

1 **PGT NO INVASIVO PARA ANEUPLOIDÍAS (niPGT-a): REPORTE DEL PRIMER NIÑO**
2 **NACIDO EN ARGENTINA**
3 **NONINVASIVE PGT FOR ANEUPLOIDIES (niPGT-a): REPORT OF THE FIRST CHILD BORN**
4 **IN ARGENTINA**

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

8

9 ¹ Medicina Reproductiva Fertilis - San Isidro, Buenos Aires, Argentina

10 ² Universidad de Belgrano - Buenos Aires, Argentina

11 ³ Biocódices S.A. - Buenos Aires, Argentina

12 ⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

13 ⁵ Laboratorio de Genómica Evolutiva y Poblacional. Instituto de Ecología, Genética y
14 Evolución de Buenos Aires (IEGEB-CONICET), Departamento de Ecología Genética y
15 Evolución, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

16

17 Correspondencia: A. Gustavo Martínez

18 agmartinez@fertilis.com.ar

19

20 **RESUMEN**

21 El Diagnóstico Genético Preimplantacional No Invasivo para Aneuploidias (niPGT-a)
22 utiliza el ADN libre de células presente en el medio de cultivo del blastocisto para
23 la caracterización cromosómica del embrión. El resultado del niPGT-a podría
24 representar el contenido genómico tanto de las células de la masa celular interna
25 como del trofoblasto, sin la necesidad de realizar una biopsia embrionaria.
26 El objetivo del presente reporte es describir el procedimiento con el que se logró
27 el primer nacimiento en Argentina de un niño cuyo embrión fue caracterizado
28 mediante esta técnica.

29

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

32

33 **ABSTRACT**

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

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

41

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

44

45 **INTRODUCCIÓN**

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

60

61 **OBJETIVO**

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

67

68 **REPORTE DEL CASO CLÍNICO**

69

70 **Diseño**

71 Reporte de caso clínico

72

73 **Pacientes**

74 Pareja compuesta por una mujer de 35 años y un varón de 38 que asisten a

75 Medicina Reproductiva Fertilis en 2020. Consultan por esterilidad primaria de 18

76 meses de evolución. Como antecedente de importancia la paciente tenía

77 diagnóstico de endometriosis, realizado durante cirugía laparoscópica (año 2015)

78 donde se le realizó la exéresis de un endometrioma de ovario izquierdo. También

79 de hipotiroidismo, en tratamiento con levotiroxina de 88 mg/día e

80 hiperprolactinemia en tratamiento con cabergolina 0.25 mg por semana.

81

82 **Evaluación femenina:**

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

84 FSH: 4.97 mUI/ml, LH: 4.97 mUI/ml, Estradiol plasmático: 37.0 ng/ml, TSH:

85 2.2µIU/ml; T4 libre: 0.93ng/dl; Prolactina: 17 ng/ml, Hormona anti-mülleriana:

86 2.4ng/ml

87 Histerosalpingografía: Normal

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

89 Cariotipo: 46,XX

90

91 **Evaluación masculina:**

92 Espermograma: concentración: 34×10^6 espermatozoides/ml, movilidad progresiva:

93 21%, morfología (criterio estricto de Kruger): 3% de formas normales

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

95 Cariotipo: 46,XY

96

97 **Indicación para realizar el procedimiento de fecundación asistida de alta**

98 **complejidad:**

99 Debido al antecedente de endometriosis, al tiempo de infertilidad y deseo

100 de la pareja de realizar el estudio del balance cromosómico de sus

101 embriones se propone realizar una fecundación *in vitro* seguida de niPGT-

102 a.

103

104 **Procedimiento de fecundación in vitro:**

105 Se realizó estimulación ovárica con FSH recombinante 150 UI+ LH recombinante 75 UI

106 (Pergoveris, Merck-Serono, Alemania) desde el día 2 del ciclo. Al alcanzar un diámetro

107 folicular medio de 14 mm, se administró una dosis diaria de antagonista de GnRh

108 (Cetrorrelix, Cetrotide NR, Merck-Serono, Alemania) hasta el momento de descargar la

109 ovulación el día 9 de estimulación, para lo cual se administró 0.2 mg de Triptorelina

110 (Gonapeptil Daily, Ferring, Suiza) 36 hs antes de la aspiración folicular.

