

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción  
Humana Asistida

**IMPACTO DE LAS TÉCNICAS DE  
REPRODUCCIÓN ASISTIDA SOBRE EL  
EPIGENOMA DE OVOCITOS Y EMBRIONES**

Autora: Rosa Luna Espejo

Tutora: María José Hernáez Silva

Alcobendas, septiembre 2022

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. OBJETIVOS .....	7
3. METODOLOGÍA .....	7
4. RESULTADOS.....	8
4.1. Estimulación ovárica controlada .....	8
4.2. Fecundación in vitro e Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides.....	11
4.3. Cultivo embrionario .....	15
4.4. Vitricación .....	17
4.4.1. Vitricación de ovocitos .....	17
4.4.2. Vitricación de embriones .....	18
5. DISCUSIÓN .....	20
5.1. Estimulación ovárica controlada .....	20
5.2. Fecundación in vitro e Inyección citoplasmática de espermatozoides .....	22
5.3. Cultivo embrionario .....	23
5.4. Vitricación .....	24
5.4.1. Vitricación de ovocitos .....	24
5.4.2. Vitricación de embriones .....	25
6. CONCLUSIONES .....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28
8. ANEXOS.....	30
8.1. Abreviaturas .....	30
8.2. Lista de genes .....	31

## **RESUMEN**

Los niños nacidos por tratamientos de reproducción asistida han ido aumentando en los últimos años debido a una sociedad que obliga a aquellos que quieren ser padres a retrasar la maternidad cada vez más. Este incremento en el número de pacientes conlleva un aumento en el interés por reducir los riesgos para la salud de los niños y pacientes asociados a estos tratamientos. Entre estos riesgos se ha descrito una mayor incidencia de las enfermedades epigenéticas. Se ha hipotetizado que los niños nacidos por técnicas de reproducción asistida tienen un mayor riesgo de sufrir estas enfermedades debido a que los procedimientos clínicos y de laboratorio tienen lugar en momentos críticos para la reorganización del epigenoma de los embriones. Es por ello por lo que en este trabajo nos hemos centrado en estudiar la literatura disponible sobre la influencia de las técnicas de reproducción asistida sobre la epigenética, en busca de las alteraciones que los tratamientos podrían estar provocando sobre el epigenoma de ovocitos y embriones en diferentes puntos del ciclo. Tras este estudio, hemos visto que las técnicas analizadas (estimulación ovárica controlada, fecundación in vitro, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, cultivo embrionario y vitrificación) modifican de diversas formas el epigenoma de ovocitos y/o embriones, especialmente la metilación de zonas específicas del genoma. No obstante, también hemos concluido que es necesario realizar estudios sobre los recién nacidos vivos por estas técnicas, así como los abortos, para determinar la trascendencia clínica de estas alteraciones.

**Palabras clave:** epigenética, impronta, tratamientos de reproducción asistida, estimulación ovárica controlada, fecundación in vitro (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), cultivo embrionario, vitrificación.

## 1. INTRODUCCIÓN

A día de hoy, más de 9 millones de niños han nacido por técnicas de reproducción asistida (ART) a nivel mundial. En el año 2019, el 9'5% de los nacimientos en España fueron mediante ART, aumentando un 1% en relación al año anterior, según datos del Instituto Nacional de Estadística. Tanto los expertos como los datos concluyen que existe una clara tendencia al aumento de los nacimientos por reproducción asistida.

Debido al impacto que este campo tiene sobre la sociedad, es de gran importancia optimizar las técnicas usadas y ampliar el estudio a todos los factores que pueden afectar a los pacientes y a los recién nacidos durante los tratamientos.

En este sentido, la epigenética ha tomado gran relevancia en los últimos años en el campo de la reproducción asistida debido a su importancia durante el desarrollo embrionario y las posibles consecuencias de su alteración.

Cada vez existen más evidencias de que la exposición a diferentes factores durante la concepción, como pueden ser los ART, pueden tener múltiples consecuencias en el desarrollo de la descendencia. Por ello, se han llevado a cabo distintos estudios que muestran cómo los embarazos por ART presentan un riesgo aumentado de parto pretérmino, bajo peso al nacer y mortalidad prenatal, así como que niños nacidos por estas técnicas presentan un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas.<sup>1</sup>

A pesar de conocer estos hechos a nivel clínico, no existen suficientes estudios que hayan relacionado estos sucesos con sus posibles causas a nivel celular y molecular. En este sentido, se han comenzado a estudiar las causas subyacentes a estos riesgos analizando los mecanismos epigenéticos que sufren alteraciones durante las ART.

La epigenética se define como el estudio de los cambios heredables en el fenotipo o la expresión de los genes causados por diferentes mecanismos que no afectan a la secuencia de ADN subyacente, y el epigenoma es el conjunto de compuestos químicos en contacto con el ADN que lo marcan y alteran para controlar su expresión.<sup>2</sup>

En la conformación del epigenoma intervienen diferentes mecanismos que explicaremos a continuación: metilación de ADN, modificación de histonas, ARN no codificantes e impronta genética.

Durante el desarrollo embrionario, tiene lugar una drástica reprogramación del epigenoma, esencial para que los gametos -células que ya tenían su destino definido-

puedan convertirse en células totipotentes tras su unión y dar lugar así a todos los linajes celulares necesarios para formar el feto. La alteración de esta reprogramación puede causar graves problemas durante el desarrollo embrionario y fetal, lo que desembocaría en múltiples enfermedades.<sup>3</sup>

A continuación, explicaremos los principales mecanismos epigenéticos:

### ***Metilación de ADN***

La metilación del ADN es el principal mecanismo epigenético de modificación de la expresión del genoma. Consiste en la adición de un grupo metilo al carbono en la posición 5 del anillo de pirimidina de la base nitrogenada citosina (5-metilcitosina, 5mC) o al nitrógeno en posición 6 del anillo de purina de la base adenina (N6-metiladenina, 6mA), aunque en células eucariotas destaca la metilación de las citosinas. La adición de este grupo metilo supone la supresión de la expresión del gen.<sup>2</sup>

La metilación de citosina suele ocurrir en las denominadas islas CpG, regiones del ADN con una elevada concentración de pares citosina y guanina enlazados por grupos fosfatos. Estas suelen encontrarse en los promotores de los genes, de forma que la metilación de estas regiones controlaría la expresión de los genes bajo estos promotores. La metilación también puede ocurrir en otras zonas del genoma como regiones codificantes o *enhancers* (región corta del ADN que puede potenciar la expresión de otros genes lejanos gracias a su unión a proteínas). En las células madre embrionarias, la metilación de citosinas fuera de las islas CpG es preponderante.<sup>2</sup>

La metilación de novo, aquella llevada a cabo en una célula donde ninguna de las cadenas del ADN está metilada, es catalizada por las enzimas ADN metiltransferasas DNMT3A/B mientras que la metilación de mantenimiento, aquella que toma como referencia la cadena de ADN que proviene de la célula progenitora tras una división celular y que está hemimetilada, la realiza las ADN metiltransferasas DNMT1. Por otro lado, la familia de enzimas TET se encargan de la desmetilación.<sup>3</sup>

El establecimiento de un epigenoma correcto es fundamental para conseguir una gametogénesis adecuada y un desarrollo embrionario normal. Durante el desarrollo embrionario temprano tiene lugar una reprogramación casi total de las marcas epigenéticas, tanto en el genoma materno como en el paterno, para poder dar lugar a las células totipotentes del embrión. En esta reprogramación es de especial importancia la

eliminación de todas las citosinas metiladas, excepto en los genes improntados y en los retrotransposones, estos últimos son regiones del ADN móviles que deben estar silenciados para no saltar a otras regiones del ADN provocando roturas y alteraciones de la secuencia. Se ha visto que el genoma paterno presenta una velocidad de desmetilación mayor que el genoma materno durante la reprogramación.<sup>3</sup>

Una vez eliminadas las marcas epigenéticas y las primeras divisiones del embrión han tenido lugar, se establece el epigenoma que permitirá que la mórula dé paso a la diferenciación entre masa celular interna y trofoectodermo en el blastocisto y las sucesivas diferenciaciones celulares que tendrán lugar durante su desarrollo.<sup>4</sup>

### ***Modificación de histonas***

Las histonas son proteínas que junto al ADN forman la cromatina. La modificación de histonas es un mecanismo epigenético que tiene como objetivo modificar la estructura de la cromatina para que sea más laxa o compacta. Una cromatina más laxa permite la entrada de la maquinaria de transcripción más fácilmente, con la consecuente expresión de los genes que se encuentren en esta región. Para ello, una serie de enzimas y complejos proteicos se encargan de añadir o eliminar distintos residuos químicos a las histonas como modificaciones postraduccionales para conseguir una cromatina más laxa (eucromatina) o compacta (heterocromatina).<sup>5</sup>

Las modificaciones postraduccionales de las histonas que podemos encontrar son: acetilación y ubiquitinación de lisina, fosforilación de serina, metilación de arginina, isomerización de prolina, entre otras. La acetilación de lisina es la modificación más común. Esta reacción es catalizada por las enzimas histona acetil transferasas y promueve la transcripción génica, por lo que es característica de la eucromatina. La acción contraria, la desacetilación de lisina, es catalizada por la familia de enzimas histona desacetilasas y se encuentra abundantemente en la heterocromatina. Estas modificaciones activan/desactivan la transcripción porque funcionan como señales para complejos proteicos remodeladores de la cromatina que recolocan los nucleosomas para abrir o cerrar la cromatina.<sup>5</sup>

Las modificaciones postraduccionales no son los únicos mecanismos epigenéticos que involucran a las histonas, sino que también existen variantes de histonas que promueven la expresión génica en las zonas en las que están presentes. Por ejemplo, las histonas H3 y H2A presentan múltiples variantes que participan en la remodelación de la cromatina.<sup>5</sup>

### ***ARN no codificante***

Los ARN no codificantes (ncRNA) son moléculas de ARN funcionales que no se traducen a proteínas. Existen diferentes tipos de ncRNA, como el ARN ribosómico o el ARN transferente, pero los ncRNA que participan en la epigenética son los ncRNA largos (lncRNA) y los ncRNA pequeños (sncRNA). Dentro de los sncRNA encontramos los microARN (miRNA), los ARN pequeños de interferencia (siRNA) y los ARN asociados a Piwi (piRNA).

