



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Programa de Doctorado en Medicina 3139

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO OVOCITARIO
MEDIANTE ANÁLISIS DEL PRIMER
CORPÚSCULO POLAR**

Tesis Doctoral presentada por
Nuria Soler Balaguer

Tesis dirigida por:

Dra. María José Escribá Pérez

Dr. Vicente Serra Serra

Dr. Jose Bellver Pradas

València, Enero 2023



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Programa de Doctorado en Medicina 3139

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO OVOCITARIO
MEDIANTE ANÁLISIS DEL PRIMER
CORPÚSCULO POLAR**

Tesis Doctoral presentada por
Nuria Soler Balaguer

Tesis dirigida por:

Dra. María José Escribá Pérez

Dr. Vicente Serra Serra

Dr. Jose Bellver Pradas

València, Enero 2023

Dra. María José Escribà Pérez,

Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat Politècnica de València

INFORMA:

Que D^a Nuria Soler Balaguer ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria de Tesis Doctoral titulada: "Diagnóstico genético ovocitario mediante análisis del primer corpúsculo polar".

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 12 de enero de 2023

MARIA JOSE | Firmado digitalmente
ESCRIBA | por MARIA JOSE |
PEREZ | ESCRIBA|PEREZ
Fecha: 2023.01.12
18:17:04 +01'00'

Dr. Vicente Serra Serra, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y
Catedrático de la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que D^a Nuria Soler Balaguer ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha
dado lugar a la memoria titulada: "Diagnóstico genético ovocitario mediante análisis del primer
corpúsculo polar".

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 10 de enero de 2023

VICENTE
|SERRA|
SERRA

Firmado
digitalmente por
VICENTE|SERRA|
SERRA
Fecha: 2023.01.11
09:12:59 +01'00'

FDO. Dr. Vicente Serra Serra

Dr. Jose Bellver Pradas, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat de València y profesor titular de la Universitat de València

INFORMA:

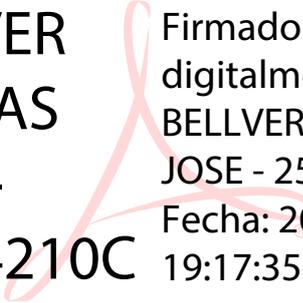
Que D^a Nuria Soler Balaguer ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: "Diagnóstico genético ovocitario mediante análisis del primer corpúsculo polar".

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa públicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, 10 de enero de 2023

**BELLVER
PRADAS
JOSE -
25404210C**



Firmado
digitalmente por
BELLVER PRADAS
JOSE - 25404210C
Fecha: 2023.01.10
19:17:35 +01'00'

FDO. Dr. Jose Bellver Pradas

Esta tesis doctoral se ha realizado con la financiación del siguiente proyecto de investigación: “Diagnóstico genético ovocitario por análisis del primer corpúsculo polar”; Ministerio de Economía y Competitividad; Proyectos de Investigación en Salud de la Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (PI16/00687). I.P.: María José Escribá Pérez.

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado durante el periodo de disfrute de una subvención para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral de la Generalitat Valenciana (ACIF/2018/076), durante los años 2018-2021, y una ayuda para estancias de contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunitat Valenciana de la Generalitat Valenciana (BEFPI/2020/029) en “Oxford University, Nuffield Department of Women’s & Reproductive Health, Reproductive Medicine & Genetics” en 2020.

AGRADECIMIENTOS

Me resultaba tan difícil visualizar este momento, que me parece increíble que ahora mismo esté escribiendo estas líneas. Unas palabras que siento la necesidad de redactar, puesto que esta etapa, de más de 6 años, ha sido posible gracias a gente maravillosa que he tenido el privilegio de conocer y tener a mi lado durante este largo viaje. Ahora que ha llegado a su fin, es momento de parar, tomar un respiro y mirar atrás el camino recorrido.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Dra. María José Escribá, Dr. Vicente Serra y Dr. Jose Bellver, por hacer posible la ejecución de este proyecto. Me gustaría dirigirme especialmente a ti, María José, por dejar que formara parte de tu equipo de investigación, por transmitirme tu entusiasmo y tus infinitos conocimientos, por iniciarme en el mundo de la embriología y por abrirme las puertas de mi vida profesional.

También quiero dar las gracias a María José de los Santos, por haber confiado en mí y permitir que me formara como embrióloga en su laboratorio.

