

***TRABAJO DE FIN DE MÁSTER en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida***

**DNA MITOCONDRIAL COMO PREDICTOR DE
LA VIABILIDAD EMBRIONARIA**

Autor: Elena Urbaneja Orbezua

Tutor: David Agudo Garcillán

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Mitocondria.....	4
1.1 ROS en la capacitación espermática.....	4
1.2 ROS y la herencia materna de mtDNA.....	6
2. mtDNA como marcador para la gestión de la viabilidad embrionaria	6
3. Técnicas basadas en mtDNA.....	9
OBJETIVO.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA.....	24

RESUMEN

En reproducción asistida y, en concreto, en fecundación *in vitro* (FIV) se ha estado confiando en herramientas de evaluación embrionaria morfológicas y morfométricas que muchos consideran imprecisas o bastante subjetivas. Más allá, las pruebas moleculares hasta ahora permiten confirmar la euploidía del embrión y la ausencia de las principales anomalías cromosómicas mediante *screening genético*. La implementación de este último tipo de pruebas ha supuesto una notable mejora en los resultados de ciclos de FIV, sin embargo, pese a esa clasificación y selección, una gran proporción de los embriones escogidos para transferencia no llegan a implantar. Resolver la incógnita detrás de la viabilidad embrionaria significaría, sin ninguna duda, un avance más que notable de cara a incrementar la tasa de embarazos exitosos en clínicas de reproducción asistida.

En las últimas décadas la bibliografía ha desvelado una posible asociación entre la cantidad de DNA mitocondrial y el potencial embrionario. Esta hipótesis parte de la premisa de que el embrión debe cumplir con un requerimiento energético mínimo para desarrollarse correctamente, pero que un contenido de mtDNA extremadamente alto puede ser síntoma de estrés metabólico e indicador de bajo potencial embrionario.

A la luz de esta hipótesis se han generado muchos proyectos que tienen como objetivo analizar este factor como marcador de la viabilidad embrionaria.

ABSTRACT

In assisted reproduction and, specifically, in vitro fertilization (IVF), there has been reliance on morphological and morphometric embryo assessment tools that many consider imprecise or quite subjective. So far, molecular tests allow to confirm the euploidy of the embryo and the absence of the main chromosomal abnormalities by genetic screening. The implementation of this last type of test has led to a notable improvement in the results of IVF cycles, however, despite this classification and selection, a large proportion of the embryos chosen for transfer fail to implant. Solving the unknown behind embryo viability would undoubtedly mean a remarkable advance in order to increase the rate of successful pregnancies in assisted reproduction clinics.

In recent decades, the literature has revealed a possible association between the amount of mitochondrial DNA and embryonic potential. This hypothesis is based on the premise that the embryo must meet a minimum energy requirement to develop correctly, an extremely high mtDNA content, however, can be a symptom of metabolic stress and an indicator of low embryonic potential.

Considering this hypothesis, many projects have been generated that aim to analyse this factor as a marker of embryo viability.

INTRODUCCIÓN

1. Mitochondria

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana que juega un papel principal en las funciones celulares clave como la producción de ATP, la regulación de la apoptosis, la homeostasis del calcio y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). La teoría más ampliamente aceptada postula que este orgánulo deriva de una bacteria α -púrpura endosimbiótica que se beneficiaría del oxígeno del huésped. Este origen evolutivo bacteriano se refleja en que este orgánulo cuenta con un genoma circular bicatenario propio, de aproximadamente 16,6kb, que se reproduce semiautónomamente cuando la célula se divide. Este mtDNA codifica un total de 37 genes, que se traducen en 22tRNA, 2 rRNA y 13 polipéptidos que formarán parte de la cadena de transporte de electrones. Las enfermedades resultantes de mutaciones en el mtDNA no se heredan siguiendo un patrón de herencia mendeliana, sino que se heredan por la línea materna y muestran una gravedad variable. Estas mutaciones dan lugar a un fenómeno conocido como heteroplasmia, en el que un mismo individuo acumula mutaciones debido a errores durante el proceso de replicación de mtDNA, dando lugar a poblaciones diferentes de mitocondrias según su genoma. En estos casos una carga mutante mayor se asocia generalmente a una mayor gravedad de la enfermedad. Este tipo de errores en la replicación también pueden ser debidos a la oxidación de los ROS (1).

1.1 ROS en la capacitación espermática

Las especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés *reactive oxygen species*) son compuestos derivados de la reducción de la molécula de oxígeno (O_2). Dentro de este grupo de metabolitos se incluyen el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que son los más conocidos. Además, también otros como el radical peroxilo, alcoxilo o hidroperóxidos orgánicos. Algunas de estas moléculas o átomos poseen uno o más electrones desapareados o radicales libres, mientras que otras no, por ello todas ellas se engloban en la categoría de especies reactivas del oxígeno. Las ROS son ubicuas en el organismo, puesto que son producto del metabolismo del oxígeno

en todos los sistemas biológicos aeróbicos, de tiempo de vida media muy corto y altamente reactivas.

Estas moléculas son producto de rutas reguladas por reacciones redox y pueden jugar roles tanto fisiológicos como patológicos en la regulación de la función del espermatozoide humano.

Hay estudios que han demostrado que al exponer a espermatozoides a bajos niveles de estrés oxidativo se induce la fusión espermatozoide-ovocito y hay una reducción en la fragmentación del ADN. Esto refleja el impacto positivo que tienen estas moléculas, por un lado, en la obtención del estado de capacitación espermática, en el que los ROS son mediadores clave en forma de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. El anión superóxido es responsable de la adquisición de estado de hiperactividad del espermatozoide, mientras que el peróxido de hidrógeno parece ser un factor significativo en el control de los eventos de fosforilación de tirosina asociados con la capacitación de los espermatozoides. Por otro lado, al mismo tiempo que permiten la capacitación espermática, los ROS también ayudan a proteger el DNA del espermatozoide frente al daño oxidativo promoviendo su compactación. Esto es gracias al fosfolípido glutatión peroxidasa (PHGPx) presente en espermatozoides de mamíferos. Esta enzima está estrechamente unida a la cromatina del espermatozoide y para funcionar, requiere de un aceptor de electrones en forma de peróxido de hidrógeno, entre otros. Por ello, es posible que una de las funciones de la generación de ROS a bajos niveles en espermatozoides del epidídimo sea la de crear esta especie de manera que se estimule la PHGPx y ayude a completar el proceso de compactación.