En primer lugar, los sncRNA modifican la expresión génica mediante ribointerferencia. Este mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional consiste en que un sncRNA se une a un ARN mensajero (mRNA) complementario, conduciéndolo a su degradación.<sup>5</sup>

A modo ilustrativo, vamos a explicar el mecanismo de acción de los siRNA. En primer lugar, una proteína llamada Dicer corta una molécula de ARN de doble cadena (exógena o endógena), dando lugar a las moléculas de siRNA. A continuación, el siRNA se une a una serie de proteínas con las que forma el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) y éste se une al mRNA complementario. Una vez unido, la proteína Argonaua del complejo RISC corta el mRNA, lo que conllevará a su degradación. Además de degradar el mRNA transcrito, los siRNA permiten metilar el mRNA durante su transcripción mediante el complejo RITS (*RNA-induced transcriptional silencing*) para inhibir su transcripción.<sup>5</sup>

Por otro lado, los lncRNA son moléculas de ARN de más de 200 nucleótidos de longitud, entre los que diferenciamos: lncRNA intergénicos, lncRNA intrónicos, *sense* lncRNA y lncRNA antisentido, según su ubicación en el genoma. Podemos destacar los lncRNA XIST y HOTAIR. Múltiples moléculas de XIST se colocan sobre uno de los cromosomas X en aquellas personas con un cariotipo XX para compensar la dosis genética de este cromosoma. Sin XIST se produce letalidad embrionaria. Por otro lado, HOTAIR regula la actividad de los complejos remodeladores de la cromatina llamados Polycomb, dirigiéndolos al locus del ADN en el que deben modificar la expresión.<sup>5</sup>

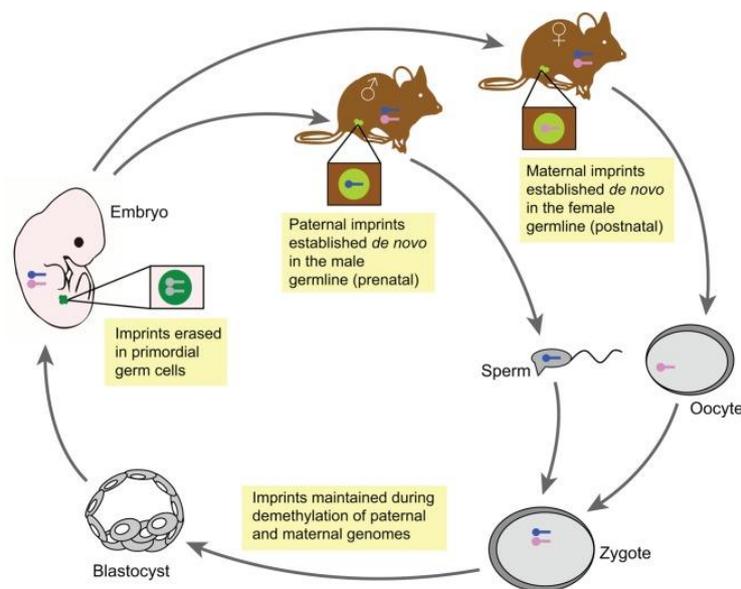
### ***Impronta genómica***

La impronta genómica es un fenómeno genético por el cual para ciertos genes los mamíferos somos funcionalmente haploides, es decir, la existencia de impronta determina

que solo se expresa el alelo materno o el alelo paterno. Se trata de una herencia no mendeliana.<sup>2</sup>

La impronta supone un marcado de los genes para diferenciar su origen parental. Este proceso involucra la metilación y remodelación de la cromatina del alelo que no se va a expresar para conseguir una expresión monoalélica del gen sin alterar la secuencia del ADN.<sup>2</sup>

La impronta genómica se establece en la línea germinal durante la formación de los gametos según el sexo del individuo, de forma prenatal en el caso de los hombres y postnatal en el caso de las mujeres (Figura 1). Esta impronta esquiva la reprogramación epigenética, que tiene lugar durante los primeros estadios de desarrollo embrionario, para más tarde eliminarse en las células germinales primordiales mientras se mantiene en el resto de células somáticas del organismo.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Establecimiento, mantenimiento y borrado de la impronta genómica durante el desarrollo del ratón. Elaborado por: Plasschaert RN, Bartolomei MS. *Genomic imprinting in development, growth, behavior and stem cells. Development.* 2014 May; 141 (9): 1805-1813. DOI: 10.1242/dev.101428.

Alrededor del 80% de los genes improntados se encuentran agrupados en los llamados centros reguladores de impronta (ICRs) y hasta ahora se conocen alrededor de 230 loci con impronta parental en humanos.<sup>2</sup>

Fallos en la impronta genómica suponen graves alteraciones durante el desarrollo embrionario que pueden desembocar en diferentes enfermedades como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Silver-Russell, el síndrome de Angelman o el síndrome de Prader-Willi.<sup>2</sup>

Como hemos visto, la epigenética juega un papel clave en el desarrollo embrionario y cualquier alteración puede suponer un grave problema para la salud del recién nacido. En reproducción asistida, el objetivo es conseguir un niño sano en casa, todos los esfuerzos y estudios enfocados a conseguir este objetivo son necesarios, permitiendo la mejora de los resultados y la satisfacción de los pacientes.

Es por ello, que creemos necesario el estudio de las posibles consecuencias a nivel epigenético de los diferentes procesos a los que se someten los gametos y embriones durante los tratamientos de reproducción asistida.

## **2. OBJETIVOS**

El presente trabajo pretende analizar la literatura disponible sobre el impacto de los tratamientos de reproducción asistida sobre el epigenoma de ovocitos y embriones, por lo que los objetivos que se plantearon fueron:

1. Describir los cambios epigenéticos que los tratamientos de reproducción asistida podrían provocar en los ovocitos y embriones, específicamente durante la estimulación ovárica controlada, la fecundación in vitro, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, el cultivo embrionario y la vitrificación.
2. Comparar los resultados de los diferentes estudios publicados sobre las alteraciones que producen los tratamientos de reproducción asistida sobre el epigenoma de ovocitos y embriones.

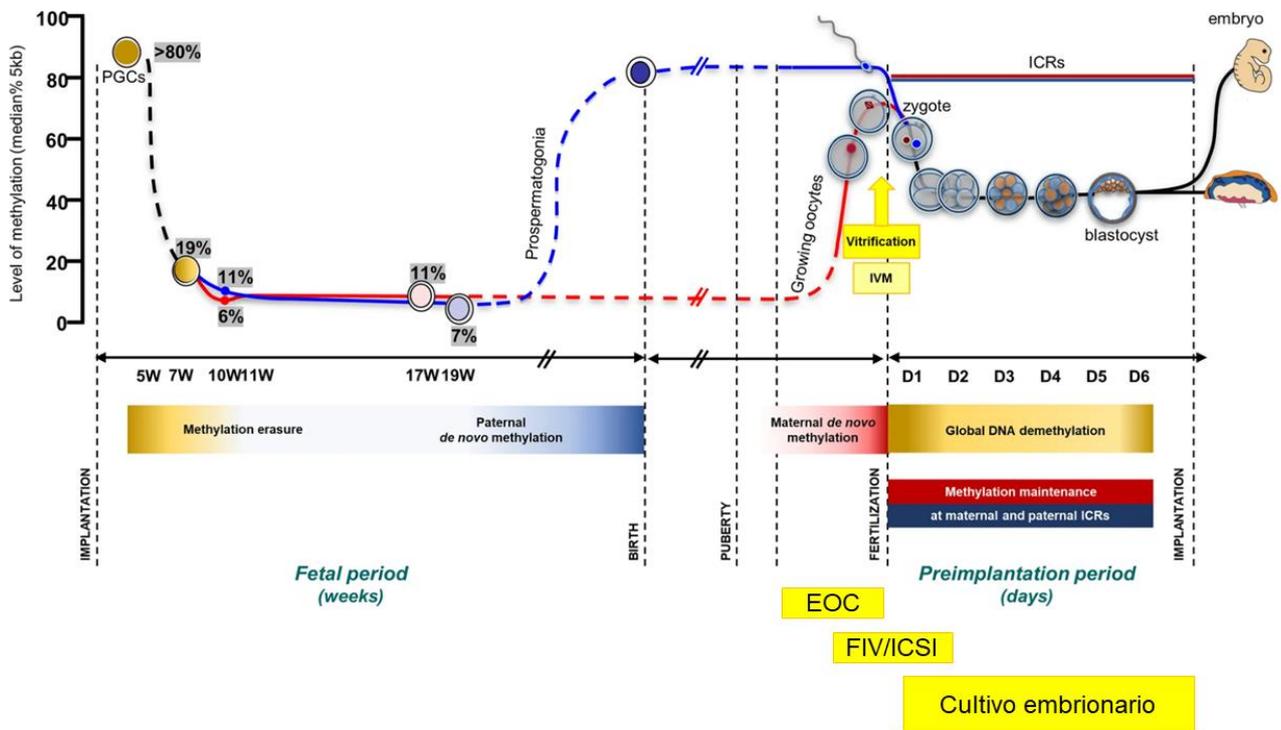
## **3. METODOLOGÍA**

Con el objetivo de obtener la información necesaria sobre las alteraciones que los tratamientos de reproducción asistida producen sobre el epigenoma de ovocitos y embriones, se realizó una búsqueda de artículos y revisiones en la base de datos Pubmed mediante palabras clave sobre epigenética, estimulación ovárica controlada, fecundación in vitro, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, cultivo embrionario y vitrificación/desvitrificación. La búsqueda se centró principalmente sobre los últimos 5 años, aunque en ocasiones se han incluido artículos anteriores a estas fechas por falta de literatura posterior. También se hizo uso de la base de datos de la biblioteca virtual de la Universidad Europea para consultar libros sobre las bases de la epigenética. Los artículos

y revisiones fueron seleccionados por su relevancia en el tema que tratamos y con la intención de exponer los diferentes puntos de vista disponibles sobre el impacto que tienen los tratamientos de reproducción asistida sobre el epigenoma.

