

PGT-A de embriones criopreservados: ¿Compromete los resultados clínicos?

PGT-A of cryopreserved embryos: Affects the clinical outcomes?

Scampoli N¹, Galindez N¹, Hovanyecz¹, Perfumo¹, Parolin¹, Ventura¹, Paz MV¹.

¹ Servicio de Medicina Reproductiva del Instituto Gamma, Rosario, Santa Fe.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Se ven comprometidos los resultados clínicos al realizar testeo genético pre-implantacional para aneuploidías (PGT-A) a embriones previamente criopreservados en comparación con los biopsiados en fresco?

Respuesta resumida: La descongelación de embriones para su posterior biopsia y re-criopreservación sería una técnica segura, que podría ser utilizada en pacientes que reciban indicación de PGT-A a embriones de procedimientos previos.

Lo que ya se sabe: El PGT-A está siendo cada vez más utilizado con el objetivo de aumentar las probabilidades de lograr un embarazo evolutivo ante la primer transferencia de un blastocisto. La biopsia embrionaria se realiza de rutina en el procedimiento en fresco, luego el embrión se criopreserva y, aquel que sea apto, se transfiere en un ciclo posterior. Sin embargo, existen pacientes a los cuales se les indica realizar PGT-A en embriones congelados, los cuales serían criopreservados dos veces. El impacto de estas sucesivas criopreservaciones, descongelaciones y

ABSTRACT

Study question: *Are clinical outcomes compromised when performing pre-implantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) on previously cryopreserved embryos compared to fresh biopsied ones?*

Summary answer: *Embryo thawing for subsequent biopsy and re-cryopreservation would be a safe technique that can be used in patients who require PGT-A on embryos from previous procedures.*

What is already known: *The use of PGT-A is becoming increasingly common with the aim of improving the chances of achieving a successful pregnancy after the first blastocyst transfer. Embryo biopsy is routinely performed in fresh cycle procedure; then the embryo is cryopreserved and, if it is an acceptable embryo, will be transferred in a subsequent cycle. However, there are patients for whom PGT-A is recommended on already frozen embryos. Therefore, these embryos would be cryopreserved twice. The impact of this successive cryopreservations, thawings, and biopsy is controversial.*

biopsia es controvertido.

Diseño del estudio: Transversal analítico.

Materiales y Métodos: Se analizaron los resultados de 1174 embriones biopsiados entre enero de 2016 y julio de 2024. Las biopsias se ejecutaron en estadio de blastocisto, realizando eclosión asistida en día 3 o previo a la biopsia. El análisis genético fue analizado por NGS utilizando la plataforma Illumina. Se comparó entre ambos grupos la tasa de supervivencia embrionaria, resultados genéticos y resultados clínicos (tasa de embarazo clínico, tasa de embarazo evolutivo y tasa de implantación) utilizando el test Chi-cuadrado con un nivel de significancia del 5%.

Resultados: No se encontraron diferencias significativas al comparar supervivencia embrionaria, ni resultados clínicos, pero sí al comparar el porcentaje de aneuploidía entre los dos grupos.

Limitaciones del estudio: Tamaño poblacional pequeño.

Implicancias de los hallazgos: Realizar dos ciclos de vitrificación-descongelación a los embriones no afectaría su supervivencia ni los resultados clínicos.

Palabras clave: PGT-A, descongelación embrionaria, tasa de embarazo.

Study design: cross-sectional, analytical.

Materials and Methods: 283 fresh embryos biopsied and 31 post-thaw embryos biopsied, between January 2016 and July 2024, were analysed. The biopsies were performed at the blastocyst stage, with assisted hatching done on day 3 or prior to biopsy. The genetic analysis was conducted by NGS using the Illumina platform. Embryo survival rate, genetic and clinical results (clinical pregnancy rate, ongoing pregnancy rate and implantation rate) were compared between both groups using the Chi-square test with a significance level of 5%.

Main results: No significant differences were found in embryo survival rate neither clinical results when comparing the two groups, but there are differences in the aneuploidy percentage.

Limitations: Small sample size.

Wider implications of the findings: Performing two vitrification-thawing cycles on embryos would not affect their survival or clinical outcomes.

Key words: PGT-A, embryo thawing, pregnancy rate.

