



TEST GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL NO INVASIVO (niPGT)

Oleksandra Karahonych

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN
MEDICINA Y GENÉTICA REPRODUCTIVA
(2021-2022)**

Tutora: Marina Sánchez Soler



Dedicado a mi padre.

*Por ser la persona que me inspira cuando
pienso que he llegado al límite.*

LISTADO DE ABREVIATURAS

aCGH – array de hibridación genómica comparativa

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AH – Assisted hatching

CNV – Variación en el número de copias

D – Día

FISH - Hibridación fluorescente *in situ*

FIV – Fecundación in vitro

ICM – Masa celular interna

ICSI – Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

MALBAC - Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles

NiPGT – Test genético preimplantacional no invasivo

NGS – Secuenciación de próxima generación

PBS – Tampón fosfato salino

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa

PGT – Test genético preimplantacional (*Preimplantation genetic testing*)

PGT-A - Test genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A)

PGT-M – Test genético preimplantacional de enfermedades monogénicas

PGT-SR – Test genético preimplantacional de reordenamientos estructurales

qPCR – PCR cuantitativa en tiempo real

SNP – Polimorfismos de un solo nucleótido

TE – Trofoectodermo

WGA – Amplificación del genoma completo

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción.....	3
Objetivos.....	6
Metodología.....	7
Resultados.....	8
Discusión.....	16
Conclusión.....	21
Bibliografía	22

RESUMEN

Los inconvenientes de la biopsia de trofoectodermo han llevado a la búsqueda de un método no invasivo y que de acceso a una mayor parte de la población al PGT. Desde que en 2016 se amplificara con éxito el ADN presente en medio y se comprobara su concordancia con la biopsia de trofoectodermo se ha estudiado aplicar este método para identificar la ploidía del embrión. A lo largo de los años se ha dado respuesta a las principales cuestiones relacionadas con la liberación de ADN en el medio de cultivo como: ¿De qué depende la concentración de ADN? ¿Hay diferencias entre el ADN de medio de embriones euploides o aneuploides? ¿Representa el ADN del medio al embrión? Además, se han superado los principales obstáculos relacionados con la contaminación de origen materno gracias al desarrollo de NGS y se ha ido estandarización el protocolo de recolección del medio hasta que, en la actualidad no se observan, diferencias significativas en los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación.

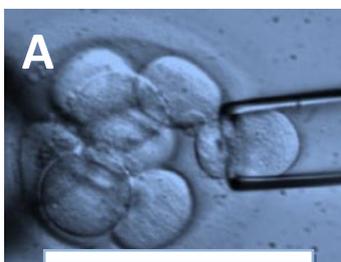
Las tasas de concordancia informadas con el embrión han convertido a niPGT en un enfoque no invasivo muy prometedor. Y aunque de momento no puede sustituir a la biopsia de trofoectodermo como prueba principal de PGT-A, PGT-SR y PGT-M se estudia su eficacia y posible utilidad. Además de poder usarse para las indicaciones clásicas de PGT o como un método de selección embrionaria adicional a la morfología, podría ser útil en la detección de aneuploidía en casos en los que PGT no está indicado para reducir el tiempo necesario de embarazo o para dar la oportunidad de transferencia en casos en los que no haya embriones euploides, debido a su capacidad para detectar mosaicismo. Dicho todo esto, la validación de este método podría significar un nuevo salto en el PGT como el que se experimentó al sustituir la biopsia de blastómera por la biopsia de trofoectodermo.

Palabras clave: test genético preimplantacional (PGT), PGT no invasivo (niPGT), ADN en medio de cultivo, ploidía embrionaria, selección embrionaria, mosaicismo

INTRODUCCIÓN

Los tests genéticos preimplantacionales (PGT, por sus siglas en inglés *Preimplantation genetic testing*) surgieron a principios de la década de los 90 para selección de sexo en embriones en etapa de división en portadores de trastornos recesivos ligados al cromosoma X mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). (1) (2) Años más tarde, gracias al desarrollo de las herramientas de amplificación y secuenciación se empezaron a identificar embriones con enfermedades monogénicas como fibrosis quística (2) (1) y enfermedad de Tay-Sachs. (3) Posteriormente, se demostró que en mujeres con edad materna avanzada las tasas de implantación eran más bajas y las de aborto espontáneo más altas y gracias al análisis citogenético vieron que la aneuploidía aumentaba con la edad materna, lo que se traducía en una disminución de la fertilidad. Entonces se recomendó el uso del test preimplantacional de aneuploidías (PGT-A) para pacientes de edad materna avanzada, pacientes con fallo de implantación, aborto de repetición y factor masculino grave. (1) (4)

En sus inicios FISH podía detectar anomalías de hasta 5 cromosomas (5) y posteriormente se fueron desarrollando sondas específicas para cada cromosoma. En las últimas décadas el desarrollo exponencial de la genética y las tecnologías de amplificación y secuenciación han llevado a grandes avances en el diagnóstico genético. Actualmente gracias a los avances en la secuenciación del genoma humano y de la bioinformática podemos analizar con fiabilidad la ganancia o pérdida de regiones cromosómicas. Hay varios métodos para la detección cromosómica actualmente en uso clínico: hibridación genómica comparativa (array-CGH), matrices de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), PCR cuantitativa multiplex y secuenciación de próxima generación (NGS). (6)



BIOPSIA EN DÍA 3



Actualmente, PGT se pueden emplear para analizar la aneuploidía de los embriones (PGT-A) y para seleccionar embriones no afectados de enfermedades monogénicas (PGT-M) o libres de reordenamientos estructurales cromosómicos (PGT-SR). (3) Inicialmente se evaluaba el contenido genético del embrión a partir de una biopsia en día 3 (D3) en la que se extraía una sola blastómera (Fig. 1A), pero los avances en las técnicas de cultivo, de biopsia y criopreservación han llevado al análisis en D5 o 6 donde se obtienen 5-10 células de trofoectodermo (TE) (Fig. 1B) (2) (1) y con las que se han logrado tasas de implantación significativamente más altas. (3) En la actualidad la mayoría de centros optan por realizar biopsia de TE en D5 o 6 porque tiene un menor efecto perjudicial sobre la viabilidad del embrión y al disponer de más células el diagnóstico genético es más confiable y con menores tasas de error si se compara con la biopsia en D3. (5) Los embriones se vitrifican y con los resultados se transfieren los euploides o libres de alteraciones genéticas para mejorar las tasas de éxito. Pero esta técnica requiere de personal entrenado, la compra y mantenimiento de equipo

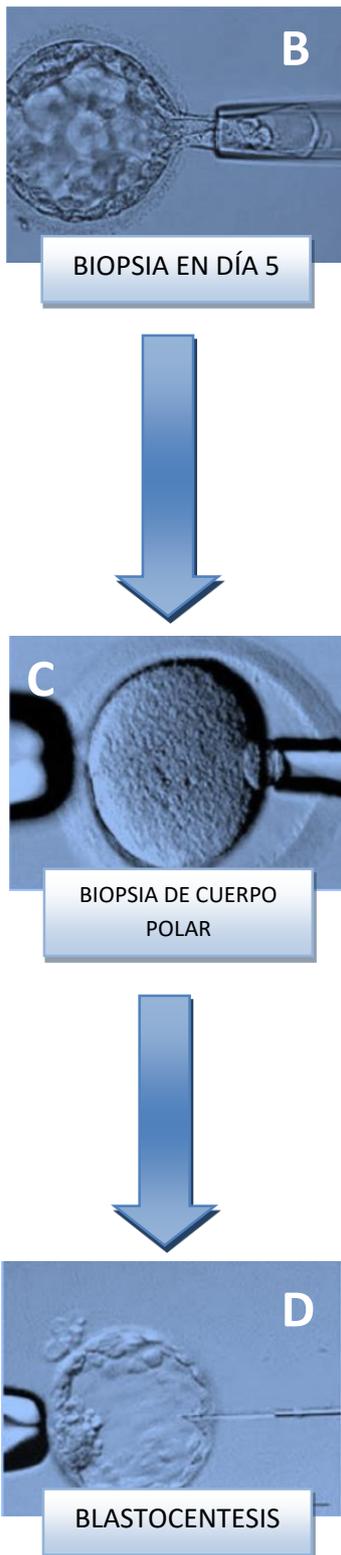


FIGURA 1. Fuentes de ADN usadas para PGT. (11)

especializado y es cara, lo que la hace inaccesible para algunas clínicas. Además, al tratarse de un método invasivo puede dañar al embrión provocando tasas de pérdida por biopsia de hasta el 30 % en algunos laboratorios. Estudios en animales han demostrado que la biopsia embrionaria puede afectar al desarrollo neural y suprarrenal, aunque no se ha evaluado su bioseguridad en humanos. (7) También se asocia a mayores riesgos de preeclampsia y a un efecto negativo sobre el potencial de implantación. (8) Si a esto le sumamos que es posible que el trofoectodermo no represente la constitución genética del embrión y que no es legal en algunos países, la búsqueda de una alternativa no invasiva se convierte en una buena opción. (9)

Un método menos invasivo se introdujo a finales de los 90 y consistía en la biopsia de cuerpo polar. (Fig 1C) Sin embargo, sólo da información del contenido cromosómico materno ya que son un producto de desecho de la meiosis materna. Por lo tanto sólo sirve para evaluar las alteraciones cromosómicas de origen materno. Los resultados obtenidos hasta el momento no muestran una mejora en la tasas de recién nacido vivo mediante esta técnica (5) (4), y además, se han informado mayores tasas de fragmentación embrionaria y detención del desarrollo tras esta biopsia. (10)