#### 4. RESULTADOS

Los tratamientos de reproducción asistida se han desarrollado intentando asemejarse lo máximo posible a lo que ocurre de forma natural (Figura 2). Sin embargo, la manipulación de los gametos y embriones, así como la exposición a diferentes factores exógenos es inevitable en múltiples puntos del proceso.



**Figura 2.** Niveles de metilación de los gametos, embrión y células germinales primordiales durante el desarrollo embrionario y fetal y momentos en los que se realiza cada técnica de reproducción asistida. PGCs: células germinales primordiales, ICRs: centro de impronta, IVM: maduración in vitro, EOC: estimulación ovárica controlada, FIV: fecundación in vitro, ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Figura obtenida de Barberet et al. con modificaciones.

A continuación, vamos a ver qué se conoce hasta ahora sobre el impacto de los diferentes ART sobre el epigenoma de los ovocitos y embriones.

##### 4.1. Estimulación ovárica controlada

La estimulación ovárica controlada es un tratamiento hormonal que pretende conseguir un desarrollo folicular múltiple para tener una cohorte de ovocitos adecuada para su uso

en ciclos de fecundación in vitro (FIV) y/o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Como hemos visto en la introducción, el establecimiento de las marcas epigenéticas en los ovocitos es dependiente del tiempo y el estadio de maduración de estos (Figura 2). En base a esto, se ha hipotetizado que la estimulación ovárica controlada podría tener una influencia negativa sobre el epigenoma de los ovocitos al reclutar ovocitos de baja calidad y alterar sus tiempos de maduración.

Varios estudios han centrado su trabajo en analizar la influencia de la estimulación ovárica controlada sobre la metilación de los genes. Por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Sato et al. encontró diferencias en la metilación de los genes improntados MEST y H19 en los ovocitos de pacientes sometidas a estimulación ovárica en comparación con un grupo de 300 ovocitos obtenidos de exámenes laparoscópicos sin estimulación ovárica previa. Las pacientes estudiadas presentaban como indicaciones para el ART factor masculino, obstrucción tubárica e infertilidad de origen desconocido. Para llevar a cabo este estudio, analizaron el perfil de metilación de MEST y H19 mediante secuenciación por bisulfito de célula única, tras lo cual describieron que el patrón de metilación normal del gen MEST se mantenía en 10 de los 16 casos estudiados, mientras que el patrón de no metilación de H19 se mantenía en 4 de los 6 ovocitos analizados.<sup>6</sup>

La influencia de la estimulación ovárica sobre el epigenoma también se ha estudiado a nivel de la metilación del genoma completo, pero no se han encontrado alteraciones. Un ejemplo es el estudio de Saenz De Juano et al. Este grupo analizó los ovocitos de dos grupos de ratones: obtenidos por ovulación natural (32 ratones) y por estimulación ovárica (24 ratones, 5 UI eCG + 5 UI hCG) y, tras realizar un análisis de la metilación del genoma completo por bisulfito, no encontraron diferencias entre los grupos.<sup>6</sup>

Otros estudios, como el realizado por Fauque et al., han analizado la influencia de la estimulación ovárica controlada sobre la expresión de genes improntados. En el caso que exponemos, Fauque et al. analizaron la expresión del gen H19 mediante PCR cuantitativa a tiempo real en 113 blastocistos de ratón. En el diseño experimental diferenciaron cuatro grupos de estudio: embriones procedentes de ratones no estimulados con fecundación y desarrollo in vivo, embriones procedentes de ratones estimulados con fecundación y desarrollo in vivo, embriones procedentes de ratones estimulados con fecundación in vivo y desarrollo in vitro y embriones procedentes de ratones estimulados con fecundación y

desarrollo in vitro. Tras el análisis, observaron que los grupos que se habían sometido a estimulación ovárica presentaban una proporción de transcritos de H19 significativamente menor que el grupo que no había sido estimulado.<sup>6</sup>

También se ha estudiado la influencia de la estimulación ovárica sobre la expresión de las enzimas metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Liang et al. analizaron el ARNm de 50 ovocitos MII de ratón distribuidos en tres grupos de estudio: un grupo control, un grupo con dosis hormonal baja (6 UI eCG y hCG) y un grupo con dosis hormonal alta (10 UI eCG y hCG). Tras el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real, observaron que ninguna de las tres enzimas presentó alteraciones en sus niveles de expresión en ninguno de los grupos de estudio. El grupo repitió este análisis en los cigotos y de nuevo no encontraron diferencias significativas. En conclusión, la estimulación ovárica no alteraba los niveles de transcripción de las enzimas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B.<sup>6</sup>

Por otro lado, también se ha analizado la influencia que podría tener la dosis de la estimulación ovárica sobre la metilación en los ovocitos. Para ello, Huo et al. realizaron en 2020 dos experimentos en ovocitos de ratones con dosis de FSH o hMG de 5, 50 y 200 UI en combinación con 5 UI de hCG. Los grupos estaban formados por una media de 6 ratones cada uno. Primero analizaron la metilación del ADN del genoma completo y no encontraron diferencias significativas entre los grupos estimulados y el grupo control no estimulado. En segundo lugar, analizaron regiones diferencialmente metiladas (DMRs) y describieron diferencias en la distribución de la metilación en las DMRs del grupo control y de los grupos estimulados. Estos patrones se conservaban en las diferentes dosis de FSH y hMG. Varios de los genes con patrones de metilación diferentes en las DMRs estaban implicados en procesos biológicos como el metabolismo de la glucosa, en el desarrollo del sistema nervioso, el ciclo celular, el procesamiento del ARNm y la proliferación celular.<sup>6</sup>

Por último, también se ha descrito que el número de estimulaciones modifica la expresión de genes de pluripotencia y conduce a alteraciones en la modificación de histonas. Para ello, Tang et al. estudiaron cuatro grupos de ratones: un grupo control con ciclo natural (n = 1956 ovocitos) y tres grupos bajo estimulación hormonal con eCG y hCG. Estos tres grupos se diferenciaban en el número de inyecciones hormonales: el primer grupo con una inyección de 8 UI hCG y 8 UI eCG (n = 4195 ovocitos), el segundo grupo con tres inyecciones con un intervalo de 7 días (n = 4973 ovocitos) y el tercer grupo con cinco

inyecciones con el mismo intervalo (n = 2025 ovocitos). Estos ovocitos fueron fecundados por apareamiento, extraídos en estadio de cigoto y cultivados hasta estadio de blastocisto, siendo analizados finalmente entre 50 y 150 blastocistos de cada grupo. En sus resultados encontraron una tendencia a la disminución de la expresión de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog conforme mayor era el número de estimulaciones, mediante un análisis de PCR cuantitativa a tiempo real. En cuanto al efecto sobre la modificación de histonas, analizaron la expresión de los genes de dos histonas deacetilasas (HDAC1/2), dos histonas acetilasas (GCN5 y HAT1), una histona metiltransferasa (G9a) y dos histonas demetilinasas (KDM6a/b). Observaron que los grupos estimulados presentaban una expresión mayor de las histonas deacetilasas HDAC1 y HDAC2, las histonas acetilasas GCN5 y HAT1 y la histona metiltransferasa G9a con respecto al grupo control, mientras que la expresión de las histonas demetilinasas KDM6A y KDM6B era menor en los grupos estimulados.<sup>6</sup>

#### **4.2. Fecundación in vitro e Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides**

El punto clave de un ciclo de reproducción asistida es la unión del ovocito y el espermatozoide en el laboratorio, favoreciendo la fecundación. Existen dos técnicas: la fecundación in vitro convencional (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La FIV convencional consiste en poner el ovocito en contacto con una muestra de espermatozoides capacitada en una placa de cultivo, permitiendo una fecundación más natural basada en que el espermatozoide más apto será el que fecunde.

La ICSI consiste en seleccionar un espermatozoide de la muestra de semen capacitada e introducirlo mediante inyección en el citoplasma del ovocito. Aunque la fecundación sea más alejada de lo que ocurre en el tracto reproductor femenino de forma natural, esta técnica permite el uso de muestras seminales de baja calidad. El uso de este tipo de muestras ha supuesto el estudio de ICSI como posible causa de enfermedades epigenéticas en recién nacidos vivos (RNV) por ART.

