

PGT no invasivo para aneuploidías (niPGT-a): reporte del primer niño nacido en Argentina

Noninvasive PGT for aneuploidies (niPGT-a): report of the first child born in Argentina

A. Gustavo Martínez^{1,2}, Diego Gnocchi¹, Jeremías Zubrzycki³, Estefanía Martínez¹, Antonio Cattaneo¹, Juan Manuel Berros^{3,4}, Marcela Irigoyen¹, Gabriel Ércoli³, Lautaro Tessari¹, Hernán Dopazo^{3,5}

1 Medicina Reproductiva Fertilis - San Isidro, Buenos Aires, Argentina. 2 Universidad de Belgrano - Buenos Aires, Argentina. 3 Biocódices S.A. - Buenos Aires, Argentina. 4 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. 5 Laboratorio de Genómica Evolutiva y Poblacional. Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEB-CONICET), Departamento de Ecología Genética y Evolución, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

El Diagnóstico Genético Preimplantacional No Invasivo para Aneuploidias (niPGT-a) utiliza el ADN libre de células presente en el medio de cultivo del blastocisto para la caracterización cromosómica del embrión. El resultado del niPGT-a podría representar el contenido genómico tanto de las células de la masa celular interna como del trofoblasto, sin la necesidad de realizar una biopsia embrionaria.

El objetivo del presente reporte es describir el procedimiento con el que se logró el primer nacimiento en Argentina de un niño cuyo embrión fue caracterizado mediante esta técnica.

Palabras clave: Test genético preimplantatorio para aneuploidías, PGT-a, no-invasivo, niPGT-a.

ABSTRACT

Noninvasive Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidies (niPGT-a) uses the cell-free DNA present in the blastocyst culture medium for chromosomal characterization of the embryo. The result of niPGT-a could represent the genomic content of both internal cell mass and trophoblast cells, without the need for an embryonic biopsy.

The objective of this report is to describe the procedure with which the first birth in Argentina of a child whose embryo was characterized by this technique was achieved.

Keywords: Preimplantation genetic test for aneuploidies, PGT-a, non-invasive, niPGT-a.

INTRODUCCIÓN

Más de una década después de utilizar la evaluación genética preimplantacional para aneuploidías (PGT-a) en los programas de medicina reproductiva, quedan aún muchas dudas sobre los riesgos del procedimiento invasivo de biopsia de los embriones y la interpretación de los mosaicismos genéticos⁽¹⁻⁵⁾. El PGT-a no invasivo de aneuploidías (niPGT-a), es el último desarrollo tecnológico para la caracterización genética de embriones preimplantatorios. La técnica utiliza el ADN embrionario que se libera al medio de cultivo de los blastocistos para caracterizar el nivel de ploidía de los autosomas y cromosomas sexuales del embrión⁽⁶⁻¹²⁾. Entre las principales ventajas de la técnica, no sólo se destaca el hecho de no intervenir la integridad física del embrión, sino que la misma puede reflejar el contenido genético del trofoblasto y de la masa celular interna. De este modo, el niPGT-a representaría de forma más precisa el contenido genómico del embrión completo⁽⁸⁾, disminuyendo la posible determinación como no transferibles de embriones que en realidad hubieran sido transferibles.

OBJETIVO

El objetivo del presente reporte es describir el procedimiento con el que se logró el primer nacimiento en Argentina de un niño cuya conformación cromosómica embrionaria fue caracterizada exclusivamente mediante la técnica de niPGT-a, en una pareja con indicación de FIV por diagnóstico endometriosis y con deseo de realizar PGT-a.

REPORTE DEL CASO CLÍNICO

Diseño

Reporte de caso clínico

Pacientes

Pareja compuesta por una mujer de 35 años y un varón de 38 que asisten a Medicina Reproductiva Fertilis en 2020. Consultan por esterilidad primaria de 18 meses de evolución. Como antecedente de importancia la paciente tenía diagnóstico de endometriosis, realizado durante cirugía laparoscópica (año 2015) donde se le realizó la exéresis de un endometrioma de ovario izquierdo. También de hipotiroidismo, en tratamiento con levotiroxina de 88 mg/día e hiperprolactinemia en tratamiento con cabergolina 0.25 mg por semana.

