

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la

Reproducción Humana Asistida

**Reemplazo Mitocondrial: prevención de
transmisión de enfermedades
mitocondriales humanas y la infertilidad**

Autor: María del Espino Núñez Fornelino

Tutor: Jesús Aguilar Prieto

Alcobendas, Septiembre 2023

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
OBJETIVOS.....	9
1. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN MITOCONDRIAL.....	10
2. INFERTILIDAD, MALA CALIDAD OVOCITARIA Y LAS MITOCONDRIAS ...	14
2.1 <i>Disfunción cualitativa del ADN mitocondrial en el envejecimiento ovárico</i>	15
2.2 <i>Disfunción cuantitativa del ADN mitocondrial en el envejecimiento ovárico</i>	16
2.3 <i>Homeostasis del calcio mitocondrial en ovocitos</i>	16
2.4 <i>Suministro de energía mitocondrial durante ensamblaje del huso</i>	17
2.5 <i>Equilibrio redox.....</i>	17
2.6 <i>Calidad mitocondrial.....</i>	18
3. TÉCNICAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL	19
<i>Transferencia de Vesícula Germinal (GVT).....</i>	19
<i>Transferencia de huso meiótico (MST).....</i>	20
<i>Transferencia del pronúcleo (PNT).....</i>	21
<i>Transferencia de corpúsculos polares (PB1T/PB2T)</i>	22
4. REGULACIÓN DE MRT EN DIFERENTES PAÍSES	24
5. POSIBLES ALTERNATIVAS A MRT	26
<i>Transferencia citoplasmática.....</i>	26
<i>Edición del genoma</i>	28
<i>TALENs</i>	29
6. RESULTADOS.....	30
<i>Transferencia de Vesícula Germinal (GVT)</i>	30
<i>Transferencia de huso meiótico (MST).....</i>	30
<i>Transferencia del pronúcleo (PNT).....</i>	31
<i>Transferencia de corpúsculos polares (PBT).....</i>	32
7. DISCUSIÓN.....	33
8. CONCLUSIÓN.....	36
9. BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

La terapia de reemplazo mitocondrial, también conocida como transferencia del genoma nuclear, es una técnica apta para utilizarla en casos de prevención de transmisión de enfermedades del ADN mitocondrial. Sin embargo, se busca la posibilidad de emplear el reemplazo mitocondrial para remediar la infertilidad causada por mala calidad y envejecimiento de los ovocitos. Un factor que a menudo se ignora pero que está involucrado en la disminución de la calidad de los ovocitos son las anomalías del ADN mitocondrial. A su vez, estas anomalías afectan a la producción de energía de las mitocondrias, el equilibrio dinámico de la red mitocondrial y la patogénesis de las enfermedades del ADNmt en la descendencia. Por ello, es interesante el uso de técnicas de reemplazo mitocondrial no solo para evitar transmitir enfermedades de origen mitocondrial a la descendencia, sino también para poner solución a la disfunción mitocondrial.

En esta revisión se explorarán los diferentes tipos de técnicas de reemplazo mitocondrial, así como alternativas a ellas, y el papel que desempeña la mitocondria en el envejecimiento y calidad ovocitaria.

Palabras clave: reemplazo mitocondrial, ADN mitocondrial, ADNmt, mitocondrias, enfermedades mitocondriales, envejecimiento, calidad ovocitaria.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADNmt	ADN mitocondrial	MRT	Técnicas de reemplazo mitocondrial
ADNn	ADN nuclear	MST	Transferencia de huso meiótico
ADP	Adenosina difosfato	NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
ATP	Adenosina trifosfato	O₂⁻	Superóxido
Ca²⁺	Calcio	Opa1	Atrofia óptica 1
CGP	Células germinales primordiales	OXPHOS	Fosforilación oxidativa
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional	PB1	Primer corpúsculo polar
ETC	Cadena de transporte de electrones	PB1T	Transferencia del primer corpúsculo polar
GVT	Transferencia de Vesícula Germinal	PB2	Segundo corpúsculo polar
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno	PB2T	Transferencia del segundo corpúsculo polar
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides	PNT	Transferencia del pronúcleo
iPSC	Células madres pluripotentes inducidas	RE	Retículo endoplasmático
Mfn1	Mitofusina 1	RNV	Recién nacido vivo
Mfn2	Mitofusina 2	ROS	Especies reactivas de oxígeno
MII	Metafase II		

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias, conocidas como las “centrales eléctricas” de las células por las funciones que desempeñan, son orgánulos celulares que cuentan con dos membranas bicapa formadas por fosfolípidos. La membrana interna se encuentra plegada hacia dentro formando lo que se conocen como crestas para así tener un área de superficie mucho mayor que garantice la eficiencia de las reacciones biológicas que se llevan a cabo en la propia mitocondria (1).

La función más importante y mejor delineada de la mitocondria es la generación de adenosina trifosfato (ATP) a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) gracias a la cadena de transporte de electrones (ETC). La energía que es liberada por los electrones que fluyen por ETC es usada para crear un gradiente de protones a través de la membrana interna de la mitocondria de manera que cuando los protones entran al espacio intermembranal, gracias a los complejos I, III y IV, se genera ATP a partir de adenosina difosfato (ADP). Este proceso libera especies endógenas reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la fuga prematura de electrones que llegan a ser tóxicos cuando superan los niveles fisiológicos normales dañando las células y contribuyendo, posiblemente, al envejecimiento (1, 2).

Las mitocondrias también se conocen como orgánulos “semiautónomos” y únicos ya que poseen ADN propio, ADN mitocondrial genómico (ADNmt). El ADNmt es una molécula circular de ADN de doble cadena que posee una longitud de 15 000 a 17 000 pares de bases en humanos. En mamíferos, el ADNmt cuenta con un total de 37 genes de los cuales 22 codifican ARN de transferencia, otros dos a ARN ribosómico y 13 proteínas que están involucradas en la respiración oxidativa, formando parte de ETC junto al ADN nuclear (ADNn), siendo necesario una transcripción coordinada entre ambos. Sin embargo, el ADNmt es más inestable que el ADNn y más susceptible al daño provocado por ROS debido a la falta de histonas protectoras y mecanismos de reparación. Este daño en el ADNmt puede provocar una disfunción respiratoria mitocondrial bloqueando así la función de otros orgánulos, como el ensamblaje del huso durante el cual, sin un suministro adecuado de ATP, se detendrá el ciclo celular y se producirán aneuploidías (1, 2, 3).

No obstante, aunque la teoría del envejecimiento celular por la producción excesiva de ROS postuló que la acumulación de mutaciones del ADNmt conduciría a anomalías en

las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial y, por tanto, un desacoplamiento parcial de la cadena que a su vez provocaría un mayor número de ROS y de mutaciones de ADNmt (provocando un aumento exponencial en la carga de mutaciones de ADNmt), artículos más recientes sugieren que son varias las vías de señalización mitocondrial las que pueden inducir el envejecimiento y la senescencia celular como por ejemplo la función alterada de ETC, la dinámica mitocondrial alterada (fusión y fisión) y la pérdida de la homeostasis del calcio (2, 4).

Es vital señalar que el ADNmt es heredado por vía materna, siendo el ADNmt paterno eliminado en el momento de la fecundación. Antes de este momento, la proporción de moléculas de ADNmt aportadas por el ovocito es más elevada a la de las moléculas de ADNmt aportadas por el espermatozoide, siendo 1:15860. Tras la fecundación, gracias a mecanismos de selección negativa como la mitofagia, todo resto de mitocondrias procedente de la vía paterna queda eliminado provocando que en estadio de embrión de 4 -8 células el ADNmt paterno sea indetectable. Esta herencia uniparental permite rastrear el linaje materno a lo largo del tiempo (4, 5). Por otro lado, el proceso de replicación de las mitocondrias es fundamental para mantener la función y la integridad de estos orgánulos. Se trata de un complejo proceso que engloba la duplicación del ADNmt, la división de la mitocondria madre y la segregación de las mitocondrias hijas a las células descendientes.

1. Replicación del ADNmt. Existen tres modelos propuestos para la explicar la replicación del ADNmt pero el más aceptado es el modelo de desplazamiento de hebras (SDM). La replicación en este modelo es continua desde dos orígenes distintos, OriH y OriL, dedicados a la replicación de la cadena H y L respectivamente. La replicación del ADNmt se inicia a partir de OriH. La ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT) sintetiza una secuencia corta de ARN que prepara la posterior replicación catalizada por la ADN polimerasa γ (Pol γ). Precediendo a Pol γ , la helicasa Twinkle progresa desenrollando el ADN. La cadena H expuesta queda enlazada por una proteína mitocondrial de unión monocatenaria (mtSSB) para evitar eventos de replicación erróneos. Una vez alcanzado OriL, se forma una estructura de tallo-bucle de cadena simple lo que bloquea la unión de mtSSB y promueve el inicio de replicación de la cadena L. La estructura de tallo-bucle es reconocida por POLRMT que a su vez sintetiza un cebador corto de ARN en la región de OriL. Pol γ reemplaza a POLRMT y la

replicación de las dos hebras sucede de manera unidireccional para acabar obteniendo dos moléculas hijas completas de ADNmt de cadena doble (6).

2. División de la mitocondria. Este proceso es conocido como fisión mitocondrial y está regulado principalmente por dos proteínas: la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1), localizada libremente en el citoplasma de las células, y la proteína de fisión 1 (Fis1) que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria. La Drp1 es una GTPasa grande que se recluta y se desplaza hacia el exterior de la mitocondria anclándose en la membrana externa mitocondrial gracias a Fis1. Cientos de proteínas Drp1 se ensamblan para formar una espiral y envuelven las porciones delgadas de los túbulos mitocondriales, estrangulándolos y escindiendo simultáneamente a las membranas externa e interna. Como resultado se obtienen dos mitocondrias hijas (7).
3. Segregación de las mitocondrias hijas. Una vez la célula se encuentra en la fase G2 de la interfase y en la fase mitótica del ciclo celular, las mitocondrias resultantes de la fisión se distribuyen espacialmente por todo el soma permitiendo la distribución equitativa de las mitocondrias a cada una de las células hijas tras la mitosis (8).

Se estima que aproximadamente en cada oogonia existen un total de 200 mitocondrias (4) mientras que, debido al aumento continuo de éstas durante la maduración del folículo, en los ovocitos en metafase II (MII) se pueden encontrar 100 000 mitocondrias y un rango de 50 000 a 550 000 de copias de ADNmt (2, 4). Existen varias diferencias en morfología y estructura de las mitocondrias de los ovocitos respecto a las de las células somáticas siendo más pequeñas (menor de 1 μ m) y esféricas y con menos crestas truncadas en los ovocitos maduros (4). Pero incluso las mitocondrias de los ovocitos presentan cambios a lo largo del desarrollo temprano que tiene lugar previo a la implantación, se vuelven más alargadas en embriones de ocho células, con un diámetro de 2,5 μ m, con más crestas y una matriz menos densa que la de los ovocitos maduros. Al quinto y sexto día tras la fecundación del ovocito, una vez formado el trofoectodermo y la masa celular interna, es cuando esta transición morfológica se completa (2, 4).

El papel de la mitocondria en la función reproductiva femenina se ha demostrado en modelos animales y se ha probado en reproducción humana asistida (4). Se ha demostrado que el envejecimiento reproductivo femenino está ligado a unas mayores tasas de infertilidad, aborto espontáneo y defectos de nacimiento, como por ejemplo la trisomía

en el cromosoma 21, por lo que se está estudiando la posibilidad de que la disminución de calidad ovocitaria no tenga como primera causa la edad materna avanzada sino que sean las alteraciones en el número de copias de ADNmt, la carga mutacional en la mitocondria y función mitocondrial en los ovocitos los causantes primarios (2, 4).