Gracias a todo el equipo de laboratorio de FIV de IVI-Valencia. A Arancha, Tamara, Pili, Sonia, Carmela, Amparo Mercader, Amparo Mifsud, Txuki, Alberto, Marcos, Chemari, Diana, Belén, Lala, Mar, Aila, Eva, Jose, Pilar, Bego, Menchín, Sergio, Rafa, Ana, Ana Belén, Ali y María (mis sinceras disculpas de antemano si he pasado por alto a alguna persona, ¡sois tantos!). Porque sin la colaboración de todos ellos no habría podido realizar esta tesis. Gracias a todos por guardarme vesículas, unipronucleares y tripronucleares, ovocitos sobrantes y demás material que me ha permitido realizar todos los estudios. En especial a Laura y Noelia, por haberme guiado y ayudado desde el primer momento que entré por las puertas del FIV, sabéis que esta tesis es también vuestra. A Fernanda, por sus consejos y por tener siempre preparadas unas palabras reconfortantes e idóneas en el momento oportuno, ya fuera en Valencia o en Roma.

Gracias también a las secretarias del FIV, Celia, Marlene y Paqui, por vuestra inmensa buena predisposición y ayuda en todo lo que he necesitado. Quiero que sepáis que os guardo mucho cariño.

A Lucía y Lorena, mi pareja especial, sabéis que el camino no ha sido fácil y habéis hecho que fuera siempre un poco más llevadero. Os quiero y os agradezco infinitamente vuestro apoyo, tanto dentro como fuera del laboratorio.

Gracias también al resto de doctorandos, Marta, Ángel y Marian, por los congresos compartidos, las risas y desahogos tan necesarios en esta etapa vivida en común.

También quiero agradecer a Xavi, Rosa y Raquel, de Sistemas Genómicos, un gran equipo humano que se ha portado genial conmigo y que me ha prestado ayuda en todo momento.

Gracias también a todos mis compañer@s de IVF-Spain, por vuestro interés y muestras de preocupación en la recta final. A Yolanda, Llanos, Ana, Mireia, Nuria, Ale, Laura, Lola, Belén, Ismael, Javi, Jorge, Sara y Silvia. Porque, pese a que únicamente habéis vivido el último tramo del camino, me lo habéis facilitado en todo momento, cambiándome guardias, turnos o vacaciones para poder terminar de escribir esta tesis.

La realización del doctorado también me ha permitido cruzar fronteras y conocer gente fantástica en el extranjero. Quiero agradecer a todo el equipo de JUNO Genetics por abrirme las puertas de su laboratorio en Oxford y dejar que aprendiera de ellos. Allí tuve la suerte de compartir estancia con Pepi, un gran descubrimiento de persona, que hizo de mi período en Inglaterra una experiencia increíble, incluso a pesar de haberla vivido en plena pandemia. De vuelta a España me llevé una gran amistad en la maleta que espero que continúe vigente siempre.

A todos mis amig@s, especialmente a mi querida barraca “Va de Bo”: Rafa, Aitana, Ana, Casandra, Tágara, Laia, Iris, Maria y Marta. Porque nuestras quedadas, pese haber sido más esporádicas estos últimos meses debido a las

circunstancias, me daban la vida, un soplo de aire fresco para poder continuar. Somos un gran pack y espero que sea así siempre.

A mi trio viajero, Carlos, Marta y María, y también a Marteta, por darme siempre fuerzas, aunque fuera desde la distancia. Porque, aunque hace tiempo que no nos veamos, sé que cuando lo hacemos es como si no hubiera pasado el tiempo.

Gracias a toda mi familia. No se puede elegir, pero es que a mí no me ha podido tocar una mejor. No existen palabras de agradecimiento para vosotros, para los que están y los que ya no están. Particularmente a mis padres, mi apoyo incondicional, siempre preocupados por mí, aunque alguno no lo exprese tan abiertamente como el otro, pero yo lo sé. Gracias a vosotros he llegado donde estoy y os estaré infinitamente agradecida por todo. A mi hermano, que, a pesar de ser tan tranquilo en algunos aspectos, sé que también has sufrido por mí en mis momentos de flaqueo. Y que, aunque yo tampoco lo digo muy frecuentemente en voz alta, te quiero y estoy orgullosa de tenerte como hermano.

Mención especial merece mi gran compañero de vida, Agus. Tú has sido el gran sufridor de esta tesis. Gracias por transmitirme esa calma tan característica tuya cuando más atacada de los nervios he estado. Gracias por no dejar que me rindiera. Gracias por tu infinita paciencia, por hacerme siempre la vida más fácil en todos los aspectos. Gracias por existir. Te quiero.