Sin embargo, a medida que aumentan los niveles de estrés oxidativo, la capacidad limitada del ciclo del glutatión del espermatozoide se vería sobrepasado y acabaría por inducir daño en el ADN (2).

1.2 ROS y la herencia materna de mtDNA

A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA, pese a que también dispone de este mecanismo de protección del material genético, es más susceptible a los daños producidos por los radicales libres, puesto que no tiene histonas (el DNA está menos compactado) y está localizado más cerca de la fuente de ROS, que son las propias mitocondrias. Al mismo tiempo, el mtDNA de los espermatozoides presenta mayor riesgo de fragmentarse, puesto que a lo largo de todo el proceso de capacitación y desplazamiento por el tracto reproductor femenino está más expuesto a ROS que el mtDNA presente en el ovocito. Esto significa que si la herencia del mtDNA fuese biparental existiría un riesgo mucho mayor de que la descendencia tuviera patologías derivadas de mutaciones del genoma mitocondrial.

Es por eso que las mitocondrias espermáticas están ubiquitinadas (proceso que comienza durante la propia espermatogénesis), de manera que aquellas que no se pierden durante la separación de la cabeza del espermatozoide y consiguen entrar en el ovocito durante la fecundación serán detectadas por el proteasoma y posteriormente degradadas, por ello, la herencia del genoma mitocondrial es exclusivamente materna (2).

2. mtDNA como marcador para la gestión de la viabilidad embrionaria

Actualmente, entre los marcadores de los que se dispone para la evaluación del potencial embrionario, parece que el contenido cromosómico ha cobrado importancia y es que, a pesar de que aún existe controversia respecto al uso de técnicas como el PGT (Test Genético Preimplantacional), la mayoría de la comunidad científica está de acuerdo con que el potencial embrionario para producir un recién nacido sano se ve limitado cuando el embrión es aneuploide en todas sus células. De hecho, las anomalías cromosómicas son la causa más común de fallo de implantación y pérdida de embarazo; sin embargo, cuando hablamos de embriones euploides aproximadamente un tercio de estos tampoco consigue salir adelante una vez realizada la transferencia (1).

Es verdad que en las últimas décadas la probabilidad de que un embrión obtenido a partir de la tecnología *in vitro* y seleccionado para transferencia lleve al nacimiento de un recién nacido sano ha aumentado. En algunas clínicas ya es típico que más de dos tercios de los blastocistos euploides y con buena morfología lleguen a dar lugar a un embarazo, pese a que obtener tales resultados en los ciclos de FIV no es una tarea sencilla. No obstante, a pesar de estas mejoras en el cultivo de embriones y aún con el desarrollo de técnicas para la evaluación de la competencia del embrión, todavía existe una fracción significativa de embriones elegidos para transferencia que no llegan a iniciar un embarazo (1).

En este contexto, el análisis de mtDNA se plantea como una técnica para evaluar la capacidad de un embrión aparentemente adecuado para la implantación de lograr dar lugar a un recién nacido vivo.

El ovocito humano maduro se considera de las células con mayor contenido tanto de mitocondrias como de mtDNA. La replicación del genoma mitocondrial en estas células comienza durante el desarrollo embrionario, cuando las ovogonias cuentan con aproximadamente 200 mitocondrias. Esta replicación continúa a medida que las células maduran hasta detenerse en la metafase II, cuando las células ya contienen cerca de 100.000 mitocondrias y entre 50.000 y 550.000 copias de mtDNA. Los embriones de mamíferos, como ya se ha explicado anteriormente, heredan mitocondrias (y consecuentemente mtDNA) exclusivamente de la madre, en concreto de la población que contiene el ovocito justo antes del momento de la fecundación. Este DNA comienza a aumentar una vez el embrión ya ha atravesado la primera diferenciación celular a trofotodermo y la masa celular interna se ha convertido en blastocisto, pero durante los días previos a la implantación se mantiene estable; aquí la función mitocondrial y la correcta expresión del mtDNA son cruciales, puesto que es un proceso que demanda energía. A lo largo de este desarrollo preimplantatorio el blastocisto tiene que confiar en

la energía que generan en cada blastómero un número limitado de mitocondrias, que con cada división celular se reducen al 50%, lógicamente (1).

Las formas mitocondriales más activas tienen significancia funcional porque son un indicador del estado del metabolismo de la célula y, por lo tanto, del blastómero. Estas formas activas son las que caracterizan un metabolismo elevado, es decir, una alta producción de ATP, por ello las diferentes transformaciones mitocondriales se asocian al requerimiento energético para el desarrollo embrionario y permiten una diferenciación de los diferentes estados preimplantatorios. Por esto, se esperaría que se relacionaran también con la capacidad o el potencial de desarrollo de los embriones tanto *in vivo* como *in vitro*, de hecho, existen estudios en embriones aparentemente normales cuyo desarrollo se detuvo durante estadios preimplantatorios *in vitro* en los que se ha visto que la transformación mitocondrial a forma activa o bien falla y no ocurre u ocurre únicamente en una fracción de la población presente en cada blastómero. Es decir, que el error a la hora de iniciar o mantener la producción de ATP alta puede estar asociado a un fallo de desarrollo. En base a esta información, se ha establecido que es necesario que los embriones cumplan con unos requerimientos metabólicos mínimos para poder salir adelante, pero, paradójicamente, no parecen ser los embriones que más número de copias de mtDNA poseen aquellos que mejor pronóstico tienen; de hecho, parece existir una tendencia que indica que un contenido de mtDNA por encima de un límite es indicador de peor potencial embrionario (Fig. 1). Esta hipótesis se puede explicar viendo ese aumento en la síntesis de mtDNA como un mecanismo compensatorio para hacer frente a las condiciones subóptimas en las que se puede encontrar un embrión de mala calidad, que, pese a ser euploide o contar con buenas características morfológicas, este destinado a un fallo implantatorio (1, 3, 4).