Tal es así que las mitocondrias se encuentran en el punto de mira debido a su implicación en enfermedades humanas graves (9). Las enfermedades mitocondriales tienen una prevalencia de 1:5000 aproximadamente, pero es la mayor parte de la población, incluyendo personas completamente sanas, las que cuentan con mutaciones en su ADNmt (9, 10). El ADNmt presenta una elevada tasa de mutaciones que son las que constituyen las patologías genéticas hereditarias más frecuentes siendo uno de cada 200 nacidos vivos portadores de este ADNmt mutado. A pesar de que no todos los descendientes desarrollan la enfermedad, las mujeres seguirán transmitiendo la mutación excepto en las ocasiones en las que sea una mutación de novo (10). Según la mutación y el nivel de ADNmt mutado, los síntomas pueden variar de leves a letales, por ejemplo, las mutaciones deletéreas del ADNmt parecen estar asociadas con un inicio tardío de enfermedades que son degenerativas (Alzheimer, Parkinson, cánceres comunes, etc.). Aun así, no existen tratamientos curativos sino paliativos, por lo que el tratamiento más efectivo es prevenir la transmisión de ADNmt mutado a las siguientes generaciones (9).

Por todo lo arriba expuesto, en esta revisión bibliográfica se va a analizar las técnicas de reemplazo mitocondrial (MRT) como opción para la no transmisión de enfermedades mitocondriales y como posible solución a la infertilidad causada por las mitocondrias.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda sistemática de diferentes artículos en buscadores como Pubmed o Science Direct y en diferentes revistas relacionadas con la Reproducción Humana Asistida mediante el uso de términos del vocabulario Medical Subjects Headings (MeSH) como mitochondrial diseases, mitochondrial replacement therapy, mitochondrial DNA, ethics, female infertility.

De un total de 59 artículos obtenidos y tras una exhaustiva lectura y comprensión así como el descarte de aquellos que no obtuviesen información relevante que diese respuesta a los objetivos presentados en esta revisión y cuya publicación datase de fechas anteriores a los avances que esta técnica presenta en la medicina reproductiva, empleando un total de 28 artículos en esta memoria.

OBJETIVOS

Determinar la eficacia y riesgos de las Técnicas de Reemplazo Mitocondrial.

Evaluar las ventajas de unas técnicas frente a otras a nivel clínico y ético.

Valorar la relación entre la mala calidad ovocitaria y la mala calidad mitocondrial.

1. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LAS ENFERMEDADES DE ORIGEN MITOCONDRIAL

Los defectos presentes en el ADNmt de los ovocitos pueden estar asociados a diferentes enfermedades. Las enfermedades de origen mitocondrial son hereditarias o causadas por mutaciones. Las personas con enfermedades del ADN mitocondrial pueden tener una combinación de ADNmt sano y mutado en sus células, conocido como heteroplasmia, que podría afectar a la gravedad de su enfermedad. En algunos casos, la terapia de reemplazo mitocondrial es la única forma de prevenir la transmisión de estas enfermedades (3).

A mayor porcentaje de moléculas de ADNmt mutado, mayor es el nivel de heteroplasmia. Se cree que no es hasta el alcance del 60% de heteroplasmia para las deleciones y alrededor de 90% para las mutaciones puntuales cuando estas enfermedades metabólicas se desarrollan clínicamente (10, 11). A partir de este umbral, la gravedad de la enfermedad aumenta en el mismo orden que la heteroplasmia. Las mujeres portadoras de ADNmt mutado tienen diferentes opciones para conseguir una descendencia libre de enfermedades mitocondriales: adopción; gestación con un óvulo de donante no emparentado; diagnóstico genético preimplantacional (DGP; biopsia de blastocistos) para seleccionar embriones sanos y diagnóstico genético prenatal (biopsia amniótica) con la opción de interrupción del embarazo (10).

Solo el DGP y el diagnóstico genético prenatal harían posible obtener descendencia relacionada genéticamente y sana en caso de madre portadora. Aunque es importante que los embriones y ovocitos seleccionados presenten un nivel de heteroplasmia bajo, esto no asegura que la progenie no acabe desarrollando la patología mitocondrial. Esto es debido al cuello de botella y a la deriva genética aleatoria (10).

En la deriva genética aleatoria, los niveles de heteroplasmia cambian con el tiempo, especialmente durante el desarrollo del embrión debido a la relajación en el ciclo mitocondrial (distribución asimétrica de las mitocondrias a las células hijas durante la mitosis). Como consecuencia, cuando se genera un embrión a partir de un ovocito heteroplásmico, el nivel final de ADNmt mutado puede diferir mucho entre los tejidos del mismo individuo, lo que respalda la variedad fenotípica observada en las enfermedades mitocondriales (incluida la ausencia de síntomas) (10). Los cambios rápidos en la heteroplasmia se observaron por primera vez en pedigríes de vacas Holstein y, posteriormente, se realizaron observaciones similares en numerosas especies de

vertebrados e invertebrados, incluidos en humanos. Estas observaciones sugirieron la existencia de un cuello de botella genético durante la transmisión materna del ADNmt (12).

La menor cantidad de mitocondrias se observa en las células germinales primordiales (CGP) más tempranas, situadas en el endodermo del saco vitelino de embriones de 3 semanas, con menos de 10 mitocondrias por célula. Durante la migración de las CGP hacia las crestas gonadales, el número de mitocondrias aumenta y con ello tiene lugar la replicación del ADNmt. Tras la diferenciación en oogonias, el número medio estimado de mitocondrias por célula es superior a 200 y cuando se alcanzan un total de 7 millones de oogonias en la semana 20 de gestación, el número total de mitocondrias es de 35 mil millones. Durante el paquiteno de la primera división meiótica, las mitocondrias se replican dando apariencia de collar o corona alrededor del núcleo llegando a un total de 1500 por célula. Finalmente, un ovocito adulto en reposo tiene aproximadamente 6000 mitocondrias y con la reanudación del desarrollo folicular puede aumentar hasta 300 000 (13). La ausencia de replicación del ADNmt entre la fecundación y la formación de CGP implica una reducción de unas 300 000 copias de ADNmt en los ovocitos maduros a 200 tras la diferenciación de oogonias lo que evidencia que es en la etapa de CGP previa a la migración donde se ubica el sitio principal para el cuello de botella, cuando el número de copias de ADNmt por célula llega a ser inferior a diez (3, 11, 13). En consecuencia, la división y diferenciación celular impulsan la segregación de variantes de ADNmt entre las células hijas, lo que lleva a niveles variables dentro de los tejidos y células de un tejido dado en el feto. Posteriormente, las células hijas amplifican selectivamente las escasas moléculas de ADNmt hasta obtener las altas cantidades presentes en los ovocitos maduros, causando disparidad de heteroplasmia entre los ovocitos de una misma mujer y permitiendo la transmisión de una enfermedad mitocondrial a la descendencia (10, 11).

Las enfermedades mitocondriales atribuibles a defectos en OXPHOS son, mayoritariamente, enfermedades graves que afectan a uno de cada 8000 individuos. Esto puede resultar en un desenlace fatal o causar morbilidad crónica afectando además a los tejidos que más energía requieren como son el corazón, el hígado, los riñones y el sistema nervioso central, entre otros (14). Un correcto funcionamiento de la mitocondria no solo depende del ADNmt, sino también de proteínas importadas del citoplasma y que están codificadas por ADNn (10). Por ello, los trastornos mitocondriales pueden estar causados

tanto por alteraciones genéticas de genes codificados por ADNmt como ADNn (Tabla 1) y las personas afectadas suelen ser heteroplásmicas.

En 1988 se describieron por primera vez las enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt. A partir de entonces, más de 100 deleciones y 50 mutaciones puntuales asociadas a enfermedades humanas han sido identificadas. Debido al gran número de personas, de todas las edades, diagnosticadas con estos trastornos, el interés por su estudio ha crecido exponencialmente. Hoy por hoy, no existe la cura para estas enfermedades, tan solo tratamientos para aliviar los síntomas o retrasar el avance (14). Es aquí donde entra en juego la terapia de reemplazo mitocondrial con el fin de conseguir una descendencia genéticamente relacionada y, sobre todo, sana.

SÍNDROME	GENÉTICA	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
Enfermedades mitocondriales con inicio durante la infancia		
Origen mitocondrial		
<u>Síndrome de Pearson</u>	Deleción de ADNmt única y a gran escala o reordenamientos de ADNmt (a menudo esporádicos)	Anemia sideroblástica de la infancia asociada a disfunción pancreática exocrina y/o endocrina, pancitopenia y tubulopatía renal.
Origen nuclear		
<u>Síndrome de Alpers-Huttenlocher</u>	ADNn (relacionado con el gen <i>POLG</i> que codifica la subunidad alfa del ADN polimerasa gamma, Poly)	Epilepsia intratable, regresión psicomotora y enfermedad hepática.
<u>Espectro de miocerebrohepatopatía infantil</u>		Neuropatía, ataxia, hipotonía, mioclonías, coreoatetosis y parkinsonismo, además de tubulopatía renal.
<u>Espectro de neuropatía por ataxia y ataxia sensorial, neuropatía, disartria y oftalmoplejía</u>		Neuropatía axonal sensorial con ataxia sensorial y cerebelosa variable.
<u>Síndrome de MEMSA</u>		Epilepsia, oftalmoplejía externa progresiva, convulsiones, disartria, demencia, espasticidad y miopatía.
<u>Síndrome de Senger</u>	ADNn (mutaciones en el gen <i>AGK</i> que codifica la enzima acilglicerol quinasa mitocondrial)	Cataratas congénitas, miocardiopatía hipertrófica, miopatía esquelética, intolerancia al ejercicio y acidosis láctica. Pacientes con o sin depleción de ADNmt en el músculo.
<u>Síndrome de MEGDEL</u>	ADNn (mutaciones en el gen <i>SERAC1</i> que codifica la proteína 1 con sitio activo de la serina)	Hipoacusia neurosensorial, encefalopatía, retraso del crecimiento, hipotonía, retraso psicomotor, distonía, espasticidad, hipoglucemia, hepatopatía y acidosis láctica.
Origen mitocondrial y nuclear		
<u>Síndrome de Leigh</u>	> 75 genes en ADNn y ADNmt	Períodos agudos de regresión del neurodesarrollo seguidos de recuperación parcial, hipotonía, distonía, hipopnea, disfagia, epilepsia, retraso del crecimiento, encefalopatía y lesiones de los ganglios basales y del tronco encefálico.
<u>Acidosis láctica congénita</u>	ADNn, mutaciones puntuales de ADNmt de novo o mutaciones puntuales de ADNmt heredadas.	Debilidad neuromuscular progresiva, acumulación de lactato en la sangre, orina y/o líquido cefalorraquídeo.