En 2013 se propuso el líquido de blastocele como una nueva fuente de material genético donde se encuentra en el 80% de la muestra. (11) Se estableció gracias a la cuantificación de 2 poblaciones de fragmentos de ADN mediante qPCR, una de 160 a 220 pares de bases que es similar al de ADN fetal presente en sangre materna, y otra de 300 a 400 pares de bases (12). Esta fuente contendría ADN tanto del trofoectodermo como de la masa celular interna, lo que la convirtió en un buen candidato para representar fielmente el genoma embrionario. (11) La blastocentesis se trata de una prueba mínimamente invasiva que consiste en la aspiración de fluido de la cavidad blastocélica mediante su microinyección (Fig. 1D) y hasta el momento se ha probado su utilidad para determinación del sexo y PGT-M. (13) Las tasas de amplificación obtenidas han variado entre el 34,7 y 87,5% (2) debido a que el ADN presente en blastocele se encuentra en una cantidad muy baja, está degradado y lo más probable es que proceda de fenómenos de necrosis. (10)

El hallazgo anterior impulsó el estudio del medio cultivo embrionario al establecer la hipótesis de que el ADN fetal empezaba a ser liberado al principio del desarrollo embrionario (14) y en 2016 consiguieron amplificar por primera vez ADN presente en medio de cultivo proponiendo

un método de PGT no invasivo (niPGT). (6) La presencia de ADN en los medios de cultivo es posible gracias a que la zona pelúcida es una membrana glicoproteica que tiene un alto grado de permeabilidad, incluso a moléculas grandes como ácidos nucleicos. (10) Existen tres posibles fuentes del ADN: células del cúmulo maternas, el trofoectodermo y la masa celular interna y se postula que su origen es apoptótico, exceptuando el materno, y aumenta exponencialmente conforme el embrión crece (15) con la función de comunicación celular. (14)

Se ha ido estableciendo un protocolo de recolección en los últimos años que se ha realizado después de una denudación estricta para eliminar todas las células de la granulosa posibles y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con el objetivo de reducir la posible contaminación materna y paterna, respectivamente. Después de la fertilización los embriones se cultivan y se hace un cambio de medio aproximadamente en D4 de desarrollo para eliminar los posibles restos de contaminación. Tras esto en D5/6, con pipeta de doble filtro estéril, se recogen entre 15-30 µl del medio en un tubo Eppendorf de 0.2 ml, libre de ARNasa y ADNasa y con 5 µl de tampón de lisis (PBS), y se almacena, generalmente, a -80°C hasta su análisis. Como control negativo se usa la misma cantidad de medio de cultivo pero sin que se utilizara para cultivo de embriones. Y el estándar de oro perfecto para la valoración de concordancias es el embrión completo, pero cuando no se tienen embriones donados para investigación sólo se compara con biopsia de TE en D5/6. Además, algunos grupos de investigación optan por la eclosión asistida o la blastocentesis antes de recoger el medio.

Los sistemas de secuenciación más utilizados para niPGT en este momento son el de SurePlex (Illumina) y MALBAC (Yikon Genomics) con los que se obtienen tasas de amplificación similares. (9) La cuantificación del ADN se realiza con Qubit HS dsDNA (Life technologies) y generación de librerías para la secuenciación con el kit de VeriSeq (Illumina) o NICS (Yikon Genomics) de NGS, respectivamente. Después, el ADN amplificado y secuenciado se procesa bioinformáticamente para analizar los resultados y aunque al principio se defendía hacer ICSI para evitar la contaminación con ADN paterno, esto ya no es problema gracias al NGS.

OBJETIVOS

- ✓ Comprender la importancia del desarrollo de tecnologías genómicas para el avance en niPGT.
- ✓ Explicar las mejoras en sus resultados y evaluarlos.
- ✓ Discutir su aplicación.
- ✓ Conocer las perspectivas futuras.

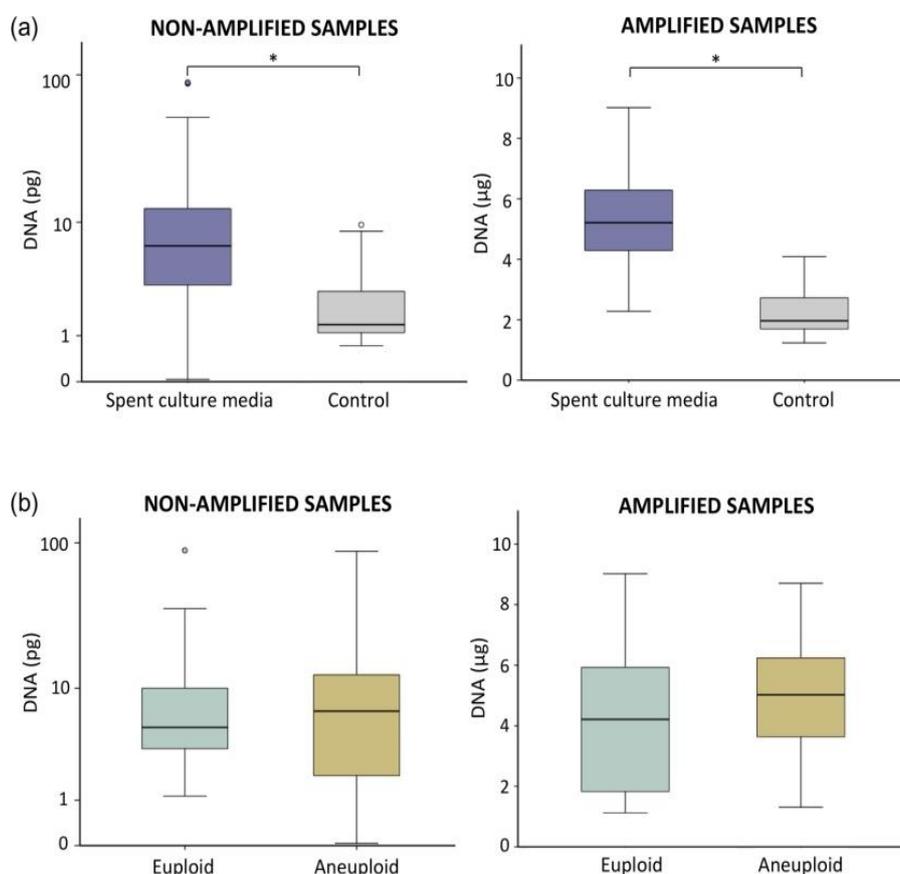
METODOLOGÍA

Para la recolección de datos utilicé la página web *Scopus* de la editorial Elsevier donde accedí a los artículos y complementariamente usé *PubMed* sobre todo por su utilidad para citar los artículos. Primero hice una búsqueda de *webinars* para una mejor comprensión del tema en conjunto y entonces realicé una primera búsqueda utilizando las palabras clave *niPGT*, *embryo culture medium*, *spent embryo culture media* y *cell-free DNA*, en un rango de 5 años y en inglés, y basé mi selección sobre todo en el número de veces que se habían referenciado los artículos y en el prestigio de la revista. Además, busqué individualmente las revistas más reconocidas de medicina y biología reproductiva en *ScienceDirect* y las revisé para asegurarme de que tenía todos los artículos publicados. Luego, tras leer todos los artículos y clasificarlos según su utilidad para los diferentes apartados del trabajo establecí los objetivos del trabajo y comencé a redactarlo.

RESULTADOS

El principal requisito que se debía cumplir para que funcionara este nuevo enfoque era que el ADN se pudiera aislar y amplificar. Cuando empezaron a probar este método tuvieron dificultades para amplificar una cantidad tan baja de ADN y los fallos en la amplificación eran más frecuentes, pero conforme se ha ido estandarizando su recolección y han ido evolucionando los métodos de amplificación las tasas de amplificación y concordancia han ido mejorando. En la actualidad, las tasas informativas rozan el 100 % y los resultados de cobertura nos sugieren que la pérdida o degradación de fragmentos de ADN en el medio de cultivo debe ocurrir aleatoriamente a lo largo del genoma y no afecta al patrón de número de copias en el embrión. (6)

La hipótesis de que el embrión libera ADN al medio se comprueba al cuantificar su presencia tanto antes como después de amplificarlo ya que se observan diferencias significativas entre el medio tras cultivo embrionario y el control negativo no expuesto a embrión (Fig. 2a). Se ha visto que la cantidad de ADN tampoco dependía de la ploidía del embrión ya que no se encuentran diferencias significativas en embriones previamente clasificados por biopsia de TE como euploides o aneuploides, (Fig. 2b) lo que permite abandonar la teoría de que la liberación de ADN al medio se debe a procesos de autocorrección. Además, no se observan diferencias significativas según el sexo del embrión (Fig. 2c) (15) aunque ciertos grupos sí informan que una suplementación con albúmina (5 mg/ml) se ha asociado a menores concentraciones de ADN en el medio. (19)