Evaluación femenina:

Recuento de folículos antrales: 13 en ovario derecho y 10 en ovario izquierdo

FSH: 4.97 mUI/ml, LH: 4.97 mUI/ml, Estradiol plasmático: 37.0 ng/ml, TSH: 2.2µIU/ml; T4 libre: 0.93ng/dl; Prolactina: 17 ng/ml, Hormona anti-mülleriana: 2.4ng/ml

Histerosalpingografía: Normal

Índice de masa corporal (IMC): 19,81 kg/m²

Cariotipo: 46,XX

Evaluación masculina:

Espermograma: concentración: 34×10⁶ espermatozoides/ml, movilidad progresiva: 21%, morfología (criterio estricto de Kruger): 3% de formas normales

Índice de fragmentación del ADN espermático (técnica de Tunel): 22%

Cariotipo: 46,XY

Indicación para realizar el procedimiento de fecundación asistida de alta complejidad:

Debido al antecedente de endometriosis, al tiempo de infertilidad y deseo de la pareja de realizar el estudio del balance cromosómico de sus embriones se propone

realizar una fecundación in vitro seguida de niPGT-a.

Procedimiento de fecundación in vitro:

Se realizó estimulación ovárica con FSH recombinante 150 UI+ LH recombinante 75 UI (Pergoveris, Merck-Serono, Alemania) desde el día 2 del ciclo. Al alcanzar un diámetro folicular medio de 14 mm, se administró una dosis diaria de antagonista de GnRh (Cetrorrelix, Cetrotide NR, Merck-Serono, Alemania) hasta el momento de descargar la ovulación el día 9 de estimulación, para lo cual se administró 0.2 mg de Triptorelina (Gonapeptil Daily, Ferring, Suiza) 36 hs antes de la aspiración folicular.

En la aspiración folicular se obtuvieron 10 ovocitos los cuales fueron colocados en forma individual bajo aceite (Oil, SAGE, EEUU) en gotas de 22 μ l de medio Quinn's Advantage protein plus for Fertilization (SAGE, EEUU). Luego de 3 horas de cultivo los ovocitos fueron denudados empleando hialuronidasa (SAGE, EEUU) y pipetas de 130 μ m (Sunligh, EEUU), obtenido 8 ovocitos en estadio de Metafase II. La muestra se semen fue procesada empleando un dispositivo microfluídico (ZyMöt®, EEUU). La fecundación fue evaluada 18 hs después de realizado el ICSI y los embriones producidos se cultivaron en forma individual bajo aceite en gotas de 22 μ l hasta el Día 3 en el medio Quinn's Advantage protein plus Cleavage (SAGE, EEUU), y luego se los colocó bajo aceite en gotas individuales de 22 μ l hasta el Día 5 de cultivo en medio Quinn's Advantage protein plus Blastocyst (SAGE, EEUU). En ese momento se realizó la criopreservación de 4 blastocistos obtenidos, para lo cual se empleó el medio de vitrificación Kitazato (Japón) y soporte de vitrificación Cryolock (EEUU). El medio de cultivo

donde habían sido cultivados los blastocistos fue recolectado (17-18 μ l), transferido a microtubos Eppendorf individuales con 5 μ L de buffer de lisis (Yikon Genomics, China) y rotulados en forma apropiada, luego de lo cual fueron colocados a -20°C a la espera del estudio genético.

Durante la recolección del medio, todos los procedimientos se realizaron en condiciones estériles en flujo laminar utilizando una máscara, cofia, guantes, camisolín quirúrgico y materiales estériles.

El cultivo se realizó a 37°C en incubadoras ESCO mini-Miri en 5% de oxígeno y 6.7% de dióxido de carbono. Los embriones de día 5 fueron evaluados según los criterios de Estambul ⁽¹³⁾.

El resultado del niPGT-a informó que 3 de los 4 embriones eran euploides. Luego de ello se realizó la transferencia empleando ciclo natural sin empleo de medicación. Se realizó la desvitrificación de un embrión empleando el medio Kitazato (Japón) y la transferencia se realizó utilizando un catéter Rocket-Echo Cath (Rocket Medical, Inglaterra).

Luego de 12 días de la transferencia se determinó un valor de β -hCG en sangre de 519 UI/ml. El embarazo clínico fue confirmado por ultrasonido 6 semanas después de la transferencia del embrión. El nacimiento de una niña sana se produjo el día 29 de marzo de 2021, luego de 39 semanas de gestación, por parto sin complicaciones.

Amplificación del genoma completo y secuenciación del ADN

El ADN libre secretado en el medio de cultivo por cada blastocisto fue utilizado para la construcción de librerías genómicas siguiendo el protocolo correspondiente (Yikon Genomics, China) que emplea la tecnología propietaria MALBAC para

la amplificación genómica completa. Posteriormente, estas librerías genómicas se normalizaron, combinaron y el producto resultante se sometió a la secuenciación masiva en paralelo (NGS) utilizando la plataforma Illumina MiSeq®.