Enfermedades mitocondriales en adultos		
Origen mitocondrial		
<u>Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)</u>	Mutaciones en ADNmt, como en el gen de la oxidorreductasa <i>NADH-Q</i> (componente de los complejos I y III). Requiere una carga de ADNmt mutante superior al 60% para que se manifieste fenotípicamente	Pérdida visual subaguda bilateral indolora, distonía, síndrome de preexcitación cardíaca y neuropatía óptica hereditaria de Leber asociados con síntomas similares a la esclerosis múltiple.
<u>Síndrome de Kearns-Sayre</u>	Deleción única de ADNmt a gran escala (a menudo esporádica)	Oftalmoplejía externa progresiva, retinopatía pigmentaria, niveles de proteína en líquido cefalorraquídeo superior a 1g/L, ataxia cerebelosa, anomalías de la conducción cardíaca, miopatía, diabetes mellitus, sordera, debilidad bulbar y demencia.
<u>Síndrome de miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares</u>	Mutaciones en ADNmt, como la variante m.3243A>G en el gen <i>MT-TL1</i> , y otras 23 variantes patogénicas en <i>MT-TL1</i> y en otros genes de ADNmt (por ejemplo, <i>MT-TF</i> , <i>MT-TV</i> y <i>MT-TQ</i>)	Episodios similares a un accidente cerebrovascular, sordera, diabetes mellitus, retinopatía pigmentada, cardiomiopatía, ataxia cerebelosa, convulsiones, encefalopatía, acidosis láctica y miopatía mitocondrial.
<u>Epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares (MERRF)</u>	Mutaciones en ADNmt, como la variante m.8344A>G en el gen <i>MT-TK</i> , y otras variantes patogénicas en los genes <i>MT-TF</i> , <i>MT-TL1</i> , <i>MT-TI</i> y <i>MT-TP</i> . Requiere una carga de ADNmt mutante superior al 85% para que se manifieste fenotípicamente	Epilepsia mioclónica progresiva, ataxia, debilidad, retinopatía pigmentada, pérdida auditiva neurosensorial, acidosis láctica, lipomas, espasticidad y defectos de conducción cardíaca.
<u>Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa</u>	Mutaciones en ADNmt, como m.8993T>G en el gen <i>MT-ATP6</i> , que es la variante más común, y m.8993T>C, una variante menos grave	Neuropatía sensitivomotora, ataxia y retinopatía pigmentaria, convulsiones, problemas de aprendizaje, demencia, debilidad muscular neurogénica proximal, anomalías de los ganglios basales, pérdida auditiva neurosensorial, baja estatura, oftalmoplejía crónica externa progresiva, defectos de conducción cardíaca, obstructiva, apnea del sueño y trastornos neuropsiquiátricos.
Origen nuclear		
<u>Encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial</u>	Gen <i>TYMP</i> , que codifica la destimidina fosforilasa, gen <i>RRM2B</i> , que codifica la subunidad M2B de la ribonucleótido-difosfato reductasa y gen <i>POLG</i> .	Alteración de la motilidad gastrointestinal, debilidad y atrofia muscular, oftalmoplejía externa progresiva, neuropatía, retinopatía, pérdida de la audición, leucoencefalopatía y disminución de la actividad de TYMP*
Origen mitocondrial y nuclear		
<u>Oftalmoplejía externa progresiva crónica</u>	Gen <i>TYMP</i> (nuclear)	Dismotilidad gastrointestinal, debilidad y atrofia muscular, neuropatía, retinopatía, pérdida de audición, leucoencefalopatía y actividad reducida de TYMP.
	Gen <i>POLG1</i> , que codifica la subunidad $\gamma 1$ de la α -ADN polimerasa (mitocondrial)	Ataxia, neuropatía sensorial periférica, parkinsonismo, insuficiencia ovárica prematura, síntomas psiquiátricos, síndrome MELAS y epilepsia.
	Gen <i>POLG2</i> , que codifica la subunidad $\gamma 2$ de la ADN polimerasa (nuclear)	Ptosis y miopatía proximal, distrofia, ataxia cerebelosa y síntomas gastrointestinales

Origen mitocondrial y nuclear (continuación)		
<u>Oftalmoplejía externa progresiva crónica</u>	Gen <i>MPV17</i> , que codifica la proteína MPV17 (mitocondrial)	Debilidad de las extremidades distales, neuropatía, intolerancia al ejercicio, diabetes mellitus, ptosis, pérdida de la audición, alteración de la motilidad gastrointestinal, depresión y parkinsonismo.
	Gen <i>DGUOK</i> , que codifica la desoxiguanosina quinasa (nuclear)	Intolerancia al ejercicio, debilidad de la cintura, calambres musculares y disfagia ocasional.
	Gen <i>TK2</i> , que codifica la timidina quinasa 2 (nuclear)	Ptosis, aleteo escapular, debilidad y atrofia muscular facial y proximal, disfagia y deficiencia respiratoria.
	Gen <i>RRM2B</i> (nuclear)	Pérdida de audición, disfunción bulbar, enfermedad renal y trastornos gastrointestinales.
	Gen <i>C10orf2</i> , que codifica la proteína Twinkle (nuclear)	Oftalmoplejía externa progresiva aislada con o sin miopatía proximal leve e intolerancia al ejercicio, fatiga, pérdida de audición, síntomas psiquiátricos de parkinsonismo y compromiso cardíaco.
	Gen <i>SLC25A4</i> , que codifica la translocasa 1 de ADP/ATP (nuclear)	Oftalmoplejía externa progresiva indolente o leve con o sin ptosis, debilidad facial, hipoacusia leve, síntomas psiquiátricos y neuropatía.
	Gen <i>SPG7</i> , que codifica paraplegina (nuclear)	Ataxia, atrofia óptica, miopatía, paraparesia espástica y atrofia cerebelosa.
	Gen <i>AFG3L2</i> , que codifica la proteína 2 similar a AFG3 (nuclear)	Ataxia, paraparesia espástica, miopatía y atrofia cerebelosa.
	Gen <i>OPAI</i> , que codifica una proteína de 120 kDa similar a la dinamina (nuclear)	Atrofia óptica, pérdida visual de aparición temprana, ataxia y sordera, espasticidad, neuropatía axonal, diabetes mellitus, epilepsia y demencia.
	Gen <i>C20orf7</i> , que codifica la exonucleasa 1 de mantenimiento del genoma mitocondrial (nuclear)	Debilidad muscular proximal, atrofia muscular generalizada, deficiencia respiratoria, insuficiencia renal crónica, arritmias cardíacas y depresión.
	Gen <i>ADN2</i> , que codifica la helicasa/nucleasa ADN2 dependiente de ATP para la replicación del ADN (nuclear)	Miopatía progresiva.
	Gen <i>RNASEH1</i> , que codifica la ribonucleasa H1 (nuclear)	Miopatía, disfagia y signos espino-cerebelosos.
	Gen <i>DNM2</i> , que codifica dinamina 2 (nuclear)	Debilidad facial y proximal, neuropatía axonal y miocardiopatía.

Tabla 1. Síndromes clínicos, patrón de herencia y características fenotípicas de las enfermedades mitocondriales (12, 14).

2. INFERTILIDAD, MALA CALIDAD OVOCITARIA Y LAS MITOCONDRIAS

Los cambios socioeconómicos del siglo XX han provocado un retraso en la maternidad debido a la participación de las mujeres en el mundo laboral (14). Este retraso conlleva una disminución en el rendimiento de ovocitos y tasas de embriones euploides lo que ha supuesto que la edad materna avanzada sea considerada la principal causa de infertilidad

en los países desarrollados (15, 16). Aunque los posibles mecanismos que contribuyen al envejecimiento ovárico y a la infertilidad no se conocen del todo, existe un consenso que culpabiliza a la disfunción mitocondrial incluyendo la acumulación de mutaciones de ADNmt, una desregulación en la homeostasis del calcio, exceso de ROS, fallos en el control de calidad mitocondrial y un suministro de energía escaso durante el ensamblaje del huso, entre otros (1, 11, 15, 17). Es por ello por lo que una opción a barajar en estos casos sería aplicar MRT.

Las mujeres nacen con un número fijo de ovocitos que se diferencian a partir de la oogonia. La oogonia se forma por división mitótica en el feto femenino y se alcanza un máximo de 7 millones aproximadamente en la semana 20 de gestación. Posteriormente entra en meiosis dando lugar a los ovocitos primarios que sufren apoptosis fisiológica y atresia folicular provocando que de los 1-2 millones de ovocitos que se tienen al nacer, se llegue a la pubertad con 400 000. Estos datos evidencian el deterioro cuantitativo que los ovarios sufren y que puede llegar a manifestarse como una reserva ovárica disminuida. Por otro lado también existe el deterioro cualitativo que se refleja en la competencia de los ovocitos, o lo que es lo mismo, en la capacidad para reiniciar el proceso meiótico y someterse a la fecundación y al desarrollo preimplantacional (15).

2.1 Disfunción cualitativa del ADN mitocondrial en el envejecimiento ovárico

La disminución de la calidad del ADNmt puede deberse a mutaciones, bases oxidativas y roturas de hebras. Esto supone un problema pues las mitocondrias son particularmente importantes en la contribución materna al desarrollo embrionario (15, 18).

El ADNmt tiene una tasa mutacional 25 veces mayor a la del ADNn y probablemente se deba a la proximidad al ETC y ROS. Además, a causa del periodo de reposo durante la detención meiótica de los ovocitos desde el nacimiento hasta el reinicio en la pubertad, aumenta la tasa de mutaciones del ADNmt asociadas al envejecimiento (15, 18). Aparentemente, la mitocondria no está adaptada para el desarrollo de una vida larga pero se ha visto que pueden escapar al daño mitocondrial oxidativo provocado por ROS gracias a que durante el periodo de latencia se produce una remodelación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial a través de la eliminación del complejo mitocondrial I (19). Aun así, el ADNmt acumula mutaciones de manera progresiva con el paso del tiempo. Es frecuente que en las mujeres portadoras de mutaciones de ADNmt, la reserva ovárica se vea reducida. Se ha propuesto que la atresia folicular sea un

mecanismo para eliminar ovocitos primarios con alta carga mutacional, lo que podría explicar la baja reserva ovárica (14, 18, 19).

2.2 Disfunción cuantitativa del ADN mitocondrial en el envejecimiento ovárico

Generalmente, el éxito de las funciones mitocondriales depende de la capacidad para equilibrar el suministro de ATP para los eventos más críticos del desarrollo y para ello es necesario un mínimo de copias de ADNmt y su replicación durante la maduración de los ovocitos (19).

En mujeres, el contenido de ADNmt de los ovocitos es un factor determinante durante la fecundación y el desarrollo embrionario. Es bien conocido que el número de copias de ADNmt es menor en ovocitos de mujeres mayores o con baja reserva ovárica. Otro ejemplo de disfunción cuantitativa en el envejecimiento ovárico son las deleciones de ADNmt. Estas deleciones aumentan con la edad materna avanza y se ha visto que durante el periodo posmenopáusico tiene lugar un aumento en la frecuencia de deleción de 4977 pares de bases del ADNmt (15).

La menopausia, la etapa final del proceso de envejecimiento ovárico, tiene lugar a una edad media de 51 años en la población caucásica aunque bien es cierto que se puede dar antes o después dependiendo de la influencia de factores ambientales y genéticos. La menopausia está precedida por 10 años durante los que el ciclo menstrual se muestra irregular y la fertilidad de la mujer se ve reducida. En mujeres que sufren de menopausia precoz se ha comprobado una disminución del ADNmt en ovocitos inmaduros asociada con la insuficiencia ovárica. Esto puede deberse a una mutación en una polimerasa de ADNmt específica (*POLG1*) que se traduce en una insuficiente capacidad de replicación del ADNmt y que puede conducir a su eliminación (3, 15, 18).

2.3 Homeostasis del calcio mitocondrial en ovocitos

Las mitocondrias juegan un papel importante en la activación de los ovocitos y en el desarrollo embrionario a través de la modulación de calcio (Ca^{2+}). Antes de la fecundación, los ovocitos maduros necesitan las oscilaciones de Ca^{2+} desencadenadas por los espermatozoides para varios procesos, como la reanudación de la meiosis, el bloqueo de la polispermia, la descondensación de la cromatina masculina, el reclutamiento de ARNm maternos y la formación de los pronúcleos. La homeostasis del Ca^{2+} en los ovocitos posovulatorios depende de una actividad mitocondrial correcta. Si existe una transferencia de Ca^{2+} excesiva desde el retículo endoplasmático (RE) a la mitocondria

puede que la fosforilación oxidativa y la homeostasis se bloqueen, aumente el estrés oxidativo y se induzca la apoptosis. Por el contrario, una baja transferencia de Ca^{2+} se traduce en una crisis bioenergética. En los ovocitos envejecidos se ha observado una menor cantidad de Ca^{2+} almacenado en el RE, una captación alterada de Ca^{2+} citoplasmático debido a una menor expresión de ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y una menor disponibilidad de ATP secundaria a una funcionalidad mitocondrial alterada. Eso indica la esencialidad de la homeostasis del calcio mitocondrial para el mantenimiento de la función metabólica mitocondrial; por lo tanto, su desregulación puede contribuir a la patología (11, 17).