INTRODUCCIÓN

El Testeo Genético Preimplantacional para Aneuploidías (PGT-A) es una herramienta que permite la selección de embriones cromosómicamente normales para ser transferidos acortando el tiempo para lograr un recién nacido vivo¹. Las biopsias embrionarias se realizan en general en estadio de blastocisto, los embriones se criopreservan a la espera del resultado genético y se transfieren en un ciclo posterior, involucrando así, un solo ciclo de vitrificación-descongelación.

Sin embargo, no todos los pacientes realizan el PGT-A en sus embriones y deben enfrentarse a sucesivas transferencias embrionarias sin lograr un embarazo evolutivo. Es en estos casos donde surge la posibilidad de realizar el testeo genético de los embriones restantes criopreservados.

Si bien las técnicas de criopreservación han avanzado significativamente en los últimos años debido a la vitrificación¹, los reportes de re-vitrificación son escasos y suele ser considerada una técnica a usar en situaciones de emergencia, como por ejemplo la imposibilidad de realizar la transferencia o la inesperada inasistencia de la paciente. A pesar de esto, se han transferido embriones re-criopreservados con resultados positivos⁽¹⁻³⁾.

Es lógico pensar que esta manipulación adicional pueda influir no solo en la sobrevivencia del embrión a la descongelación, sino también en el potencial de implantación y desarrollo del embarazo. No obstante, la literatura es contradictoria en cuanto a esta temática. En los trabajos de Cimadomo y Zhou, los embriones re-biosados y que, por lo tanto, experimentan una segunda ronda de vitrificación-descongelación, tienen buena tasa de sobrevivencia, embarazo clínico y nacido vivo^(2,3). Por otro lado, Li encuentra que la tasa de nacidos vivos

de embriones que sufrieron una segunda re-vitrificación es menor en comparación a embriones vitrificados una sola vez⁽⁴⁾; y Zheng concluye en su trabajo que, si bien la tasa de embarazo clínico es comparable con embriones criopreservados una sola vez, en los embriones que sufren una segunda ronda de vitrificación hay una tasa de aborto mayor que en el grupo control⁽⁵⁾.

Por lo expuesto anteriormente, nos propusimos realizar este trabajo retrospectivo, donde comparamos los resultados clínicos de pacientes que realizaron PGT-A en fresco con aquellos que biopsiaron blastocistos previamente criopreservados en un ciclo anterior, con el objetivo de analizar si existe una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de embarazo clínico, tasa de embarazo evolutivo y de implantación entre ambos grupos y verificar si ésta es una opción segura para indicar a las pacientes de nuestro centro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: estudio transversal analítico.

Pacientes y procedimientos: El estudio analizó 1174 embriones biopsiados de 614 ciclos de PGT-A realizados en el Servicio de Medicina Reproductiva del Grupo Gamma, durante enero de 2016 y julio de 2024. Se transfirieron en total 314 embriones euploides, los cuales se clasificaron en dos grupos según si la biopsia embrionaria fue realizada en fresco (Grupo FRESCO) o post-descongelación embrionaria (Grupo DESCRIO). En el grupo FRESCO, se incluyeron 283 embriones, mientras que en el grupo DESCRIO, 31 embriones. Los procedimientos de laboratorio, cultivo y clasificación embrionaria se realizaron siguiendo los protocolos ya publicados⁽⁶⁻⁸⁾. Para las vitrificaciones y descongelaciones embrionarias se utilizaron medios KITA-ZATO. Las biopsias embrionarias fueron

llevadas a cabo en estadio de blastocisto, efectuando la eclosión asistida en día 3 o previo a la biopsia, utilizando el láser Lykos (Hamilton Thorne Inc., USA)⁽⁹⁾. El análisis genético se realizó por NGS empleando la plataforma Illumina. Las transferencias embrionarias fueron realizadas con preparación endometrial sincrónica artificial, utilizando estrógenos y progesterona. Se compararon resultados clínicos (tasa de embarazo clínico, tasa de embarazo evolutivo y tasa de implantación), resultados genéticos, sobrevida de los embriones descongelados para transferir, y los distintos motivos de indicación de PGT-A entre ambos grupos, utilizando como análisis estadístico el test Chi-cuadrado con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

En el período en estudio, se biopsiaron 1174 embriones , de los cuales 1067 fueron biopsiados en fresco, y 107 luego de descongelarlos. Este último grupo inicialmente contaba con 136 embriones, de los cuales 29 no fueron de calidad apta para biopsiar o se degeneraron en el proceso de descongelación (21%).