“Per això, precisament, potser convindrà recordar de tant en tant —ara com sempre— que l’esperit de la ciència, més no a de la mà de la supèrbia i el triomfalisme, es manifesta sempre, i per força, indèstriablement vinculat a les nocions de prudència i humilitat: perquè els pobres coneixements de què disposem són sempre relatius i incerts, modestos, provisionals, susceptibles de revisió; perquè les discretes i isolades parcel·les del saber conquerides fins ara són ridículament insignificants en comparació amb la immensitat dels oceans encara ignots per a la ment humana; i perquè la curiositat per allò mai no desvelat (més que no l’eufòria pel descobriment ja aconseguit) constitueix, si bé es mira, el fonament de l’essència última de l’actitud científica. Altrament dit: que el «Només sé que no sé res» socràtic —ai!— continua preservant el recte sentit i la plena vigència”

Joan Borja, Altea, 2022

A la meua família, especialment
a la meua iaia Antonia, allà on estiga

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	13
INTRODUCCIÓN	19
1. Enfermedades monogénicas	21
1.1. Prevalencia y detección de variantes patogénicas.....	21
1.2. Técnicas de diagnóstico.....	23
2. El óvulo: foliculogénesis y ovogénesis	30
3. Respuesta ovocitaria de activación.....	34
3.1. Mecanismo bioquímico de activación ovocitaria	34
4. Fecundación	37
5. Partenogénesis	39
5.1. Tipos de respuestas ovocitarias de activación.....	40
5.2. Producción de partenogenotas	42
5.2.1. Protocolos de AOA.....	42
5.2.2. Tasa de activación y desarrollo ulterior.....	44
6. Diagnóstico genético ovocitario.....	48
6.1. Fundamento	48
6.2. Estudio molecular	50
6.3. Ventajas	53
6.4. Limitaciones	54
6.4.1. Logística.....	54
6.4.2. Eventos de recombinación.....	57
6.4.3. Alteraciones en la segregación meiótica.....	59
JUSTIFICACIÓN.....	61
OBJETIVOS	65
METODOLOGÍA	69
1. Aprobación, consentimientos y lugar de ejecución	71

2. Donantes de ovocitos.....	72
3. Obtención de ovocitos	75
4. Crioconservación ovocitaria	79
5. Producción de partenogenotas y cultivo	84
6. Biopsia de corpúsculo polar y partenocitos	86
7. Análisis genéticos	89
7.1. Estudio de informatividad	89
7.2. Determinación de ploidía	93
7.3. Genotipado de las tríadas meióticas	96
8. Capacidad diagnóstica ovocitaria por análisis de CP1: variables de estudio	98
9. Diseño experimental	101
10. Análisis estadístico	104
RESULTADOS.....	105
1. Estudio 1: Puesta a punto de la metodología de biopsia de CP	107
1.1. Tasa de supervivencia.....	107
1.1.1. Primera fase.....	107
1.1.2. Segunda fase.....	109
1.2. Tasa de activación ovocitaria	112
1.2.1. Primera fase.....	112
1.2.2. Segunda fase.....	114
2. Estudio 2: Validación del test genético ovocitario mediante análisis de las tríadas meióticas	115
2.1. Donante #7	115
2.1.1. Estudio de ploidía.....	115
2.1.2. Estudio de informatividad y segregación alélica.....	117
2.1.3. Análisis genético de las tríadas meióticas e inferencia del contenido genético ovocitario.....	119
2.2. Donante #8	124
2.2.1. Estudio de ploidía.....	124
2.2.2. Estudio de informatividad y segregación alélica.....	125

2.2.3. Análisis genético de las tríadas meióticas e inferencia del contenido genético ovocitario.....	130
DISCUSIÓN.....	135
CONCLUSIONES.....	159
BIBLIOGRAFÍA.....	163
ANEXOS.....	191
RESUMEN.....	209

