis SJ, Schenker JG. A historical perspective of the clinical evolution of the assisted reproductive technologies. *Gynecol Endocrinol.* 1999;13(6):420–40.
5. Cimadomo D, Rienzi L, Capalbo A, Rubio C, Innocenti F, García-Pascual CM, et al. The dawn of the future: 30 years from the first biopsy of a human embryo. The detailed history of an ongoing revolution. *Hum Reprod Update.* 2020;26(4):453–73.
6. Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations†. *Hum Reprod Open.* 2020 Mar 1;2020(3):1–20.
7. Imudia AN, Plosker S. The Past, Present, and Future of Preimplantation Genetic Testing. *Clin Lab Med.* 2016;36(2):385–99.
8. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, Scarica C, Palagiano A, Canipari R, et al. The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
9. Popovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: The ultimate diagnostic dilemma. *Hum Reprod Update.* 2020;26(3):313–34.
10. Homer HA. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): The biology, the technology and the clinical outcomes. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2019;59(2):317–24.
11. Viotti M. Preimplantation genetic testing for chromosomal abnormalities: Aneuploidy, mosaicism, and structural rearrangements. *Genes (Basel).* 2020;11(6).
12. Chen HF, Chen M, Ho HN. An overview of the current and emerging platforms for preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in in vitro fertilization programs. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2020;59(4):489–95.
13. Munne S, Kaplan B, Frattarelli JL, Gysler M, Child TJ, Nakhuda G, et al. Global multicenter randomized controlled trial comparing single embryo transfer with embryo selected by preimplantation genetic screening using next-generation sequencing versus morphologic assessment. *Fertil Steril.* 2017 Sep 1;108(3):e19.
14. Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril.* 2019;112(6):1071-1079.e7.
15. Geraedts J, Sermon K. Preimplantation genetic screening 2.0: The theory. *Mol Hum Reprod.* 2016;22(8):539–44.

16. Carvalho F, Moutou C, Dimitriadou E, Dreesen J, Giménez C, Goossens V, et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders†. *Hum Reprod Open*. 2020;2020(3):1–18.
17. De Rycke M, Berckmoes V. Preimplantation genetic testing for monogenic disorders. *Genes (Basel)*. 2020;11(8):1–15.
18. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): The next revolution in reproductive genetics? *Hum Reprod Update*. 2020;26(1):16–42.
19. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, Martinez S, Navarro R, Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum Reprod*. 2018;33(4):745–56.
20. Rubio C, Rienzi L, Navarro-Sánchez L, Cimadomo D, García-Pascual CM, Albricci L, et al. Embryonic cell-free DNA versus trophoctoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil Steril*. 2019;112(3):510–9.
21. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, et al. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223(5):751.e1-751.e13.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mi tutora María Gaytán Muñoz por el buen trato recibido durante mi periodo de prácticas en IVI Madrid y por guiarme y ayudarme en la realización de este trabajo. Además, agradecer a mi familia por darme la posibilidad de estudiar lo que quiero y apoyarme en todo, al igual que mis amigos y mi pareja que me animan a seguir día a día.