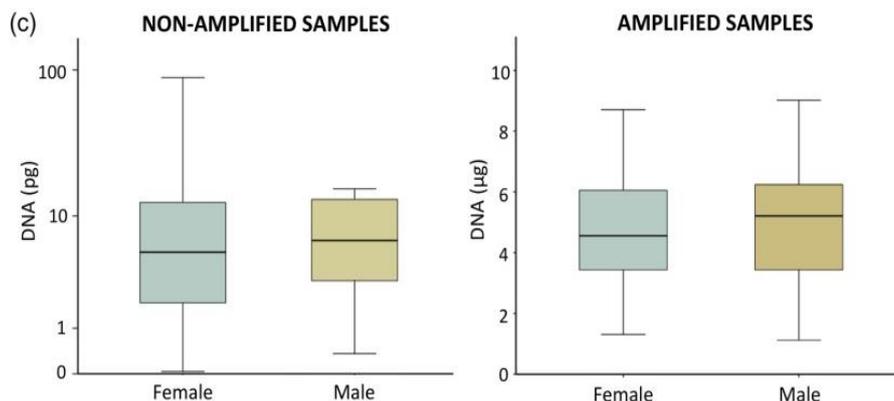


FIGURA 2. Cuantificación de ADN presente en medio de cultivo embrionario a) tras su uso para cultivo embrionario o no, b) según ploidía del embrión y c) según el sexo del embrión. (15)

En cuanto a la relación de los resultados obtenidos con el método de secuenciación elegido un estudio ha evaluado los dos kits de secuenciación comerciales más usados, SurePlex (Illumina) y NICS (Yikon Genomics), y se han obtenido tasas informativas y de concordancia similares, como podemos ver en la siguiente tabla de resultados (Fig 3). (9) Aunque se ha visto que como método de amplificación MALBAC (*Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles*) se ha asociado a mayor uniformidad y fidelidad de resultados ya que proporciona una mayor cobertura del genoma (>70 %) y tiene una tasa de alelos *drop up* muy baja, así como una ma-

	niPGTA-NICS (n=92)	niPGTA-Veriseq (n=92)
Informative rate (%)	92.4 (85/92)	92.4 (85/92)
Mosaicism rate (%)	30.4 (28/92)	28.3 (26/92)
PPV	79.6	75.5
NPV	67.7	66.7
Sensitivity	78.0	80.0
Specificity	69.7	60.6
Diagnostic concordance (%)	74.6 (62/83)	72.3 (60/83)

FIGURA 3. Comparación entre NICS (Yikon Genomics) y Veriseq (Illumina). (9)

yor profundidad de lectura (30x). (14) (6) MALBAC consiste en la amplificación del genoma completo (WGA) utilizando cebadores aleatorios para una etapa de preamplificación. Estos cebadores incluyen secuencias complementarias en los extremos 3' y 5' que permiten que los amplicones completos formen bucles y sólo se sigan amplificando los semiamplificones (los que todavía no han formado bucle). Después se realiza una amplificación exponencial de los amplicones resultantes de la etapa anterior con cebadores específicos (Fig. 4). (16)

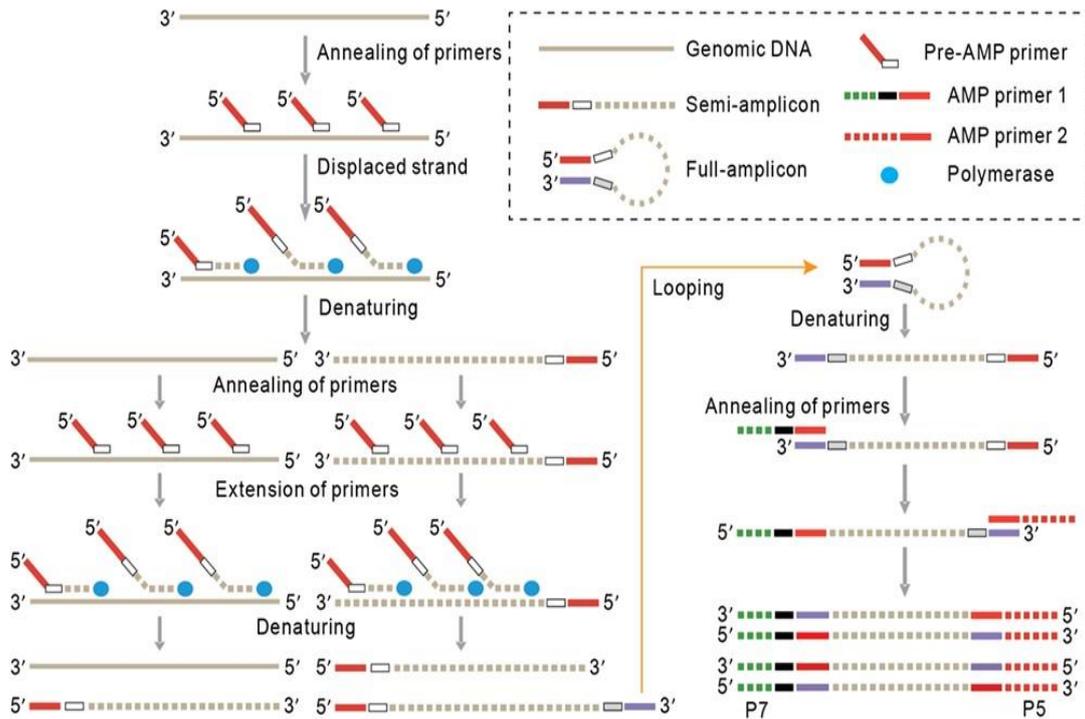


FIGURA 4. Etapa de preamplificación y amplificación lineal de MALBAC. (16)

Estudios recientes han evaluado las tasas de amplificación de niPGT-A mostrando más fallos de amplificación los embriones euploides en comparación con los aneuploides. También se obtienen más fallos al cambiar el medio en D4, una menor exposición al medio y biopsia en día 5 en lugar de en D6 (Fig. 5) (17) (18), todo esto asociado a un tiempo insuficiente para que el embrión libere ADN al medio. (17) Por el momento los mejores resultados se han obtenido utilizando un volumen menor de medio de cultivo, cambiándolo en día 4, recolectando el medio tras 48 horas de cultivo y, por tanto, realizando la biopsia en D6. (19)

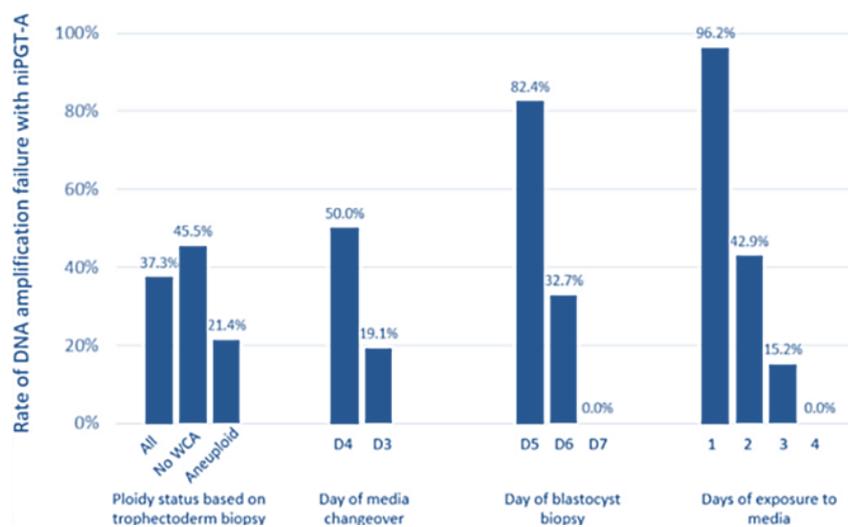


FIGURA 5. Tasas de fallo de amplificación con niPGT-A según el estado de ploidía embrionaria, día de cambio de medio, día de la biopsia del blastocisto y días de exposición al medio. (18)

También se ha evaluado la implicación del medio de cultivo embrionario y el tipo de incubador y no se han encontrado diferencias significativas en las tasas de concordancia (Fig. 6 B y C, respectivamente). Lo único que se puede decir en este apartado es que las placas con pocillos comunicados lógicamente se descartan, por lo que para poder utilizar incubadores como GERI se deberán desarrollar nuevas placas. Tampoco afecta a la precisión de los resultados la edad de la paciente (Fig. 6 A), el protocolo de estimulación ovárica, la calidad del embrión ni el grado de fragmentación. (19) (20)