2.4 Suministro de energía mitocondrial durante ensamblaje del huso

Una disfunción respiratoria en la mitocondria a causa del ADNmt dañado puede bloquear las funciones de otros orgánulos como por ejemplo el ensamblaje del huso (1). Existe un mayor porcentaje de huso interrumpido, un mayor porcentaje de colocación anormal de tubulina de la placa metafásica durante la segunda división meiótica y un mayor porcentaje de fallo en la segregación cromosómica en ovocitos de mujeres de edad avanzada en comparación con mujeres más jóvenes (17). Durante el ensamblaje del huso, las mitocondrias se transportan a la periferia del sitio de ensamblaje a través de la dineína que consume energía. El proceso de organización del huso por microtúbulos y el mantenimiento de la inestabilidad dinámica del huso para ayudar a promover la segregación cromosómica durante la meiosis y la mitosis requieren un suministro adecuado de ATP, de lo contrario, el ciclo celular se detendrá causando aberraciones cromosómicas que acabaran determinando la calidad del ovocito y del embrión (1, 16).

2.5 Equilibrio redox

La fosforilación oxidativa mitocondrial es un proceso bioquímico reductor y oxidante que produce ROS como subproducto. Es importante neutralizar ROS porque, en exceso, pueden dañar el ADN celular, los lípidos y las proteínas causando deterioro celular y patologías asociadas como el envejecimiento del ovocito (17).

Los mecanismos de protección mitocondrial contra la fuga de electrones y el exceso de ROS incluyen las enzimas superóxido dismutasa, que convierten el superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las mitocondrias dependen de las actividades combinadas de las peroxirredoxinas 3 y 5, la tiorredoxina 2 y la tiorredoxina reductasa 2 para descomponer el peróxido de hidrógeno generado localmente y reducir las proteínas oxidadas. Las proteínas mitocondriales son específicamente susceptibles a la oxidación y

al daño oxidativo. Cuando se compara con la concentración del antioxidante glutatión (GSH), las mitocondrias muestran una mayor proporción de tioles proteicos expuestos a GSH en comparación con el citosol y también tienen un pH ligeramente más alto. Por lo tanto, aunque los estados redox celulares y mitocondriales están estrechamente conectados, mantener la homeostasis redox-metabólica en el medio mitocondrial es un desafío (17, 19).

La mayoría de las reacciones redox celulares utilizan el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), que existe en formas oxidadas, reducidas y fosforiladas. Los niveles de NAD disminuyen con el aumento de los años, lo que se ha relacionado con varias características del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, específicamente la disminución mitocondrial (19).

2.6 Calidad mitocondrial

Generalmente, la disfunción mitocondrial celular solo persiste si los mecanismos de control de calidad fallan. Una forma para controlar la calidad mitocondrial es a través del equilibrio dinámico de fusión y fisión de la red mitocondrial (11, 17). La fusión se rige por las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) en la membrana externa, y la atrofia óptica 1 (Opa1) localizada en la membrana interna. Cuando la célula carece de Mfn1 y Mfn2 no se produce la fusión de la membrana externa y se obtiene un fenotipo consistente con el envejecimiento reproductivo femenino (por ejemplo, pérdida de células apoptóticas que resulta en un agotamiento folicular acelerado). La ausencia de Mfn1 también causa un bloqueo en la foliculogénesis que se traduce en la interrupción del crecimiento de ovocitos y de la ovulación, mientras que los ovocitos que no cuentan con Mfn2 presentan telómeros acortados. Por otra parte, la carencia de Opa1 imposibilita el progreso de la fusión de la membrana interna, aunque sí de la externa (11).

En cuanto al proceso de fisión, está gobernado por la proteína de fisión mitocondrial y la proteína 1 relacionada con la dinamina, que aseguran que las mitocondrias dañadas se diluyan fuera de la red y se eliminen para mantener la salud general de la red de orgánulos (17).

Mientras que el aumento de la fusión o la disminución de la fisión promueve la formación de redes mitocondriales alargadas, el aumento de la fisión y la disminución de la fusión causan fragmentación mitocondrial (11).

Otro mecanismo de control de calidad mitocondrial se lleva a cabo a través de la mitofagia y la proteostasis. Cuando las mitocondrias son disfuncionales, sufren una despolarización de membrana y pasan a ser el objetivo para una degradación a través de la mitofagia. Por otro lado, la proteostasis es esencial como mecanismo para la renovación de proteínas que equilibran la síntesis, degradación y reciclaje de proteínas. Ambos procesos aseguran la red mitocondrial y un fallo en alguno de ellos podría comprometer la salud mitocondrial (17, 18).

La disfunción mitocondrial contribuye, como ya se ha visto anteriormente, al envejecimiento y en última instancia a la senescencia. En contraste, el control de calidad mitocondrial es antagónico al envejecimiento ya que promueve la salud de la red mitocondria, su metabolismo y su contribución a la función celular general. No obstante, el envejecimiento acelera la tasa de alteraciones mitocondriales comprometiendo la efectividad de los procesos de control de calidad. Sería interesante comprobar si la modulación del control mitocondrial de la calidad celular a través de la apoptosis de los orgánulos disfuncionales puede impulsar una mejor aptitud de los ovocitos (17).

3. TÉCNICAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL

En un intento de conseguir una progenie relacionada genéticamente y sana, al DGP y el diagnóstico genético prenatal podría sumarse las técnicas de reemplazo mitocondrial y, además, ser una opción a barajar también en mujeres con problemas de fertilidad de causa mitocondrial. A continuación veremos los diferentes tipos de MRT en profundidad, así como sus especificaciones y ventajas y desventajas.

Transferencia de Vesícula Germinal (GVT)

Los ovocitos inmaduros detenidos en la profase I se caracterizan por tener la vesícula germinal como núcleos y permanecen en este estado durante años hasta que son estimulados en los ciclos menstruales. La GVT consiste en el transplante de la vesícula germinal del ovocito primario de una paciente a un ovocito de donante del que se ha extraído la vesícula germinal previamente. Una vez aplicada la técnica, el ovocito resultante ha de ser sometido a maduración in vitro para completar la meiosis y alcanzar la maduración, y así poder ser fecundado y transferido a la paciente (10).

Las principales ventajas que presenta GVT pueden ser la fácil manipulación de la vesícula germinal debido a su tamaño y la ausencia de embriones generados para llevar a cabo la

técnica. En cuanto a las desventajas, se ha visto una baja eficacia y además un desarrollo deficiente del ovocito tras la transferencia (10).

Transferencia de huso meiótico (MST)

El núcleo de los ovocitos que se encuentran en metafase II no está definido y la observación de ADNn se hace difícil debido a la ausencia de envoltura nuclear. Sin embargo, el huso meiótico, que es donde se ubican los cromosomas, si es posible observarlo con un microscopio de luz polarizada debido a las propiedades birrefringentes de los microtúbulos. La MST consiste en la transferencia del huso meiótico de un ovocito en metafase II de una paciente portadora de una enfermedad mitocondrial a un ovocito de donante sana que ha sido enucleado previamente. Posteriormente el ovocito sería fecundando y transferido (Figura 1) (10).

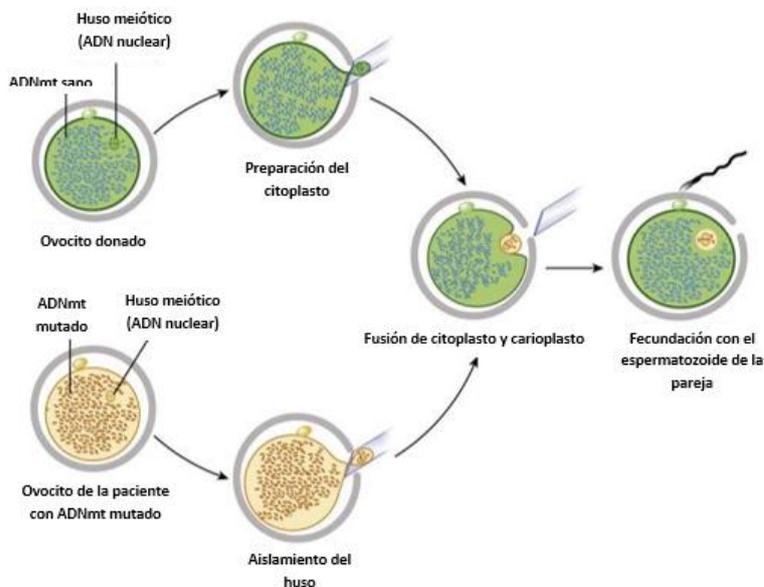


Figura 1. Transferencia de huso meiótico. Los ovocitos no fecundados portadores de ADNmt donante y mutado (izquierda) contienen cromosomas femeninos ensamblados en husos. Los husos de ambos ovocitos se extraen en carioplastos. Debido al pequeño tamaño del huso, los carioplastos llevan menos mitocondrias y menos ADNmt mutado. Los carioplastos de los ovocitos de los pacientes se

Esta técnica es estrictamente preventiva ya que el embrión generado estará libre de la enfermedad mitocondrial en cuestión desde el momento de la fecundación (21).

Al igual que en la GVT, no se requiere la generación de embriones, lo que supone una gran ventaja. Por otro lado, habría que destacar el reducido número de mitocondrias que presenta el huso lo cual puede traducirse en un menor arrastre de éstas al ovocito de la donante, solventando en gran parte una de las mayores preocupaciones del reemplazo mitocondrial. Sin embargo, existen otros puntos que hay que tener en cuenta a la hora de entender la factibilidad de una técnica de reemplazo, las desventajas. En este caso, tenemos la desventaja de la difícil visualización del huso meiótico y la activación

prematura de maduración de un ovocito debido a la sensibilidad del huso frente a la micromanipulación. Además, también es frecuente en ovocitos de mujeres de edad materna avanzada la no transferencia de un cromosoma que se encuentre disperso dentro del citoplasma del ovocito. El mayor punto a favor de la MST es el gran número de artículos publicados referentes a su aplicación con resultados positivos y sólidos (10).

En primer lugar, para llevar a cabo la MST, inhibidores del citoesqueleto, como la citocalasina B, son indispensables para hacer menos rígidos el citoplasma y la membrana celular y así evitar la lisis, tanto durante el aislamiento como la transferencia en sí. Por otro lado, HVJ-E (virus Sendai inactivado) es necesario para inducir de manera eficiente la fusión de la membrana al prevenir la activación prematura. Se ha comprobado que el HVJ-E no resulta perjudicial para los ovocitos si la exposición es breve y, además, es casi inexistente la integración cromosómica genes exógenos ni infección viral ya que se trata de un virus de ARN monocatenario de sentido negativo (14).