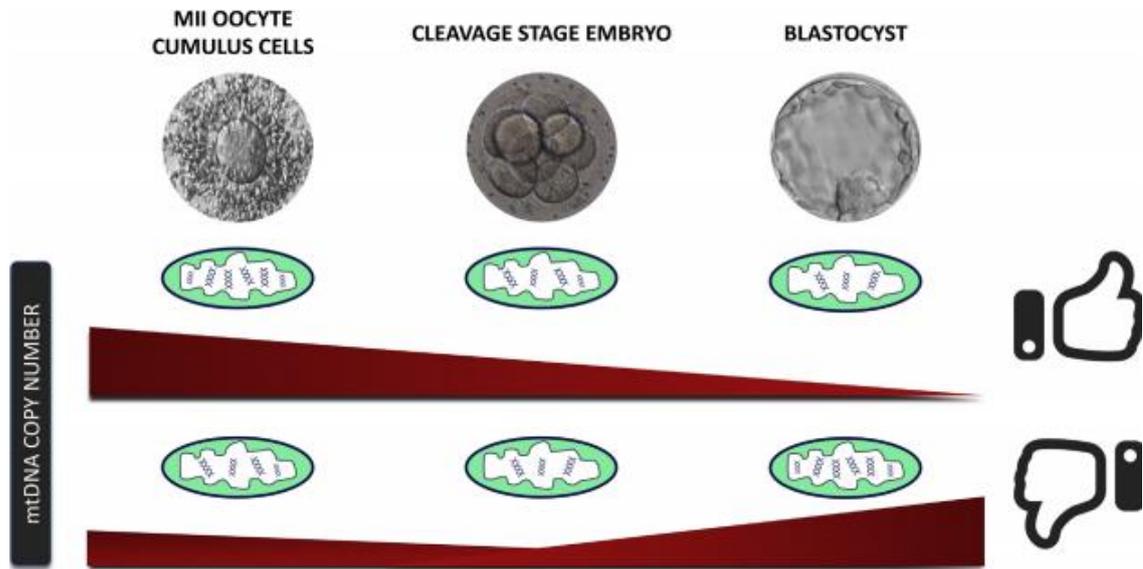


Figura 1. Modelo propuesto que mostraría la relación entre DNA mitocondrial (mtDNA) y viabilidad embrionaria. Un número de copias más alto de mtDNA tanto en células del cúmulo como en embriones de día 3 está asociado con un mejor resultado. En blastocistos, sin embargo, parece que se da el caso contrario, pues lo recomendable sería que la cantidad de mtDNA fuera reduciéndose hasta la llegada a estadio de blastocisto (Cecchino *et al.*, 2018).

Visto lo anterior, hay autores que proponen que existe una relación directa entre la cantidad de mtDNA y el potencial del embrión para dar lugar a un recién nacido vivo.

3. Técnicas basadas en mtDNA

Lógicamente, apoyándose en estos resultados ya hay empresas y grupos de investigación que han puesto en marcha estudios para analizar las alternativas que plantea esta propuesta. Actualmente existen empresas que se basan en esa premisa y han comercializado tests genéticos como MitoGrade™ (Reprogenetics) y MitoScore™ (Igenomix) (5, 6).

Otros equipos van más allá y plantean transferencias citoplasmáticas. Este trabajo no se va a centrar en estos tratamientos, pero, aun así, es una parte importante del contexto en el que se enmarca.

En un principio, la mayoría de los tratamientos consistentes en transferencia de genoma mitocondrial estaban motivados por tratar de evitar la herencia de enfermedades con origen mitocondrial y menos en tratar de mejorar la fertilidad. Esto es porque, al contrario que la transferencia mitocondrial para tratar enfermedades genéticas, cuando el objetivo es mejorar la previsión de fertilidad los estudios clínicos tienen más difícil justificación. En el primer caso, el argumento más habitualmente esgrimido es que los riesgos que suponga la transferencia se compensan con el propio riesgo de que la descendencia herede la mutación que se está tratando de evitar con el tratamiento, en este escenario es más fácil plantear estudios clínicos que valoren la efectividad de la transferencia como tratamiento. Es por eso por lo que, cuando hablamos del tratamiento para la mejora de la fertilidad, los trabajos que han ido abriendo el camino en este campo han sido principalmente estudios retrospectivos (7).

Ya en la década de los 90 hubo algún intento de mejorar la calidad ovocitaria y embrionaria mediante la inyección de citoplasma de ovocitos donados, jóvenes y sanos en ovocitos de mujeres con historia reproductiva en la que había habido fallos recurrentes. Esta inyección citoplasmática consistía en la inyección de la mitocondria obtenida a partir de donantes más jóvenes y resultó en el nacimiento de aproximadamente 50 bebés aparentemente sanos (7).

Posteriormente, basándose en tratamientos que tenían como objetivo evitar la herencia materna de enfermedades asociadas a genoma mitocondrial se propuso la transferencia de huso mitótico, que permite que el material genético del ovocito de la paciente pueda ser inyectado en el ovocito de una donante sana antes de la fecundación.

