

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

**Revisión bibliográfica sobre Diagnóstico**  
**Genético Preimplantacional No Invasivo**  
**frente al Diagnóstico Genético**  
**Preimplantacional convencional**

Autor: Rosario Eugenia Lázaro Sánchez

Tutor: Jesús Aguilar Prieto

Villaviciosa de Odón, 2020/2021

## **ÍNDICE**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1-6</b>
<b>1.1. Historia del DGP .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Técnicas de Biopsia.....</b>	<b>2-5</b>
<b>1.3. Problemática DGP .....</b>	<b>5-6</b>
<b>1.4. niDGP-A .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Objetivos....</b>	<b>7</b>
<b>3. Métodos .....</b>	<b>7</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>7-18</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>19-21</b>
<b>6. Conclusión.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>21-24</b>

## **RESUMEN**

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es una técnica que permite el estudio genético de los embriones, mediante la obtención de ADN del embrión. Para ello, se llevan a cabo técnicas invasivas, entre ellas, la más utilizada, es la biopsia de trofooctoderma entre los días 3 y 5 de desarrollo. Esta es una técnica cara y compleja que puede afectar a la viabilidad del embrión si no se realiza correctamente. Además, uno de los problemas principales es la presencia de mosaicismo embrionario, lo que podría llevar al descarte de embriones sanos o la selección de embriones alterados.

Por ello, en los últimos años están surgiendo nuevas técnicas menos invasivas para la detección de anomalías embrionarias, basadas en el análisis del “ADN libre” o cfDNA (ADN libre circulante, por sus siglas en inglés) que se encuentra en los medios de cultivos como son la blastocentesis y el ni-DGP (Diagnóstico Genético Preimplantacional No Invasivo). Concretamente, esta última es una técnica totalmente no invasiva en la que se está haciendo mucho hincapié para demostrar su fiabilidad frente a las técnicas de DGP convencional.

En este trabajo se ha hecho una revisión bibliográfica con el fin de describir la fiabilidad de las nuevas técnicas de DGP, en especial el ni-DGP frente a las técnicas convencionales de DGP. Para ello, se han comparado varios estudios que demuestran los niveles de concordancia entre los resultados de ambas técnicas.

## 1.INTRODUCCIÓN

Conseguir un recién nacido vivo sano (RNV) es el objetivo principal de los profesionales de la medicina reproductiva. En las últimas décadas diversos métodos de estudio se han desarrollado para lograr este fin. Entre ellas el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es la técnica más usada en la actualidad para seleccionar embriones libres de anomalías y mutaciones genéticas antes de su transferencia al útero, mediante el cual, se biopsian células del embrión y posteriormente, estas células biopsiadas se someten a una prueba de diagnóstico genético.

Dentro del DGP encontramos distintas variantes dependiendo del tipo de estudio que se quiera realizar: el DGP-A para detectar aneuploidías, anomalías cromosómicas numéricas, tanto duplicaciones como deleciones, el DGP-M para detectar enfermedades monogénicas hereditarias y el DGP-SR para detectar alteraciones estructurales de uno o varios genes. Además, existe el DGP combinado en el que podemos estudiar varias enfermedades monogénicas, aneuploidías o alteraciones cromosómicas estructurales, incluso podemos seleccionar qué embriones son histocompatibles con un hermano enfermo. Otro tipo es el eDGP, para el estudio de enfermedades genéticas no mendelianas en el que se involucran varios factores genéticos y epigenéticos, se evalúan trastornos de penetrancia total o parcial. En los últimos años han surgido nuevas alternativas menos invasivas basadas en el estudio del “ADN libre” o cfDNA. Estas técnicas son conocidas como DGP no invasivo (niDGP), del cual existen dos estrategias: la blastocentesis, esta es medianamente invasiva, o el análisis de los medios de cultivos utilizados durante el cultivo del blastocisto (5) (Figura 1).

<b>DGP-A</b>	• Detección de Aneuploidías
<b>DGP-M</b>	• Detección de enfermedades Monogénicas
<b>DGP-SR</b>	• Detección de alteraciones estructurales
<b>DGP combinado</b>	• Estudio combinado de enfermedades monogénicas, aneuploidías o alteraciones estructurales
<b>eDGP</b>	• Enfermedades genéticas no Mendelianas
<b>niDGP</b>	• Prueba no invasiva

Figura 1. Figura que representa los tipos de DGP.

## **1.1. Historia del DGP**

A lo largo de los años el DGP ha ido evolucionando, el tipo de biopsia y el momento de la biopsia han ido cambiando. Los primeros estudios fueron llevados a cabo por Gardner y Edwards en 1968. Realizaron un estudio cuyo objetivo era determinar el sexo de embriones de mamíferos, mediante el cual usando una pipeta holding aspiraron células del trofoectodermo de embriones de ratón (3). Pero no fue hasta dos décadas más tarde cuando, gracias a la aparición de la *fecundación in vitro* (FIV) se realizaron los primeros avances en DGP y las primeras biopsias de blastocistos en humanos. Los avances en la mejora del método de biopsia en modelos animales permitieron que a finales de la década de 1980 se realizaran las primeras biopsias de embriones. Concretamente, se realizaron biopsias de blastómeras en etapa de escisión, en día 3 de desarrollo, en la cual se perfora la ZP utilizando ácido Tyrode y posteriormente se obtenían las blastómeras mediante aspiración. Las primeras biopsias de embriones humanos con resultados positivos de embarazos y los primeros recién nacidos vivos se realizaron en 1990 por el grupo de Handyside, en el cual se realizó DGP para pacientes portadores de trastornos hereditarios ligados al cromosoma X (3).

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la biopsia de blastómeras, varios grupos de científicos se plantearon el estudio de la biopsia de varias células del trofoectodermo (TE) en día 5 de desarrollo, a partir del cual se podría obtener una muestra que proporciona más material para el análisis de tejido extraembrionario sin afectar a la masa celular interna (IMC) que es la que da origen al feto, basándose en los estudios de Gardner y Edward y en estudios anteriores en blastocistos de ratón y títí (9,16).

Los primeros procedimientos de biopsia de TE eran muy agresivos ya que se biopsiaban muchas células y era un proceso muy lento por lo que se podría ver comprometida la viabilidad del embrión, no se llevaron a la práctica clínica hasta años después cuando se perfeccionó la técnica.

## **1.2. Técnicas de Biopsia**

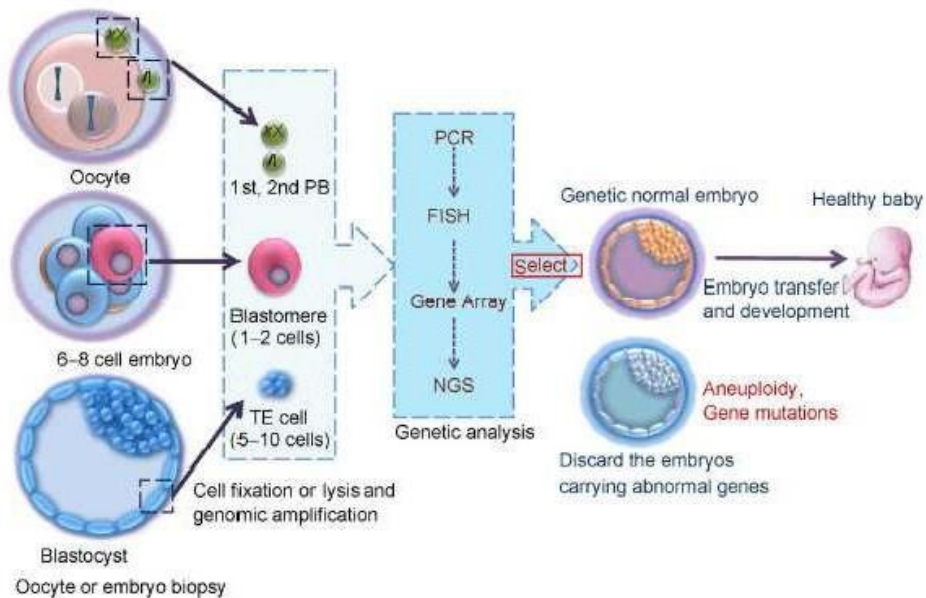
Basándose en el protocolo de apertura de la zona pelúcida con láser (17) se perfeccionó la técnica y es la que se utiliza hoy día, para la cual existen dos tipos de protocolos (1,8).