111 En la aspiración folicular se obtuvieron 10 ovocitos los cuales fueron colocados en

112 forma individual bajo aceite (Oil, SAGE, EEUU) en gotas de 22 μ l de medio Quinn's

113 Advantage protein plus for Fertilization (SAGE, EEUU). Luego de 3 horas de cultivo los

114 ovocitos fueron desnudados empleando hialuronidasa (SAGE, EEUU) y pipetas de 130

115 μ m (Sunligh, EEUU), obtenido 8 ovocitos en estadio de Metafase II. La muestra se

116 semen fue procesada empleando un dispositivo microfluídico (ZyMöt®, EEUU). La
117 fecundación fue evaluada 18 hs después de realizado el ICSI y los embriones
118 producidos se cultivaron en forma individual bajo aceite en gotas de 22 µl hasta el Día
119 3 en el medio Quinn's Advantage protein plus Cleavage (SAGE, EEUU), y luego se los
120 colocó bajo aceite en gotas individuales de 22 µl hasta el Día 5 de cultivo en medio
121 Quinn's Advantage protein plus Blastocyst (SAGE, EEUU). En ese momento se realizó la
122 criopreservación de 4 blastocistos obtenidos, para lo cual se empleó el medio de
123 vitrificación Kitazato (Japón) y soporte de vitrificación Cryolock (EEUU). El medio de
124 cultivo donde habían sido cultivados los blastocistos fue recolectado (17-18 µl),
125 transferido a microtubos Eppendorf individuales con 5µL de buffer de lisis (Yikon
126 Genomics, China) y rotulados en forma apropiada, luego de lo cual fueron colocados a
127 -20°C a la espera del estudio genético.

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

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

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

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

143

144 **Amplificación del genoma completo y secuenciación del ADN**

145 El ADN libre secretado en el medio de cultivo por cada blastocisto fue utilizado para la
146 construcción de librerías genómicas siguiendo el protocolo correspondiente (Yikon
147 Genomics, China) que emplea la tecnología propietaria MALBAC para la amplificación
148 genómica completa. Posteriormente, estas librerías genómicas se normalizaron,
149 combinaron y el producto resultante se sometió a la secuenciación masiva en paralelo
150 (NGS) utilizando la plataforma Illumina MiSeq®.

151

152 **Análisis de los datos**

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

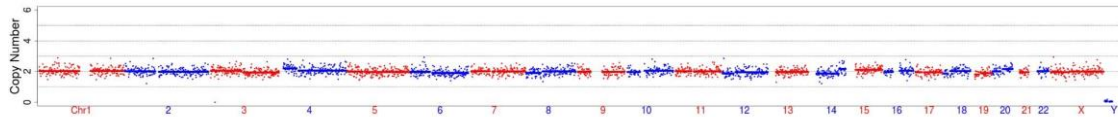
158

159 **Resultados de niPGT-a**

160

161 Muestra embrionaria 1 (Euploide)

162 46, XX

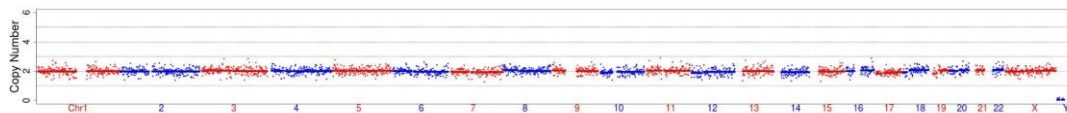


163

164

165 Muestra embrionaria 2 (Euploide)

166 46, XX

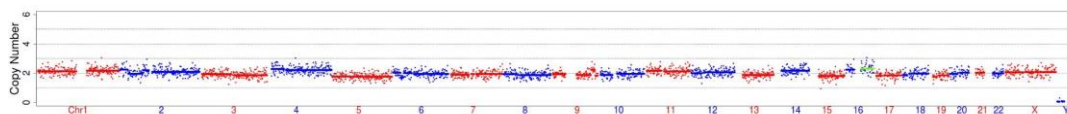


167

168

169 Muestra embrionaria 3 (Aneuploide)

170 46, XX | +16q (x3,mos,~30%)