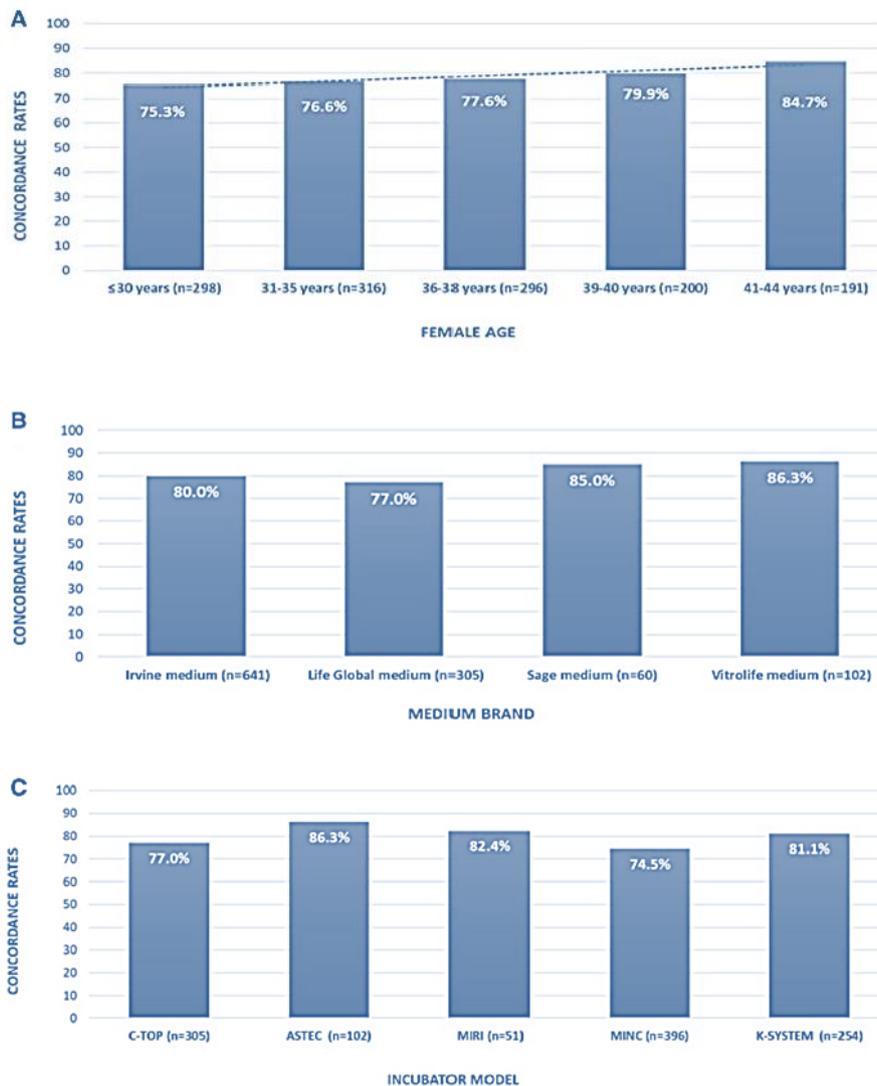
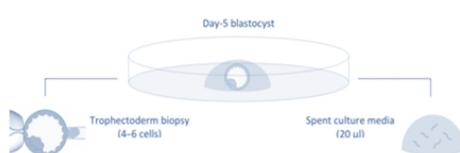


FIGURA 6. Tasas de concordancia entre niPGT y biopsias de TE según A) edad de la paciente, B) diferentes marcas de medios de cultivo y C) diferentes incubadores. No se encontraron diferencias significativas. (19)

Los estudios que argumentaron a favor de la blastocentesis para aumentar la cantidad de ADN analizable presentan las tasas de concordancia más bajas, lo que pone en duda a esta técnica para mejorar la predicción de la ploidía embrionaria. (14) También la eclosión asistida se ha usado con el objetivo de facilitar la liberación del ADN, sin embargo, no mejora las tasas de concordancia (Tabla 1 y 2) y es una práctica que se está abandonando. (20)

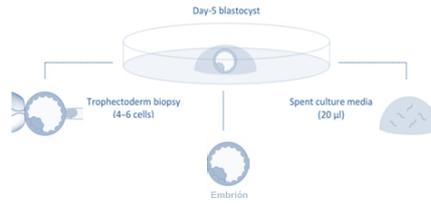
La recolección del medio al principio fue en D3 hasta que observaron diferencias significativas en la secuencia de lecturas de embriones euploides y aneuploides, lo que sugería que los embriones aneuploides tenían tasas más altas de degradación y secreción de ADN durante ese periodo dando lugar a un resultado erróneo mediante niPGT. (20) Después se observó que el contenido de ADN aumentaba a medida que el embrión se desarrollaba y con el objetivo de obtener mayores cantidades de ADN algunos grupos de investigación lo cuantificaron y observaron tasas de informatividad significativamente más bajas en D5 que en D6 (Tabla 1). (13) (21) (19) Finalmente un metaanálisis reciente en el que se observaron tasas de recién nacido vivo similares tras la transferencia de blastocistos euploides en D5 o D6 impulsó la recolección de medio en D6. (21) (19) Este paso ha sido determinante para mejorar las tasas de concordancia con trofoectodermo registrando valores de hasta el 89 % y disminuyendo las tasas de falso positivo hasta la mitad.



ESTUDIO	N	TASA INFORMATIVA (%)	CONCORDANCIA CON BIOPSIA TE (%)	FALSO POSITIVO (%)	FALSO NEGATIVO (%)	MANIPULACIÓN
Vera-Rodriguez, y otros, 2018 (15)	56	91,1	30,3	-	66,7 %	Recolección D5 tras AH D3
Ho, y otros, 2018 (20)	41	97,6	65	-	-	Recolección D5 con AH vs no AH D3
Huang, y otros, 2019 (22)	52	92,3	89,1	2,2	8,7	Recolección D5 tras AH D3
Yeung, y otros, 2019 (13)	168	D5: 55,6 D6: 84,6	D5: 76 D6: 71,2	D5: 12 D6: 13,6	D5: 12 D6: 15,2	Recolección D5 o D6 tras AH D3
Rubio, y otros, 2019 (19)	115	D5: 81,8 D6/7: 98,8	D5: 63 D6/7: 84	D5: 29,6 D6/7: 8,6	D5: 3,7 D6/7: 2,5	Recolección D5 vs D6/7
Lledo, y otros, 2021 (9)	92	92,4	74,6 o 72,3	-	-	Recolección D5/6 tras AH D3
Hanson, y otros, 2021 (18)	166	D5: 17,6 D6/7: 74,2	D5: 66,7 D6/7: 74,5	D5: 33,3 D6/7: 18,4	-	Recolección D5, 6 o 7

Tabla 1. Resultados actuales de concordancia entre niPGT y biopsia de TE.

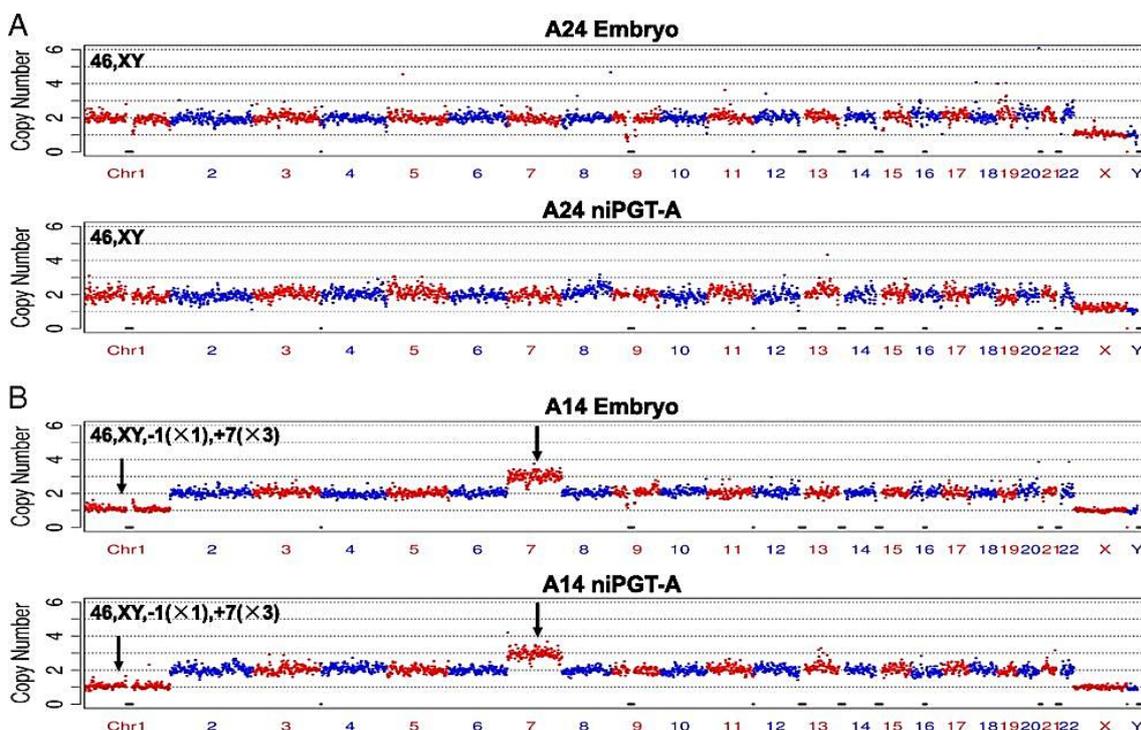
En los últimos años han utilizado el embrión como método de validación de PGT y las diferencias en las tasas de concordancia no han sido significativas al comparar ambos métodos. Además, se observan tasas de concordancia similares entre el ADN del medio y el embrión, así como del medio y biopsia de TE, lo que respaldaría que el ADN presente en medio se origina de ambas fuentes. Tampoco se han observado diferencias significativas al comparar la tasa de falsos negativos y falsos positivos (Tabla 2) y las diferencias entre grupos se asocian principalmente a la contaminación de origen materno y al mosaicismo embrionario, respectivamente. (22)



ESTUDIO	N	TASA INFORMATIVA (%)	CONCORDANCIA EMBRIÓN-niPGT (%)	CONCORDANCIA EMBRIÓN-TE(%)	FALSO POSITIVO (%)	FALSO NEGATIVO (%)	MANIPULACIÓN
Ho, y otros, 2018 (20)	41	97,6	D3: 50 vs 62,5 D5: 31,3 vs 58,8	85,7 vs 100	-	-	AH D3 vs no AH
Huang, y otros, 2019 (22)	52	92,3	93,8	82	NIPGT: 16	NIPGT: 11.8	AH D3
Rubio, y otros, 2019 (19)	81	90,1	84,4	87,5	NIPGT: 6,3 TE: 10,9	NIPGT: 9,4 TE: 10,6	No AH
Yin, y otros, 2021 (17)	75	78,67	89,9	94,67	-	NIPGT: 10,17 TE: 5,33	No AH
Chen, y otros, 2021 (8)	256	97,6	78,1	83,6	NIPGT: 27,8 TE: 25	NIPGT: 10 TE: 7,2	No AH

Tabla 2. Resultados actuales de concordancia con masa celular interna con niPGT y biopsia de TE.