En el primero, en día 3 de desarrollo se realiza el hatching o eclosión asistida, el cual consiste en realizar un pequeño orificio en la zona pelúcida (ZP) que puede realizarse mediante ácido Tyrode o mediante disparos de láser y se deja el embrión en cultivo secuencial hasta día 5 de desarrollo. En día 5 de desarrollo podemos observar cómo parte del trofoectodermo (TE) ha salido por la zona donde se realizó el hatching, esas células que han salido serán biopsiadas mediante un método de tracción de las células o de movimiento rápido, ayudado de pulsos de láser en ambos casos. Mientras que el segundo método consiste en dejar hasta día 5 de desarrollo el embrión en cultivo. En día 5 de desarrollo se perforará la zona pelúcida y se realizará la biopsia de trofoectodermo por el lado opuesto a donde se encuentre la masa celular interna (MCI) para evitar dañarla (1,8). Posteriormente, el embrión se vitrificará hasta obtener los resultados del estudio genético. Este método fue corroborado por el grupo de investigación de Parriego en 2007 (3).

Para el análisis genético de la muestra se han desarrollado una variedad de métodos. La primera técnica que se utilizó para el diagnóstico genético del DGP fue la hibridación fluorescente in situ (FISH) mediante sondas marcadas con una secuencia específica (3). Esta prueba presenta limitaciones ya que el número de cromosomas que se pueden evaluar es muy limitado debido a la limitación de fluoróforos. Para sortear esta limitación en 1996 Wells y Delhanty desarrollaron un método citogenético que permite la enumeración simultánea de todos los cromosomas. Este método se basa en el microarray de hibridación genómica comparada (CGH) (3). Se considera una técnica FISH con principios competitivos ya que el ADN de la muestra problema competirá con el ADN control para hibridar con cromosomas metafásicos. Los cromosomas son marcados con fluoróforos distintos y posteriormente, mediante un escáner, se puede identificar dónde se ha producido la hibridación y si se han producido ganancias o pérdidas de material genético. Las técnicas de arrays de CGH con la aparición de las tecnologías de secuenciación masiva (NGS) están dejando de usarse. Desde 2013 el uso de la NGS es cada vez más amplio a nivel global ya que es una técnica que permite secuenciar un número de bases mayor por experimento. Además, es capaz de detectar todos los tipos de variaciones genómicas en un único experimento (3). Actualmente, las tecnologías *Illumina* y *Thermo Fisher* son las técnicas de secuenciación más utilizadas debido a su alta efectividad.

Una vez obtenidos los resultados se hará la transferencia del embrión no afectado/euploide que pasará por un proceso de desvitrificación. En 2014 el grupo de investigación de Capalbo propone el protocolo de apertura secuencial de la ZP y posterior biopsia de TE en día 5-7 sin previa eclosión asistida en día 3 (2).

Por otro lado, a principios de la década de 1990 se realizaron los primeros estudios sobre biopsia de los corpúsculos polares como alternativa a la biopsia de embriones. Para ello se produce una rotura de la zona pelúcida y se biopsian los corpúsculos polares, pero esta técnica presenta limitaciones ya que solo ofrece información sobre el material genético materno y tampoco se pueden detectar errores sobre la no disyunción mitótica.



**Figura 2.** Figura resumen de los procedimientos para un DGP.











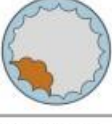

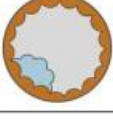

Entre 2012 y 2013 se realizaron estudios para demostrar la superioridad de la biopsia de TE frente a la biopsia en día 3 de blastómeras y se demostró que el potencial de implantación fue menor en el caso de los embriones biopsiados en día 3 frente a los embriones que se les realizó una biopsia de TE en día 5 (13). Aunque no se han podido evaluar los riesgos en embriones humano, se han obtenido resultados en estudios animales que muestran un mayor riesgo neurodegenerativo, mayor peso corporal y modificaciones epigenéticas producidas después de la biopsia de blastómeras en día 3 (3). A pesar de estos resultados la biopsia en día 3 de desarrollo se

sigue realizando en muchos laboratorios. Sin embargo, la técnica llevada a cabo actualmente en la mayoría de los laboratorios para la detección de anomalías genéticas es la biopsia de TE en día 5 de desarrollo.

### 1.3. Problemática

Pese a ser la biopsia la técnica más usada hoy día para la detección de anomalías genéticas, en los últimos años se está cuestionando su uso. Uno de los temas de debate sobre el DGP es la seguridad de la biopsia del embrión, ya que existen riesgos al ser una prueba de micromanipulación que conlleva una biopsia invasiva.

Otro de los problemas a los que se enfrenta el DGP es la presencia del mosaicismo embrionario, que se caracteriza por la presencia de dos o más linajes celulares en el embrión. Ante la presencia de mosaicismo, se pueden formar células euploides y aneuploides en el trofoblasto. Además, la frecuencia de aneuploidías en el trofoblasto es mucho mayor que en la MCI, por lo que puede no ser informativo. En estadio de blastocisto podemos encontrar distintos tipos de embriones mosaicos dependiendo del linaje celular afectado. (Figura 3)

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

**Figura3.** Figura que representa la clasificación de los distintos tipos de mosaicismo. (18)



Por otro lado, es una prueba de alto coste ya que el material y el equipo empleado es costoso. Además, el personal que realiza la técnica de biopsia debe tener una formación especial y ser embriólogos experimentados y con una gran precisión para realizarla.

Dadas todas estas barreras a las que se enfrenta la biopsia invasiva del embrión se han buscado alternativas más económicas y menos invasivas. Los estudios actuales se centran en la blastocentesis y en la detección de ADN en el medio de cultivo utilizado.

#### **1.4. ni-DGP-A**

La blastocentesis es un proceso mínimamente invasivo que consiste en la obtención de ADN libre que las células han podido liberar hacia el blastocele. Este proceso se realiza mediante la aspiración del líquido del blastocisto con una aguja de ICSI por el lado opuesto a donde se encuentra la MCI, dejando al embrión completamente colapsado (10). Aunque es una técnica prometedora, se necesitan más estudios debido a que no se ha comprobado suficiente capacidad de reproducibilidad y precisión ya que el ADN obtenido, en su mayoría, proviene de células necróticas y apoptóticas.

La otra alternativa es el estudio del ADN libre en los medios de cultivo de embriones (cfDNA), este es un método completamente no invasivo. Se ha comprobado la existencia de ADN mitocondrial y celular en medios de cultivos de blastocistos. Actualmente, se desconoce el mecanismo de liberación de ADN embrionario. Un estudio llevado a cabo por el grupo de Legge en 1995 comprobó que macromoléculas relativamente grandes son expulsadas al medio a través de la zona pelúcida. Esto es posible ya que la ZP contiene un alto grado de permeabilidad que permite el paso de ciertas moléculas, lo que podría explicar la expulsión de ADN al medio.