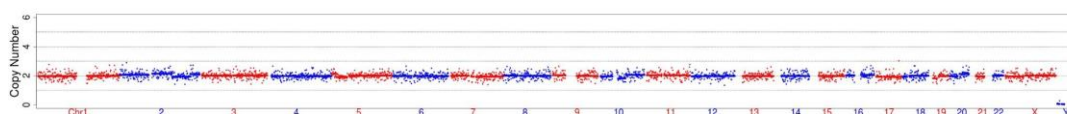


171

172

173 Muestra embrionaria 4 (Euploide)

174 46, XX



175

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

181

182

183 DISCUSIÓN

184 El primer trabajo que analizó las posibilidades de un cribado genético sobre todo los
185 cromosomas humanos a partir de ADN del medio de cultivo de embriones fue
186 publicado por Shamonki y col. (11). Posteriormente siguieron diferentes publicaciones
187 reportando valores de sensibilidad y especificidad en comparaciones con embriones
188 completos y biopsias de trofoectodermo (14,15), e incluso las primeras experiencias
189 en Argentina (16,17). De forma paralela varios artículos reportaron el nacimiento de
190 niños sanos a partir de blastocistos euploides seleccionados por niPGT-a (6,12,18).

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

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

200 Adicionalmente, el PGT-a invasivo determina el estado cromosómico embrionario
201 mediante el análisis de algunas células del trofectodermo, que, de hecho, no
202 originarán al feto luego de la implantación, siendo sólo parte de las estructuras
203 placentarias y demás anexos. Es bien sabido que el trofectodermo tiene alto grado de
204 mosaicismo debido al acelerado proceso de modelación que sufre al prepararse para
205 la implantación y formación de las estructuras recién mencionadas que dan soporte

206 vital al feto (21). Esto trae consigo la posibilidad de descartar, como producto de falsos
207 positivos, embriones que se hubieran implantado normalmente.

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

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

215

216 **REFERENCIAS**

- 217 1. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. How PGS/PGT-A laboratories succeeded in
218 losing all credibility. *Reprod Biomed Online*. 2018; 37:242-245.
- 219 2. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of
220 mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med*. 2015; 373:2089-2090.
- 221 3. Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, Silverberg K,
222 Kalista T, Handyside AH, KatzJaffe M, Wells D, Gordon T, Stock-Myer S, Willman S;
223 STAR Study Group. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus
224 morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-
225 prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil Steril*. 2019; 112:
226 1071-1079.
- 227 4. Paulson RJ. Preimplantation genetic screening: what is the clinical efficiency? *Fertil*
228 *Steril*. 2017; 108:228-230.
- 229 5. Rosenwaks Z, Handyside AH, Fiorentino F, Gleicher N, Paulson RJ, Schattman GL,
230 Scott RT Jr, Summers MC, Treff NR, Xu K. The pros and cons of preimplantation
231 genetic testing for aneuploidy: clinical and laboratory perspectives. *Fertil Steril*.
232 2018; 110:353-361.
- 233 6. Franco JG Jr, Vagnini LD, Petersen CG, Renzi A, Canas MCT, Petersen B, Ricci J,
234 Nicoletti A, Zamara C, Dieamant F, Oliveira JBA. Noninvasive Preimplantation
235 Genetic Testing for Aneuploidy (niPGT-A): The first Brazilian baby. *JBRA Assist*
236 *Reprod*. 2020; 24:517-520.
- 237 7. Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Ahmady A, Ingles S, Chung K, Bendikson KA,
238 Paulson RJ, McGinnis LK. Pushing the limits of detection: investigation of cell-free
239 DNA for aneuploidy screening in embryos. *Fertil Steril*. 2018; 110:467-475.