A continuación podemos ver como niPGT es capaz de identificar la ploidía y el sexo del embrión con precisión cuando la contaminación materna es mínima y la amplificación es óptima. En la fig. 7A se muestra el perfil del número de variación de copias (CNVs) concordante entre el embrión completo euploide 46,XY y el medio de cultivo, la fig. 7B un perfil aneuploide concordante entre ambos, la fig. 7C un perfil ruidoso de niPGT para un embrión euploide, y en la fig. 7D un perfil de mosaicismo que aunque es discordante se acerca mucho al obtenido con el análisis del embrión completo. En este estudio los resultados ruidosos se asociaron a una cantidad insuficiente de ADN en el medio de cultivo y no a la contaminación ya que los perfiles para los cromosomas sexuales presentaban un coeficiente de variación (CV) de uno. (22)



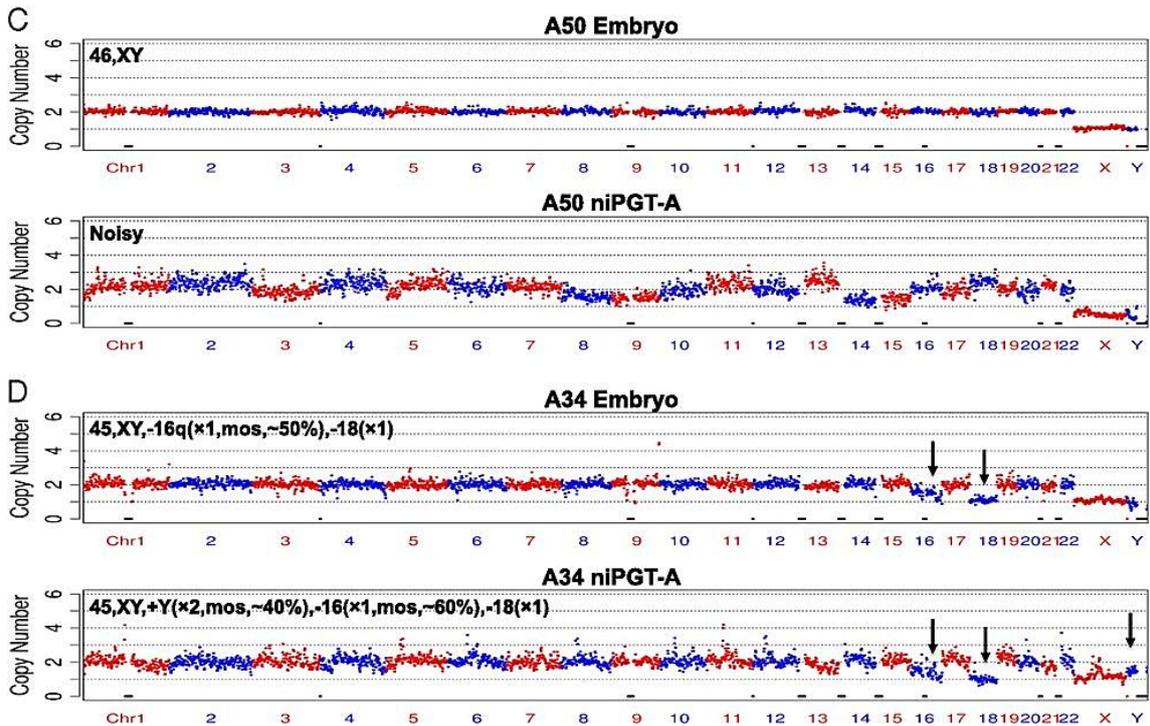


FIGURA 7. Perfiles cromosómicos obtenidos mediante niPGT: euploide (A), aneuploide (B), perfil ruidoso (C) y mosaico (D). (22)

Actualmente las sensibilidades ($[\text{verdaderos positivos}]/[\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}]$) y los valores predictivos negativos ($[\text{verdaderos negativos}]/[\text{verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}]$) tanto para niPGT-A como para biopsia de TE son del 100%. Pero en algunos casos se observa que las especificidad ($[\text{verdaderos negativos}]/[\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}]$) de niPGT-A es significativamente más alta que la obtenida con biopsia de TE (80 % vs. 50 %) y esto se debe principalmente a su mayor concordancia con embriones mosaico. Podemos observar que con niPGT la tasa de falsos negativos desaparece en mosaicos de hasta el 60 % y que los falsos positivos disminuyen conforme aumenta el porcentaje de mosaicismo (Fig. 8) (22) lo que se traduce en que es más preciso detectando mosaicismo.

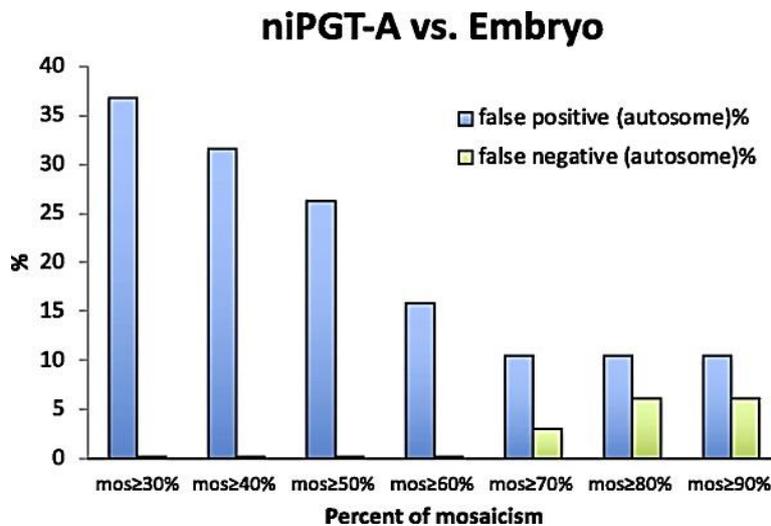


FIGURA 8. Tasas de falsos positivos y negativos según el nivel de mosaicismo obtenidas mediante niPGT. (22)

Recientemente se ha permitido el cultivo in vitro de embriones hasta el día 14 para investigación. Un primer estudio ha evaluado la genética del embrión tras el periodo de implantación y la ha comparado con los resultados obtenidos mediante niPGT y biopsia de TE para establecer qué prueba refleja mejor el estado cromosómico del embrión. No se han encontrado diferencias significativas en las tasas de concordancia, sin embargo, la tasa de concordancia para los autosomas entre la biopsia de TE y los embriones en cultivo extendido fue del 43,8 %, lo que es sorprendentemente bajo en comparación con los resultados obtenidos hasta el momento (Fig. 9A). También observaron que a medida que se desarrolla el embrión aumenta más la concordancia con niPGT en comparación con la biopsia de TE (Fig. 9B). Además, se obtiene una sensibilidad del 100 % para niPGT y una tasa de falsos negativos del 0 % lo que lo convertiría en un mejor candidato para descartar embriones aneuploides (Fig. 9C). (7)

A

	Autosomal chromosome concordance (%)	Sex chromosome concordance (%)
PGT-A vs. Outgrowth	7/16(43.8)	14/16(87.5)
niPGT-A vs. Outgrowth	9/16(56.3)	14/16(87.5)
PGT-A vs. niPGT-A	10/18(55.6)	17/18(94.4)
PGT-A vs. niPGT-A vs. Outgrowth	7/15(46.7)	13/15(86.7)

This table shows the autosomal concordance rate and the sex chromosome concordance rate.

B

	day 10 (%)	day 8 or 9 (%)
PGT-A vs. Outgrowth	5/9(55.6)	2/7(28.6)
niPGT-A vs. Outgrowth	7/10(70)	2/6(33.3)
PGT-A vs. niPGT-A	6/9(66.7)	4/9(44.4)
PGT-A vs. niPGT-A vs. Outgrowth	5/9(55.6)	2/6(33.3)

This table shows the autosomal concordance rate between 10-day-old and 8-day-old or 9-day-old embryos.

C

	PGT-A	niPGT-A
sensitivity	87.5%	100%
specificity	77.8%	87.5%
PPV	87.5%	88.9%
NPV	75%	100%
FPR	14.3%	12.5%
FNR	22.2%	0%

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; FPR: false-positive rate, FNR: false-negative rate
These calculations were done with respect to outgrowth chromosomes

FIGURA 9. Resultados del estudio con embriones en cultivo extendido. (7)

Por último, en cuanto a la tasa de embarazo, aborto espontáneo y tiempo hasta el embarazo todavía es pronto para sacar conclusiones pero hay grupos que ya han reportado nacimientos vivos sanos utilizando este método de selección. Sería necesario más tiempo y más estudios para ver su influencia en los resultados. Pero teniendo en cuenta que PGT beneficia principalmente a mujeres > 35 años, se espera un resultado similar.