La metodología inicial de MST requería la sincronización de la donante de óvulos y de la paciente para la recuperación de ovocitos. Sin embargo, teniendo en cuenta las diferencias en las etapas del ciclo menstrual y en la respuesta a gonadotropinas, se comenzaron a vitrificar los ovocitos. Gracias a los avances en los procedimientos de vitrificación y desvitrificación de los ovocitos, esta opción es viable habiéndose llegado a demostrar que la transferencia de husos vitrificados a citoplasmas frescos producían mejores resultados que en los controles, dando lugar a descendencia sana. No solo eso, también se observó buenos resultados con ovocitos de donantes ya vitrificados, aunque la intención es que el desenlace final de estos ovocitos no sea para MRT (14).

Transferencia del pronúcleo (PNT)

Esta técnica requiere la creación y manipulación de cigotos. La práctica es sencilla y es que consiste en transferir los pronúcleos de un cigoto a otro previamente enucleado. Aquí entra el inconveniente ético ya que el PNT obliga a descartar uno de los embriones generados (10). Esta técnica no es estrictamente preventiva (la transferencia de genes tiene lugar una vez hay cigoto) (21).

La PNT consiste en llevar a cabo la fecundación in vitro utilizando los óvulos de la mujer afectada o portadora y los espermatozoides del futuro padre para que así, el día 1 de desarrollo, sea posible la extracción de ambos pronúcleos. Los pronúcleos son transferidos a un cigoto enucleado que cuenta con mitocondrias sanas procedentes de la

donante y se desarrolla in vitro hasta que alcanza el estado apropiado para ser transferido (Figura 2) (21).

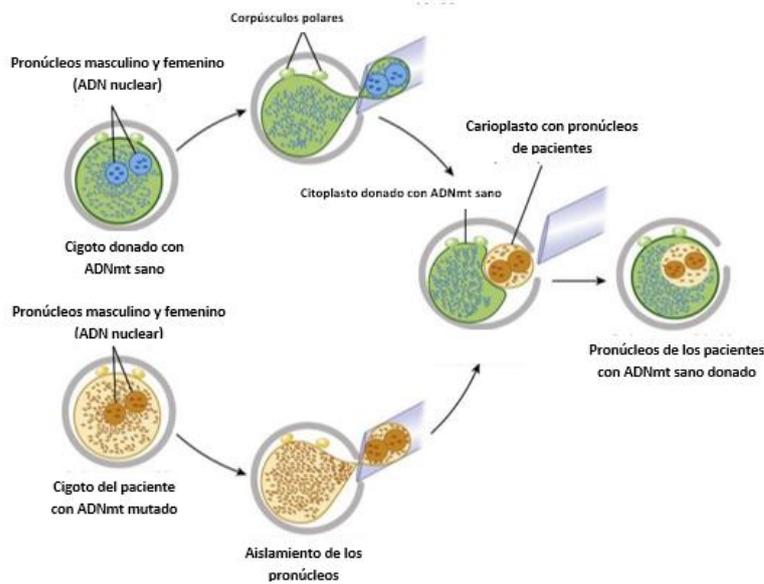


Figura 2. Transferencia del pronúcleo. Los pronúcleos masculinos y femeninos, ambos muy visibles pero similares en apariencia, se eliminan de los cigotos del paciente (abajo a la izquierda) y del donante (arriba a la izquierda) mediante aspiración a carioplastos utilizando una micropipeta. Tenga en cuenta que el carioplasto del paciente contiene citoplasma con mitocondrias y ADNmt,

conocido como arrastre. Debido al arrastre de las mitocondrias del paciente, el cigoto reconstruido aún puede contener cantidades inaceptables de ADNmt mutado (20).

A diferencia del huso, los pronúcleos si son resistentes a la micromanipulación sin llegar a desencadenar ningún evento adverso en el desarrollo embrionario y, además, son fácilmente visibles con un microscopio. No obstante, es necesario sopesar los pros y los contras de esta técnica, siendo la mayor desventaja la generación y posterior destrucción del embrión resultante tras la fecundación del ovocito de la donante, ya que supone un obstáculo ético. Otro de los contras con el que el PNT cuenta es la posibilidad de presentar una alta tasa de arrastre debido a que el citoplasma que rodea los pronúcleos es altamente rico en mitocondrias (10).

Transferencia de corpúsculos polares (PB1T/PB2T)

- a. Transferencia del primer corpúsculo polar (PB1T): el primer corpúsculo polar (PB1) se forma durante la maduración del ovocito. En este proceso, el ADN se duplica dando lugar a 2 pares de cromosomas de los cuales uno permanecerá en el ovocito y otro se empaquetará formando el PB1. El PB1T consiste en transferir el PB1 a un óvulo de donante enucleado y no fecundado (Figura 3) (21).

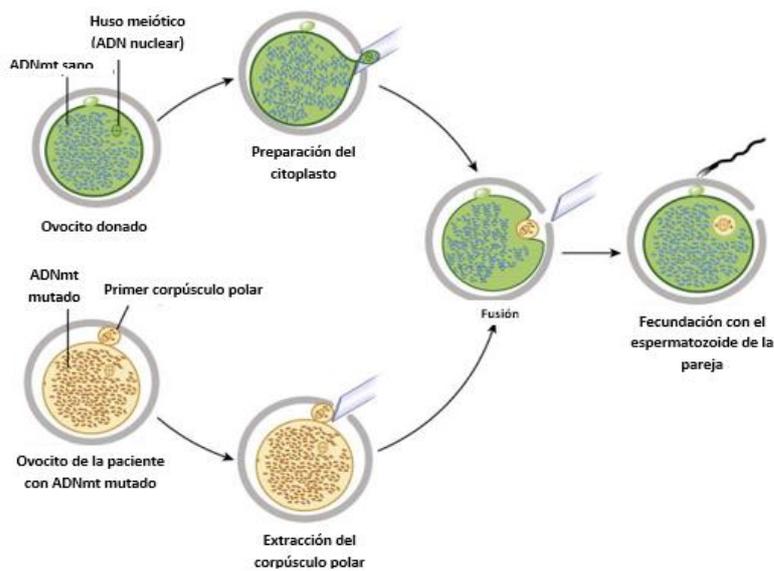


Figura 3. Transferencia del primer corpúsculo polar. El procedimiento se inicia con la recuperación de PB1 de ovocitos MII no fecundados de pacientes y es seguido por la fusión con citoplastos MII de donantes de los cuales se ha extraído el huso. Los ovocitos MII reconstruidos se fecundan y se transfieren a un receptor (20).

- b. Transferencia del segundo corpúsculo polar (PB2T): este corpúsculo se forma durante la fecundación donde un conjunto de los cromosomas se empaqueta formando el segundo corpúsculo polar (PB2) y el otro formará parte del ADN nuclear del embrión. Se trata de transferir el PB2 a un cigoto medio enucleado (Figura 4) (21).

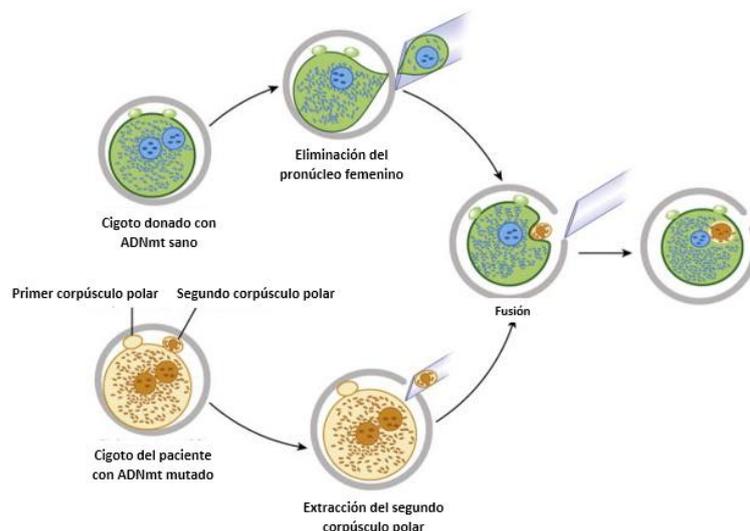


Figura 4. Transferencia del segundo corpúsculo polar. PB2 se recupera de cigotos en etapa pronuclear. Los cigotos reconstruidos se producen por transferencia de PB2 a cigotos receptores de los que se han eliminado los pronúcleos femeninos (20).

Los corpúsculos polares contienen un número reducido de mitocondrias, lo que supone una ventaja para reducir el índice de arrastre mitocondrial.

La estrategia llevada con el PB1T es estrictamente preventiva mientras que la PB2T no lo es.

En cuanto a los pros y los contras de la transferencia de corpúsculos polares, se deben diferenciar las dos técnicas, la transferencia del primer corpúsculo polar y la transferencia del segundo corpúsculo polar. Para ello, se ha elaborado la siguiente tabla donde se exponen las diferencias y las semejanzas en las ventajas y desventajas de ambas técnicas:

PB1T	PB2T
No es necesario la generación de embriones	Generación y destrucción del embrión procedente del cigoto de la donante
Fácil manipulación	Fácil manipulación
Posibles diferencias epigenéticas entre PB1 y el genoma del ovocito	Posibles diferencias epigenéticas entre PB2 y el genoma del ovocito
Bajo número de publicaciones	Bajo número de publicaciones
Posibilidad de combinar con MST	Posibilidad de combinar con PNT

Tabla 2. Ventajas (color verde) y desventajas (color rojo) de ambas técnicas de transferencia de corpúsculo polar (10).
Elaboración propia.

Bien es cierto que una de las principales objeciones o contras del uso de corpúsculos polares para el reemplazo mitocondrial es que el genoma nuclear y los corpúsculos podrían presentar diferencias epigenéticas (Tabla 2). Sin embargo, los estudios de *Wang et al. (2014)*, y *Zhang et al. (2017)* demostraron que la información genética del ovocito-cigoto y los corpúsculos polares es prácticamente la misma y que su entorno epigenético es muy similar, refutando así esta desventaja (10). Igualmente, más estudios a largo plazo son necesarios para poder confirmar que esta técnica es capaz de generar individuos sanos y sin anomalías epigenéticas, y para observar la eficacia real de PB2T debido a la dificultad que conlleva la manipulación en cigotos humanos.

4. REGULACIÓN DE MRT EN DIFERENTES PAÍSES

Bien es conocida la esperanza generada por las MRT en mujeres con problemas de fertilidad o portadoras de enfermedades mitocondriales para conseguir descendencia propia y sana. Aun así, no en todos los países se tiene la posibilidad de acceder a estas técnicas.

Debido a los desacuerdos éticos de diferentes expertos, existen grandes diferencias entre los enfoques regulatorios de MRT en todo el mundo (Tabla 3) como por ejemplo en países en los que ninguna de las técnicas está permitida (Estados Unidos, Canadá, Australia y Singapur) frente a países donde está legalizado y se desarrolla clínicamente, como en Reino Unido (22).