Unos años más tarde, apareció la posibilidad de trabajar con una fuente de mitocondrias de la propia paciente. Esto es gracias a la opción de aislar células precursoras de ovocitos de mujeres en edad reproductiva. Estas células residen en la capa exterior protectora de la corteza ovárica y hay estudios que han demostrado que las mitocondrias aisladas de este tipo de células son de gran calidad y, por lo tanto, pueden funcionar como una importante fuente de mitocondrias autólogas (7).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es aportar una visión general del estado de la técnica basada en la cuantificación de DNA mitocondrial como indicador del potencial implantatorio del embrión y valorar su eficacia como predictor.

A su vez, los objetivos secundarios son los de plantear mejoras de cara a investigaciones futuras y la posibilidad de replantear el objetivo de este marcador como prueba complementaria o como predictor negativo de la viabilidad embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

La búsqueda bibliográfica se realizó a partir de la página de PubMed. El principal criterio de selección fue la cantidad de citas bibliográficas de los artículos en otros trabajos y la repercusión que tuvieron estos en el marco de la investigación con mtDNA como marcador de viabilidad embrionaria. Las palabras clave en las que se basó la búsqueda fueron “DNA mitocondrial”, “mtDNA”, “selección embrionaria” y “viabilidad embrionaria”. Debido a la limitada cantidad de citas bibliográficas que está permitido incluir en el trabajo se descartaron aquellos trabajos con menos significancia o menos actualizados.

En base a estos criterios se ha trabajado con 19 artículos en total, 6 de ellos reviews, de los grupos de investigación más relevantes en el contexto del mtDNA como marcador de potencial embrionario. A partir de la lectura y análisis de estos trabajos se ha desarrollado la memoria, en la que se pretenden recoger los resultados y conclusiones elaboradas por diferentes autores hasta ahora y describir el escenario actual de la técnica.

RESULTADOS

En 1995 se publicó un estudio que pretendía vincular el potencial de desarrollo de ovocitos MII y su contenido en ATP (8). Para ello se realizaron mediciones de contenido de ATP de los ovocitos previas a la fecundación y se relacionaron con el resultado exitoso o no posterior a la transferencia. Un criterio de inclusión importante en el estudio fue la evaluación microscópica y clasificación del embrión en día 3, siendo una condición estricta que los embriones incluidos en el estudio fueran considerados embriones de alta calidad según dicha clasificación. Esto permitiría unas condiciones de partida igualadas para todos los embriones y evitaría un sesgo en los resultados. Éstos revelaron que aquellos ovocitos maduros (MII) que morfológicamente aparentaban ser normales diferían significativamente los unos de los otros en cuanto a contenido de ATP: la mayoría de los ovocitos pertenecientes a aquellas mujeres que sí que lograron concebir poseían un contenido de ATP de entre 2,2-3 pmol; en contraste, ninguno de los ovocitos pertenecientes a las pacientes que no lograron quedarse embarazadas tenía un contenido en ATP superior a los 2 pmol. En base a esas observaciones, declararon que el potencial de desarrollo de los ovocitos *in vitro* y de los embriones tras la transferencia podía estar estrechamente relacionado con el contenido de ATP, más que con las características morfológicas del embrión a la hora de la transferencia.

En 1999 se publicó el primer estudio que propuso una asociación entre la infertilidad que acompañaba al aumento de la edad materna y una disminución de la viabilidad ovocitaria. En este estudio valoraban la posibilidad de que esta viabilidad disminuida se

debiera a una cantidad reducida de mtDNA ovocitario y una tasa de mutación elevada. Estudios posteriores a este también observaron la misma tendencia, incluso algunos en biopsias de corpúsculos polares. A partir de este momento, y observadas las evidencias anteriores, se comenzó a investigar el potencial del mtDNA como biomarcador (9).

No fue hasta 2015 cuando fueron publicados de la mano de dos estudios diferentes las primeras evidencias de que existía una potencial relación entre el contenido de mtDNA de células del trofotodermo y la viabilidad embrionaria. El primero de estos (5) contaba con una muestra de 39 embriones en estado de escisión y 340 blastocistos, procesados mediante una combinación de hibridación genómica comparativa de microarrays (aCGH), PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) y secuenciación de nueva generación (NGS). Los resultados, además de descubrir que los niveles de mtDNA eran más elevados en embriones aneuploides, también mostraron que, de media, los blastocistos euploides que habían logrado un embarazo clínico poseían un número de copias de mtDNA significativamente menor que aquellos embriones que, pese a haber sido clasificados como euploides, no habían logrado tal éxito. En base a los datos obtenidos, los autores establecieron un límite de cantidad de mtDNA a partir del cual no ocurría el embarazo. Poco después, se publicó el segundo de estos manuscritos (6), que secundaba las conclusiones a las que había llegado el anterior. En este caso, 205 embriones en estado de escisión y 65 blastocistos fueron analizados, observándose que las posibilidades de implantación que poseía un blastocisto se reducían a medida que aumentaba el contenido en mtDNA de éste. En ambos casos se realizó la normalización del contenido en mtDNA respecto al DNA nuclear. Lo cierto es que ambos estudios obtuvieron resultados conflictivos entre sí para embriones de día 3 o anteriores, pero, conjuntamente, sí que concluyeron que un aumento en el número de copias de mtDNA estaba asociado a un descenso del potencial de implantación en blastocistos y que existía un límite superior con un 100% de valor predictivo negativo para el potencial de implantación, es decir, un valor a partir del cual los blastocistos no lograban esa implantación.

Estos resultados tenían sentido a la luz de estudios anteriores como el publicado en 2002 por Henry J. Leese (3), en el que planteaba la que él llamaba ‘Hipótesis del Embrión Silencioso’ (*Quiet Embryo Hypothesis*), que establece que un embrión con un correcto desarrollo adopta una actividad metabólica de base, que él denomina silenciosa. Es de esperar, entonces, que un embrión que está destinando a un desarrollo anormal sufra un estrés metabólico que se vea reflejado en forma de un aumento de la producción metabólica y, por lo tanto, de la cantidad de mtDNA, resultando este un excelente biomarcador de potencial implantatorio y viabilidad embrionaria. En ello se apoyaron los autores de ambos proyectos; de hecho, en base a estas conclusiones se patentaron los primeros tests que pretendieron utilizar este marcador en un entorno clínico: MitoGrade™ (Reprogenetics) y MitoScore™ (Igenomix).