En este sentido, el trabajo de Marques et al. se centra en los defectos en la metilación de los genes improntados en espermatozoides procedentes de biopsia testicular. Para ello analizaron los patrones de metilación mediante clonación y secuenciación por bisulfito de los genes improntados H19 y MEST en las muestras de 24 pacientes azoospermicos con diferentes etiologías (5 pacientes con aneyaculación, 5 pacientes con azoospermia

primaria obstructiva, 5 pacientes con azoospermia secundaria obstructiva y 9 con azoospermia secretora). Los resultados fueron comparados con casos con espermatogénesis normal, con y sin obstrucción del epidídimo, y muestras eyaculadas normozoospermicas. Tras los análisis, observaron una disminución de la metilación de H19 en 4 de los pacientes, todos ellos pertenecientes al grupo con azoospermia secretora. Además, uno de ellos presentó 9 de los 10 clones analizados no metilados por completo. Este paciente había realizado un ciclo de ICSI con todos los embriones bloqueados durante el desarrollo. Por otro lado, todos los grupos de pacientes presentaron niveles de metilación normales para el gen MEST. Sin embargo, los grupos de aneyaculación y azoospermia secundaria obstructiva presentaban un porcentaje de clones normales para MEST menor que el resto de grupos de pacientes.<sup>6</sup>

El artículo publicado por Kobayashi et al. también apoya la posible influencia de ICSI sobre el epigenoma de los embriones procedentes de los pacientes con mala calidad seminal, en este caso aquellos con oligozoospermia. En su estudio analizaron, mediante secuenciación por bisulfito, los patrones de metilación de 2 genes con impronta paterna (H19 y GTL2) y 5 genes con impronta materna (MEST, LIT1, ZAC, PEG3 y SNRPN) en las muestras seminales de 97 hombres infértiles. Estas muestras fueron comparadas con muestras de pacientes normozoospermicos. Sus resultados describieron alteraciones en la metilación de ambos genes con impronta paterna. En el caso de H19 encontraron alteraciones en 1 paciente con oligozoospermia moderada (5-20 millones de espermatozoides/ml) y 3 pacientes con oligozoospermia severa (<5 millones de espermatozoides/ml). Para el caso de GTL2, encontraron alteraciones en 2 pacientes con oligozoospermia moderada y 4 pacientes con oligozoospermia severa. También encontraron alteraciones en el patrón de metilación de los genes con impronta materna analizados en varios individuos: 12 pacientes para MEST, 4 pacientes para LIT1, 3 pacientes para ZAC, 5 pacientes para PEG3 y 4 pacientes para SNRPN. Además, de los 6 casos con oligozoospermia severa, 5 presentaban patrones de metilación alterados tanto en los genes con impronta paterna como con impronta materna. Tras este análisis, hicieron un seguimiento de los ART de 24 pacientes que presentaron alteraciones en la metilación. Seis pacientes tuvieron embarazos: 2 llegaron a término y 4 fueron abortos. Todos los abortos tuvieron lugar tras ICSI, mientras que de los dos embarazos que llegaron a término uno fue espontáneo y otro tuvo lugar tras ICSI. Pudieron analizar una muestra de cordón umbilical del recién nacido por ICSI y comparar sus patrones de metilación con

los de su padre. Observaron que el recién nacido no había heredado ninguno de los patrones de metilación alterados detectados en las muestras seminales del padre.<sup>6</sup>

Otros estudios se centraron en comparar los patrones de metilación de diferentes genes en niños nacidos por FIV o ICSI con los de niños nacidos por gestación espontánea, encontrando pequeñas diferencias significativas entre los grupos analizados.

Por ejemplo, Whitelaw et al. realizaron un estudio retrospectivo en el que estudiaron diferencias en la metilación de niños nacidos mediante FIV convencional, ICSI y gestación espontánea. Analizaron los patrones de metilación de los genes improntados IGF2, SNRPN, LINE-1 e INS mediante pirosecuenciación en tres cohortes: una cohorte de niños nacidos por FIV (n = 49), una cohorte de niños nacidos por ICSI (n = 20) y una cohorte de niños nacidos por gestación espontánea (n = 86). Obtuvieron las muestras de frotis bucal. En sus resultados describieron unos niveles de metilación mayores del gen improntado SNRPN en RNIV concebidos mediante ICSI en comparación con niños nacidos por gestación espontánea y FIV. Estos resultados son estadísticamente significativos en la comparación de todas las cohortes (Tabla 1).

	ICSI vs Gestación espontánea	ICSI vs FIV	ICSI vs Gestación espontánea y FIV
% Metilación diferencial	1,03% (p = 0,031)	1,13% (p = 0,043)	1,05% (p = 0,023)

**Tabla 1.** Resultados del estudio de Whitelaw et al. Se muestran las comparaciones de los niveles de metilación entre las tres cohortes del estudio (ICSI, FIV y gestación espontánea) junto a su p valor.

Sin embargo, con respecto a los genes IGF2, LINE1 e INS no encontraron diferencias significativas entre ninguna de las cohortes.<sup>6</sup>

Otro estudio, realizado por Rancuort et al., describió pequeñas diferencias significativas en los patrones de metilación de varios genes improntados procedentes de muestras de placenta y sangre de cordón umbilical de niños nacidos por FIV, pero tras analizar la expresión de estos genes no observaron diferencias en sus niveles de transcripción. En su trabajo estudiaron los patrones de metilación de los genes GRB10, MEST, SNRPN, KCNQ1, H19 y IGF2 en tres grupos: 61 pares madre-hijo con gestaciones espontáneas, 59 con embarazos tras FIV convencional y 27 embarazos mediante el uso de inducción de la ovulación (IO). Tras el análisis por pirosecuenciación con bisulfito, encontraron pequeñas diferencias significativas en los niveles de metilación de H19 en el grupo de

FIV (43,4%) en comparación con el grupo de la gestación espontánea (44,7%) tanto en las muestras de placenta como en las muestras de sangre del cordón umbilical. En el gen SNRPN encontraron diferencias en las muestras de placenta (42,1% vs 40,4%) y en el gen KCNQ1 encontraron diferencias en las muestras de sangre del cordón umbilical (48% vs 51,4%). No encontraron más diferencias en el resto de genes entre los dos grupos. En cuanto, a los resultados del grupo de IO en comparación con el grupo de gestación espontánea, también encontraron pequeñas alteraciones en los niveles de metilación en los mismos genes que en el grupo de FIV. Estas variaciones en la metilación del grupo de IO eran muy parecidas a las obtenidas en el grupo de FIV: menor metilación de H19 en la placenta de IO (40,2% vs 44,6%), mayor metilación de KCNQ1 en el cordón umbilical de IO (43,6% vs 42,3%) y, por último, mayor metilación de SNRPN tanto en el cordón umbilical (42,5% vs 40,4%) como en la placenta (43,2% vs 41,1%) de IO. Con el objetivo de analizar si estas diferencias en la metilación se traducían en diferencias en la expresión de los genes, analizaron los niveles de transcripción mediante PCR cuantitativa sin encontrar diferencias para SNRPN y KCNQ1, pero sí para H19. En este caso, la expresión de H19 era algo mayor en los grupos de FIV e IO que en el grupo de gestación espontánea ya que los dos grupos presentaban una pequeña pérdida del nivel de metilación normal.<sup>7</sup>

Un estudio reciente llevado a cabo por El Hajj et al. determinó, mediante un análisis de metilación del genoma completo, pequeñas diferencias significativas entre un grupo de niños nacidos por ICSI y niños nacidos por gestación espontánea. A partir de 48 muestras de sangre del cordón umbilical de niños nacidos por ICSI y 46 muestras de niños nacidos por gestación espontánea, analizaron 428227 sitios CpG mediante pirosecuenciación por bisulfito. De ellos, un 0.11% mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque con un tamaño del efecto pequeño ( $\beta < 10\%$ ).

Por último, Choux et al. comparó los patrones de metilación de varios genes improntados y transposones en un grupo de 15 niños nacidos por FIV, 36 niños nacidos por ICSI y 48 niños nacidos por gestación espontánea. Tras el análisis mediante pirosecuenciación por bisulfito de 3 DMRs de genes con impronta (H19/IGF2, KCNQ1 y SNRPN) y 4 familias de genes transponibles (AluYa5, LINE-1, ERVFRD-1 y ERVW-1) procedentes de muestras de placenta y cordón umbilical, observaron que la metilación del ADN tanto en las DMR de los genes H19, IGF2 y KCNQ1 como en los elementos transponibles LINE-1 y ERVFRD-1 era menor en los grupos FIV e ICSI en comparación con el grupo control

en las muestras placentarias, sin embargo no encontraron diferencias significativas entre los grupos en las muestras de cordón umbilical en ninguno de los genes estudiados.<sup>8</sup>

### **4.3. Cultivo embrionario**

Tras la fecundación, los embriones deben ser cultivados durante varios días en el laboratorio antes de ser transferidos al útero materno, con el objetivo de seleccionar los embriones de mejor calidad y descartar aquellos no viables.

Existen múltiples artículos en la literatura que han demostrado que el cultivo embrionario in vitro provoca alteraciones epigenéticas en los embriones.