PAÍS	MRT PERMITIDA	OBSERVACIONES
Reino Unido	PNT	Según la Autoridad de Fecundación Humana y Embriología, solo se permite el uso de PNT o MST si existe riesgo de que el ovocito o el embrión creado a partir de ese ovocito puedan tener anomalías en el ADNmt con riesgo de desarrollar una enfermedad mitocondrial.
	MST	
Estados Unidos	Ninguna	La Oficina de Terapias Celulares, Tisulares y Génicas del Centro de Evaluación e Investigación Biológica ha optado por un enfoque bastante restrictivo con respecto a los MRT y parece poco probable que cambie a corto plazo.
Canadá	Ninguna	La legislación canadiense (Ley de Reproducción Humana Asistida) no distingue entre MRT y edición de genes. Las MRT están prohibidas (uso clínico e investigación) independientemente de si están destinadas a tratar la infertilidad o a prevenir la transmisión de enfermedades mitocondriales a la descendencia.
Australia	Ninguna	En septiembre de 2019, el Consejo Nacional de Salud e Investigación Médica comenzó su proceso de consulta, que caracterizó como "un proceso público para obtener opiniones de la comunidad australiana sobre los problemas sociales y éticos asociados con la donación mitocondrial".
Alemania	MST	Según la Ley alemana de protección de embriones: " <i>Toda persona que provoque artificialmente la penetración de un óvulo humano por un espermatozoide humano o inyecte artificialmente un espermatozoide humano en un óvulo humano, sin la intención de provocar un embarazo de la mujer de la que se originó el óvulo, será castigada con hasta tres años de prisión o una multa.</i> " Por lo tanto, la transferencia de MST y PB1 no están prohibidas en virtud del artículo 1, apartado 2.
	PB1T	
Israel	PNT	La ley de Prohibición de Intervención Genética se dirige a las intervenciones en "células reproductivas", y estas se definen muy específicamente como "espermatozoide u ovocito humano". Sin embargo, no define el término embrión y no prohíbe explícitamente la modificación genética de embriones. Una interpretación razonable de la ley implica que la MST estaría prohibida, ya que es una intervención en el ovocito, mientras que la PNT estaría permitida, ya que el ovocito fecundado ya no es una célula reproductora sino una entidad biológica a la que la ley no se refiere.
Singapur	Ninguna	El Comité Asesor de Bioética está considerando la posible legislación de MST, PNT y PBT
México	Todas	A nivel federal, la investigación sobre lo que se llama "fecundación asistida", que incluye MRT, solo está permitida cuando está dirigida a resolver problemas de infertilidad que no pueden resolverse de otra manera. A nivel estatal, hay 9 estados que prohíben la PNT porque sus constituciones locales protegen la vida humana desde el momento de la fecundación.
Ucrania	PNT	No existen restricciones legales explícitas sobre los MRT. Pero para el primer nacimiento a través de PNT (para tratar infertilidad), se requirió de una aprobación por parte de la Asociación Ucraniana de Medicina Reproductiva.

PAÍS	MRT PERMITIDA	OBSERVACIONES
Grecia	MST	Una mujer dio a luz al primer niño concebido por MST. El procedimiento estaba dirigido a tratar la infertilidad y fue logrado por un equipo compuesto de científicos y médicos españoles y griegos que trabajan en Grecia. El equipo español se encontraba trabajando en Grecia porque la ley española no lo permite y, además, sería necesario que la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida otorgase un informe favorable y que la autoridad sanitaria pertinente autorizase la(s) técnica(s) para uso experimental provisional.

Tabla 3. Las diferentes técnicas de MRT permitidas alrededor del mundo. *Elaboración propia a partir de Cohen et al. (2020).*

5. POSIBLES ALTERNATIVAS A MRT

Transferencia citoplasmática

Inicialmente, la transferencia citoplasmática se empezó a usar como un procedimiento para complementar los ovocitos de las pacientes con citoplasma de donante. El motivo de esta técnica residía en mejorar la viabilidad y competencia de los ovocitos, donde la causa subyacente se determinó como “deficiencia ooplasmática” (14). La transferencia citoplasmática se puede distinguir entre la transferencia sincrónica, donde tanto el ovocito de la donante como el de la receptora se encuentran en la misma etapa de desarrollo (por ejemplo, donante en MII joven y receptora en MII envejecido), y la transferencia asincrónica, donde el reemplazo se realiza entre dos ovocitos en etapas diferentes de desarrollo (por ejemplo, desde MII hasta MI) (23). Además de la sincronía entre los ovocitos de las pacientes, también se puede clasificar según el tipo de técnica que se lleve a cabo para la transferencia citoplasmática (24):

Transferencia ooplásmica por electrofusión con ooplasto donado (Figura 5).

1. Se coloca un ovocito de la receptora en la pipeta de Holding.
2. Mediante disección mecánica se realiza una apertura sobre la zona pelúcida.
3. A través de esa apertura, se retira el corpúsculo polar.
4. En el ovocito de la donante, se hace un espacio en la posición contraria a donde se encuentra el corpúsculo polar para evitar extraer material nuclear.

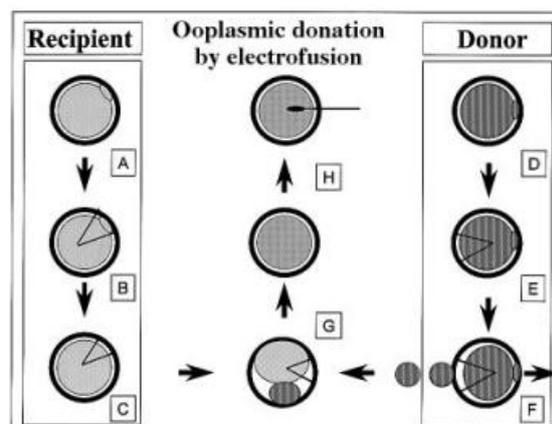


Figura 5. Transferencia ooplásmica por electrofusión con ooplasto donado (24).

5. El ovocito de la donante se sumerge en una solución que contiene relajantes de membrana y se extraen los ooplastos.
6. El ooplasto extraído de la donante se coloca en el espacio perivitelino del ovocito receptor del que ya se extrajo el corpúsculo polar. Para introducir el ooplasto de donante, éste fue succionado con una microherramienta que lo introdujo en el ovocito receptor, siendo esto la electrofusión.
7. Finalmente, se inyecta un espermatozoide en la célula híbrida fusionada que ha permanecido entre 40 y 90 minutos incubada con anterioridad.

Transferencia ooplásmica por inyección de ovocitos en estadio de MII (Figura 6).

1. Se llena una aguja de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) con polivinilpirrolidona y se inmoviliza y aspira un espermatozoide. El espermatozoide se utiliza como marcador para identificar la posición del ooplasma aspirado.

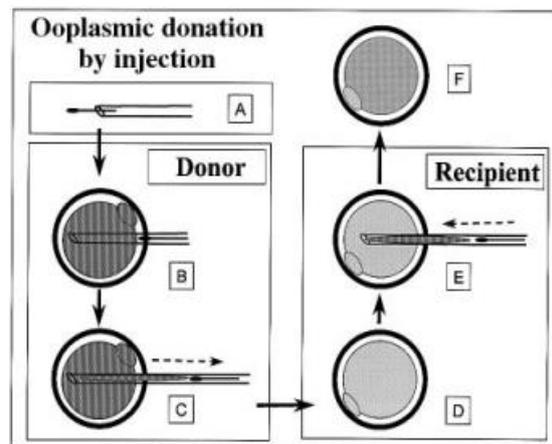


Figura 6. Transferencia ooplásmica por inyección de ovocitos en estadio de MII (24).

2. Una vez se coloca el ovocito donado en la pipeta de Holding, se perfora la membrana en la posición de las tres en punto mientras se mantiene el espermatozoide en la punta de la pipeta de ICSI. El corpúsculo polar debe estar a las 2 o a las 4 en punto para que la toma de muestra del ooplasma sea en el lado contralateral de la placa metafásica.
3. El ooplasma se aspira de áreas opuestas al corpúsculo polar, sobre las 8 o 10 en punto, usando el espermatozoide como punto de referencia. El ooplasma que se aspira supone el 7-14% del volumen ooplásmico.
4. Se coloca el ovocito receptor en la pipeta de Holding con el corpúsculo polar a las 8 en punto.
5. Con la pipeta de ICSI se rompe la membrana y se deposita el ooplasma y el espermatozoide que se encontraban en su interior.

Primero se comenzó a utilizar la electrofusión pero no se obtuvo el éxito esperado, las tasas de fecundación fueron bajas, se observaron anomalías pronucleares e incluso un desarrollo deficiente del embrión. Fue entonces cuando se empezó a emplear la transferencia ooplásmica durante ICSI que tuvo más éxito y se llegó a utilizar en algunas clínicas para pacientes con fallo recurrente de implantación obteniendo buenos resultados y recién nacido vivo (RNV) (14, 23). Cuando se empezó a llevar a cabo esta técnica no fue bajo la sospecha de que las pacientes (receptoras) contasen con ADNmt mutado en sus ovocitos. Aun así, *Brenner et al. (2000)* observaron que, a pesar de una transferencia de un volumen bastante pequeño de citoplasma, el ADNmt de la donante estaba presente en 6 de 13 embriones y en 2 de 4 muestras de sangre del cordón umbilical. Esto demuestra que la transferencia citoplasmática no es una opción de MRT ya que sería necesario transferir volúmenes muy elevados para obtener una dilución apropiada del ADNmt mutado, lo que supondría la lisis del ovocito (14). Por otra parte, han surgido preocupaciones debido a la heteroplasmia que puede darse ya que el ADNmt materno está en mayor proporción que el donado, lo que se traduce en una posible mayor cantidad de ADNmt mutado de lo esperado tras la transferencia (25).

Edición del genoma

Los avances recientes en el desarrollo de la tecnología de edición de genes nucleares, ha llevado a investigar sobre como orientarlo hacia la edición del genoma mitocondrial. CRISPR/Cas9 ha surgido como una herramienta revolucionaria para la edición de genes nucleares por lo que es interesante la posibilidad de hacer efectiva esta técnica para el ADNmt (19).

Jo et al. (2015) comprobaron que, además de detectarse en la fracción nuclear, Cas9 también se distribuía sustancialmente a otros compartimentos como al citoplasma y a las mitocondrias. Esto dio lugar a crear una nueva versión de Cas9 (mitoCas9) que se dirigiese específicamente al ADNmt añadiendo una secuencia de orientación mitocondrial (21, 26). La secuencia de orientación mitocondrial del citocromo C (localizado en la matriz de la mitocondria) se utilizó para dirigir mitoCas9 a la matriz de las mitocondrias y así interactuar con el ADNmt (26). Tras comprobar si esta nueva función de Cas9 era funcional para la edición de ADNmt, se observó que las mitoCas9 dirigidas a las mitocondrias se pueden aplicar para la edición del ADNmt junto con sgARNs (ARN guía) diseñados a medida (19, 26).

Teniendo en cuenta la contribución por parte de las mitocondrias al proceso de envejecimiento de los ovocitos y a ciertas enfermedades, este descubrimiento sobre la edición génica podría suponer un gran avance para paliar dichos escenarios (17).

A pesar de lo esperanzador que resultan estos resultados, aún deben ser validados en nuevos estudios antes de ser considerados aplicables en la medicina reproductiva humana. Sin embargo, su combinación junto a la técnica de reemplazo mitocondrial podría abrir nuevas estrategias terapéuticas contra las mitocondrias patológicas (17, 19).

TALENs

Los TALENs son nucleasas que cuentan con un dominio de unión al ADN efector similar a un activador de la transcripción de *Xanthomonas* fusionado a un dominio nucleasa FokI. Cuando estos TALENs se crean de manera que su diana sea escindir el ADNmt mutado, se conocen como mito-TALENs (21).

Yang et al. (2018) comprobaron la efectividad de mito-TALENs en células madres pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes con enfermedades mitocondriales. Las iPSC son muy prometedoras para la investigación en esta área pues se ha reportado que pueden portar varias mutaciones heteroplásmicas de ADNmt, lo que ha abierto nuevas vías para entender la relación existente entre el genotipo y el fenotipo de los tejidos y órganos afectados por mutaciones del ADNmt.

Además de comprobar su efectividad en iPSC, TALENs ya se ha utilizado para eliminar selectivamente el ADNmt mutado tanto en embriones murinos como en ovocitos de ratón sin fecundar. Estos ratones, gracias a la acción de mito-TALENs, dieron a luz a dos generaciones sucesivas de ratones sanos. Es vital destacar que tras inyectar un ARNm que codifica mito-TALEN en el ovocito de ratón heteroplásmico portador de dos haplotipos diferentes de ADNmt, se obtuvo un cambio en la heteroplasmia del ADN mitocondrial (21).