A raíz de estos estudios, muchos laboratorios a lo largo del mundo trataron de reproducir los resultados obtenidos por los equipos de Fragouli y Díez-Juan. En 2016 surgió otro estudio con una muestra mucho mayor a la empleada por los grupos anteriores (4). En él se analizaron un total de 1396 embriones y llevaron el análisis de los datos un paso más allá: ajustaron la ratio para que se tuvieran en cuenta las diferencias entre embriones femeninos y masculinos y entre euploides y aneuploides. Esta corrección matemática, que, teóricamente, debería mejorar la exactitud de los resultados, provocó que, a la hora de analizar los datos, no se encontrara relación entre niveles de mtDNA y la viabilidad embrionaria o incluso la aneuploidía. La gestión y análisis de los datos también fue llevada a cabo mediante NGS y RT-qPCR y los niveles de mtDNA se normalizaron utilizando como referencia DNA nuclear.

Al año siguiente, parte del equipo de Fragouli publicó otros dos estudios que respaldaban los resultados que obtuvieron en su publicación original. El primero de ellos (10) fue el estudio ciego retrospectivo con mayor tamaño muestral hasta el momento, el cual incluía 1500 blastocistos euploides de hasta 35 clínicas diferentes. Al igual que en los primeros estudios publicados, se confirmó que el porcentaje de los embriones que no

llegaron a implantar (33 embriones de 282 transferencias totales) poseían niveles elevados de mtDNA, sin embargo, menos del 10% de éstos contenía un número de copias superior al límite establecido por los estudios anteriores. Algo llamativo de este estudio fue la variabilidad que mostraron los resultados entre las diferentes clínicas: la mitad de las clínicas no produjeron ningún embrión con un número de copias de mtDNA elevado; en la otra mitad, el porcentaje de estos fluctuaba del 1% hasta incluso el 27%.

El siguiente fue un estudio de cohortes, el único estudio prospectivo llevado a cabo hasta el momento acerca del mtDNA como marcador del potencial implantatorio (11). En él de 199 blastocistos euploides que se transfirieron 57 no llegaron a implantar y 9 de ellos poseían niveles anormalmente altos de mtDNA. La conclusión que obtuvo este estudio fue la de que el valor predictivo negativo de la cuantificación de mtDNA era del 100%.

Otro estudio posterior a estos últimos (12), al igual que el de Victor *et al.* también fue incapaz de encontrar asociación alguna entre la viabilidad embrionaria y la cantidad en contenido de mtDNA de las muestras, que en este caso procedían de 187 pacientes que se sometieron a una doble transferencia embrionaria de embriones de sexo opuesto (datos que se obtuvieron gracias a PGT-A), de manera que si alguno de los dos implantaba, la información sobre el sexo del embrión ayudaría a saber cuál de los dos embriones lo había conseguido. En 69 de los casos el parto fue de un único bebé de sexo conocido y el análisis posterior de los datos no reveló ninguna diferencia sistemática en la cantidad de mtDNA relativo entre embriones que lograron implantar y aquellos que no. Este estudio introdujo, sin embargo, una nueva valoración interesante: la comparación entre embriones pertenecientes a la misma cohorte, algo que, hasta el momento, no se había tenido en cuenta en el diseño del estudio.

Más reciente es un estudio retrospectivo de 2018 (13), con datos recabados de una única clínica que, de nuevo, no obtuvo resultados que apoyaran la hipótesis. Un total de 1510 biopsias de blastocisto fueron incluidas en el estudio y clasificadas en tres categorías (1 = high, 2 = mid, 3 = poor) en base a sus características morfológicas. Se observó que aquellos embriones de peor calidad (grupo 3) resultaban ser también aquellos que tenían niveles mayores de mtDNA en comparación con los pertenecientes a los grupos 1 y 2 y también que eran los embriones aneuploides aquellos que mayores niveles mostraban. Los resultados permitieron observar que los niveles de mtDNA sí que eran orientativos a la hora de diferenciar embriones de muy buena calidad (grupo 1) y embriones de calidad baja (grupo 3), pero, tras generar un subgrupo en el que excluyeron los embriones aneuploides, el valor predictivo resultaba no ser estadísticamente significativo. Concluyeron, por lo tanto, que, pese a que el mtDNA mostraba alguna asociación al grado de clasificación de los embriones, esta se perdía en el momento en el que sólo se analizaban embriones euploides.

Por último, en 2020 se ha publicado un estudio (14) dividido en dos partes. En una primera fase (n = 615) se planteó un estudio retrospectivo que valoraba, de nuevo, si la cantidad de mtDNA en biopsias de trofoectodermo se correlaciona con el resultado en FIV. La segunda fase (n = 78) incluía una comparación entre los resultados de las transferencias de dos embriones pertenecientes a la misma cohorte folicular. Un planteamiento que recuerda al llevado a cabo por Treff *et al.*, pero que, sin embargo, en este caso se llevó a cabo mediante dos transferencias consecutivas, en vez de una doble. De estas dos transferencias una falló y en la otra el embrión llegó a implantar, de manera que sabiendo el contenido en mtDNA de cada uno de ellos se podría evaluar la precisión de este factor para predecir el potencial implantatorio de embriones de la misma cohorte. Todos los embriones pasaron previamente un test genético para detectar la presencia de aneuploidías, de manera que se trataba de embriones euploides. El estudio concluyó que la implantación no estaba relacionada con el número de copias relativo que poseían los embriones, y tampoco describieron ningún valor superior a partir del cual la implantación

era menos probable, de la misma manera que tampoco se vio esta tendencia en embriones que pertenecían a la misma cohorte.