En la TABLA 1 se muestran los resultados obtenidos en el grupo FRESCO y

DESCRIO. Se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de embriones aneuploides (P=0,018). Por otro lado, existe una tendencia a un mayor número de embriones euploides en el grupo DESCRIO, aunque esta diferencia no fue significativa (P=0,051). En cuanto a los embriones mosaico, no hay diferencias entre los dos grupos.

Las indicaciones médicas por las cuales los pacientes decidieron realizar PGT-A en cada grupo se muestran en la TABLA 2. Se puede observar que tanto la indicación de Screening (que incluye pacientes que no tienen una indicación médica para PGT-A y, además, los procedimientos con ovodonación) como RIF (falla de implantación), se encuentran en mayor porcentaje en el grupo DESCRIO con respecto al grupo FRESCO (P=0,019 y P=0,014 respectivamente).

Se transfirieron en total 314 embriones vitrificados, 283 pertenecientes al grupo FRESCO y 31 al grupo DESCRIO. Al analizar la sobrevida de los 314 embriones euploides luego de la descongelación, se encontró que el grupo FRESCO tuvo una tasa del 98,26%, mientras que para el grupo DESCRIO fue del 100%. Como se

Tabla 1. Descripción de los ciclos de PGT-A con sus resultados genéticos

	TOTAL	FRESCO	DESCRIO	P
Ciclos de descongelacion	-	-	71	-
Ciclos de biopsia	614	550	64	-
Nº embriones descongelados	-	-	136	-
Nº embriones biopsiados	1174	1067	107	-
Nº embriones euploides	473	39,55% (422/1067)	47,66% (51/107)	0,05
Nº embriones anormales	519	45,17% (482/1067)	34,58% (37/107)	0,018*
Nº embriones mosaico	165	13,78% (147/1067)	16,82% (18/107)	0,19

*estadísticamente significativo

refleja en la TABLA 3, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los dos grupos en cuanto a los resultados clínicos, como son la tasa de embarazo clínico, tasa de embarazo evolutivo y tasa de implantación.

DISCUSIÓN

Aunque la literatura sugiere que la re-vitrificación de embriones es una herramienta promisoriosa en el campo de la reproducción asistida, el uso práctico de esta técnica no ha sido todavía desarrollado¹. En el presente trabajo nos cuestionamos sobre la factibilidad de descongelar embriones para realizar el PGT-A.

Los datos analizados demuestran que no existiría daño alguno al realizar dicho procedimiento debido a que no encontramos diferencias en la tasa de embarazo clínico,

la tasa de embarazo evolutivo o en la tasa de implantación al transferir embriones biopsiados con uno o dos procesos previos de vitrificación (TABLA 3). Sin embargo, de los 71 ciclos de descongelación realizados para PGT-A, 7 no contaron con embriones sobrevivientes o de buena calidad para biopsiar (TABLA 1), lo que representó un 10,77% del total de los ciclos del grupo DESCRIO. Esto podría deberse a que la mayoría de estos embriones se decidieron biopsiar después de varios ciclos de transferencias fallidas, es decir que no eran embriones de primera elección respecto a su morfología. Esto hace cuestionarnos si el asesoramiento al paciente sobre realizar el PGT-A en embriones criopreservados, sería una opción segura para todos o sólo para aquellos pacientes cuyos embriones sean de cierta calidad, robusta y suficiente como

TABLA 2. Distribución poblacional y de las indicaciones médicas para realizar PGT-A.

	FRESCO	DESCRIO	P
Edad media pacientes con ovos propios	38,93	38,02	0,04*
% Mujeres ≤35 años con ovos propios	15,27% (71/465)	25,49% (13/51)	0,03*
Abortos	14,91% (82/550)	9,37% (6/64)	0,11
Screening (sin indicación de PGT)	23,64% (130/550)	35,94% (23/64)	0,019*
Era (≥40 años)	46,55% (256/550)	37,50% (24/64)	0,07
Factor masculino	4,55 % (25/550)	3,12% (2/64)	0,29
Falla de implantación recurrente (RIF)	7,45% (41/550)	15,62% (10/64)	0,014*
Otros	2,91 % (16/550)	0 % (0/64)	-

*estadísticamente significativo

TABLA 3. Resultados de tasa de embarazo clínico, embarazo evolutivo e implantación para el grupo FRESCO y el grupo DESCRIO.