Los enfoques actuales se centran en el estudio del cfDNA como alternativa al DGP debido a que no se usan técnicas invasivas y su coste es mucho menor.

## **2.OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es demostrar si es posible que mediante el análisis por NGS del ADN liberado por el embrión al medio de cultivo (cfADN) se pueda reemplazar a las técnicas de biopsia embrionaria para el Diagnóstico Genético Preimplantacional.

## **3.MÉTODOS**

Para realizar el presente trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos publicados entre 1988 y 2020 tanto de trabajos publicados en español como en inglés.

Las bases de datos consultadas fueron National Library of Medicine (a través de PubMed y Medline) y Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America para la consulta de una gran variedad de artículos en revistas científicas como “Fertility and Sterility”, “Human Reproduction Update”.

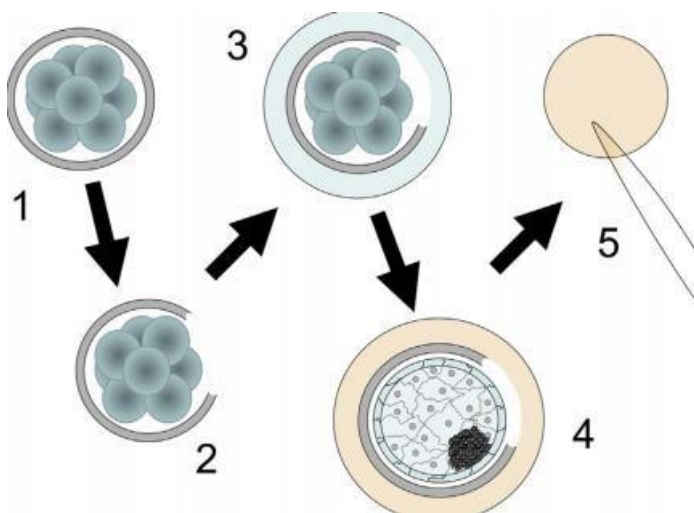
Las palabras claves utilizadas fueron: preimplantation genetic testing, noninvasive PGT, free embryonic DNA, trophoctoderm biopsy, ICSI, culture medium, human blastocyst DNA.

## **4.RESULTADOS**

En la última década diversos estudios se han centrado en demostrar la presencia de ADN embrionario en los medios de cultivos con el fin de demostrar que el análisis del cfADN es un método alternativo de detección de anomalías embrionarias. Fue en 2013 cuando el grupo de estudio de Stigliani se plantearon la hipótesis de que la fragmentación de blastómeras conlleva la liberación de ADN celular al medio de cultivo. Ellos demostraron por primera vez la presencia de ADN genómico (ADNg) y ADN mitocondrial (ADNmt) en el medio de cultivo. El protocolo consistía en recoger, por un lado, tras la transferencia embrionaria, el medio de cultivo usado y, por otro lado, el medio de cultivo de embriones vitrificados en día 2 y 3. Posteriormente, mediante cuantificación

por PCR cuantitativa, demostraron la presencia, en el secretoma, de ADNmt y ADNg procedente del embrión en ambos medios de cultivo (15).

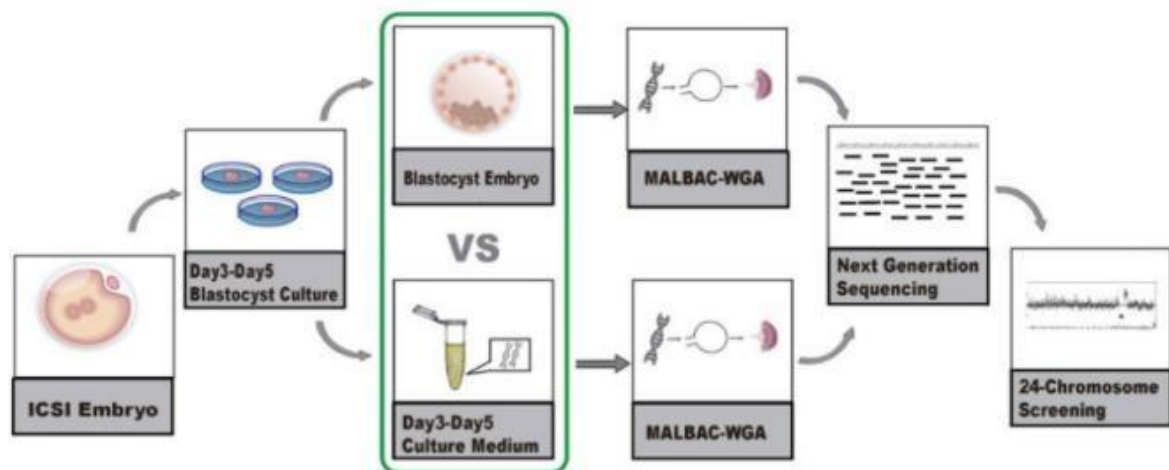
Una vez demostrada la presencia de ADN en los medios de cultivos se llevaron a cabo diversos estudios. Los primeros estudios publicados sobre el análisis de ADN libre de células en medios de cultivo de embriones vienen de la mano del grupo de investigación de Shamonki y colaboradores en 2016. El estudio consistió en comparar los resultados obtenidos tras analizar medios de cultivo usados frente a los resultados obtenidos mediante biopsia de TE en día 5. Para ello, en día 3 de desarrollo, los embriones se cambiaron de medio hacia una segunda placa de cultivo y se les realizó la eclosión asistida con el objetivo de facilitar la biopsia en día 5 y la salida de ADN embrionario libre. En día 5 o 6 los embriones fueron sometidos a biopsia de trofoectodermo, se vitrificaron y el TE se mandó a analizar mediante aCGH. Por otro lado, el medio usado se recogió y se procesó para su posterior análisis mediante aCGH (Figura 4). En este estudio se utilizaron un total de 57 embriones de los cuales 55 obtuvieron resultados positivos para la presencia de ADN en el medio, aunque los resultados de amplificación fueron relativamente bajos. Obtuvieron niveles de concordancia entre los resultados de la biopsia de trofoectodermo (BT) y del cfDNA muy bajos de apenas un 3,5% (14).



**Figura 4.** Procedimiento para la obtención de ADN libre en medios usados para FIV. (14)

El grupo de Xu y colaboradores en 2016 realizaron un estudio en el cual utilizaron 42 embriones que vitrificaron en día 3. Posteriormente los desvitrificaron y colocaron en medios de cultivo hasta llegar a blastocisto. En día 5, se recogió el medio de cultivo y se

analizó mediante WGA y secuenciación mediante múltiples ciclos de amplificación basados en hibridación y bucle (MALBAC) –NGS (Figura 5). Compararon los resultados del medio de cultivo con el blastocisto y obtuvieron unos niveles de concordancia del 85,7%. Del total de resultados, se observaron 2 falsos negativos. Esto puede deberse a la contaminación de células maternas del cúmulus en el medio. También se obtuvieron 4 falsos positivos que se asociaron al mosaicismo embrionario, ya que estudios anteriores demostraron que los embriones tienden a extruir hacia el exterior las células que presentan errores mitóticos. Este ensayo se aplicó a un paciente con una translocación equilibrada, del que se obtuvieron 3 blastocistos. Mediante el análisis del medio de cultivo se detectaron anomalías cromosómicas en 2 de ellos. Posteriormente, se lisó el blastocisto completo y se analizó; obtuvieron los mismos resultados que mediante el análisis del medio. De todos ellos, sólo uno de los embriones obtuvo un cariotipo normal. Este se seleccionó para transferencia y el 5 de marzo de 2016 resultó en nacimiento de un recién nacido vivo cromosómicamente normal (20).