Hay gran parte la bibliografía, reviews sobre todo, que también van más allá y plantean otros aspectos a tener en cuenta en estos estudios. En uno publicado por Cecchino *et al.* (15) habla, además de estudios que han demostrado que existe también una relación entre la cantidad de mtDNA de las pacientes y su IMC, también de que los protocolos de estimulación pueden tener influencia en los niveles de mtDNA, como casos en los que se ha descrito un efecto negativo de la progesterona en altas dosis en la calidad embrionaria. Concluye, respecto al tema que nos ocupa, que el uso del mtDNA como marcador en la práctica clínica aún está sin resolver y que, además, la ausencia de tecnología no invasiva para llevar a cabo estos estudios complica la obtención de nuevos datos. Propone nuevos estudios, centrados en otros aspectos como células de la granulosa, corpúsculos polares, medios de cultivo embrionarios... y su relación con el mtDNA.

Por otro lado, otros autores ven más optimista la aplicación del mtDNA en el contexto de la reproducción asistida. Algunos lo plantean como complemento de otras pruebas genéticas, aumentando su eficacia predictiva, e incluso apuestan por nuevos tratamientos como transferencias mitocondriales o tratamientos dietéticos que podrían mejorar la función mitocondrial (16).

Otros centran sus conclusiones en recalcar la importancia de un buen planteamiento de cara a proyectos futuros y plantean preguntas que aún necesitan ser investigadas más a fondo: ¿pueden deberse estos resultados a diferencias entre clínicas?, ¿qué información nos da exactamente el número de copias de mtDNA?, ¿puede realmente ayudarnos en la elección del embrión de mayor calidad o hay que plantear otro enfoque? (17,18,19,1).

DISCUSIÓN

Los resultados publicados en el estudio de Van Blerkom *et al.* (7) abrieron la veda a las posteriores investigaciones sobre el tema, dejando en el aire dos importantes premisas: tanto en la misma cohorte de ovocitos como entre cohortes, el contenido de ATP varía de unos a otros de manera significativa; por otro lado, el contenido de ATP del embrión durante las primeras etapas de desarrollo y preimplantación puede estar directamente relacionado o determinado por el contenido del ovocito no fecundado.

Investigaciones posteriores vincularon ese contenido de ATP a un estrés metabólico y, posteriormente, a mtDNA. Los primeros trabajos que tuvieron como objetivo valorar el potencial del mtDNA como predictor de la viabilidad embrionaria fueron en su gran mayoría retrospectivos (5,6,4,10), hecho que algunos *reviews* consideran que perjudica la exactitud de los resultados obtenidos en estos grupos (15). Los dos primeros estudios en conjunto establecieron una posible asociación entre el número de copias de mtDNA de embriones de día 5 y su potencial implantatorio y postularon este análisis como posible técnica para la mejora de resultados de tratamientos de FIV. Se trató de los primeros estudios que pusieron su atención sobre el embrión en vez de evaluar el potencial del ovocito, pero, pese a estos resultados y a la generación de tests comerciales, la comunidad científica consideró que era demasiado pronto para su implementación en un entorno clínico. Generaron un entusiasmo exacerbado que, según algunos autores, ha ido progresivamente sustituyéndose por escepticismo al mismo tiempo que se comenzó a comprender la complejidad mitocondrial. A medida que se fueron publicando nuevos artículos y quedaron claras las contradicciones entre resultados, el objetivo de muchos investigadores ha sido afinar la metodología, de manera que se puedan obtener resultados precisos (19, 15).

Más allá de la retrospectividad, los autores están de acuerdo en que la clave para continuar la investigación acerca de esta técnica radica en plantear una metodología adecuada.

En lo relativo al diseño del estudio, todos los autores coinciden en que, llegados a este punto y a la vista de las discordancias que hay hasta ahora en los resultados obtenidos por los distintos grupos, es necesario que los siguientes proyectos propuestos sean ensayos clínicos aleatorizados, puesto que la mayoría de la información de la que se dispone actualmente proviene de estudios retrospectivos.

Algunos han hecho hincapié en la importancia de evitar sesgos a la hora de realizar la selección de pacientes (19). Muchos de los que han obtenido conclusiones favorables (5,6,10) han utilizado datos recaudados de pacientes pertenecientes a distintas clínicas; uno de ellos (10), de hecho, mostraba una marcada variación entre clínicas en lo relativo a niveles elevados de mtDNA en la población de blastocistos. Estas diferencias entre clínicas no parecen deberse a variaciones entre grupos de pacientes, sino que hay autores que especulan que pueden estar provocadas por diferencias en los procedimientos o en las condiciones de cultivo propias de cada centro. En base a esto, si es cierto que se puede establecer una asociación entre estrés embrionario y niveles alterados de mtDNA, es posible que esta medida sí que resulte un indicador útil para evaluar la calidad de los procedimientos llevados a cabo en el laboratorio, ajustar las condiciones de cultivo o analizar el impacto de cambios que se introduzcan en los protocolos. (18,19). En relación con esto mismo, hay, por otro lado, autores que sí consideran que los pacientes deben proceder de distintas clínicas para que se considere un estudio más preciso, pues sería la elección de una única clínica la que introduciría el sesgo en los resultados (12,1). Al hilo de la selección de pacientes, hay muchos autores que consideran acertada la decisión de un par de los estudios (12,14) de analizar la capacidad del mtDNA como marcador del potencial implantatorio en embriones pertenecientes a la misma cohorte. Se trata de propuestas de diseño elegantes que hacen referencia a la aplicación más interesante de esta premisa, que es la posibilidad de seleccionar al embrión más viable, dentro de aquellos de los que dispone, para una paciente dada. En otras palabras, la capacidad de