Se ha comprobado que los mito-TALENs consiguen reducir los niveles de heteroplasmia y, por tanto, de mutación del ADNmt tanto en modelos animales como en humanos. Por lo que hay que destacar el gran potencial de esta técnica para la eliminación o corrección específica de mutaciones de ADNmt (27).

6. RESULTADOS

Transferencia de Vesícula Germinal (GVT)

Muy pocos trabajos han evaluado GVT. Estas investigaciones se llevaron a cabo en modelos murinos y llamó la atención la baja eficacia de esta técnica en la generación de descendencia. De hecho, en el trabajo de *Neupane et al. (2014)* ningún embrión sobrevivió hasta el estadio de blastocisto. Esto se debe a que GVT utiliza ovocitos inmaduros que han de someterse a maduración in vitro y, actualmente, las técnicas de maduración in vitro disponibles reducen el desarrollo potencial de los ovocitos (10, 14)

Dados los malos resultados obtenidos en modelos animales, se supone que esta técnica no se empleará en ovocitos humanos hasta que se optimicen los procedimientos de maduración in vitro (10).

Transferencia de huso meiótico (MST)

De todos los trabajos que han mostrado los resultados tras emplear MST, el artículo publicado por *Tachibana et al.*, en 2009 fue un hito debido a la alta eficacia y al bajo arrastre mitocondrial (< 3%). Estos resultados apoyaron la traducción de esta técnica a un entorno humano. Se transfirió el huso meiótico entre ovocitos humanos que posteriormente fueron fecundados por ICSI y, además de los blastocistos obtenidos, se derivaron cinco líneas de células madre embrionarias (ESC). A pesar del fenotipo normal de las ESC y de las buenas tasas de transferencia obtenidas, se detectó un menor desarrollo a blastocisto en comparación con el obtenido en macacos en 2009 (43 % vs. 61 %). Esto pareció deberse a que más del 50% de los cigotos humanos obtenidos presentaban una fecundación anormal lo cual puede aumentar el riesgo de aneuploidía en el embrión imposibilitando el desarrollo correcto (10, 14).

La investigación llevada a cabo por *Wang et al.*, en 2014 fue la excepción de los resultados prometedores de otros investigadores. El arrastre mitocondrial fue bastante alto, con niveles promedios de 5,5% y 7,7%, respectivamente, en muestras de tejidos de ratones de primera y segunda generación. Es probable que este hecho se debiese a una menor cualificación de los operadores que llevaron a cabo la microinyección de los ovocitos (10).

Por otro lado, en los estudios llevados a cabo por los grupos de *Paull et al. (2013)* y *Yamada et al. (2016)* la tasa de ovocitos que alcanzaron el estadio de blastocisto fue menor que la de *Tachibana*. El motivo de la disminución en el desarrollo de los ovocitos puede residir en que en lugar de emplear ICSI, los autores optaron por la partenogénesis.

La capacidad de desarrollo de los ovocitos que se someten a partenogénesis se ve reducida. Además, el desarrollo a blastocisto fue similar al logrado por los controles, lo que apoya la hipótesis de que el bajo desarrollo de este trabajo se debiese por el tipo de activación de los ovocitos y no por el empleo de MST (10, 14).

En 2016 se reportó el primer nacimiento derivado de la aplicación clínica de una MRT, en concreto de MST, de un varón aparentemente sano, hijo de una mujer portadora de una mutación deletérea en el ADNmt (m.8993T > G) responsable del síndrome de Leigh. El desarrollo a blastocisto fue muy superior a la observada en otros trabajos realizados en humanos, aunque no fueron de buena calidad. Tan solo un blastocisto estuvo libre de aneuploidías y fue el que se transfirió al útero materno dando lugar a un RNV, quien presentó tan solo un 1% del ADNmt de la madre, pudiendo dar lugar a alguna anomalía en el futuro (10, 21). Este caso fue el que dio nombre a la *Técnica de los Tres Padres*.

En resumen, la MST es compatible con el desarrollo embrionario y ha generado nacimientos sanos tanto en animales (primates y ratones) como en humanos.

A pesar de las bajas tasas de arrastre mitocondrial derivadas de la técnica, existe el riesgo de que el ADNmt transportado aumente en la descendencia. Faltan estudios, particularmente en animales, que permitan determinar las implicaciones a largo plazo de esta técnica (10).

Transferencia del pronúcleo (PNT)

La PNT es la técnica de reemplazo mitocondrial MRT con mayor extensión bibliográfica. El primer trabajo en el que se empleó PNT fue en ratones y se demostró la compatibilidad de esta técnica con el desarrollo embrionario logrando el nacimiento de 10 ratones con fenotipo normal. Por otro lado, aunque *Sato et al.*, en 2005 consiguieron prevenir la transmisión vertical de la enfermedad mitocondrial en un modelo murino con deleciones patógenas de ADNmt, el arrastre mitocondrial llegó al 12% en el día 300. Por lo general, el arrastre mitocondrial observado en el resto de los trabajos fue muy inconsistente, desde niveles mínimos, incluso indetectables, hasta tasas cercanas al 24% en *Wang et al.* (2014). PNT ha demostrado ser capaz de alcanzar bajos niveles de arrastre, pero la gran variabilidad observada sugiere que esta técnica depende demasiado del operador y del procedimiento de micromanipulación empleado (10, 14).

En cuanto a embriones humanos, *Craven et al.* aplicaron esta técnica a aquellos que poseían un número anormal de pronúcleos logrando eliminar más del 98% de las

mitocondrias maternas, lo que, en principio, es suficiente para prevenir la manifestación clínica de la enfermedad y su transmisión a las generaciones posteriores (21).

Cabe destacar que *Hyslop et al.* (2016) observaron que el genotipo mitocondrial era inestable en cultivos prolongados de ESCs derivados de embriones sometidos a PNT. Una de estas líneas de ESCs sufrió un aumento progresivo del ADNmt materno transportado, pasando del 4% (paso 1) al 60% (paso 12) (10). Aunque no se pudo determinar la causa, se especula (entre otras razones) que un haplotipo puede tener una ventaja replicativa sobre otro en combinaciones específicas (21). Este fenómeno también ocurrió con cultivos largos de ESCs derivados de embriones con MST (10).

No cabe duda que en la PNT, al igual que en la MST, la transferencia mitocondrial difiere mucho entre estudios requiriendo estudios a largo plazo para evaluar la seguridad de la transferencia en generaciones sucesivas (14).

Transferencia de corpúsculos polares (PBT)

Wang et al. (2014) propusieron PB1T y PB2T como MRT por Wang cuando demostraron que los corpúsculos polares gozan de la información genética necesaria para el desarrollo embrionario en ratones. De igual forma, compararon los resultados obtenidos a partir de PB1T con MST y PB2T con PNT, obteniendo que la eficacia de PB1T en el desarrollo de blastocistos fue de hasta el 87,5 frente a 85,7% en MST, y logró una tasa de natalidad del 42,8 %, mientras que los resultados de PB2T fue menos eficiente que PNT (55.5% y 81.3%, respectivamente). Con respecto a los remanentes de ADNmt en las dos primeras generaciones, encontraron que el arrastre de ADNmt con PNT fue mucho mayor que con PB1T, MST y PB2T, que lograron un arrastre de ADNmt bajo o indetectable, especialmente en PB1T. Este menor arrastre se debe a que los corpúsculos polares se encuentran rodeados por una membrana y cuentan con muy poco citoplasma mientras que el elevado arrastre tras PNT podría deberse a la amplificación de ADNmt alrededor de los pronúcleos que ocurre durante la activación cigótica (10, 21).

Por otro lado, PB1T y PB2T también demostraron ser viables en gametos humanos. Para PBT2, el potencial de desarrollo embrionario mostró resultados contradictorios en diferentes investigaciones: mientras que *Zhang et al.* no pudieron generar blastocistos tras PBT2, *Wu et al.* obtuvieron datos similares a los observados con PB1T, siendo aceptables. Esta diferencia en los resultados pudo deberse a la dificultad que conlleva la identificación de los pronúcleos femeninos en los cigotos humanos (14).

En cuanto al arrastre mitocondrial en esta técnica, se ha informado de niveles mínimos tanto en embriones como en ESC (donde se mantuvo estable durante un cultivo prolongado de 20 pases) (10).

Concluyendo, las PBT han demostrado presentar niveles mínimos de arrastre mitocondrial y ser compatibles con el desarrollo embrionario tanto en animales como en humanos, con niveles mínimos de transferencia mitocondrial, los más bajos entre las MRT.

7. DISCUSIÓN

A la luz de lo expuesto en este documento, a pesar de que el objetivo principal actual de MRT es prevenir la transmisión de enfermedades mitocondriales a las siguientes generaciones, el tratamiento de la infertilidad a través de esta técnica es un terreno que se busca explorar. La afirmación que respalda este hecho se basa en la noción de que las mitocondrias son las causantes de algunos casos de infertilidad (28). Uno de los factores críticos relacionados con la baja calidad ovocitaria es el envejecimiento de los ovocitos. Bien es cierto que en situaciones con fallos recurrentes de FIV, la opción más clara suele ser optar por ovocitos o embriones donados, sin embargo, MRT podría proporcionar un reemplazo eficiente y completo de todo el componente citoplasmático así como de mitocondrias saludables.

Ahora bien, existe una serie de cuestiones bioéticas respecto al reemplazo mitocondrial. La principal cuestión es el hecho de que algunos profesionales del área lo califican de modificación genética de la línea germinal. Por el contrario, existe un argumento en contra de su inclusión como modificación genética de la línea germinal y es que el núcleo materno permanece intacto, por lo que no se modifica su genoma. A su vez, debido a que es el genoma nuclear el que se transfiere, algunos autores han tachado el término de “reemplazo mitocondrial” de incorrecto y como forma de desorientar intencionalmente el debate público (10, 21).

Una opción para solucionar la evasiva a utilizar MRT por su riesgo a afectar a la línea germinal sería la selección de embriones masculinos aunque esta opción no se considera ya que supone una reducción del número de embriones disponibles para transferir disminuyendo, a su vez, la eficacia del procedimiento (10).

Además, ¿dónde quedaría el límite? Muchos autores que se oponen a esta técnica argumentan que una vez abierta la puerta a la modificación genética de la línea germinal, es cuestión de tiempo que su uso se extienda a muchas otras aplicaciones.

Teniendo en cuenta el plano moral de las MRT, hay que destacar que MST y PB1T actúan sobre el ovocito mientras que PNT y PB2T requieren de la destrucción de un embrión para generar otro sano. Aunque bien es cierto que ningún estudio ha comparado las cinco técnicas descritas en esta revisión entre ellas (10), hay ciertos datos que pueden hacernos ver las ventajas de unas frente a otras. Sobre GVT, se obtuvieron malos resultados en el desarrollo embrionario por lo que se descartó su uso en un entorno clínico en un futuro cercano. Por otro lado, MST y PNT han demostrado ser compatibles con un desarrollo correcto del embrión tanto en modelos animales como en humanos. En cuanto al arrastre mitocondrial, PNT tiende a generar tasas algo superiores pero, aun así, no existen evidencias claras que respalden MST sobre PNT o viceversa. Por lo contrario, la preferencia hacia MST frente a PNT por las objeciones éticas es una realidad. En cuanto las PBT, tienen unas tasas de arrastre mitocondrial mínimas. La mayor ventaja que presenta esta técnica frente al resto es la posibilidad de reducir el número de ovocitos de la madre necesarios para obtener ovocitos sanos ya que si el primer corpúsculo polar pudiese usarse junto al huso meiótico y el segundo corpúsculo polar con el pronúcleo, se podría reducir el número de ovocitos maternos a la mitad. El uso combinado de PB1T con MST y PB2T con PNT podría aumentar en gran medida la eficiencia de las MRT.