**Figura 5.** Diagrama del proceso del ensayo de obtención de ADN de medio de cultivo y de blastocisto. (20)

Posteriormente otro grupo de estudio evaluaron la ploidía embrionaria utilizando los medios de cultivos usados hasta blastocisto y los compararon con los resultados de análisis del corpúsculo polar (4). Para ello utilizaron el medio de cultivo de 22 embriones a los que se les hizo biopsia de ambos corpúsculos en día 1 post-ICSI. Tras la biopsia, los embriones se cultivaron en nuevas gotas de cultivo hasta día 5, momento en el que se recogió la muestra de medio de cultivo para su análisis. Tanto la muestra de los medios de cultivo como la de los corpúsculos polares, se analizaron mediante aCGH. De las 22 muestras de medio de cultivo se pudieron finalmente

amplificar 18. De las 18 muestras, en 13 de ellas, se obtuvieron resultados concordantes de ploidía entre los análisis del medio de cultivo con la biopsia del corpúsculo, lo que equivale en una concordancia del 72,2%.

En 2018 el grupo de investigación de Ho y colaboradores realizaron un estudio en el cual querían comprobar si el momento de recolección del medio de cultivo o la eclosión asistida interfieren en los datos obtenidos al analizar el ADN en los medios de cultivos. Para ello, utilizaron 61 embriones de los cuales, 41 embriones se cultivaron hasta día 5, momento en el que se recogió el medio y se les hizo PGT-A al embrión completo. Por otro lado, de los 20 restantes, a 10 se les realizó eclosión asistida en día 3 y se recogió muestra de medio de cultivo después de realizar la eclosión asistida (AH) en día 3 y D5 y los otros 10 se cultivaron hasta día 5, se recogió muestra de medio de cultivo en D3 y D5 y posteriormente se les realizó la eclosión asistida. Posteriormente, a esos 20 embriones se les realizó PGT-A. Se comparó la precisión en la detección de aneuploidías con el uso del análisis del medio del cultivo en comparación con biopsias de TE y de embriones completos mediante la tecnología NGS. Comprobaron que en D3 la concentración de DNA en el medio de cultivo era mayor que en D5, sin embargo, la calidad del ADN era mayor en D5 versus D3, reflejando una mayor concordancia de ploidía en D5 (56,3% y 65% respectivamente). Esto sugiere que, en etapa de escisión, la expulsión de ADN es mayor, pero es mayoritariamente de células anormales. Sin embargo, conforme avanzan en su desarrollo, los embriones expulsan al medio ADN que sí reflejan la ploidía real del embrión. Por otro lado, obtuvieron tasas ligeramente superiores de cfDNA en los medios de cultivos recogidos antes de la realización del AH, sin embargo, los resultados no son significativos debido al pequeño tamaño de la muestra (6).

Una vez descrita la presencia de cfDNA en los medios de cultivos, el grupo de investigación de Vera-Rodríguez y Rubio en 2018 realizaron un estudio para determinar el origen del ADN libre en los medios de cultivos de embriones. Este estudio combina análisis cromosómico de ADN de los medios de cultivo, secuenciación de SNP para identificar la contaminación y análisis mediante FISH, de blastocisto completo, para determinar mosaicismo. El estudio incluía embriones humanos fertilizados mediante ICSI, con AH en día 3 y en día 5 se les realizó biopsia de trofoectodermo para análisis de DGP-A y posteriormente se recogió el medio usado. Se utilizaron 141 muestras de medios

de cultivo de los cuales 28 gotas eran de grupo control, medios sin contacto con embriones, que dividieron en dos grupos: secuenciación de ADN no amplificado (53 muestras de medio usados y 17 medios de muestra control) y secuenciación de ADN amplificado (60 muestras de medio gastado y 11 muestras de medio control) (19).

Analizaron las muestras de los dos grupos para determinar la cantidad de ADN en los medios de cultivo y observaron que la cantidad de ADN era mayor en los medios que habían estado en contacto con embriones que los medios que no habían estado en contacto (6,7pg frente a 1,4pg). Por otro lado, analizaron si dependiendo del grado de aneuploidía o el sexo de los embriones las cantidades de ADN variaban y no encontraron diferencias significativas. (Figura 6)

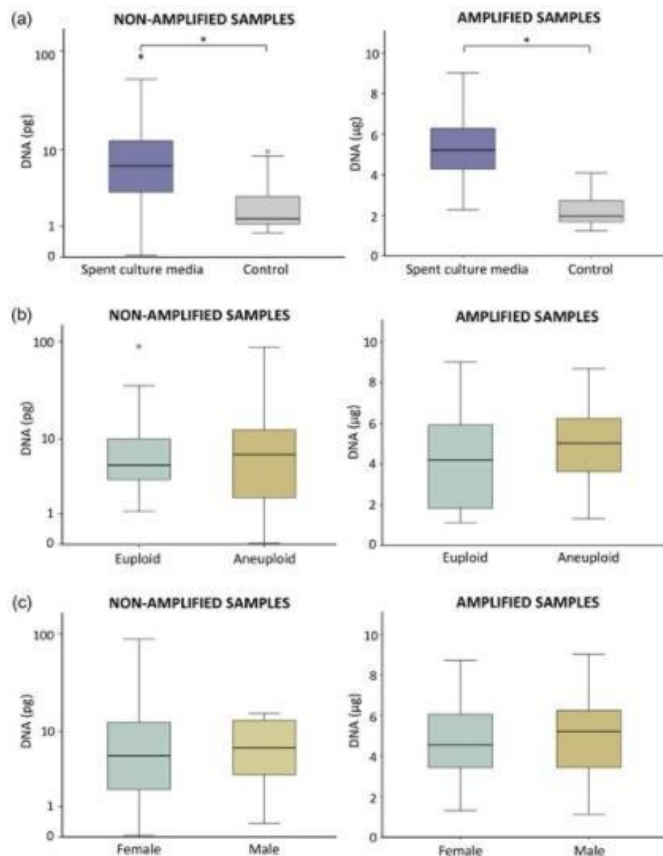


Figura 6. Diagrama de cajas para la cuantificación de ADN. (19)

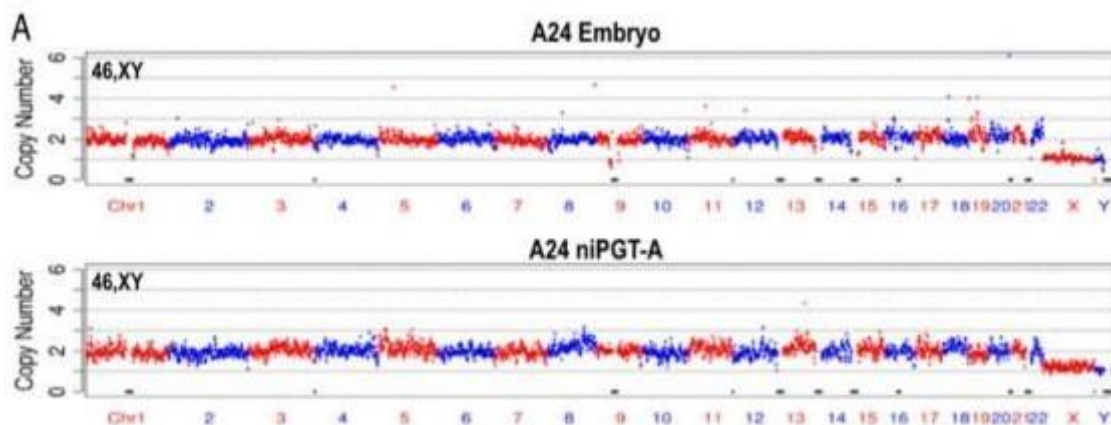
Para analizar la concordancia de ADN de los medios de cultivos usados y del ADN de biopsia de trofoectodermo se utilizaron muestras de 56 embriones sometidos a PGT-A y se recolectaron sus medios usados. Los resultados mostraron un 30,4% de embriones concordantes (ambas muestras aneuploides), un 60,8% de embriones con presencia de contaminación materna o externa y un 5,8% de muestras no informativas. Debido al alto porcentaje de muestras con presencia de contaminación se realizó secuenciación por SNP