Uno de los primeros artículos publicados que analiza los efectos del medio de cultivo sobre el epigenoma es el realizado por Doherty et al. en el año 2000. En este estudio, analizaron los niveles de expresión y el patrón de metilación del gen con impronta paterna H19 tras el cultivo embrionario en dos medios de cultivo diferentes. Los embriones de ratón fueron cultivados hasta estadio de blastocisto en medio de Whitten o en medio KSOM enriquecido con aminoácidos (KSOM AA). En cuanto a la expresión de H19, observaron que todos los embriones presentaban expresión bialélica del gen, aunque los embriones cultivados en el medio de Whitten presentaron una mayor expresión paterna (40% media  $\pm$  6% error estándar, n = 7) en comparación con los embriones cultivados en el medio KSOM AA (10%  $\pm$  3%, n = 3). A continuación, analizaron mediante enzimas de restricción si la expresión bialélica de H19, contraria a la expresión materna monoalélica que ocurre de forma natural, se debía a una alteración en la impronta de los genes. Sus resultados mostraron que los embriones cultivados en el medio de Whitten sufrían una pérdida significativa de la metilación en el ICR de H19, mientras que la metilación del alelo paterno en los embriones cultivados en KSOM AA se mantenía.<sup>6</sup>

Más recientemente, y aunque los estudios con embriones humanos sean escasos, podemos comentar el estudio de Kleijkers et al. en el que analizaron por microarrays las diferencias en la expresión génica de embriones humanos cultivados en dos medios de cultivo diferentes: G5 y HTF (fluido tubárico humano). Aunque este estudio no evalúe las alteraciones epigenéticas, cabe destacar que sus resultados mostraron una expresión diferencial de 951 genes entre ambos grupos, con una población de estudio de 10 blastocistos por grupo. Encontraron que 18 vías de señalización enriquecidas en estos genes estaban involucradas en la apoptosis, el metabolismo, el procesamiento de las proteínas y la regulación del ciclo celular. Más concretamente, los genes diferencialmente

expresados implicados en la replicación del ADN, en el punto de control de G1 a S en el ciclo celular, en la fosforilación oxidativa y en el procesamiento de las proteínas estaban regulados al alza en G5 en comparación con HTF. Los genes implicados en la apoptosis, aunque diferencialmente expresados, no concluyen si la expresión era a la alza o a la baja entre los dos grupos. Es importante destacar que los embriones analizados fueron elegidos de aquellos que no fueron seleccionados para transferencia o crioconservación.<sup>6</sup>

Fijándonos en estudios de los últimos años, podemos evaluar cómo los medios de cultivo más nuevos pueden estar influyendo sobre el epigenoma de los embriones.

En 2020, Mulder et al. centraron su investigación en las diferencias en la metilación de genes improntados en muestras placentarias. Establecieron tres grupos de estudio: placentas procedentes de embriones cultivados en medio G5 (n = 54), placentas procedentes de embriones cultivados en medio HTF (n = 43) y placentas procedentes de gestaciones espontáneas (n = 69). Estudiaron 34 DMRs asociadas a genes improntados mediante secuenciación de nueva generación tras conversión del ADN por bisulfito. Analizando la media de metilación por amplicón de cada DMR, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media de los niveles de metilación de 31 de los 34 DMRs entre G5 y HTF. En cuanto a los 3 DMRs no comentados, correspondientes a GRB10, MEG3 y DIRAS3, no pudieron obtener datos sobre su metilación en ninguno de los dos grupos. Además, comprobaron que no existían diferencias significativas entre las muestras placentarias procedentes de los medios de cultivo y las muestras placentarias de las gestaciones espontáneas.<sup>9</sup>

En 2021, Barberet et al. tampoco encontraron diferencias significativas en la metilación del ADN al comparar los medios de cultivo no secuenciales/globales de Irvine Scientific y de LifeGlobal. En su estudio, analizaron las DMRs de 4 genes improntados (H19/IGF2, KCNQ1, SNRPN, MEST) y 2 genes transponibles (AluYa5 y LINE-1) mediante pirosecuenciación por bisulfito. Las muestras procedían de frotis bucal de niños concebidos tras el cultivo en cada uno de los medios: 23 muestras para el medio de la LifeGlobal y 14 muestras para el medio de Irvine Scientific. En sus resultados no describieron diferencias estadísticamente significativas en la metilación del ADN de los DMRs de los genes improntados estudiados ni de los elementos transponibles entre los dos grupos.<sup>10</sup>

## 4.4. Vitrificación

### 4.4.1. Vitrificación de ovocitos

La vitrificación permite la crioconservación de ovocitos y embriones durante el tiempo necesario para continuar con los ART en las condiciones óptimas, ya sea por una necesidad de preservación de la fertilidad en el caso de los ovocitos o por realizar la transferencia embrionaria en el momento más fisiológicamente óptimo del útero, consiguiendo muy buenos resultados.

En la literatura solo podemos encontrar un número muy reducido de estudios centrados en los efectos de la vitrificación sobre la metilación del ADN en ovocitos humanos. Estos estudios, expuestos a continuación, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación entre los ovocitos en fresco y los ovocitos vitrificados.

Liu et al. realizaron un estudio global de inmunofluorescencia para detectar las citosinas metiladas (5mC) de 12 ovocitos metafase II (MII) en fresco, 20 MII tras maduración in vitro (IVM) y 19 MII procedentes de vesículas germinales (VG) vitrificadas maduradas in vitro. Los resultados del estudio de inmunofluorescencia no demostraron diferencias significativas en los niveles de metilación de los tres grupos (grupo MII en fresco:  $1.18 \pm 0.37$ , grupo MII IVM:  $1.16 \pm 0.34$  y grupo MII vitrificado:  $1.06 \pm 0.23$ , media  $\pm$  desviación estándar).<sup>11</sup>

De Munk et al. también realizaron un estudio global de inmunofluorescencia, pero en este caso analizaron 31 embriones en día 3 procedentes de 17 MII en fresco y 14 MII vitrificados. Tras la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de la metilación (5mC) y la hidroximetilación (5-hidroximetilcitosina, 5hmC), determinaron que no existían diferencias significativas entre los embriones procedentes de ovocitos en fresco y ovocitos vitrificados (Tabla 2).<sup>11</sup>

	Ovocitos en fresco	Ovocitos vitrificados	P valor
Media 5mC	$1.0 \pm 0.49$	$0.83 \pm 0.41$	0.299
Media 5hmC	$1.0 \pm 0.40$	$0.81 \pm 0.36$	0.189

**Tabla 2.** Resultados del estudio de De Munk et al. Se muestran la media de los niveles de fluorescencia para 5mC y 5hmC de ambos grupos de estudio, ovocitos en fresco y ovocitos vitrificados, junto a su p valor.

Por último, Al-Khtib et al. realizaron un estudio de pirosecuenciación por bisulfito para analizar las DMRs de H19 y KCNQ1 en 77 MII tras IVM procedentes de VG vitrificadas y 85 MII tras IVM procedentes de VG en fresco. En sus resultados observaron que los ovocitos MII procedentes de VG vitrificados tenían los mismos niveles de metilación en la DMR de KCNQ1 que los ovocitos MII procedentes de VG en fresco ( $p > 0.99$ ). También observaron que los ovocitos vitrificados que se habían bloqueado en metafase I (MI) tenían unos niveles de metilación inferiores a los de MII ( $p < 0.001$ ), lo cual demuestra que la vitrificación no afecta a la metilación de novo que tiene lugar durante la reanudación de la meiosis in vitro. En cuanto a H19, la mayor parte de los ovocitos vitrificados que llegaron al estadio MII tras IVM presentaban la DMR de H19 no metilada, al igual que los controles en fresco ( $p = 0.18$ ), mientras que los ovocitos que se habían bloqueado en MI tenían un nivel de metilación superior ( $p < 0.001$ ).<sup>11</sup>

En contraposición, existen múltiples estudios sobre el efecto de la vitrificación en el epigenoma de modelos animales, principalmente murinos y bovinos. Debido al gran número de estudios y a la elevada heterogeneidad que existe entre ellos, tanto a nivel de modelos animales como de técnicas empleadas y secuencias objeto de estudio, solo comentaremos que existen tanto artículos que apoyan la existencia de un efecto negativo de la vitrificación sobre el epigenoma como artículos que no han encontrado ningún efecto significativo.<sup>11</sup>

#### **4.4.2. Vitrificación de embriones**

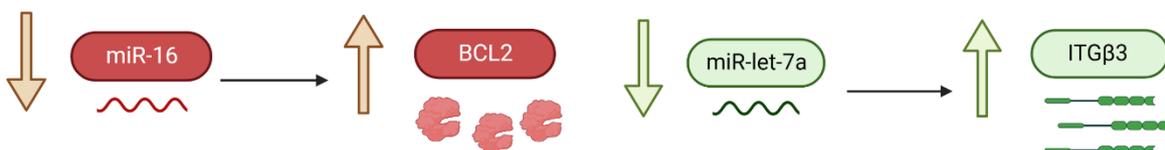
Los estudios del efecto de la vitrificación sobre el epigenoma de los embriones son muy escasos, especialmente en el caso de embriones humanos. Entre ellos podemos destacar los comentados a continuación.