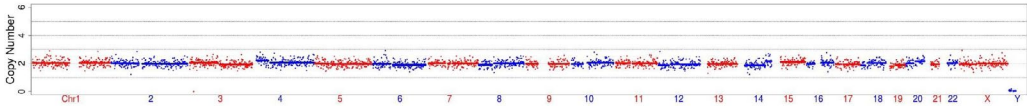
Análisis de los datos

Los datos de secuenciación y el reporte de anomalías cromosómicas fueron realizados empleando el software ChromGo (Yikon Genomics, China). Este software permite la evaluación de cromosomas enteros, el análisis de los brazos cortos y largos de cada cromosoma, y la detección de deleciones o duplicaciones >10Mb, además de permitir la determinación del sexo embrionario y la presencia de mosaicismo.

Resultados de niPGT-a

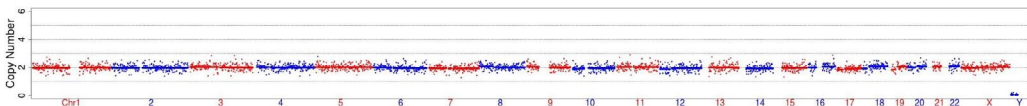
Muestra embrionaria 1 (Euploide)

46, XX



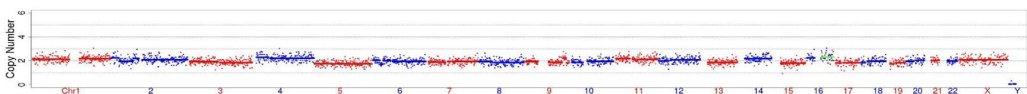
Muestra embrionaria 2 (Euploide)

46, XX



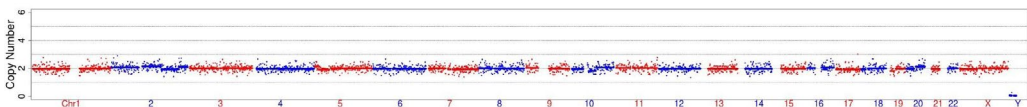
Muestra embrionaria 3 (Aneuploide)

46, XX | +16q (×3,mos,~30%)



Muestra embrionaria 4 (Euploide)

46, XX



Perfil genómico de las 4 muestras embrionarias analizadas para el caso. Para la muestra 3 se observa un incremento en el número de copias del 30% (mosaico) en el brazo q del cromosoma 16. Para el resto de las muestras, el número de copias de regiones secuenciadas es el esperado para muestras normales diploides (2N, cariotipo 46 XX)

DISCUSIÓN

El primer trabajo que analizó las posibilidades de un cribado genético sobre todo los cromosomas humanos a partir de ADN del medio de cultivo de embriones fue publicado por Shamonki y col. (11). Posteriormente siguieron diferentes publicaciones reportando valores de sensibilidad

y especificidad en comparaciones con embriones completos y biopsias de trofoectodermo ^(14,15), e incluso las primeras experiencias en Argentina ^(16,17). De forma paralela varios artículos reportaron el nacimiento de niños sanos a partir de blastocistos euploides seleccionados por niPGT-a ^(6,12,18).

La ventaja obvia del niPGT-a es evitar la biopsia embrionaria, que acarrea un daño potencial al trofoectodermo. Esto puede producir dos inconvenientes: algunos embriones pueden ver afectada su sobrevivencia luego de la injuria y en otros, pese a sobrevivir al proceso, pueden ver afectada su capacidad de implantarse. Una cuestión adicional es la necesidad de embriólogos con considerable formación y experiencia para realizar la manipulación embrionaria al momento de realizar la biopsia.

Por otra parte, algunos trabajos realizados en animales, muestran que la biopsia embrionaria puede estar asociada con cambios en el tubo neural fetal o el desarrollo suprarrenal ^(19,20).

Adicionalmente, el PGT-a invasivo determina el estado cromosómico embriona-

rio mediante el análisis de algunas células del trofoectodermo, que, de hecho, no originarán al feto luego de la implantación, siendo sólo parte de las estructuras placentarias y demás anexos. Es bien sabido que el trofoectodermo tiene alto grado de mosaicismo debido al acelerado proceso de modelación que sufre al prepararse para la implantación y formación de las estructuras recién mencionadas que dan soporte vital al feto ⁽²¹⁾. Esto trae consigo la posibilidad de descartar, como producto de falsos positivos, embriones que se hubieran implantado normalmente.

Finalmente, han sido publicados dos estudios que comparan en PGT-a invasivo y el niPGT-a en embriones donados para investigación ^(8,22). En ambos la conclusión fue que el niPGT-a tuvo menor tasa de falsos positivos que el PGT-a invasivo.

niPGT-a es un método que evita la biopsia embrionaria y que proporciona resultados más exactos con sobre la euploidía del embrión completo. Por lo tanto se presenta como una técnica muy promisoriosa para el estudio genómico de los embriones en el momento previo a la implantación.