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

- 1C:** un complemento cromosómico
- 2C:** dos complementos cromosómicos
- 2n:** diploide
- 4C:** cuatro complementos cromosómicos
- A23187:** calcimicina / ionóforo de calcio
- ACO:** anticonceptivo oral
- ACP:** agentes crioprotectores
- ADI:** ganancia de alelo, del inglés *Allele Drop In*
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADN-ic:** ADN libre circulante
- ADO:** pérdida de alelo, del inglés *Allele Drop Out*
- AOA:** activación ovocitaria artificial, del inglés *Artificial Oocyte Activation*
- APC:** complejo promotor de la anafase, del inglés *Anaphase-Promoting Complex*
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- Ba²⁺:** bario
- Br²⁺:** bromo
- BS:** solución de lavado, del inglés *Basic Solution*
- Ca²⁺:** calcio
- CaMKII:** calmodulina
- CCB:** citocalasina B
- CCD:** citocalasina D
- CCO:** complejo cúmulo-corona-ovocito
- CEIC:** comité ético de investigación clínica
- CEP:** sonda específica de centrómero, del inglés *Centromere specific Probe*
- CGH:** hibridación genómica comparada, del inglés *Comparative Genomic Hybridization*
- CGT:** test de compatibilidad genética o test de portadores, del inglés *Carrier Genetic Test*

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

CI: consentimiento informado

cm: centímetro

cM: centimorgan

COS: estimulación ovárica controlada, del inglés *Controlled Ovarian Stimulation*

CP: corpúsculo polar

CP1: primer corpúsculo polar; 1PB, del inglés *1st Polar Body*

CP2: segundo corpúsculo polar; 2PB, del inglés *2nd Polar Body*

CSF: factor citostático, del inglés, *Cytotatic Factor*

DAG: diacilglicerol

DGP: diagnóstico genético preimplantación

DMAP: dimetilaminopurina

DMSO: dimetilsulfóxido

DS: solución de dilución, del inglés *Dilution Solution*

DSB: del inglés, *Double-Strand Breaks*

E: especificidad

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ES: solución de equilibrio, del inglés *Equilibration Solution*

FISH: hibridación in situ fluorescente, del inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*

FIV: fecundación in vitro

FN: falso negativo, del inglés *false negative*

FP: falso positivo, del inglés *false positive*

FQ: fibrosis quística

HIP: hoja de información al paciente

HLA: antígeno leucocitario humano, del inglés *Human Leukocyte Antigens*

HPC: hidroxipropilcelulosa

HSA: albúmina sérica humana, del inglés *Human Serum Albumin*

IC: intervalo de confianza

ICSI: del inglés, *Intracytoplasmic Sperm Injection*

IMC: índice de masa corporal

IP3: inositol trifosfato

IP3R: receptor de IP3

La²⁺: lantano

LH: hormona luteinizante

LR: razón de verosimilitud, del inglés *Likelihood Ratio*

LSI: sonda específica de locus, del inglés *Locus-Specific Identifier probe*

MALBAC: del inglés, *Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles*

MAPK: MAP kinasa

Mb: megabase

Mg²⁺: magnesio

MI: primera meiosis

MII: segunda meiosis

MIII: tercera meiosis

MPA: acetato de medroxiprogesterona

MPF: del inglés, *M-phase Promoting Factor*

n: haploide

NEBD: rotura de la envoltura nuclear, del inglés *Nuclear Envelope Breakdown*

NGS: del inglés, *Next-Generation Sequencing*

NI: no informativo

ni-PGT: PGT no invasivo, del inglés *Non Invasive Preimplantation Genetic Test*

NN: no núcleo

NOAR: respuesta ovocitaria de activación normal, del inglés *Normal Oocyte Activation Response*

NS: no señal

OAR: respuesta ovocitaria de activación, del inglés *Oocyte Activation Response*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPU: punción folicular, del inglés *Ovum Pick-Up*

Ovocito MI: ovocito detenido en la metafase de la primera meiosis

Ovocito MII: ovocito detenido en la metafase de la segunda meiosis

Ovocito MIII: ovocito detenido en la metafase de la tercera meiosis

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*

PGT-A: test genético preimplantación para aneuploidías, del inglés *Preimplantation Genetic Test for Aneuploidies*

PGT-M: test genético preimplantación para enfermedades monogénicas, del inglés *Preimplantation Genetic Test for Monogenic disorders*

PIP2: fosfatidilinositol bifosfato

PKC: proteína quinasa C

PLC ζ : fosfolipasa C-zeta

PN: pronúcleo

PNM: pronúcleo materno

PSSC: separación precoz de cromátidas hermanas, del inglés *Premature Separation of Sister Chromatids*

PZD: disección parcial de zona, del inglés *Partial Zona Dissection*

rFSH: hormona foliculoestimulante humana recombinante

S: sensibilidad

SEF: Sociedad Española de Fertilidad

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

SNP: polimorfismos de nucleótido simple, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*