- 240 8. Huang J, Yan L, Lu S, Zhao N, Qiao J. Re-analysis of aneuploidy blastocysts with an
241 inner cell mass and different regional trophoctoderm cells. *J Assist Reprod Genet.*
242 2017; 34:487-493.
- 243 9. Olcha M, Elzaky M, Jaremko M, John Z, Hensinger B, Lu S. A review of 1,504
244 autologous embryos evaluated using a non-invasive platform for preimplantation
245 genetic testing for aneuploidy at a private clinic. *Hum Reprod.* 2020; 35:i373.
- 246 10. Rubio C, Navarro-Sánchez L, García-Pascual CM, Ocali O, Cimadomo D, Venier W,
247 Barroso G, Kopcow L, Bahçeci M, Kulmann MIR, López L, De la Fuente E, Navarro R,
248 Valbuena D, Sakkas D, Rienzi L, Simón C. Multicenter prospective study of
249 concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from
250 1301 human blastocysts. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 223:751.
- 251 11. Shamonki MI, Jin H, Haimowitz Z, Liu L. Proof of concept: preimplantation genetic
252 screening without embryo biopsy through analysis of cell-free DNA in spent
253 embryo culture media. *Fertil Steril.* 2016; 106:1312-1318.
- 254 12. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, Wang H, Song X, Ma T, Bo S, Shi C,
255 Ren J, L, Cai LY, Yao B, Xie XS, Lu S. Noninvasive chromosome screening of human
256 embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro
257 fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113:11907-11912.
- 258 13. Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D,
259 Hardarson T, Lundin K, Magli MC, Mortimer D, Mortimer S, Munné S, Royere R,
260 Scott L, Smitz J, Thornhill A, van Blerkom J, Van den Abbeel E. Alpha Scientists in
261 Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The
262 Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert
263 meeting. *Hum Reprod.* 2011;26: 1270–1283.

- 264 14. Kimelman D, Pavone ME. Non-invasive prenatal testing in the context of IVF and
265 PGT-A. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2021; 70:51-62.
- 266 15. Munné S, Nakajima ST, Najmabadi S, Sauer MV, Angle MJ, Rivas JL, Mendieta LV,
267 Macaso TM, Sawarkar S, Nadal A, Choudhary K, Nezhat C, Carson SA, Buster JE.
268 First PGT-A using human in vivo blastocysts recovered by uterine lavage:
269 comparison with matched IVF embryo controls. *Hum Reprod.* 2020; 35:70-80.
- 270 16. Ahumada AO, Nieto Francisco L, Zubrzycki J, Dopazo H. Validación de un protocolo
271 de PGTA-a no invasivo. Primera experiencia en Argentina. Congreso SAMeR. 2021.
272 Rosario, Argentina.
- 273 17. Francisco Leocata Nieto F, Zubrzycki J, Dopazo H, Ahumada AO. A comparison of
274 non-invasive and trophoctoderm biopsy PGT-A. First experience in Argentina. 76th
275 ASRM Scientific Congress. 2020. Virtual congress.
- 276 18. Fang R, Yang W, Zhao X, Xiong F, Guo C, Xiao J, Chen L, Song X, Wang H, Chen J,
277 Xiao X, Yao B, Cai LY. Chromosome screening using culture medium of embryos
278 fertilized in vitro: a pilot clinical study. *J Transl Med.* 2019; 17:1-8.
- 279 19. Wu Y, Lv Z, Yang Y, Dong G, Yu Y, Cui Y, Tong M, Wang L, Zhou Z, Zhu H, Zhou Q,
280 Sha J. Blcolmastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early
281 embryo development, which impacts neural development and function in resulting
282 mice. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71:176174.
- 283 20. Zeng Y, Lv Z, Gu L, Wang L, Zhou Z, Zhu H, Zhou Q, Sha J. Preimplantation genetic
284 diagnosis (PGD) influences adrenal development and response to cold stress in
285 resulting mice. *Cell Tissue Res.* 2013; 354:729-741.
- 286 21. Carlson, B. *Human embryology and developmental biology*, 6th ed., Ed. Harcourt.

- 287 22. Vagnini L, Petersen CG, Renzi A, Oliveira JBA, Oliani AH, Nakano R, Almodin CG,
288 Marcondes C, Ceschin A, Amaral A, Borges Jr E, Castelo Branco A, Soares JB, Lopes
289 J, Franco Jr. JG. Noninvasive preimplantation genetic test for aneuploidy (NIPGT-A)
290 has a lower false positive rate than that of the invasive PGT-A. Hum Reprod. 2020;
291 35:i359-60.