En primer lugar, en el estudio de Derakhshan-Horeh et al. no observaron alteraciones en el metiloma de embriones de D3 debidas a la vitrificación. Para ello, analizaron mediante pirosecuenciación por bisulfito los niveles de metilación del DMR de los genes H19 e IGF2. Los grupos de estudio consistían en 13 embriones en fresco biopsiados en D3 y cultivados hasta estadio de blastocisto y 17 embriones biopsiados y vitrificados en D3, posteriormente desvitrificados y cultivados hasta estadio de blastocisto. En sus resultados exponen que el porcentaje de metilación del DMR estudiado no presentaba diferencias significativas entre ambos grupos (grupo en fresco:  $38.27\% \pm 4.1$ , grupo vitrificado:  $35.5\% \pm 3.6$ ,  $p > 0.05$ ), así como que ambos grupos presentaban un porcentaje de

metilación inferior al control realizado con linfocitos procedentes de muestras de sangre periférica de 6 voluntarios ( $49.52\% \pm 1.86$ ).<sup>12</sup>

Sin embargo, el estudio realizado por Ghosh et al. sí muestra diferencias significativas en la metilación global del ADN y en el elemento transponible LINE-1 en muestras placentarias procedentes de embriones humanos en fresco y embriones crioconservados. Cabe destacar que este estudio se llevó a cabo con congelación lenta y no vitrificación. El grupo realizó un ensayo de metilación luminométrica (LUMA) para analizar los niveles de metilación globales en 128 embriones en fresco y 54 congelados, así como un ensayo de pirosecuenciación para evaluar los niveles de metilación de LINE-1 en 90 embriones en fresco y 36 embriones congelados. El análisis LUMA mostró diferencias significativas en la metilación global entre ambos grupos (grupo congelado:  $0,54 \pm 0,06$ , grupo en fresco:  $0,51 \pm 0,07$ ,  $p < 0.0001$ ). El ensayo de pirosecuenciación mostró diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la metilación de LINE-1 (grupo congelado:  $0,48 \pm 0,04$ , grupo en fresco:  $0,48 \pm 0,05$ ,  $p = 0.0137$ ).<sup>13</sup>

Por último, también se ha analizado la influencia de la vitrificación sobre el epigenoma desde el punto de vista de los niveles de miRNAs. Este estudio realizado por Daneshvar et al. se centró en las alteraciones en los niveles de expresión de los miRNAs miR-let-7a y miR-16, así como de los genes ITGβ3, BCL2 y BAX. ITGβ3 es el gen de la integrina β3, que participa en el proceso de implantación del blastocisto, y aumenta su expresión cuando los niveles de miR-let-7a se reducen. BCL2 es un gen anti-apoptótico que se ve influido por los niveles de miR-16 de forma que al disminuir este miRNA, los niveles de expresión de BCL2 aumentan (Figura 3). El gen BAX es un gen pro-apoptótico y junto con BCL2 son dos genes de gran importancia para la supervivencia del embrión.



*Figura 3. Representación de la relación entre los miRNAs miR-16 y miR-let-7a y sus genes diana BCL2 e ITGβ3, respectivamente.*

Analizaron 15 blastocistos de buena calidad, procedentes de parejas jóvenes (25-35 años) y fértiles, divididos en tres grupos de estudio con 5 blastocistos en cada grupo: en fresco, vitrificado y revitrificado. Tras un análisis por PCR cuantitativa de transcripción inversa observaron que tanto miR-let-7a como miR-16 disminuían su expresión en los grupos vitrificado y revitrificado en comparación con el grupo en fresco, lo cual provocaba un

aumento de la expresión de sus genes diana ITGβ3 y BCL2. Conviene señalar que a pesar de que se observó un aumento de la expresión de BCL2 en el grupo vitrificado con respecto al fresco, no había diferencias significativas en la expresión de miR-16 en este grupo. Además, el gen BAX sufrió una disminución de su expresión en el grupo revitrificado.

Es importante destacar que, al igual que en el caso de los ovocitos, existen varios estudios que analizan la influencia de la vitrificación sobre el epigenoma de embriones en modelos animales. Sin embargo, por límites de extensión y capacidad de este trabajo no es posible comentar todos los artículos disponibles, por ello nos hemos centrado en aquellos que estudian embriones humanos principalmente. Algunos de estos trabajos en modelos animales presentan resultados a favor de que la vitrificación altera el epigenoma, mientras que otros estudios no encuentran diferencias significativas entre los grupos.<sup>14</sup>

## **5. DISCUSIÓN**

El presente trabajo se ha centrado en una búsqueda y análisis de la literatura disponible en cuanto a las alteraciones epigenéticas que pueden causar los ART sobre el epigenoma de ovocitos y embriones. Con el objetivo de tener una visión global de lo que un ciclo de reproducción asistida podría suponer sobre el epigenoma, hemos estudiado la literatura disponible sobre la estimulación ovárica controlada, FIV/ICSI, cultivo embrionario y vitrificación/desvitrificación.

### **5.1. Estimulación ovárica controlada**

Los estudios expuestos en este trabajo sobre la estimulación ovárica tienen diferentes aproximaciones sobre la implicación de la estimulación ovárica sobre el epigenoma. Los estudios de Sato et al. y Saenz de Juano et al. analizaron los niveles de metilación obteniendo resultados diferentes, pero no excluyentes. Sato et al. concluyeron que la estimulación alteraba la metilación de varios genes improntados, mientras que Saenz de Juano et al. no encontraron diferencias al analizar los metilomas completos. El estudio de Huo et al., que se centra en la influencia de la dosis de la estimulación sobre la metilación, apoya por un lado el estudio de Saenz de Juano et al. al determinar que no existen diferencias significativas a nivel de la metilación del genoma completo, y por otro lado también apoya el estudio de Sato et al. al encontrar diferencias a nivel de las DMRs, observando además que los patrones de metilación se mantenían en las diferentes dosis

hormonales. Por lo tanto, parece que la estimulación afecta a la metilación de zonas específicas del genoma, pero no a la metilación global del ADN. No obstante, es importante ser cautos a la hora de extrapolar los resultados de estos estudios ya que presentan varias limitaciones: los tamaños poblacionales son pequeños, dos de los tres estudios se realizaron en modelos murinos y el estudio de Sato et al., el único con ovocitos humanos, obtuvo los gametos de parejas con infertilidad, por lo que no podemos descartar por completo que estas alteraciones se deban a la infertilidad de la pareja y no a la estimulación.

Por otro lado, los estudios de Fauque et al. y Liang et al. analizan la influencia de la estimulación ovárica desde el punto de vista de la expresión génica. Fauque et al. demuestran que la estimulación ovárica disminuye los niveles de expresión del gen improntado H19, mientras que Liang et al. no observa alteraciones en la expresión de las enzimas metiltransferasas (encargadas de la metilación de novo y su mantenimiento) incluso con diferentes dosis hormonales. Por lo tanto, la modificación de la expresión de los genes improntados tendría que deberse a otro mecanismo que no implicara la reducción de las metiltransferasas. A pesar de que estos artículos son con modelos de ratón, los tamaños poblacionales son mayores que en los artículos comentados previamente, lo cual refuerza sus conclusiones.

Por último, el estudio de Tang et al. nos muestra cómo la estimulación ovárica también afecta a la modificación de histonas, alterando la expresión de varios tipos de enzimas modificadoras de histonas como histonas acetilasas, deacetilasas, metiltransferasas y demetilasas en los blastocistos procedentes de ratones estimulados. Este grupo también muestra cómo la estimulación disminuye la expresión de varios genes implicados en la pluripotencialidad celular a medida que aumentan las dosis hormonales, lo cual podría afectar al desarrollo del embrión.

Tras este análisis, hemos podido comprobar que la estimulación ovárica controlada parece alterar los patrones de metilación y la expresión de varios genes improntados, así como la expresión de diferentes enzimas modificadoras de histonas y genes pluripotenciales, siendo las modificaciones mayores a medida que se aumentan las dosis hormonales. Conociendo esto, el siguiente paso sería realizar estudios sobre cómo estas alteraciones pueden estar influyendo sobre la calidad de los ovocitos y su capacidad para dar lugar a embriones normales y RNV sanos, por ejemplo, analizando muestras placentarias y de cordón umbilical. Además, estudiar cómo la estimulación ovárica puede estar afectando

a la eficacia del ciclo dando lugar a ovocitos de peor calidad es de gran interés para mejorar el trabajo en el laboratorio.

## **5.2.Fecundación in vitro e Inyección citoplasmática de espermatozoides**

Se ha hipotetizado mucho sobre que los procedimientos de FIV e ICSI puede estar alterando el epigenoma de los embriones, especialmente ICSI al tratarse de una técnica invasiva y utilizarse en los casos de mala calidad seminal. En relación a esto último, los trabajos de Marques et al. y Kobayashi et al. demuestran cómo pacientes con azoospermia y oligozoospermia presentan alteraciones en los patrones de metilación de varios genes con impronta y elementos transponibles. Al hacer ICSI, no se pueden discriminar aquellos espermatozoides con alteraciones epigenéticas por lo que éstas pueden ser heredadas por la descendencia. Es más, algunos estudios han documentado tasas de fecundación y embarazo menores con el uso de muestras de tejido testicular de pacientes con azoospermia secretora en comparación con pacientes con azoospermia obstructiva, lo cual se correlaciona con los resultados que obtuvieron Marques et al.<sup>6</sup> Además, en un estudio realizado por Kobayashi et al. posteriormente al que comentamos, encontraron que 17 de los 78 abortos analizados tras embarazos por ART presentaban alteraciones epigenéticas, y que en 7 de ellos las alteraciones eran las mismas que las encontradas en el semen de los padres.<sup>15</sup> Sin embargo, en el estudio inicial de Kobayashi et al., tras analizar los patrones de metilación de una serie de genes improntados en un RNV por ICSI, observaron que éste no había heredado ninguna de las alteraciones encontradas en el semen del padre. Teniendo en cuenta estos tres artículos, el nacimiento de niños con patrones de metilación normales de padres con alteraciones de la metilación en el semen podría deberse a varias explicaciones: que el semen presente un mosaicismo en los patrones de metilación donde los embriones con alteraciones se bloqueen en el desarrollo y, por lo tanto, solo los embriones normales pueden llegar a término o, que el embrión sea capaz de resolver estas alteraciones durante su desarrollo.