Las razones por las que se busca limitar el uso de MRT en la prevención de enfermedades no son de naturaleza ética sino más bien por seguridad. Al limitar su aplicación, en caso de que algo no salga como se espera, el número de individuos afectados será mínimo. No obstante, *Pennings et al.* (2022) señala que en la fase inicial en la que la MRT se encuentra, sería conveniente emplear esta técnica para remediar la infertilidad causada por mala calidad ovocitaria. Esto, en un entorno de investigación clínica, permitiría un mayor aprendizaje por parte de los investigadores para mejorar sus habilidades técnicas y tener un mayor conocimiento antes de comenzar con casos de alto riesgo, como el de las enfermedades mitocondriales. El riesgo de su uso en enfermedades prevalece en el arrastre mitocondrial de ADNmt mutante, riesgo que es inexistente en casos de envejecimiento de los ovocitos. Por ello, sería recomendable limitar su uso, por ahora, a los casos de infertilidad.

Por otro lado, bien es cierto que algunos autores plantean la hipótesis de una incompatibilidad mitonuclear tras MRT. Cuando se realiza un MRT, el mecanismo de herencia uniparental se rompe, el ADNn se localiza en un entorno nuevo con genes mitocondriales ajenos y con riesgo de generar incompatibilidades. A pesar de que esta hipótesis ha sido probada en modelos animales, otros expertos plantean que la presencia de incompatibilidades mitonucleares en humano es improbable debido a la naturaleza exogámica de nuestra especie. Sin embargo, algunos estudios han comparado secuencias de ADNn y ADNmt de poblaciones humanas con el fin de detectar posibles incompatibilidades obteniendo unos resultados contradictorios. Exista o no incompatibilidad mitonuclear, podría evitarse seleccionando ovocitos de donantes con un haplogrupo mitocondrial igual que el de la madre lo que no solo atenuaría el riesgo de incompatibilidades mitonucleares, sino que también evitaría la ventaja replicativa del ADNmt materno contra el ADNmt donado (10, 14).

Además de aliviar enfermedades mitocondriales y casos de infertilidad, la MRT puede presentar nuevas opciones para jóvenes con cáncer. Se ha demostrado que los husos de ovocitos criopreservados podrían rescatarse y transferirse a citoplastos frescos (14). Si a este hecho, le sumamos la posibilidad de usar la mitad de ovocitos maternos para un tratamiento MRT combinando técnicas, la preservación de fertilidad de los pacientes oncológicos sería bastante superior y muy prometedora.

En cuanto a la regulación de MRT, mientras en algunos países (Tabla 3) está bien reguladas, en muchos otros las regulaciones existentes obligan a optar por un enfoque más tajante, de todo o nada. Estados Unidos promulgó una ley de asignaciones que parece prohibir los MRT; en Canadá, tanto el uso reproductivo como el de investigación están prohibidos por las leyes existentes. En el caso contrario, Reino Unido ha creado un sólido esquema regulatorio para permitir MRT. Australia y Singapur están siguiendo los pasos del Reino Unido y ya han comenzado un proceso de consulta pública antes de tomar medidas para legalizar los MRT. La mayoría de países que se han revisado en este documento se encuentran en la primera etapa de un diseño regulatorio: permitirlos o prohibirlos. No obstante, el país más desarrollado en cuanto a la legislación de MRT, Reino Unido, sí que se ha enfrentado a los siguientes pasos necesarios para una correcta regulación como, por ejemplo, aclarar si los niños concebidos por MRT deben tener acceso a las identidades de las donantes, como se deben financiar los MRT, etc (22). Lo

ideal sería que más países llegasen al punto en el que se encuentra Reino Unido para así ver como difieren las respuestas a estas preguntas.

A pesar de las restricciones de MRT en estos países, no existe un gran turismo médico. Igualmente, aún no sabemos cómo se plantearía la ciudadanía de los niños nacidos en otros países gracias MRT cuando su práctica está prohibida en el país de origen.

8. CONCLUSIÓN

Las técnicas de reemplazo mitocondrial podrían considerarse aptas tanto para mujeres que cuenten con enfermedades de origen mitocondrial y tengan el deseo de una progenie genéticamente relacionada y sana como para aquellas que sufran de un envejecimiento ovárico por causa mitocondrial. Dado que MRT, a pesar de los buenos resultados que puede obtener, no deja de ser un procedimiento invasivo, es necesario una buena formación y habilidad por parte de los operarios que garanticen la optimización de las condiciones científicas y clínicas. Por ello, sería conveniente un primer desarrollo de la técnica en casos de infertilidad y, una vez haya datos suficientes que avalen los resultados positivos de esta técnica, poder emplearla en casos de enfermedades mitocondrias con el fin de marcar una diferencia real a las miles de personas que conviven con ellas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang, W., & Wu, F. (2023). Effects of adverse fertility-related factors on mitochondrial DNA in the oocyte: a comprehensive review. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 21(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01078-6>
2. Babayev, E., Wang, T., Szigeti-Buck, K., Lowther, K., Taylor, H. S., Horvath, T., & Seli, E. (2016). Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mtDNA quantity. *Maturitas*, 93, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.06.015>
3. Rahimi Darehbagh, R., Khalafi, B., Allahveisi, A., & Habiby, M. (2022). Effects of The Mitochondrial Genome on Germ Cell Fertility: A Review of The Literature. *International journal of fertility & sterility*, 16(2), 70–75. <https://doi.org/10.22074/IJFS.2021.527076.1098>
4. Seli, E., Wang, T., & Horvath, T. L. (2019). Mitochondrial unfolded protein response: a stress response with implications for fertility and reproductive aging. *Fertility and sterility*, 111(2), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.048>

5. Rossmann, M. P., Dubois, S. M., Agarwal, S., & Zon, L. I. (2021). Mitochondrial function in development and disease. *Disease models & mechanisms*, *14*(6), dmm048912. <https://doi.org/10.1242/dmm.048912>
6. Fontana, G. A., & Gahlon, H. L. (2020). Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation. *Nucleic acids research*, *48*(20), 11244–11258. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa804>
7. Chiong, M., Cartes-Saavedra, B., Norambuena-Soto, I., Mondaca-Ruff, D., Morales, P. E., García-Miguel, M., & Mellado, R. (2014). Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Frontiers in cell and developmental biology*, *2*, 72. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00072>
8. Mishra, P., & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(10), 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
9. Chiaratti, M. R., Garcia, B. M., Carvalho, K. F., Machado, T. S., Ribeiro, F. K. D. S., & Macabelli, C. H. (2018). The role of mitochondria in the female germline: Implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. *Cell biology international*, *42*(6), 711–724. <https://doi.org/10.1002/cbin.10947>
10. Sendra, L., García-Mares, A., Herrero, M. J., & Aliño, S. F. (2021). Mitochondrial DNA Replacement Techniques to Prevent Human Mitochondrial Diseases. *International journal of molecular sciences*, *22*(2), 551. <https://doi.org/10.3390/ijms22020551>
11. Podolak, A., Woclawek-Potocka, I., & Lukaszuk, K. (2022). The Role of Mitochondria in Human Fertility and Early Embryo Development: What Can We Learn for Clinical Application of Assessing and Improving Mitochondrial DNA? *Cells*, *11*(5), 797. <https://doi.org/10.3390/cells11050797>
12. Zhang, H., Burr, S. P., & Chinnery, P. F. (2018). The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays in biochemistry*, *62*(3), 225–234. <https://doi.org/10.1042/EBC20170096>
13. Jansen, R. P., & de Boer, K. (1998). The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and cellular endocrinology*, *145*(1-2), 81–88. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(98\)00173-7](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00173-7)

14. Tachibana, M., Kuno, T., & Yaegashi, N. (2018). Mitochondrial replacement therapy and assisted reproductive technology: A paradigm shift toward treatment of genetic diseases in gametes or in early embryos. *Reproductive medicine and biology*, *17*(4), 421–433. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12230>
15. Chiang, J. L., Shukla, P., Pagidas, K., Ahmed, N. S., Karri, S., Gunn, D. D., Hurd, W. W., & Singh, K. K. (2020). Mitochondria in Ovarian Aging and Reproductive Longevity. *Ageing research reviews*, *63*, 101168. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101168>
16. Labarta, E., de Los Santos, M. J., Escribá, M. J., Pellicer, A., & Herraiz, S. (2019). Mitochondria as a tool for oocyte rejuvenation. *Fertility and sterility*, *111*(2), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.036>
17. van der Reest, J., Nardini Cecchino, G., Haigis, M. C., & Kordowitzki, P. (2021). Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing. *Ageing research reviews*, *70*, 101378. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101378>
18. May-Panloup, P., Boucrot, L., Chao de la Barca, J. M., Desquiret-Dumas, V., Ferré-L'Hotellier, V., Morinière, C., Descamps, P., Procaccio, V., & Reynier, P. (2016). Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. *Human reproduction update*, *22*(6), 725–743. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw028>
19. Tesarik, J., & Mendoza-Tesarik, R. (2023). Mitochondria in Human Fertility and Infertility. *International journal of molecular sciences*, *24*(10), 8950. <https://doi.org/10.3390/ijms24108950>
20. Wolf, D. P., Mitalipov, N., & Mitalipov, S. (2015). Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends in molecular medicine*, *21*(2), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.001>
21. Gómez-Tatay, L., Hernández-Andreu, J. M., & Aznar, J. (2017). Mitochondrial Modification Techniques and Ethical Issues. *Journal of clinical medicine*, *6*(3), 25. <https://doi.org/10.3390/jcm6030025>
22. Cohen, I. G., Adashi, E. Y., Gerke, S., Palacios-González, C., & Ravitsky, V. (2020). The Regulation of Mitochondrial Replacement Techniques Around the World. *Annual review of genomics and human genetics*, *21*, 565–586. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-111119-101815>

23. Darbandi, S., Darbandi, M., Khorram Khorshid, H.R. *et al.* Ooplasmic transfer in human oocytes: efficacy and concerns in assisted reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 15, 77 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0292-z>
24. Cohen, J., Scott, R., Alikani, M., Schimmel, T., Munné, S., Levron, J., Wu, L., Brenner, C., Warner, C., & Willadsen, S. (1998). Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Molecular human reproduction*, 4(3), 269–280. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.3.269>
25. Brenner, Carol & Barritt, Jason & Willadsen, Steen & Cohen, Jacques. (2000). Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic *transplantation*. *Fertility and sterility*. 74. 573-8. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00681-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00681-6).
26. Jo, A., Ham, S., Lee, G. H., Lee, Y. I., Kim, S., Lee, Y. S., Shin, J. H., & Lee, Y. (2015). Efficient Mitochondrial Genome Editing by CRISPR/Cas9. *BioMed research international*, 2015, 305716. <https://doi.org/10.1155/2015/305716>
27. Yang, Y., Wu, H., Kang, X., Liang, Y., Lan, T., Li, T., Tan, T., Peng, J., Zhang, Q., An, G., Liu, Y., Yu, Q., Ma, Z., Lian, Y., Soh, B. S., Chen, Q., Liu, P., Chen, Y., Sun, X., Li, R., ... Fan, Y. (2018). Targeted elimination of mutant mitochondrial DNA in MELAS-iPSCs by mitoTALENs. *Protein & cell*, 9(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0499-y>
28. Noohi, F., Ravitsky, V., Knoppers, B. M., & Joly, Y. (2022). Mitochondrial Replacement Therapy: In Whose Interests?. *The Journal of law, medicine & ethics : a journal of the American Society of Law, Medicine & Ethics*, 50(3), 597–602. <https://doi.org/10.1017/jme.2022.98>