	FRESCO	DESCRIO	P
Ciclos et	277	30	-
Embriones descongelados para et	288	31	-
Embriones transferidos	283	31	-
Tasa de sobrevida	98,26 %	100,00 %	-
Tasa embarazo clínico	54,15% (150/277)	53,33% (16/30)	0,47
Tasa embarazo evolutivo	46,2 % (128/277)	46,67% (14/30)	0,48
Tasa de implantación	53,00% (150/283)	51,61% (16/31)	0,44

para sobrellevar el proceso de biopsia. Por otro lado, encontramos una mayor tendencia de embriones euploides en el grupo DESCRIO (TABLA 1), aunque la misma no llega a ser estadísticamente significativa ($P=0,051$). Se observa en este grupo, además, que el porcentaje de mujeres menores a 36 años que realizaron PGT-A con ovocitos propios fue significativamente mayor ($P=0,03$) que en el grupo FRESCO (TABLA 2). Esto, junto con que, en este mismo grupo, una de las causas predominantes por las cuales los pacientes realizaron el PGT-A fue Screening ($P=0,019$), podrían explicar la tendencia de la euploidía encontrada.

Uno de los puntos fuertes de este trabajo es la ínfima variabilidad de la metodología utilizada, ya que el mismo se llevó a cabo en un único centro de fertilidad, con protocolos unificados no solo en las condiciones de cultivo, técnicas de criopreservación, descongelación y transferencia,

sino también en el abordaje clínico de los casos. En contraposición, dada la naturaleza retrospectiva del mismo y el pequeño tamaño de la muestra de embriones que fueron descongelados para biopsiar, nos deriva a la necesidad de realizar nuevos estudios prospectivos y con un mayor tamaño muestral para sacar conclusiones más robustas.

CONCLUSIÓN

En este trabajo no evidenciamos una diferencia estadísticamente significativa en los resultados clínicos que represente un detrimento para el embrión al comparar embriones biopsiados en fresco con embriones descongelados para biopsiar. Esto sugiere que la descongelación de embriones para su posterior biopsia y re-vitrificación sería una técnica segura, que podría ser utilizada para pacientes que reciban indicación o deseen realizar el PGT-A a embriones de procedimientos previos.

REFERENCIAS

1. Wilding M.; Terribile M.; Parisi I.; y col. Thaw, biopsy and refreeze strategy for PGT-A on previously cryopreserved embryos. *Facts Views Vis Obgyn*, 11(3):223-227, 2019.
2. Zhou S.; Xie P.; Zhang S.; y col. Complex mosaic blastocysts after preimplantation genetic testing: prevalence and outcomes after re-biopsy and re-vitrification. *RBMO*, Vol. 43, 2021.
3. Cimadomo D.; Rienzi L.; Romanelli V.; y col. Inconclusive chromosomal assessment after blastocyst biopsy: prevalence, causative factors and outcomes after re-biopsy and re-vitrification. A multicenter experience. *Human reproduction*, Vol.33, No. 10pp. 1839-1846, 2018.
4. Li J.; Xiong S.; Zhao Y.; y col. Effect of the re-vitrification of embryos at different stages on embryonic developmental potential. *Frontiers in Endocrinolog*, Vol 12, No. 653310, 2021.
5. Zheng X.; Chen Y.; Yan J.; y col. Effect of repeated cryopreservation on human embryo developmental potential. *Reproductive Biomedicine Online* 35, 627-632, 2017.
6. Sepúlveda, S.; Garcia, J.; Arriaga, E. y col. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 91: 1765-70, 2009.
7. Ebner, T.; Yaman, C.; Moser, M. y col. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J Assist Reprod Genet* 18: 623-8, 2001.
8. Paz MV, Cicaré J, Lo Menzo F, y col. Culture in single versus sequential medium: effects on clinical outcomes and their relation to the presence of cytoplasmic granulations. *Reproducción*. 2017; 32: 6-16
9. Paz MV, Chiera M, Hovanyecz y col. Blastocysts derived from OPN oocytes: Genetic and clinical results. *JBRA Assisted Reproduction* 2020; 24 (2): 143-146