utilizar, llegada la hora de la transferencia embrionaria, este marcador como un factor evaluador más para la clasificación de los embriones. Estos dos diseños, de hecho, concluyeron, en base a sus resultados, que no existía significancia para considerar que había una asociación entre niveles menores de mtDNA (y por lo tanto un hipotético mejor pronóstico en base a publicaciones anteriores) y un mayor éxito de implantación dentro de una misma cohorte de embriones. Ambos estudios reconocen sus limitaciones, como que en ninguna paciente se evaluaron el total de los embriones de la misma cohorte de los que disponía, o la necesidad de plantear un ensayo clínico aleatorizado; pero los planteamientos son, como mínimo, merecedores de que se revisen en proyectos futuros. Esta conclusión, junto con la de algún otro artículo (11) puede dar la idea de que, pese a que no hay indicios suficientes para considerar que el mtDNA pueda funcionar como marcador para seleccionar el embrión idóneo, a lo mejor podría servir como criterio de exclusión para descartar embriones dentro de una misma cohorte, ya que en varios casos se ha descrito una eficacia del 100% como predictor negativo del potencial implantatorio.

A propósito de la importancia de evitar sesgos, también es interesante, además de que las muestras partan de condiciones de cultivo similares, que se trate de los mismos tipos de muestra o, en caso de que no, que se tenga en cuenta a la hora de manejar los datos obtenidos. Existen casos en los que esto no se ha hecho adecuadamente (13) y se han mezclado, por ejemplo, blastocistos de día 5 y de día 6, lo cual introduce un sesgo en los resultados si se tiene en cuenta que los primeros presentan un contenido de mtDNA significativamente más alto que aquellos de día 6 (15).

Otro punto importante de cara a la metodología adecuada para plantear estudios futuros es la cuantificación del mtDNA. Pese a ser un procedimiento ampliamente utilizado y metodizado en investigación, en este caso es esencial que la cuantificación sea precisa, puesto que las muestras con las que se trabaja (biopsia de trofodermo) contienen un número mínimo de células y varían de muestra a muestra. Debido a esto, la cuantificación de mtDNA *per se* no aportaría ninguna información, ya que no se podría

diferenciar una muestra con alto contenido de mtDNA (resultado de estrés embrionario) de una muestra con un alto contenido celular o mitocondrial. Para ello, la cantidad de mtDNA obtenida se normaliza frente a una o varias secuencias que se encuentran en el genoma nuclear. (18,19).

Respecto a la normalización de mtDNA, otro refinamiento que sería recomendable incluir en el diseño de un estudio de este tipo es una corrección de la que ya se habló anteriormente (4), que se trata de un factor de corrección que normaliza las variaciones en la composición de DNA. En embriología está adaptado para tener en cuenta, por ejemplo, las diferencias entre los genomas de embriones femeninos y masculinos, ya que el primero es más largo que el segundo y no tenerlo en cuenta podría dar lugar a un sesgo en los resultados. De manera similar, un embrión aneuploide contendrá más o menos material genético por célula que un embrión euploide, por lo que aplicar un factor de corrección a la hora de analizar los resultados puede también permitir la precisión de los mismos.

La elección de la correcta secuencia del genoma nuclear a amplificar para realizar la normalización es de igual manera esencial; de hecho, hay autores (5,12,10,11,14) que han propuesto utilizar secuencias *multi-copy*, como la secuencia Alu, presente en cientos de miles de copias repartidas a lo largo de todo el genoma. Seleccionar una única secuencia, como hicieron en su estudio Díez-Juan *et al.* (6), podría no servir para determinar correctamente los niveles de mtDNA, según estos autores, debido al fenómeno ADO (*allele dropout*). Este fenómeno está causado por la presencia de variantes de un único nucleótido (SNV) situados en los sitios de unión de los *primers forward* o *reverse*, que provocan que estos *primers* pierdan la capacidad de unión y por lo tanto se dé una falta parcial o total de amplificación de uno de los alelos cuyas secuencias se pretende amplificar (5).

Hay otros autores, en cambio, que consideran que el error en caso de realizar un test *multi-copy* sería el mismo que utilizando una única secuencia para la amplificación, es

decir, que el resultado no variaría, y, además, que el error asociado a este fenómeno se repartiría de forma aleatoria y por igual a lo largo de los diferentes grupos de embriones, sin llegar a sesgar realmente los resultados. Considera, también, que las secuencias Alu, al igual que otras secuencias *multi-copy*, por su naturaleza móvil y auto-transponible, generan gran variabilidad en número dentro de la población humana, de manera que no serían la elección ideal para un estudio que requiere la estandarización o normalización de las muestras (19). Los estudios que han confiado en la elección de genes multi-copy en sus metodologías han obtenido resultados conflictivos, de manera que no permiten saber mucho más sobre la supuesta mejora que supone (5,12,10,11, 14).

La elección de las secuencias a amplificar en el genoma mitocondrial también tiene sus consideraciones. Sus locus no pueden estar en los cromosomas sexuales, puesto que, obviamente, provocarían sesgos asociados al sexo del embrión. Además, estas regiones deberán ser únicas, es decir, deben ser lo menos parecidas posible a regiones que se encuentren en el genoma nuclear. Esto es importante debido a la presencia en el genoma nuclear de segmentos de DNA mitocondrial nuclear o NUMTs. Estas son secuencias de DNA de origen mitocondrial que a lo largo de la evolución se han ido insertando en forma de pseudogenes en el genoma nuclear y, si no son tenidas en cuenta, podrían sesgar los resultados de un estudio de estas características (19).

En cuanto al método llevado a cabo para la cuantificación, los más destacados son la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), NGS, que, en este tipo de estudios, debe tener la suficiente capacidad de secuenciación (*Deep sequencing*), y RT-qPCR, siendo las dos últimas aquellas en las que, actualmente, los investigadores más confían (19).