(solo de autosomas) para determinar el origen del DN libre. Para ello, se analizó ADN del trofoectodermo, del líquido folicular y del medio gastado. Los resultados obtenidos al comparar el ADN embrionario frente al materno fueron superiores al 80% en la mayoría

de las muestras. Por otro lado, los resultados de ADN embrionario en el medio fueron muy variantes, ya que se encontraron resultados desde el 0% al 100% siendo la media de un 8%, lo que podría indicar que el ADN embrionario no está representado de manera uniforme en el medio de cultivo.

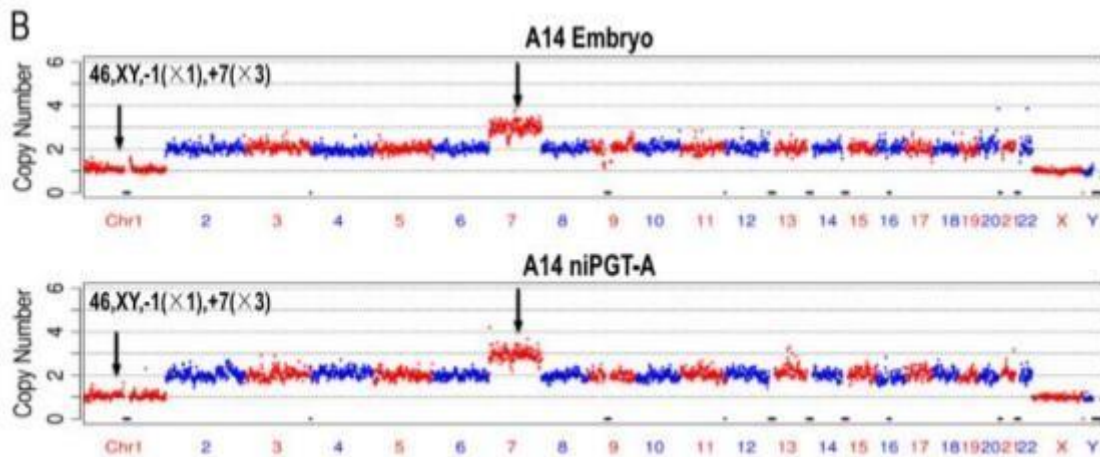
El mosaicismo embrionario también tiene un gran impacto al comparar el ADN de las muestras de BT y de los medios de cultivo. Para su estudio volvieron a analizar 12 embriones aneuploides completos que previamente se analizaron mediante FISH, 11 de ellos mostraron un patrón de mosaicismo tanto en BT como para el cfADN y de los 24 cromosomas analizados el 75% concordaban con el análisis de BT y de cfADN. Además, como estos embriones también se incluyeron en el análisis de SNP se estudió si había algún patrón que correlacionara la cantidad de ADN embrionario en el medio con el resultado del FISH. Obteniéndose que, hay mayor porcentaje de ADN embrionario en el medio, cuanto mayor sea la concordancia entre los medios de cultivos y el diagnóstico del trofoectodermo.

Uno de los estudios que demostraron una gran fiabilidad del niDGP-A para el análisis de aneuploidías fue el realizado por el grupo de Huang y colaboradores en 2019. En él establecieron un umbral de mosaicismo. Utilizaron un total de 52 embriones desvitrificados que previamente habían sido sometidos a DGP-A y sus correspondientes 52 muestras de medio de cultivo, de los cuales sólo 48 muestras obtuvieron perfiles de número de copias interpretables (CN) (7). Los resultados demostraron que el niDGP-A es capaz de identificar tanto embriones euploides (Figura 7) como embriones aneuploides (Figura 8).



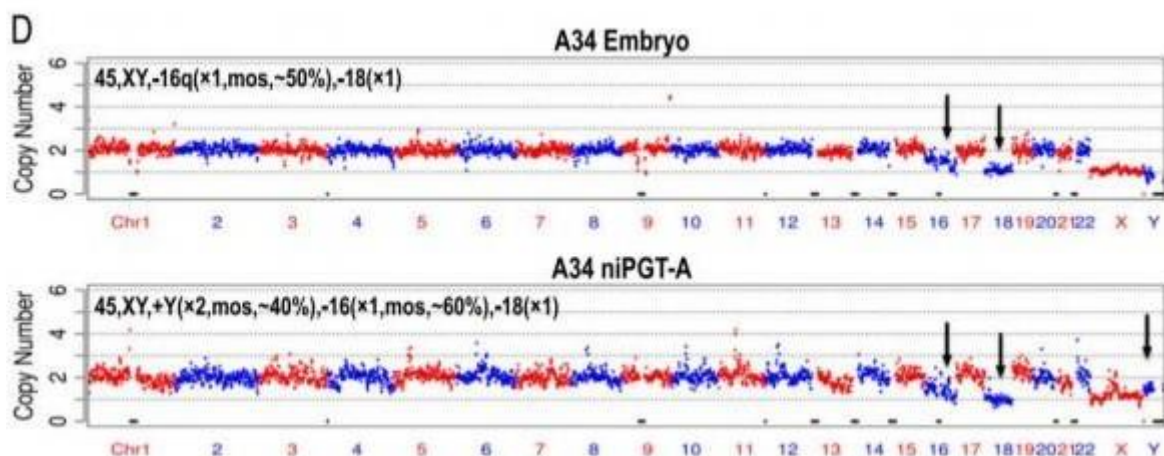
**Figura 7.** Perfiles embrión A24. Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A24, en el eje vertical observamos el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas

sexuales. El perfil de arriba es el usado como referencia (método invasivo) y el de abajo el obtenido tras el análisis del cfDNA del medio de cultivo (niPGT-A). En este caso ambos perfiles son euploides y varones (46, XY) (7).



**Figura 8.** Perfiles embrión A14. Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A14, en el eje vertical se ve el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas sexuales. En este caso, tanto en el perfil de arriba como en el niPGT-A podemos observar varias alteraciones numéricas. 46, XY, -1, +7. En el cromosoma 1 solo hay una copia por lo que sufre una monosomía del cromosoma 1. En el cromosoma 7 ocurre algo distinto, hay una copia de más, habiendo un total de 3 copias, este suceso se denomina trisomía del cromosoma 7 (7).

Por otro lado, otro de los grandes problemas cuando se analiza genéticamente un embrión es el mosaicismo. Los embriones mosaicos son aquellos que presentan células con diferentes CN para al menos un cromosoma. En la figura 9 se muestra el ejemplo de un embrión mosaico con un CN no completo para el cromosoma 16, tanto en el perfil obtenido por análisis de DGP como el obtenido por niDGP.