REFERENCIAS

1. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. How PGS/PGT-A laboratories succeeded in losing all credibility. *Reprod Biomed Online*. 2018; 37:242-245.
2. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med*. 2015; 373:2089-2090.
3. Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, Silverberg K, Kalista T, Handyside AH, KatzJaffe M, Wells D, Gordon T, Stock-Myer S, Willman S; STAR Study Group. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril*. 2019; 112: 1071-1079.
4. Paulson RJ. Preimplantation genetic screening: what is the clinical efficiency? *Fertil Steril*. 2017; 108:228-230.
5. Rosenwaks Z, Handyside AH, Fiorentino F, Gleicher N, Paulson RJ, Schattman GL, Scott RT Jr, Summers MC, Treff NR, Xu K. The pros and cons of preimplantation genetic testing for aneuploidy: clinical and laboratory perspectives. *Fertil Steril*. 2018; 110:353-361.
6. Franco JG Jr, Vagnini LD, Petersen CG, Renzi A, Canas MCT, Petersen B, Ricci J, Nicoletti A, Zamara C, Dieamant F, Oliveira JBA. Noninvasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (niPGT-A): The first Brazilian baby. *JBRA Assist Reprod*. 2020; 24:517-520.
7. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, Bendikson KA, Paulson RJ, McGinnis LK. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018; 110:467-475.
8. Huang J, Yan L, Lu S, Zhao N, Qiao J. Re-analysis of aneuploidy blastocysts with an inner cell mass and different regional trophoctoderm cells. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34:487-493.
9. Olcha M, Elzaky M, Jaremko M, John Z, Hensing B, Lu S. A review of 1,504 autologous embryos evaluated using a non-invasive platform for preimplantation genetic testing for aneuploidy at a private clinic. *Hum Reprod*. 2020; 35:i373.
10. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W, Barroso G, Kopcow L, Bahçeci M, Kulmann MIR, López L, De la Fuente E, Navarro R, Valbuena D, Sakkas D, Rienzi L, Simón C. Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 223:751.
11. 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; 106:1312-1318.
12. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, Wang H, Song X, Ma T, Bo S, Shi C, Ren J, L, Cai LY, Yao B, Xie XS, Lu S. 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; 113:11907-11912.
13. Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D, Hardarson T, Lundin K, Magli MC, Mortimer D, Mortimer S, Munné S, Royere R, Scott L, Smitz J, Thornhill A, van Blerkom J, Van den Abbeel E. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011;26: 1270-1283.
14. Kimelman D, Pavone ME. Non-invasive prenatal testing in the context of IVF and PGT-A. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.

- col. 2021; 70:51-62.
15. Munné S, Nakajima ST, Najmabadi S, Sauer MV, Angle MJ, Rivas JL, Mendieta LV, Macaso TM, Sawarkar S, Nadal A, Choudhary K, Nezhat C, Carson SA, Buster JE. First PGT-A using human in vivo blastocysts recovered by uterine lavage: comparison with matched IVF embryo controls. *Hum Reprod.* 2020; 35:70-80.
 16. Ahumada AO, Nieto Francisco L, Zubrzycki J, Dopazo H. Validación de un protocolo de PGTA-a no invasivo. Primera experiencia en Argentina. Congreso SAMeR. 2021. Rosario, Argentina.
 17. Francisco Leocata Nieto F, Zubrzycki J, Dopazo H, Ahumada AO. A comparison of non-invasive and trophoctoderm biopsy PGT-A. First experience in Argentina. 76th ASRM Scientific Congress. 2020. Virtual congress.
 18. Fang R, Yang W, Zhao X, Xiong F, Guo C, Xiao J, Chen L, Song X, Wang H, Chen J, Xiao X, Yao B, Cai LY. Chromosome screening using culture medium of embryos fertilized in vitro: a pilot clinical study. *J Transl Med.* 2019; 17:1-8.
 19. Wu Y, Lv Z, Yang Y, Dong G, Yu Y, Cui Y, Tong M, Wang L, Zhou Z, Zhu H, Zhou Q, Sha J. Blcolmastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71:176174.
 20. Zeng Y, Lv Z, Gu L, Wang L, Zhou Z, Zhu H, Zhou Q, Sha J. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) influences adrenal development and response to cold stress in resulting mice. *Cell Tissue Res.* 2013; 354:729-741.
 21. Carlson, B. *Human embryology and developmental biology*, 6th ed., Ed. Harcourt.
 22. Vagnini L, Petersen CG, Renzi A, Oliveira JBA, Oliani AH, Nakano R, Almodin CG, Marcondes C, Ceschin A, Amaral A, Borges Jr E, Castelo Branco A, Soares JB, Lopes J, Franco Jr. JG. Noninvasive preimplantation genetic test for aneuploidy (NIPGT-A) has a lower false positive rate than that of the invasive PGT-A. *Hum Reprod.* 2020; 35:i359-60.