DISCUSIÓN

Una prueba no invasiva eficiente podría dar una idea de la genética del embrión sin la necesidad de correr el riesgo de dañarlo y si se establece un protocolo sería más fácil de reproducir y menos costosa. La baja concentración de ADN y su degradación se ha ido superando a medida que han mejorado las tecnologías de amplificación y en los últimos años se han obtenido resultados de concordancia de hasta el 89,1 % con la biopsia de trofoectodermo y 93,8 % con el embrión. (9) Sin embargo, el uso de niPGT se ha probado en embriones previamente biopsiados, criopreservados y usando como controles positivos embriones donados para investigación que son mayoritariamente aneuploides. Todo esto ha podido tener un efecto negativo en los resultados. (18)

La contaminación del medio ha sido el principal obstáculo para la mayoría de estudios iniciales. Por ellos propusieron medidas que incluyen la eliminación escrupulosa de todas las células del cúmulo maternas, la aplicación de ICSI para eliminar la contaminación de origen paterno (14) (15) y la realización de un lavado adicional antes de hacer el cambio de medio. Pero se ha comprobado que el ADN presente en el medio de cultivo sólo representa una pequeña fracción (8 %) (15) mediante análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y hoy en día muestras con hasta un 86 % de ADN materno no tienen un patrón contaminado, por lo que mediante NGS el efecto de la contaminación es insignificante. (13) Hecho que respaldan los resultados de concordancia de casi el 100 % para los cromosomas sexuales, que es la manera más fácil de ver la contaminación materna.

Como ya sabemos, en la biopsia de TE sólo se analizan las células del trofoectodermo, que dan lugar a la placenta, por lo que los resultados pueden no ser representativos de la masa celular interna, que es la que originará al embrión, (Fig. 10) y se calcula que para una representación estadística correcta sería necesaria una biopsia de 27 células del trofoectodermo. La hipótesis de que el ADN presente en medios de cultivo es liberado tanto por células del trofoectodermo como por las de la masa celular interna, convierte a niPGT en un mejor candidato para representar con mayor precisión la dotación cromosómica del embrión.

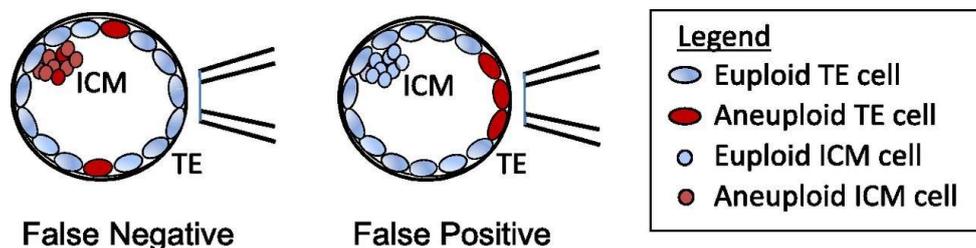


FIGURA 10. Representación gráfica de que la biopsia de TE puede no representar al embrión. (22)

En estudio realizado con embriones de ratón mosaico quimérico observaron que la apoptosis de células aneuploides de la masa celular interna fue 10 veces mayor que las células aneuploides del trofoectodermo, lo que respaldaría que niPGT sea capaz de representar mejor al embrión (25) . Además, como podemos ver en los siguientes ejemplos la biopsia de TE no es capaz de detectar ningún grado de mosaicismo, mientras que niPGT es capaz de detectar mosaicismo de $\geq 60\%$ (Fig. 11 A18, A30 y A44).

ID	niPGT-A	Embryo	TE-biopsy
A18	45,XY,-5(x1),+6(pter→q25.3,~161M,x3), +19(x3),+22(x3,mos,~60%)	47,XY,-5(x1,mos,~70%),+6(x3), +19(x3,mos,~50%),+22(x3,mos,~60%)	48,XY,-5(x1),+6(x3), +19(x3),+22(x3)
A19	46,XX,+11(x3),-16(x1)	47,XX,+11(x3),-16q(x1)	47,XX,+11(x3),-16(x1)
A20	45,XX,-2(x1)	45,XX,-2(x1)	45,XX,-2(x1)
A25	45,XX,-21(x1)	45,XX,-21(x1)	45,XX,-21(x1)
A26	45,XY,+19(x3,mos,~70%),-22(x1)	46,XY,+19(x3),-22(x1)	46,XY,+19(x3),-22(x1)
A27	47,XX,+16(x3)	48,XX,+16(x4)	48,XX,+16(x3)
A28	45,XX,-8(x1),+22(x3,mos,~70%)	45,XX,-8(x1)	46,XX,-8(x1),+22(x3)
A29	46,XX,-10(x1),+11(x3),-12(x1),+21(x3)	46,XX,-10(x1),+11(x3),-12(x1),+21(x3)	45,XX,-10(x1),+11(x3),-12(x1)
A30	47,XX,+4(x3),+8(x3,mos,~70%)	46,XX,+4(x3,mos,~70%),+8(x3,mos,~70%)	48,XX,+4(x3),+8(x3)
A32	46,XY,-22(x1,mos,~60%)	46,XY,+13(x3,mos,~30%),+17q(x3,mos, ~40%),-22(x1,mos,~60%)	45,XY,-22(x1)
A34	45,XY,-16(x1,mos,~60%),-18(x1)	45,XY,-16q(x1,mos,~50%),-18(x1)	45,XY,-18(x1)
A35	47,XX,+16(x3),-18(x1),+22(x3)	46,XX,+16(x3),-18(x1), +22(x3,mos,~60%)	47,XX,+16(x3) -18(x1),+22(x3)
A36	45,XY,-22(x1)	45,XY,-22(x1)	45,XY,-22(x1)
A37	47,XY,+21(x3)	47,XY,+21(x3)	47,XY,+21(x3)
A38	45,XX,-22(x1)	45,XX,-22(x1)	45,XX,-22(x1)
A41	46,XY,+3(x3,mos,~70%)	47,XY,+3(x3)	47,XY,+3(x3)
A44	46,XX,+19q(x3,mos,~70%)	46,XX,+19(x3,mos,~70%)	47,XX,+19(x3)

Figura 11. Comparación de perfiles cromosómicos entre niPGT, biopsia de TE y el embrión.

Recientemente la Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGDIS) se ha posicionado a favor de la transferencia de embriones mosaico de bajo nivel cuando no haya embriones euploides disponibles para la pareja dada la alta prevalencia del mosaicismo. La transferencia exitosa de blastocistos mosaico de bajo grado diagnosticados mediante niPGT podría dar a la parejas la posibilidad de transferencia aunque las tasas de implantación sean menores a las de embriones euploides. (26) Y después de lo argumentado anteriormente niPGT podría ser más indicado para detectar estos embriones.

Por otro lado, los estudios que correlacionan ambos métodos (biopsia de TE y niPGT) con el embrión no son suficientes Y podrían ayudar comprender mejor el desarrollo embrionario humano, sobre todo las investigaciones de cultivo in vitro más allá del D6. Y como su uso en clínica no se ha podido validar por el momento una aplicación temprana de la técnica como único método de selección podría tener consecuencias adversas. Por lo que, las investigaciones futuras deberían centrarse también en el mecanismo de liberación de ADN para demostrar que realmente puede representar la dotación cromosómica del embrión mejor que la biopsia de TE.

Finalmente, tras todo lo expuesto anteriormente vamos a discutir las posibles utilidades para niPGT. Aunque en la mayoría no se ha podido probar su utilidad se espera tener datos en el futuro.

➤ EDAD MATERNA AVANZADA.

Es bien conocido que la tasa de aneuploidía aumenta con la edad y con la disminución de la reserva ovárica, por lo que este grupo es el principal beneficiario de PGT-A. La selección de embriones euploides ha permitido reducir el tiempo para lograr embarazo al evitar la transferencia de embriones aneuploides con menores tasas de implantación o que pueden terminar en aborto espontáneo. También ha permitido reducir el número de embriones transferidos al elegir el embrión con mayor potencial de implantación, evitando así también gestaciones múltiples. (19)

(23) En la actualidad, las pruebas no invasivas se han convertido en candidatas para PGT-A gracias a sus prometedoras tasas de amplificación y tasas de concordancia crecientes.

➤ **ABORTO DE REPETICIÓN.**

Afecta a alrededor del 5 % de las parejas en la consulta (23) y consiste en la consecución de 2 o 3 abortos espontáneos antes de la semana 14 de gestación. (19) Las causas pueden ser genéticas, anatómicas, endocrinológicas o inmunológicas. El 50 % de casos se asocia con anomalías cromosómicas, principalmente con aneuploidía. Diversos estudios han informado mejoras significativas en las tasas de implantación y de recién nacido vivo tras PGT-A, por lo que se recomienda en este tipo de pacientes incluso cuando la causa es desconocida ya que también disminuye el número de ciclos necesarios para lograr el embarazo. (23) Sin embargo, aunque se ha probado en estas pacientes todavía no se ha estudiado la eficacia de niPGT-A en este grupo de pacientes en cuanto a si mejora o no las tasas de aborto.

➤ **FALLO DE IMPLANTACIÓN REPETIDO.**

Se define como 3 o más intentos de FIV fallidos tras la transferencia de embriones de alta calidad o después de la transferencia acumulada de > 10 embriones. (23) (19) Las causas son de origen materno o embrionario. Las anomalías cromosómicas en embriones pueden estar presentes tanto en embriones que han detenido su división como en embriones morfológicamente normales, por lo que la selección mediante PGT-A adquiere un papel importante aumentando la tasa de recién nacido vivo y reduciendo el número de transferencias necesarias para lograr el embarazo. (23) Todavía no hay estudios que evalúen niPGT en este tipo de pacientes, pero podría valorarse en un futuro.