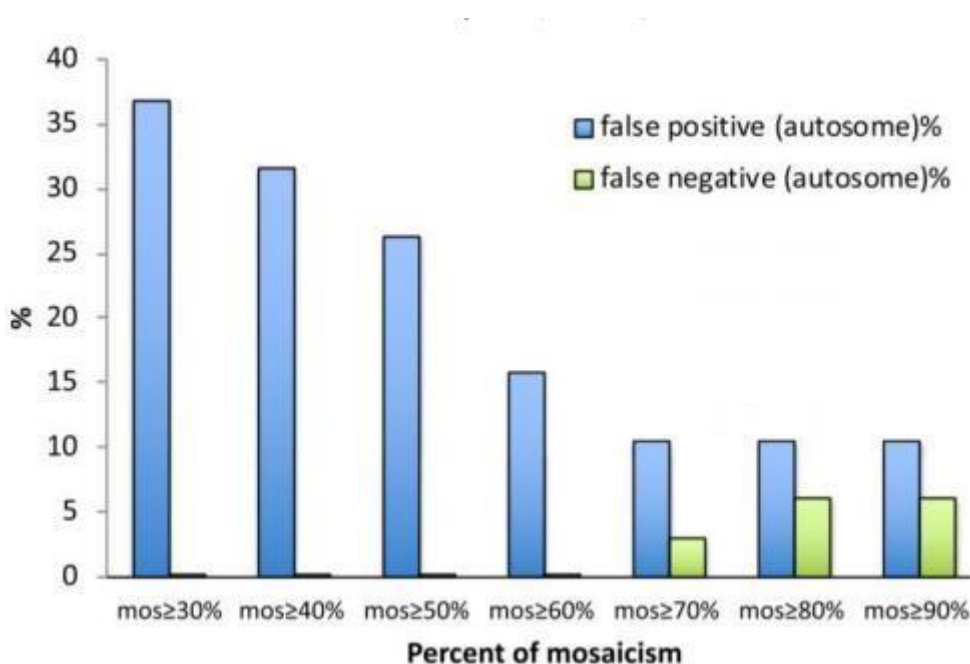


**Figura 9.** Se observan dos perfiles correspondientes al embrión A46, en el eje vertical observamos el número de copias (CN) y en el eje horizontal los 22 cromosomas autosómicos y los 2 cromosomas sexuales. En este caso representa un embrión mosaico, con diferentes poblaciones celulares. En el perfil superior, en el cromosoma 16 hay un CN no completo de 1.5 lo que significa que la mitad de las células son diploides y la otra mitad haploides (45, XY, -16q (50%)). Además, en el cromosoma 18 hay una monosomía. Por



otro lado, en el perfil inferior aparece un resultado similar detectando correctamente la monosomía del cromosoma 18, y con un mosaicismo de 1.4 lo que significa que el 40% es diploide y el 60% haploide (45, XY, -16(60%)). Sin embargo, en este perfil aparece un mosaicismo del cromosoma Y que no aparece en el de referencia (+Y (40%)) (7).

Debido al problema del mosaicismo establecieron un límite para poder identificar las aneuploidías pese al mosaicismo, fue lo que denominaron el umbral de mosaicismo (M). Este fue creado para minimizar los FP y los FN. Dependiendo del límite puesto, habrá más o menos FP y FN. En estudios anteriores Huang y colaboradores demostraron que estableciendo el límite en 30% no cabía la posibilidad de FN. Sin embargo, en este estudio demostraron que conforme aumentaba el porcentaje de limitación la posibilidad de darse un FP era menor. El punto en el cual la tasa de FP era mínima siendo la tasa de falsos positivos cero ocurría al poner el límite en un 60%, tal y como se refleja en la figura 10.



**Figura 10.** Representación de los distintos niveles de limitación establecidos para minimizar los diagnósticos erróneos. En la figura se observa una gráfica en la que el eje vertical representa el porcentaje de falsos positivos (azul) y falsos negativos (verde) para los distintos límites de porcentaje de mosaicismo. En el primer límite de 30% no hay falsos negativos pese a que el porcentaje de falsos positivos sea el más alto. La mejor opción es el límite de 60%, debido a que el porcentaje de falsos positivos es mínimo y el de falsos negativos sigue siendo 0 (7).

Utilizando el umbral “M” del 60% determinaron la ploidía en las muestras de medios de cultivos obteniéndose una concordancia del 93,8% al comparar los resultados del análisis de los medios con el análisis del embrión completo, la concordancia fue de un 82% al comparar los resultados obtenidos en el análisis de la BT y del embrión

completo. Estos resultados demuestran que el niDGP-A supera al DGP convencional con BT.

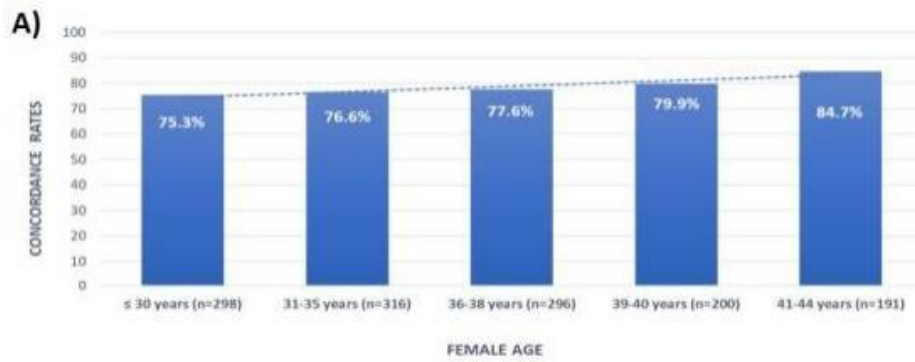
En 2019 el grupo de estudio de Rubio junto al grupo Rienzi continuaron sus estudios y se plantearon un cambio en las condiciones de cultivo para sortear los problemas de contaminación. Modificaron el protocolo de cultivo de embriones y análisis de NGS, tanto en la manipulación embrionaria como el momento ideal de recolección del medio. Además, observaron los resultados clínicos de embarazos donde tenían información tanto de biopsia de trofoectodermo como del análisis del ADN del medio de cultivo (11). En cuanto al cultivo embrionario, en D4 realizaron un cambio de medio y pasaron los embriones a gotas de cultivo de solo 10  $\mu$ l, cantidad menor a la usada en estudios anteriores. De esta forma, minimizan la cantidad de medio y disminuyen la cantidad de ADN degradado en el medio que podría interferir en los resultados. Hasta el momento de la biopsia no se realiza la eclosión asistida a los embriones, esta se realiza entre los días 5-7. Inmediatamente después de transferir los embriones a las placas de biopsia, recogen el medio de cultivo. Con este protocolo pretenden realizar un enfoque totalmente no invasivo. Un total de 115 embriones se utilizaron para este estudio, de los cuales se obtuvieron resultados informativos para BT y cfDNA de 108 muestras. Realizaron el protocolo estándar de NGS para el análisis de aneuploidías para las muestras BT, sin embargo, para las muestras de medios de cultivo los volúmenes fueron preamplificados y amplificados mediante ciclos térmicos expandidos para aumentar el rendimiento de ADN después de WGA (amplificación del genoma humano completo).

Obtuvieron resultados para la concordancia general de ploidía de un 78,7% siendo significativamente mayor en las muestras de D6/7 respecto a las muestras en D5, alcanzando valores del 63% en D5 y del 84% en D6/7, lo que aumenta la fiabilidad respecto a estudios anteriores. Los resultados de falsos positivos (BT euploide - cfDNA aneuploide) fueron mayores en D5 respecto a D6/7, de 29% y 8,6% respectivamente. El mayor porcentaje en D5 puede ser por el ADN degradado en el medio. Respecto a los falsos negativos (BT aneuploide y cfDNA euploide) no se obtuvieron diferencias significativas siendo del 3,7% para las muestras en D5 y del 2,5% en D6/7. La sensibilidad de este estudio, proporción de embriones aneuploides identificados correctamente al comparar la BT y el cfDNA, es de 94,5% y la especificidad, proporción

de embriones euploides identificados correctamente al comparar los resultados de la BT y del cfDNA, es de un 71,7%, alcanzando valores del 82,1% los D6/7. Estos resultados confirman que cuanto mayor sea el tiempo de cultivo en las condiciones específicas mayor será su especificidad.