Por otro lado, existen múltiples artículos que demuestran alteraciones en la metilación del ADN en niños nacidos por FIV e ICSI en comparación con niños nacidos por gestación espontánea. Estas diferencias se han encontrado tanto a nivel de zonas específicas del genoma (genes improntados y elementos transponibles) como a nivel del genoma completo. Entre los estudios que hemos analizado, los llevados a cabo por Whitelaw et al., Rancourt et al. y Choux et al. encontraron diferencias en los patrones de metilación de genes improntados y elementos transponibles, mientras que en el estudio de El Hajj et

al. descubrieron alteraciones de la metilación del ADN en el genoma completo. A pesar de haber encontrado todas estas alteraciones, las diferencias en los niveles de metilación de los grupos son muy pequeñas y cuando se ha estudiado la expresión de los genes con impronta alterada, como en el estudio de Rancourt et al., solo uno de los tres genes alterados presentaba diferencias en su expresión que se correlacionaba con sus niveles de metilación. Además, los grupos en estos estudios suelen ser de pequeño tamaño, por la dificultad del acceso a este tipo de muestras, por lo que se suele referir la necesidad de realizar estudios de mayor alcance.

Tras haber analizado los estudios aquí comentados, podemos concluir que a pesar de haber demostrado la presencia de alteraciones en la metilación del ADN de RNV tras ART, las diferencias entre los grupos nacidos por ICSI, FIV y gestación espontánea son pequeñas y parecen no tener una gran significancia sobre el desarrollo embrionario y fetal. Además, parece que en este caso el principal causante de las alteraciones en los patrones de metilación es la herencia procedente de muestras seminales de baja calidad, y no tanto las técnicas en sí. Sería interesante estudiar cómo los embriones podrían estar resolviendo las alteraciones en la metilación demostradas en muestras seminales oligozoospermicas y azoospermicas, o a qué se debe que los RNV procedentes de estas muestras no presenten las mismas alteraciones.

### **5.3. Cultivo embrionario**

El cultivo embrionario ha sido desde el primer momento el principal objetivo de los estudios como causa en la alteración del epigenoma de los embriones y, consecuentemente, de la salud de los RNV. El estudio de Doherty et al. en el año 2000 demostró que el cultivo en los medios Whitten y KSOM AA provocaba una pérdida de la metilación del gen improntado H19 y su consecuente expresión bialélica en embriones de ratón. Además, en el año 2015 un estudio realizado por Kleijkers et al. demostró que existía un elevado número de genes que se expresaban de forma diferencial en embriones humanos cultivados en los medios G5 y HTF. Muchos de estos genes estaban implicados en múltiples procesos biológicos clave, como la regulación del ciclo celular o la fosforilación oxidativa, y se encontraban regulados al alza en los embriones cultivados en G5. Sin embargo, los embriones analizados habían sido reclutados de aquellas cohortes donde ya se habían seleccionado los embriones para la transferencia y la crioconservación, es decir, se trataba de los embriones de peor calidad. Esto nos lleva a pensar que las alteraciones en la expresión génica podrían deberse a un problema

intrínseco de los embriones y no al cultivo embrionario *per se*. Esta reflexión junto al hecho de que solo fueron analizados 10 embriones por grupo dificulta la posibilidad de extrapolar estos resultados.

Recientemente, los estudios de Mulder et al. y Barberet et al. no encontraron diferencias significativas entre los distintos medios analizados (G5 y HTF y medios globales de Irvine Scientific y LifeGlobal, respectivamente) a nivel de la metilación de múltiples genes improntados y elementos transponibles. Si comparamos estos resultados con los obtenidos por Doherty et al., donde había una clara alteración de la metilación, podemos hipotetizar que el hecho de que no se observen diferencias en estos estudios más recientes se deba a que los medios de cultivo han mejorado durante las últimas dos décadas, evitando así las modificaciones epigenéticas que estaban causando en un primer momento. A su vez, esta diferencia en los resultados podría deberse a que las muestras utilizadas son diferentes: en los estudios de Mulder et al. y Barberet et al. se analizan muestras placentarias y de frotis bucal de los RNV, mientras que en el estudio de Doherty et al. se analizaron embriones de ratón. Es posible que, como comentábamos en el apartado de FIV e ICSI, estas alteraciones epigenéticas se estén resolviendo durante el desarrollo embrionario y fetal y no sean detectables tras el nacimiento.

Podemos concluir por tanto que el cultivo embrionario altera el epigenoma de los embriones, pero que la mejora de los medios de cultivo en las últimas décadas ha permitido reducir estas alteraciones.

## **5.4. Vitrificación**

### **5.4.1. Vitrificación de ovocitos**

En los comienzos del uso de la vitrificación en la práctica clínica, muchos expertos se encontraban escépticos con esta técnica por los posibles problemas que los crioprotectores y la crioconservación podrían suponer sobre los gametos y embriones. A pesar de ello, la vitrificación ha demostrado ser una técnica segura, con un porcentaje de supervivencia superior al 90% y miles de niños nacidos gracias a su uso a día de hoy.

En este trabajo hemos observado cómo los estudios disponibles llevados a cabo con ovocitos humanos no observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación entre ovocitos en fresco y vitrificados.

Los tres artículos analizados permiten obtener una visión general de los posibles efectos de la vitrificación sobre el epigenoma ya que se estudian las alteraciones que ésta podría tener sobre la metilación desde varios puntos de vista. Liu et al. analizaron la metilación del ADN directamente sobre los gametos, De Munk et al. observaron la metilación global en los embriones procedentes de ovocitos vitrificados y en fresco y Al Khtib et al. mostraron el análisis de zonas específicas del ADN como son las DMRs de dos genes improntados. Estos resultados resultan tranquilizadores, ya que estamos observando que no solo no existen alteraciones de la metilación tras la vitrificación en los propios ovocitos, sino que además estos son funcionales porque dan lugar a embriones normales y libres de alteraciones en la metilación. Además, el análisis de Al Khtib et al. sobre dos genes improntados complementa estos estudios, dando información necesaria sobre posibles alteraciones a nivel de zonas específicas del genoma. Además, este último estudio también concluye que la vitrificación parece no tener un impacto sobre la reanudación de la meiosis, ya que las VG consiguen madurar hasta MII tras la desvitrificación.

No obstante, el hecho de que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas en estos estudios no descarta por completo que la vitrificación esté afectando a la metilación del ADN de los ovocitos. Debemos tener en cuenta que las poblaciones de estudio de estas investigaciones no son muy grandes, especialmente en el estudio de Liu et al., y que el uso de la maduración in vitro de los ovocitos podría estar alterando los resultados. Además, el hecho de que existan trabajos en animales que sí han encontrado alteraciones en el epigenoma de los ovocitos podría indicar que la falta de resultados positivos en los estudios con ovocitos humanos se deba al escaso número de investigaciones con estos gametos. Por lo tanto, aunque a priori podamos concluir que la vitrificación no altera el epigenoma de los ovocitos, sería adecuado aumentar el número de estudios en este sentido con el objetivo de obtener unas conclusiones más claras y extrapolables.

#### **5.4.2. Vitrificación de embriones**

La vitrificación de embriones ha permitido diferir los ciclos con el objetivo de transferir los embriones cuando el endometrio se encuentra más receptivo, el cual se puede ver alterado con el uso de la estimulación ovárica controlada. Se trata, por tanto, de una técnica de gran importancia para los ART, no solo por la necesidad de crioconservar el

resto de embriones viables de la cohorte, sino también por la posibilidad de elegir el momento más adecuado para la transferencia.

La gran relevancia de la vitrificación a la hora de conseguir unos buenos resultados en los tratamientos trae consigo la necesidad de conocer los posibles problemas que podría acarrear sobre la calidad de los embriones sometidos a la técnica. Entre estos posibles problemas, encontramos las alteraciones epigenéticas.

Como habíamos comentado en los resultados, el número de estudios sobre la influencia de la vitrificación sobre el epigenoma de embriones humanos es bastante escaso, por lo que debemos ser cautos a la hora de extrapolar los resultados obtenidos.

El estudio de Derakhshan-Horeh et al. no encontró diferencias significativas en la metilación de los genes improntados H19 e IGF2 en embriones de D3 vitrificados. Los embriones de D3 suelen ser mucho más sensibles a la manipulación que los blastocistos, por lo que el hecho de no hallar diferencias entre los embriones en fresco y los embriones vitrificados es esperanzador en cuanto a que la vitrificación puede no estar afectando a la metilación del ADN. Sin embargo, debemos tener en cuenta que este estudio tenía unos grupos pequeños, con 13 embriones en fresco y 17 vitrificados, debido a la dificultad de obtener embriones humanos. En contraposición, el estudio de Daneshvar et al. ha encontrado diferencias en la expresión de dos miRNAs y sus genes diana entre blastocistos en fresco, blastocistos vitrificados y blastocistos revitrificados. La disminución de la expresión de miR-let-7a en los embriones vitrificados y revitrificados se traducía en un aumento de la expresión de su gen diana ITG $\beta$ 3. Este gen codifica para la integrina  $\beta$ 3, implicada en el proceso de adherencia durante la implantación del blastocisto. Varios estudios han reportado mejores resultados en la implantación de blastocistos vitrificados frente a blastocistos en fresco.<sup>14</sup> La mejor sincronización del blastocisto con el útero tras la vitrificación podría certificar los mejores resultados de la implantación, aunque no podemos descartar que el aumento de la integrina  $\beta$ 3, demostrado en este estudio, esté influyendo de cierta forma en una mejora de la implantación. Además, la disminución de la expresión de miR-16 y el consecuente aumento de la expresión de su gen diana BCL2 podría suponer una protección contra la apoptosis en los embriones vitrificados, debido a la función antiapoptótica de este gen. Además, el estudio llevado a cabo por Ghosh et al. también encontró diferencias significativas en la metilación global del ADN y de LINE-1 en muestras placentarias, con tamaños poblacionales grandes, 128 muestras procedentes de embriones en fresco y 54

congelados. Sin embargo, es importante señalar que este estudio se llevó a cabo con congelación lenta y no con vitrificación.