➤ **INFERTILIDAD POR FACTOR MASCULINO.**

Las aneuploidías embrionarias también se asocian a anomalías cromosómicas en el espermatozoide. Se debe principalmente a un cariotipo anormal y deleciones en el cromosoma Y, aunque también se asocia a varicocele, quimioterapia, edad paterna avanzada y estilo de vida. (23) En pacientes oligozoospermicos se observa un aumento de las diploidías sexuales y de los cromosomas 18 y 21 especialmente en muestras con una concentración menor de 5 millones/ml, en teratozoospermicos aneuploidía del cromosoma 17 y en azoospermicos y portadores de microdeleciones en Y mayores tasas de diploidía y trisomía, principalmente para los cromosomas sexuales. (19) En definitiva, en estos casos se aprecia un aumento en la incidencia de embriones cromosómicamente aneuploides para los cromosomas sexuales por lo que se recomienda PGT-A siendo niPGT-A un posible candidato para ello.

➤ **EMBARAZO TRISÓMICO PREVIO.**

El riesgo relativo de un segundo embarazo con trisomía del cromosoma 13, 18, y 21 es mayor si han tenido un embarazo anterior con trisomía, sobre todo en mujeres menores de 35 años. El uso de PGT-A permite la selección de los embriones euploides para transferir a este grupo de pacientes (19) y un enfoque no invasivo podría ser viable para ello.

➤ **PACIENTES CON BUEN PRONÓSTICO Y TRANSFERENCIA DE EMBRIÓN ÚNICO.**

El principal objetivo de la selección de embriones y la transferencia de uno solo es aumentar las tasas de éxito de los tratamientos y evitar los embarazos múltiples con los inconvenientes que conllevan. Diferentes estudios han comparado la tasa de embarazos obtenidas al transferir un embrión seleccionado solo por criterios morfológicos o combinándolos con PGT-A en pacientes con un buen pronóstico (<35 años). Las revisiones sistemáticas han revelado mejores tasas de embarazo y menores tasas de aborto espontáneo al incluir PGT-A. Sin embargo, en otros estudios se han obtenido hallazgos contradictorios que podrían deberse a la diferencia en las técnicas de biopsia. (23) (19) Un enfoque no invasivo sería más fácil de estandarizar y aplicar en cualquier laboratorio contribuyendo a la mejora de los resultados.

➤ **OVOCITOS DONADOS.**

A pesar de que las donantes deban ser mujeres sanas, jóvenes y fértiles aún existe el riesgo de que den lugar a embriones aneuploides. Se han obtenido tasas de aneuploidía de origen materno de entre el 53,2 % y el 88,1 % en embriones obtenidos con óvulos de donantes, por lo que su selección mediante PGT-A podría aumentar la eficacia de los ciclos de ovodonación. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no apoyan su eficacia. (23) El análisis del medio de cultivo podría constituir un método para seleccionar embriones procedentes de ovodonación porque no supondría ningún riesgo para su viabilidad y el descarte de embriones aneuploides contribuiría en la mejora de la eficacia de los ciclos de ovodonación.

➤ **ENFERMEDADES MONOGÉNICAS.**

En parejas portadoras de trastornos de un solo gen (PGT-M). Hasta este momento niPGT-M sólo ha mostrado tasas de amplificación suficientes para α -talasemia (10) y β -talasemia. (27)

➤ **PAREJAS PORTADORAS DE TRANSLOCACIONES.**

También se realizan un test genético preimplantacional en el caso de portadores de translocaciones (PGT-SR). El método no invasivo ha sido capaz de detectar translocaciones desequilibradas en concordancia con la biopsia de TE y el análisis completo de embriones donados. (25) También se ha estudiado a portadores de translocaciones equilibradas y la elección del embrión mediante niPGT ha dado lugar a niños sanos. (6)

➤ **NÚMERO LIMITADO DE EMBRIONES.**

El mosaicismo se define como la presencia de diferentes líneas celulares en un mismo embrión y se relaciona con errores mitóticos tras la fertilización y antes de la duplicación del ADN, y raramente a partir de una no disyunción meiótica. El embrión puede tener una mezcla de líneas celulares aneuploides y euploides o de líneas aneuploides con diferentes anomalías cromosómicas (Fig. 12). Y estas aneuploidías pueden ser de ganancia o pérdida de un cromosoma, complejas o estructurales. (23) (24)

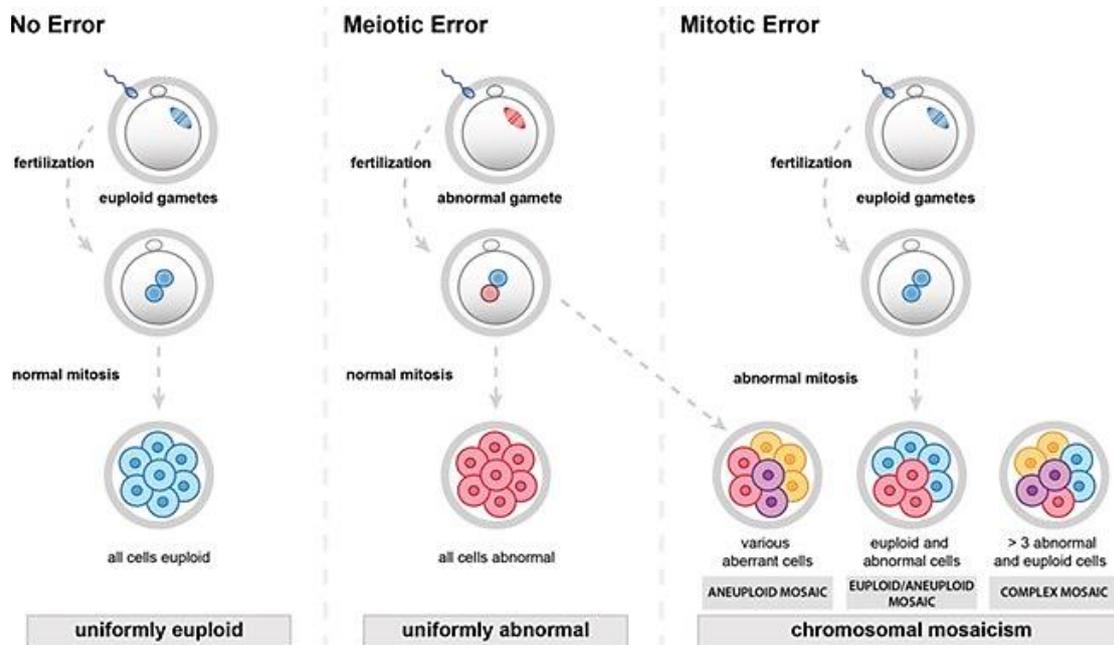


FIGURA 12. Clasificación de embriones según su status cromosómico. (24)

La tasa de mosaicismo disminuye con la edad, mujeres menores de 35 años presentan tasas del 26,6 % mientras que en mujeres mayores de 42 es del 10,5 %. La obtención de un blastocisto euploide se vuelve más difícil a medida que aumenta la edad por el aumento de las tasas de aneuploidía y por factores como la falta de desarrollo folicular, la recuperación fallida de ovocitos y a tasa más baja de formación de blastocistos. (23) En los casos de embriones en mosaico, el PGT-A basado en una sola muestra tomada del trofotodermo del embrión puede dar lugar un falso positivo ya que puede no reflejar el perfil genómico de la masa celular interna.

En tal caso, la mejora en la detección de mosaicismos podría aumentar las tasas de implantación en mujeres > 35 años ya que algunos de los embriones aneuploides descartados podrían tratarse de mosaicos que aunque presenten menor tasa de implantación que uno euploide podrían resultar en un recién nacido sano. Un estudio evaluó el mosaicismo en restos abortivos y en nacidos vivos obteniendo resultados positivos en el 32 % y el 16 % de los casos respectivamente. Así que aunque el mosaicismo se asocia a aborto espontáneo también puede llegar a individuo sano, hecho que respalda otro estudio en el que se transfirieron 18 embriones mosaicos porque no se disponía de euploides y se obtuvo una tasa de nacimiento vivo del 33 %. (24) Los estudios realizados hasta el momento convierten al niPGT en un mejor candidato para detectar el mosaicismo debido a la elevada tasa de falsos positivos y negativos asociadas a la biopsia de TE.

CONCLUSIÓN

NiPGT podría ofrecerse como un modelo de priorización que en combinación con la morfología podría seleccionar embriones para transferencia reduciendo la probabilidad de transferir embriones aneuploides así como el número de transferencias para lograr embarazo. Otro posible enfoque sería utilizarlo en combinación con la biopsia de TE para conseguir una detección más precisa de aneuploidías realizando un análisis en paralelo mediante *single-cell*. También podría permitir el análisis de embriones de mala calidad que a menudo se consideran inadecuados para la biopsia y se descartan (9) (12) o evitar la rebiopsia tras resultados inconcluyentes. Además, sería un método más económico, más fácil de automatizar tras su estandarización y validación y daría acceso a una población más amplia de pacientes y de laboratorios FIV.(21) Lo único que hay que tener en cuenta es que obligaría a una transferencia en diferido ya que, al igual que la biopsia de TE, se requieren unos 10 días para que el laboratorio de genética tenga los resultados.