Más allá de esto, hay autores que plantean nuevas estrategias, como ya se ha mencionado anteriormente. Entre ellos se encuentran las transferencias mitocondriales, que pueden ser de donante pero que también pueden ser autólogas, de manera que se evita

correr riesgos como la heteroplasmia; es importante destacar que esta tecnología ya se ha utilizado en algunos estudios, mejorando las tasas de pacientes con ciclos de FIV anteriores con resultados muy pobres. Otra de las propuestas son los llamados nutrientes mitocondriales, agentes de origen natural que se pueden utilizar para potenciar la capacidad de generar energía de la mitocondria, como, por ejemplo: la coenzima Q10, el resveratrol o el ácido α -lipoico. Este tratamiento tiene su base sobre la premisa de que una mejora de la función mitocondrial podría, potencialmente, retrasar o incluso revertir ese proceso de declive de la función reproductora (7).

En resumen, debido las contradicciones en la bibliografía de la que se dispone actualmente y sus limitaciones, las recomendaciones generales de los investigadores en este momento son las de plantear estudios de cohortes prospectivos, aleatorizados y controlados y ensayos clínicos aleatorizados, que permitan, por un lado, comparar embriones hermanos y su capacidad de implantación en base a su contenido en número de copias de mtDNA y evaluar si la implementación de esta técnica permite mejorar los resultados en FIV. Al mismo tiempo, apuestan por nuevos planteamientos que ayuden a comprender la función mitocondrial y su vínculo, en caso de que realmente lo haya, con el potencial embrionario.

CONCLUSIÓN

En el mundo de la reproducción asistida las mejoras y nuevas propuestas en técnicas se tienen que basar en una evidencia sólida. En el caso del mtDNA se ha podido observar que la bibliografía de la que se dispone en este momento no es la suficiente, según los profesionales en el sector. Puesto que se trata de una nueva técnica, aún es pronto y los proyectos que la han estudiado son pocos y contradictorios, muchos de ellos, además, son retrospectivos y esto puede afectar a la precisión de los resultados. Hay consenso entre los autores en que, de momento, existe la necesidad de plantear otros proyectos para indagar más allá sobre esta técnica y poder establecer el mtDNA como marcador del potencial embrionario. Por otro lado, también están las propuestas de otros investigadores, que impulsan a considerar otras aplicaciones de este marcador, como predictor negativo o como complemento de un *screening* genético, reconociendo que el desarrollo del potencial embrionario es un proceso multifactorial y demasiado complejo como para que un único marcador aporte la pista para una implantación exitosa.

En resumen, está claro que la investigación acerca de esta técnica está aún en una etapa muy temprana y todo parece apuntar a que aún es necesaria mucha investigación acerca del tema, de manera que se puedan esclarecer un poco más los factores que regulan la viabilidad embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kim J, Seli E. Mitochondria as a biomarker for IVF outcome. *Reproduction*. 2019;156:235-242.
- (2) Aitken R J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*. 2017;84:1039–1052.
- (3) Leese H J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays*. 2002; 24:845-849.

- (4) Victor A R, Brake A J, Tyndall J C, Griffin D K, Zouves C G, Barnes F L, Viotti M. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil. Steril.* 2017; 107: 34–42.
- (5) Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel C E, Kokocinski F, Cohen J, Munne S, Wells D. Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age, Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. *PLoS Genetics.* 2015; 11.
- (6) Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez, S, Al-Asmar N, Riboldi M, Díaz-Gimeno P, Valbuena D, Simón C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: Less is better. *Fertility and Sterility.* 2015; 3, 534-541.
- (7) Chinnery P F. Mitochondrial Replacement in the Clinic. *The New England Journal of Medicine.* 2020; 19:1855-1857.
- (8) Van Blerkom J, Davis P W, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1995; 10(2):415-424.
- (9) de Boer K, Jansen R, Leigh D, Mortimer D. Quantification of mtDNA copy number in the human secondary oocyte. *Hum Reprod.* 1999;14:2419.
- (10) Ravichandran K, McCaffrey C, Grifo J, Morales A, Perloe M, Munne S, Wells D, Fragouli E. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: Retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers. *Human Reproduction.* 2017; 32(6): 1282–1292.
- (11) Fragouli E, McCaffrey C, Ravichandran K, Spath K, Grifo J A, Munné S, Wells D. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study. *Hum Reprod.* 2017; 32(11): 2340-2347.
- (12) Treff N R, Zhan Y, Tao X, Olcha M, Han M, Rajchel J, Morrison L, Morin S J, Scott R T. Levels of trophoctoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos. *Hum Reprod.* 2017; 32(4):954-962.

- (13) Klimczak A M, Pacheco L E, Lewis K E, Massahi N, Richards J P, Kearns W, Saad A F, Crochet J R. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*. 2018;35:871-877.
- (14) Scott R T, Sun L, Zhan Y, Marin D, Tao X, Seli E. Mitochondrial DNA content is not predictive of reproductive competence in euploid blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*. 2020;41(2):183–190.
- (15) Cecchino G N, Garcia-Velasco J A. Mitochondrial DNA copy number as a predictor of embryo viability. *Fertility and Sterility*. 2019; 111:205–211.
- (16) Wang T, Zhang M, Jiang Z, Seli E. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 77: e12651.
- (17) Seli E. Mitochondrial DNA as a biomarker for in-vitro fertilization outcome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2016;28(3):158-163.
- (18) Wells D. Mitochondrial DNA quantity as a biomarker for blastocyst implantation potential. *Fertility and Sterility*. 2017;108(5)742–747.
- (19) Viotti M, Victor A R, Zouves C G, Barnes F L. Is mitochondrial DNA quantitation in blastocyst trophoblast cells predictive of developmental competence and outcome in clinical IVF?. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34: 1581-1585.