Según estos estudios, podríamos concluir que tanto la vitrificación como la congelación lenta provocan alteraciones en los mecanismos epigenéticos de los embriones humanos. Por sus tamaños poblacionales mayores, el estudio sobre la congelación lenta permite mayor confianza a la hora de extrapolar sus resultados que los estudios sobre la vitrificación. Sin embargo, sería de interés realizar más estudios sobre la influencia de la vitrificación sobre los mecanismos epigenéticos del embrión, especialmente sobre la alteración de miRNAs y sus genes diana y cómo esto puede afectar a la implantación y viabilidad de los embriones.

## **6. CONCLUSIONES**

La realización de este trabajo nos ha permitido comprobar cómo el epigenoma de ovocitos y embriones parece verse alterado por las técnicas de reproducción asistida utilizadas en varios puntos del ciclo de tratamiento.

La estimulación ovárica controlada parece afectar a la metilación y expresión de genes improntados, así como a la expresión de enzimas modificadoras de histonas y genes pluripotenciales. No parece afectar, sin embargo, a la metilación global del genoma y a la expresión de las enzimas encargadas de la metilación. Además, las modificaciones parecen ser más severas conforme la dosis hormonal es mayor. Estas alteraciones podrían suponer un empeoramiento de la calidad de los ovocitos, por lo que sería interesante realizar estudios que demuestren cómo estas alteraciones podrían estar afectando a la capacidad de los ovocitos de ser fecundados, a la calidad embrionaria y a la salud de los RNV.

La FIV e ICSI también parecen alterar tanto los niveles de metilación de genes improntados y elementos transponibles como la metilación global del genoma, pero estas alteraciones son pequeñas y no parecen suponer modificaciones en la expresión de estos genes. Es la calidad seminal la que los estudios sugieren como principal causante de las alteraciones en la metilación de embriones obtenidos mediante ICSI. Hemos podido observar cómo los ciclos con muestras de baja calidad seminal dan lugar a un mayor número de abortos y algunos de estos presentan los mismos patrones de metilación alterados que las muestras seminales utilizadas.

El cultivo embrionario también se ha demostrado ser causante de alteraciones en los patrones de metilación de los embriones. La mejora de los medios de cultivo parece haber reducido la incidencia de estas modificaciones, pero es importante estar al tanto de este hecho a la hora de la elección de los medios para mejorar la eficiencia del trabajo en el laboratorio.

Por último, la vitrificación no parece afectar a la metilación del ADN de los ovocitos y embriones, pero sí a la expresión de miRNAs en los embriones. Es más, los resultados sugieren que la vitrificación de los embriones y la transferencia en diferido podría mejorar la eficacia de los ciclos, tanto por la mejor sincronización del embrión y el endometrio como por el aumento de la expresión de genes relacionados con la implantación y la protección contra la apoptosis.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Novakovic B, Lewis S, Halliday J. Assisted reproductive technologies are associated with limited epigenetic variation at birth that largely resolves by adulthood. *Nat Commun.* 2019; 10: 3922. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11929-9>
2. Hoover R, Ibarra M. *Epigenetics & Classical Genetics* [Internet]. Delhi: Academic Studio; 2012 [cited 2022 April 25]. Available from: [https://search-ebscohost-com.ezproxy.universidadeuropea.es/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=446519&lang=es&site=ehost-live&scope=site](https://search.ebscohost.com.ezproxy.universidadeuropea.es/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=446519&lang=es&site=ehost-live&scope=site)
3. Xu R, Li C, Liu X, Gao S. Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein Cell.* 2021 Jan;12(1):7-28. doi: 10.1007/s13238-020-00757-z.
4. Xu Q, Xie W. Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends Cell Biol.* 2017; 28 (3): 237-253. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.008>
5. Paro R, Grossniklaus U, Santoro R, Wutz A. *Introduction to Epigenetics* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021[cited 2022 April 26]. Available from: <https://library.oapen.org/handle/20.500.12657/48275>
6. Sciorio R, El Hajj N. Epigenetic Risks of Medically Assisted Reproduction. *J Clin Med.* 2022; 11: 2151. <https://doi.org/10.3390/jcm11082151>

7. Rancourt R, Harris H, Michels K. Methylation levels at imprinting control regions are not altered with ovulation induction or in vitro fertilization in a birth cohort. *Hum. Reprod.* 2012; 27: 2208–2216. <https://doi.org/10.1093/humrep/des151>
8. Choux C, Binquet C, Carmignac V, Bruno C, Chapusot C, Barberet J, LaMotte M, Sagot P, Bourc'His D, Fauque P. The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility. *Hum. Reprod.* 2017; 33: 331–340. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex366>
9. Mulder CL, Wattimury TM, Jongejan A, deWinter-Korver CM, van Daalen SKM, Struijk RB, Borgman SCM, Wurth Y, Consten D, van Echten-Arends J. Comparison of DNA methylation patterns of parentally imprinted genes in placenta derived from IVF conceptions in two different culture media. *Hum. Reprod.* 2020; 35: 516–528. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa004>
10. Barberet J, Binquet C, Guilleman M, Doukani A, Choux C, Bruno C, Bourredjem A, Chapusot C, Bourc'his D, Duffourd Y. Do assisted reproductive technologies and in vitro embryo culture influence the epigenetic control of imprinted genes and transposable elements in children? *Hum. Reprod.* 2021; 36: 479–492. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa310>
11. Barberet J, Barry F, Choux C, Guilleman M, Karoui S, Simonot R, Bruno C, Fauque P. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenetics.* 2020 Aug 10; 12(1): 121. doi: 10.1186/s13148-020-00911-8.
12. Derakhshan-Horeh M, Abolhassani F, Jafarpour F, et al. Vitrification at Day 3 stage appears not to affect the methylation status of H19/IGF2 differentially methylated region of in vitro produced human blastocysts. *Cryobiology* 2016; 73(02): 168–174. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.08.003
13. Ghosh J, Coutifaris C, Sapienza C, et al. Global DNA methylation levels are altered by modifiable clinical manipulations in assisted reproductive technologies. *Clin Epigenetics.* 2017; 9: 14. doi: 10.1186/s13148-017-0318-6
14. Daneshvar M, Movahedin M, Salehi M, Noruzinia M. Alterations of miR-16, miR-let-7a and their target genes expression in human blastocysts following vitrification and re-vitrification. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021 Oct 9; 19(1): 155. doi: 10.1186/s12958-021-00842-w

15. Kobayashi H, Hiura H, John RM, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, Suzuki R, Suzuki F, Hayashi C, Utsunomiya T, Yaegashi N, Arima T. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet.* 2009 Dec; 17 (12): 1582-91. doi: 10.1038/ejhg.2009.68.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Abreviaturas

Abreviatura	Descripción	Abreviatura	Descripción
5hmC	5-hidroximetilcitosina	ICR	Centro regulador de impronta
5mC	5-metilcitosina	ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
6mA	N6-metiladenina	IVM	Maduración in vitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico	lncRNA	ARN no codificante largo
ARN	Ácido ribonucleico	MI	Metafase I
ART	Tratamientos de reproducción asistida	MII	Metafase II
CpG	Pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos	miRNA	Micro ARN
DMR	Región diferencialmente metilada	ncRNA	ARN no codificante
eCG	Gonadotropina coriónica equina	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EOC	Estimulación ovárica controlada	piRNA	ARN asociados a Piwi

FIV	Fecundación in vitro	RNV	Recién nacido vivo
FSH	Hormona foliculoestimulante	siRNA	ARN pequeños de interferencia
hCG	Gonadotropina coriónica humana	sncRNA	ncRNA pequeños
hMG	Gonadotropina menopáusica humana	VG	Vesícula germinal
HTF	Fluido tubárico humano		

## 8.2. Lista de genes

Nombre gen	Descripción	Nombre gen	Descripción
AluYa5	Subfamilia de los elementos transponibles Alu	HDAC2	Histone Deacetylase 2
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	IGF2	Insulin Like Growth Factor 2
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator	INS	Insulin
DIRAS3	DIRAS Family GTPase 3	ITGβ3	Integrin Subunit Beta 3
DNMT1	DNA Methyltransferase 1	KCNQ1	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3 Alpha	KDM6A	Lysine Demethylase 6A
DNMT3B	DNA Methyltransferase 3 Beta	KDM6B	Lysine Demethylase 6B
ERVFRD-1	Endogenous Retrovirus Group FRD Member 1, Envelope	LINE-1	Class I transposable elements

ERVW-1	Endogenous Retrovirus Group W Member 1, Envelope	LIT1	KCNQ1 Opposite Strand/Antisense Transcript 1 (KCNQ1OT1)
G9A	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2 (EHMT2)	MEST	Mesoderm Specific Transcript
GCN5	Lysine Acetyltransferase 2A (KAT2A)	NANOG	Nanog Homeobox
GRB10	Growth Factor Receptor Bound Protein 10	OCT4	POU Class 5 Homeobox 1 (POU5F1)
GTL2/MEG3	Maternally Expressed 3	PEG3	Paternally Exprept 3
H19	H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript	SNRPN	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N
HAT1	Histone Acetyltransferase 1	SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
HDAC1	Histone Deacetylase 1	ZAC	PLAG1 Like Zinc Finger 1 (PLAGL1)