Numerosos estudios han demostrado el potencial de niPGT y la alta confiabilidad en la detección y amplificación del ADN del medio paralela a los avances en genómica. Sin embargo, todavía se estudia la utilidad, seguridad y validez clínica de PGT. Por lo que es importante realizar un asesoramiento preciso a los pacientes informándoles sobre las ventajas y desventajas de esta técnica, y que entiendan su uso y su eficacia clínica. (25) (4) (5) Si se aplica niPGT debe quedar claro que no es un método de diagnóstico.

Las principales conclusiones que podemos sacar de este trabajo son:

- NiPGT elimina el riesgo de dañar al embrión.
- El ADN en medio de cultivo podría reflejar mejor la ploidía del embrión que la biopsia de TE.
- Podría ofrecer información complementaria de embriones a los que no se aplicaría PGT que junto a la morfología ayudaría a priorizar la selección.
- No se puede ofrecer por el momento como diagnóstico y se recomienda su validación complementaria con una prueba invasiva, es decir, de momento no puede sustituir a la biopsia de TE si hay indicación de PGT.
- El futuro de la técnica va de la mano de los avances en genómica.
- Conocer mejor la biología del embrión y su desarrollo podría ayudarnos a mejorar las técnicas de diagnóstico.

En conclusión, en los últimos años numerosos grupos de investigación han apostado por esta técnica y hasta hay artículos en los que se le atribuye el mérito de haber mejorado las tasas de implantación o de aborto espontáneo, sin embargo, el número de muestra estudiado es muy pequeño y eso puede dar lugar a un sesgo en los resultados. Los estudios hasta el momento han sido prospectivos pero van a ser necesarios estudios aleatorizados y de doble ciego para probar la eficacia de niPGT en la población general y que se le pueda dar un uso clínico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maxwell SM, Grifo JA. Should every embryo undergo preimplantation genetic testing for aneuploidy? A review of the modern approach to in vitro fertilization. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 2018; p. 53, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.07.005>.
2. Rogers A, Menezes M, Kane SC. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Conditions: Is Cell-Free DNA Testing the Next Step? *Mol Diagn Ther*. 2021; p. 25, 683–690. <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00556-0>.
3. Takeuchi K. Pre-implantation genetic testing: Past, present, future. *Reproductive Medicine and Biology*. 2020; p. 20(4). 20. 10. <https://doi.org/1002/rmb2.12352>.
4. Cornelise S, Zagers M, Kostova E, Fleischer K, van Wely M, Mastenbroek S. Preimplantation genetic testing for aneuploidies (abnormal number of chromosomes) in in vitro fertilisation. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2020; p. 9(9), CD005291. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005291.pub3>.
5. Sciorio R, Tramontano L, Catt J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2020; p. 36(1), 6–11. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1641194>.
6. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; p. 113(42), 11907–11912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613294113>.
7. Shitara A, Takahashi K, Goto M, Takahashi H, Onodera Y, Makino K, et al. Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophectoderm biopsy. *PLoS one*. 2021; p. 16(2), e0246438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246438>.
8. Chen L, Sun Q, Xu J, Fu H, Liu Y, Yao Y, et al. A Non-invasive Chromosome Screening Strategy for Prioritizing in vitro Fertilization Embryos for Implantation. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021; p. 9, 708322. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.708322>.
9. Lledo B, Morales R, Ortiz JA, Rodriguez-Arnedo A, Ten J, Castillo JC, et al. Consistent results of non-invasive PGT-A of human embryos using two different techniques for chromosomal analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2021; p. 42(3), 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.10.021>.

10. Leaver M, Wells D. Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics? *Human reproduction update*. 2020; p. 26(1), 16–42. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz033>.
11. Sciorio R, Dattilo M. PGT-A preimplantation genetic testing for aneuploidies and embryo selection in routine ART cycles: Time to step back? *Clinical genetics*. 2020; p. 98(2), 107–115. <https://doi.org/10.1111/cge.13732>.
12. Rubio C,RC,BDH,SRT,J&SC. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent culture medium as a substitute for trophoctoderm biopsy. *Fertility and sterility*. 2021; 115(4), 841–849. (<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.02.045>).
13. Yeung Q, Zhang YX, Chung J, Lui WT, Kwok Y, Gui B, et al. A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (NiPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019; p. 36(8), 1609–1621. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01517-7>.
14. Farra C, Choucair F, Awwad J. Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2018; p. 33(12), 2162–2167. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey314>.
15. 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. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2018; p. 33(4), 745–756. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey028>.
16. Jiao J, Shi B, Sagnelli M, Yang D, Yao Y, Li W, et al. Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2019; 34(7): p. 1369–1379.
17. Yin B, Zhang H, Xie J, Wei Y, Zhang C, Meng L. Validation of preimplantation genetic tests for aneuploidy (PGT-A) with DNA from spent culture media (SCM): concordance assessment and implication. *Reproductive biology and endocrinology (RB&E)*. 2021; p. 19(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00714-3>.
18. Hanson BM, Tao X, Hong KH, Comito CE, Pangasnan R, Seli E, et al. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy exhibits high rates of deoxyribonucleic acid amplification failure and poor correlation with results obtained using trophoctoderm biopsy. *Fertility and sterility*. 2021; p. 115(6), 1461–1470. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.01.028>.
19. Rubio C, Rodrigo L, Garcia-Pascual C, Peinado V, Campos-Galindo I, Garcia-Herrero S, et al. Clinical application of embryo aneuploidy testing by next-generation sequencing. *Biology of reproduction*. 2019; p. 101(6), 1083–1090. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz019>.

20. 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. *ertility and sterility*. 2018; p. 110(3), 467–475.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.036>.
21. Franco JG, Dieamant F, Oliveira J. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (niPGT-A) and the principle of primum non nocere. *JBRA assisted reproduction*. 2020; p. 24(4), 391–393. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200075>.
22. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019; p. 116(28), 14105–14112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907472116>.
23. Greco E, Litwicka K, Minasi M, Cursio E, Greco P, Barillari P. Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *Int J Mol Sci*. 2020; p. 21(12): 4381.doi: 10.3390/ijms21124381.
24. Popovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma. *Human reproduction update*. 2020; p. 26(3), 313–334. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz050>.
25. Kuznyetsov V, Madjunkova S, Abramov R, Antes R, Ibarrientos Z, Motamedi G, et al. Minimally Invasive Cell-Free Human Embryo Aneuploidy Testing (miPGT-A) Utilizing Combined Spent Embryo Culture Medium and Blastocoel Fluid -Towards Development of a Clinical Assay. *Scientific reports*. 2020; p. 10(1), 7244. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64335-3>.
26. Li X, Hao Y, Chen D, Ji D, Zhu W, Zhu X, et al. Non-invasive preimplantation genetic testing for putative mosaic blastocysts: a pilot study. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2021; p. 36(7), 2020–2034. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab080>.
27. Ou Z, Deng Y, Liang Y, Chen Z, Sun L. Improved Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Beta-Thalassemia Using Spent Embryo Culture Medium Containing Blastocoelic Fluid. *Frontiers in endocrinology*. 2022; p. 12, 793821. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.793821>.
28. Popovic M,DL,BA,MB,&HB. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma.. *Human reproduction update*. 2020; p. 26(3), 313–334. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz050>.
29. Li J, Liu Y, Qian Y, Zhang D. Noninvasive preimplantation genetic testing in assisted reproductive technology: current state and future perspectives. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2020; p. 47(12), 723–726. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.11.007>.

30. Gombos K, Gálik B, Kalács K, Gödöny K, Várnagy Á, Alpár D, et al. NGS-Based Application for Routine Non-Invasive Pre-Implantation Genetic Assessment in IVF. *International journal of molecular sciences*. 2021; p. 22(5), 2443. <https://doi.org/10.3390/ijms22052443>.
31. Ben-Nagi J, Odia R, Gonzalez XV, Heath C, Babariya D, SenGupta S, et al. The First ongoing Pregnancy Following Comprehensive Aneuploidy Assessment Using a Combined Blastocentesis, Cell Free DNA and Trophectoderm Biopsy Strategy. *Journal of reproduction & infertility*. 2019; p. 20(1), 57–62.
32. Volozonoka L, Miskova A, Gailite L. Whole Genome Amplification in Preimplantation Genetic Testing in the Era of Massively Parallel Sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; p. 23(9), 4819; <https://doi.org/10.3390/ijms23094819>.
33. Blanshard RC, Chen C, Xie XS, Hoffmann ER. Single cell genomics to study DNA and chromosome changes in human gametes and embryos. *Methods in cell biology*. 2018; p. 144, 441–457. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.03.037>.
34. 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. *Fertility and sterility*. 2016; p. 106(6), 1312–1318. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1112>.
35. Kuznyetsov V, Madjunjova S, Antes S, Abramov R, Motamedi G, Ibarrientos Z, et al. Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. *PloS one*. 2018; p. 13(5), e0197262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197262>.
36. Chen J, Jia L, Li T, Guo Y, He S, Zhang Z, et al. Diagnostic efficiency of blastocyst culture medium in noninvasive preimplantation genetic testing. *F&S reports*. 2020; p. 2(1), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2020.09.004>.
37. 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 trophectoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2020; p. 223(5), 751.e1–751.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.04.035>.