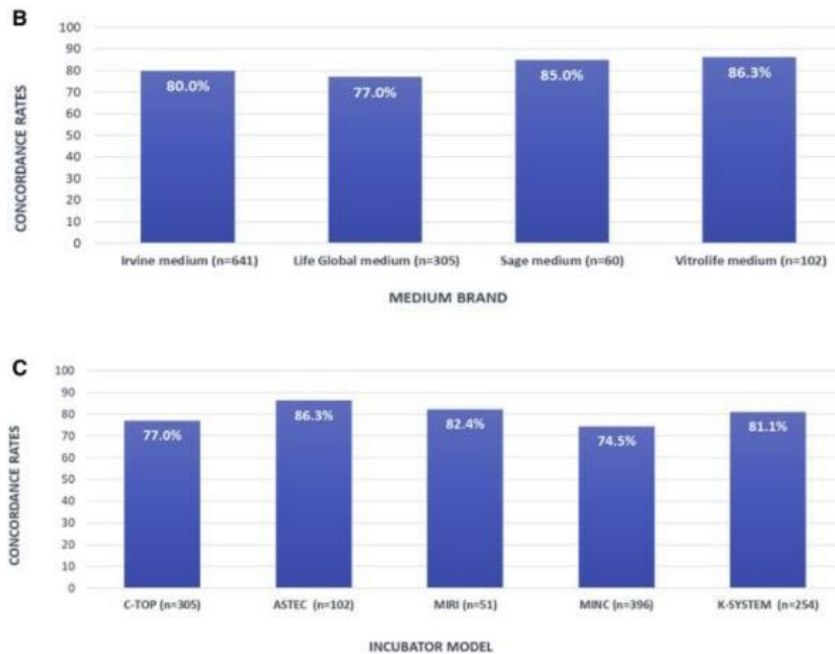
Con respecto a los resultados clínicos, se realizó un estudio doble ciego, las transferencias de embriones se realizaron en base a los resultados de las biopsias y fueron transferencias únicas. Se dividieron en dos grupos de estudios: en el primero tanto la BT como el análisis de los medios el resultado era normal, embriones euploides y se obtuvo una tasa de implantación del 52,9% y curiosamente no hubo ningún aborto clínico. En el segundo grupo los resultados de la BT eran normales, euploides, pero los resultados del análisis del cfDNA informaban de aneuploidía. En este grupo la tasa de implantación fue menor, de un 16,7% y si ocurrieron abortos clínicos. Estos datos son muy importantes ya que prueba la importancia del estudio genético de los medios de cultivos, podría usarse como prueba complementaria a la BT para la detección de aneuploidías, aunque el tamaño muestral es pequeño, por lo que los resultados no son estadísticamente significativos.

En 2020 el grupo de estudio de Rubio y colaboradores junto a 8 centros de reproducción asistida de alrededor del mundo realizaron un estudio multicéntrico para determinar la utilidad clínica del niDGP-A en el cual, evaluaron la concordancia y reproducibilidad. En total se evaluaron 1301 embriones de 371 pacientes y 467 ciclos de DGP-A, solo obtuvieron resultados informativos al comparar el cfDNA y la BT de 1108 muestras (12). Las condiciones del laboratorio y de cultivo fueron distintas para cada centro, aunque todos utilizaron el mismo protocolo específico de recolección de medio en D6/7 que se aplicó en el estudio anterior, en el cual no había previa manipulación del blastocisto ni biopsia. La tasa de concordancia de ploidía al comparar los resultados de BT y de cfDNA para las muestras informativas (866) fue de 78,2%, un poco menos a la obtenida en el estudio anterior, aunque los resultados entre centros fueron variables entre un 72,5% y 86,2%. Además, analizaron la tasa de concordancia según la edad materna y obteniéndose una línea de tendencia significativa conforme avanzaba la edad materna (Figura 7).



**Figura 11.** Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (Biopsia TE vs niPGT-A) en relación con la edad materna. (12)

Sin embargo, analizaron la concordancia respecto a la calidad embrionaria, el tipo de medio empleado y el tipo de incubador y no se observaron diferencias significativas. (Figura 8)



**Figura 8.** Representación sobre la tasa de concordancia entre ambos métodos (Biopsia TE vs niPGT-A) en relación con el medio de cultivo y el tipo de incubador usado. (12)

En cuanto a la sensibilidad global por centro osciló entre un 76,5% y un 91,3% y la especificidad entre un 64,7% y un 93,3%. Pero se observó, que el centro con mayor tasa de concordancia obtuvo resultados de sensibilidad y especificidad mayores, un 86,7% y 87,5% respectivamente, lo que podría indicar que si se cumplen los pasos para eliminar la contaminación se pueden lograr buenos resultados.

Por último, entre los blastocistos considerados como aneuploides por BT (81) realizaron un estudio comparativo en el que analizaron el ADN de los medios de cultivo frente a la BT y a la ICM. Obtuvieron resultados informativos de concordancia del 97,5% para las BT (79/81), 90,1% para las muestras de cfADN (73/81) y del 90,1% para las biopsias de MCI (73/81). En total, 64 muestras mostraron resultados informativos para los 3 tipos de muestras. Consideraron los resultados del ICM como el valor más predictivo de la información genética del embrión, se obtuvieron tasas de concordancia de ploidía para el cfDNA y para BT de 87,5% y 84,4% respectivamente. Obtuvieron resultados discordantes para 10 muestras, de las cuales 4 correspondían a un diagnóstico aneuploide en el análisis del cfDNA mientras que en la biopsia de MCI era euploide y 6 correspondían a un resultado del análisis del cfDNA euploide mientras que para la MCI fue aneuploide, esto puede deberse a la contaminación materna en el medio y al mosaicismo embrionario.

Estos resultados que reflejan altas tasas de concordancia multicéntricas evidencian que siguiendo un protocolo específico el análisis del cfDNA este podría usarse para el estudio de aneuploidías embrionarias.

	Manipulación previa	Tecnología	Tamaño muestral (n)	% Concordancias	Problemas
(Shamonki et al., 2016)	Sí	aCGH	57	3,5%	N pequeña y baja amplificación del genoma
(Xu et al., 2016)	Sí	NGS	42	85,7%	Contaminación del medio
(Feichtinger et al., 2017)	Sí	aCGH, MALBAC-NGS	22	27%	N pequeña y contaminación del medio
(Ho et al., 2018)	Sí	NGS	61	65%	N pequeña y contaminación de medios
(Rubio et al., 2018)	Sí	NGS, SNP, FISH	141	30,4%	N pequeña
(Rubio et al., 2019)	No	WGA, NGS	115	78,7%	Contaminación del medio
(Huang et al., 2019)	Sí	WGA, NGS	52	93,8%	N pequeña
(Rubio et al., 2020)	No	NGS	1301	78,2%	

## **5. DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos para la presencia de ADN embrionario (15) en el medio han hecho posible que diversos grupos de investigación hayan centrado sus investigaciones en demostrar que es posible el estudio del cfADN como alternativa al uso del DGP convencional.

Las investigaciones se han llevado a cabo, en su mayoría, comparando los resultados de las biopsias de trofoectodermo (BT) con los resultados obtenidos del análisis de los medios de cultivo (cfDNA), aunque cada grupo de investigación ha seguido un protocolo de cultivo y recolección de medios distinto. Se han obtenido datos de concordancia muy dispares, pero que han ido aumentando conforme se estandarizaban los protocolos de estudios. Las concordancias han ido desde un 3,5% (14), 85,7% (20), 72,2% (4), 65% (6), 30% (19), 93,8% (7), 84% (11), hasta un 78,2% (12).

Aunque las tasas de concordancia entre el grupo de Xu y colaboradores y del grupo de Rubio y colaboradores son similares, concretamente, este último estudio aborda un enfoque totalmente no invasivo ya que en el primero se realizan pasos previos de vitrificación y desvitrificación de embriones que podrían mejorar la salida de cfDNA. Sin embargo, este último deja intacto al embrión hasta el momento de la eclosión asistida previa al DGP.

Uno de los problemas a los que se han enfrentado en general casi todos los grupos de investigación, ha sido la baja concentración de ADN en el medio para su cuantificación y la contaminación en el medio. Por lo que fue muy importante conocer el momento adecuado de recolección del medio de cultivo. El grupo de Ho y colaboradores demostraron que a medida que los embriones avanzaban en su desarrollo las concentraciones de cfDNA eran mayores, encontrando concentraciones más altas a partir del día 3. Sin embargo, la contaminación en el medio era tan elevada que alteraban los resultados. Por ello el grupo de estudio de Rubio y colaboradores modificaron el protocolo de recolección y demostraron que cambiando a los embriones de gota de cultivo en día 4 eliminaban la contaminación materna y externa que interfiere en los resultados. Por otro lado, modificaron el método de análisis de los medios de cultivos. Hasta ahora,

la mayoría de los grupos de investigación usaban para el análisis genético del ADN las técnicas aCGH o NGS, sin embargo, en este estudio modificaron el protocolo del análisis de NGS para los medios de cultivo, todas las muestras de medios fueron preamplificadas y amplificadas por medio de ciclos térmicos extendidos para aumentar el rendimiento del ADN después del WGA y obtuvieron mejores resultados de amplificación del ADN. Además, pudieron comprobar que si dejaban los embriones en cultivo hasta el día 6 las concentraciones de cfDNA eran superiores que sí se recogía el medio en día 5.

Gracias a los avances y la mejora de los protocolos se han obtenido resultados con altas tasas de concordancia entre los análisis de cfDNA embrionario y las biopsias de trofoectodermo alcanzando valores del 78,2% (12), por otro lado, la falta de diferencias significativas entre los 8 centros que colaboraron en este estudio indica su reproducibilidad en diversas condiciones de laboratorio. Además, las altas tasas de concordancia del cfDNA con el TE y el ICM pueden sugerir que el cfDNA podría originarse en ambos compartimentos, lo que abre la puerta a conocer el origen del cfDNA embrionario que hoy día sigue sin conocerse con seguridad.

Estos avances han llevado a la creación de un test no invasivo de la mano del grupo Igenomix y el grupo de Rubio, denominado EMBRACE (Embryo Analysis of the Culture Environment). Este ofrece la posibilidad mediante un método no invasivo, analizando el medio de cultivo, ver qué embriones tienen más probabilidad de ser normales, es un método que prioriza la selección de embriones en base a la probabilidad de ser genéticamente normal, es decir hace un ranking de los embriones.

Entre sus ventajas encontramos que, si seleccionamos primero aquellos embriones con mayor probabilidad de ser normales, se necesitaran menos transferencias para conseguir un embarazo evolutivo y por tanto se reducen los riesgos de abortos. Además, reduce los costes de un ciclo al disminuir el número de transferencias embrionarias.

Para desarrollar este método se han tomado las biopsias de TE como punto de referencia, ya que es la técnica más establecida en la actualidad. Se han tomado tres puntos claves para la elaboración de este test. Primero, definir límites de ploidía, aquel punto donde la concordancia entre BT y el cfDNA es mayor para cada uno de los cromosomas. Segundo, establecer la tasa de euploidía por embrión en base a la tasa de

concordancia con el trofoectodermo. Tercero, establecer una prioridad embrionaria, aquellos embriones con una tasa elevada de euploidia tendrán prioridad a la hora de la transferencia.

## **6. CONCLUSIONES**

Los avances recientes en investigación han demostrado la viabilidad y fiabilidad del niDGP-A. Con la mejora de las técnicas de NGS se ha demostrado la presencia de ADN embrionario en el medio y que los resultados de su amplificación reflejan la dotación cromosómica representativa del embrión, obteniéndose altas tasas de concordancia entre el cfDNA, las biopsias de trofoectodermo y la MCI.

El ni-DGP podría presentar grandes ventajas, no como reemplazo de las técnicas actuales de DGP, sino como una técnica complementaria que permite un sistema de priorización de acuerdo al riesgo de aneuploidías embrionarias, lo que conlleva a un ahorro de tiempo y de costes en los ciclos. Pese a los buenos resultados obtenidos, es necesario realizar más estudios para comprobar si los resultados pueden mejorar y si el sistema de priorización puede ser una alternativa aceptable a corto plazo. Para ello el grupo de Igenomix está desarrollando un estudio prospectivo randomizado junto a 15 clínicas de reproducción repartidas por todos los continentes, en el cual comparan los resultados de pacientes que se han sometido a transferencia de acuerdo con la morfología embrionaria frente a pacientes que se han sometido a transferencia en base a los resultados obtenidos del análisis de los medios de cultivos.

Finalmente, todavía quedan muchas preguntas por responder, entre ellas, conocer el origen del cfDNA. Aunque se piensa que este puede provenir de los dos compartimentos del embrión, se necesitan más estudios que lo corroboren. Otras de las incógnitas que quedan por resolver es conocer por qué el embrión elimina ese ADN al medio.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Boer KA De, Ph D, Catt JW, Ph D, Jansen RPS, Leigh D, et al. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF.



2004;82(2): 295-298.

2. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology , euploidy and implantation : an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. 2014;29(6):1173–1181.

3. 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):453–473.

4. Feichtinger M, Vaccari E, Carli L, Wallner E, Mädler U, Figl K, et al. Non-invasive preimplantation genetic screening using array comparative genomic hybridization on spent culture media: a proof-of-concept pilot study. *Reprod Biomed Online*. 2017;34(6):583–589.

5. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2020;49(5):101723.

6. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, et al. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018;110(3):467-475.e2.

7. Huang L, Bogale B, Tang Y, Lu S, Xie XS, Racowsky C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophoctoderm biopsy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(28):14105–14112.

8. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. 2005;84(6): 1628-1636.

9. Monk M, Handyside A. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J Reprod Fertil*. 1988; 82: 365-368.

10. Palini S, Galluzzi L, Stefani S De, Bianchi M, Wells D, Magnani M, et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6): 603–610.

11. 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):510–519.
12. 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.
13. Scott R, Upham KM, Forman EJ, Zhao T. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100(3):624–630.
14. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent embryo culture media. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1312–1318.
15. Stigliani S, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2652–60.
16. Summers PM, Campbell JM, Miller MW. Normal in-vivo development of marmoset monkey embryos after trophoctoderm biopsy. 1988;3(3):389–393.
17. Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santalo J, Barri PN, Menezo Y. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote*. 1997; 5: 351-354.
18. Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. *Fertil Steril*. 2017;107(5):1107–1112.
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):745–756.

20. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(42):11907–11912.