SNV: variantes de nucleótido simple, del inglés *single-nucleotide variants*

SOAF: factor espermático de activación ovocitaria, del inglés *Sperm Oocyte Activating Factors*

Sr²⁺: estroncio

STR: del inglés, *Short Tandem Repeats*

TCG: test de compatibilidad genética o test de portadores

TN: verdadero negativo, del inglés *True Negative*

TP: verdadero positivo, del inglés *True Positive*

TS: solución de calentamiento, del inglés *Thawing Solution*

UI: unidades internacionales

VG: vesícula germinal

VS: solución de vitrificación, del inglés *Vitrification Solution*

WGA: amplificación del genoma completo, del inglés *Whole Genome Amplification*

WS: solución de lavado, del inglés *Washing Solution*

ZP: zona pelúcida

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Estudios que han llevado a cabo el diagnóstico genético de diferentes enfermedades a partir del análisis de CP
- Tabla 2.** Principales protocolos de activación ovocitaria aplicados por diversos autores en diferentes especies
- Tabla 3.** Características de las variantes patogénicas (enfermedad que provoca, gen donde se localiza y tipo de herencia) que presentan las donantes de ovocitos incluidas en el estudio
- Tabla 4.** Descripción de la variante patogénica (subrayada) y polimorfismos de nucleótido simple (SNP) específicos de la región de interés del gen *F9* de la donante #7
- Tabla 5.** Descripción de la variante patogénica (subrayada) y marcadores microsatélite (STR) específicos de la región de interés del gen *CFTR* de la donante #8
- Tabla 6.** Resultados de ploidía inferidos tras hibridación in situ fluorescente (FISH) para 5 cromosomas (cromosoma 13, 21, X, Y y 18) sobre partenocitos individuales
- Tabla 7.** Descripción de la variante patogénica (en cursiva y subrayada; resaltada en amarillo) y polimorfismos específicos de la región de interés del gen *F9* de la donante #7 (se resaltan en verde los informativos)
- Tabla 8.** Polimorfismos informativos y variante patogénica de la donante #7
- Tabla 9.** Genotipo de la variante patogénica (rs757996262; amarillo) y de los 2 marcadores SNP informativos asociados a ella (rs422187 y rs6048; verde) para los componentes analizados de las tríadas meióticas
- Tabla 10.** Resultados de ploidía inferidos tras hibridación in situ fluorescente (FISH) para 4 cromosomas (cromosoma 7, X, Y y 18) sobre partenocitos individuales

Tabla 11. Descripción de la variante patogénica (en cursiva y subrayada; resaltada en amarillo) y microsatélites específicos de la región de interés del gen *CFTR* de la donante #8 (se resaltan en verde los informativos)

Tabla 12. Marcadores STR informativos y variante patogénica de la donante #8

Tabla 13. Genotipo de la variante patogénica (dF508), los marcadores STR informativos asociados a ella (*CFTR*-18xAC, D7S633, D7S677, IVS8CA, IVS17bTA, 25xAC y 30xAC) y los de los cromosomas X (DXS8025 y DXS1068) y 18 (D18S61 y D18S1127), para los componentes analizados de las tríadas meióticas

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema de la meiosis (color amarillo), y gametogénesis masculina (azul) y femenina (rosa) (Imagen extraída de Handel y Schimenti, 2010)

Figura 2. Mecanismos de recombinación meiótica (Imagen extraída de Morgan et al., 2017)

Figura 3. Proceso de foliculogénesis (arriba) y ovogénesis (abajo) (imagen extraída de Mihalas et al., 2017)

Figura 4. Modelo propuesto para la reanudación meiótica a partir de la detención en el estadio de MII en los ovocitos de mamífero (Figura extraída de Tiwari et al., 2018)

Figura 5. Niveles de actividad MPF y MAP kinasa (MAPK) durante los principales eventos de la meiosis ovocitaria I y II (Figura extraída de Jones 2005)

Figura 6. Formación de dos husos bipolares en el cigoto y posterior segregación independiente de los genomas materno y paterno, ocupando compartimentos nucleares separados en el embrión de dos células (figura extraída de Reichman et al., 2018)

Figura 7. Respuesta ovocitaria donde se muestra la ploidía del cigoto/partenogenota resultante tras el proceso de fecundación normal (izquierda) y de diferentes protocolos de activación ovocitaria artificial (derecha) (Adaptado de Bos-Mikich et al., 2016)

Figura 8. Esquema de los dos posibles escenarios de segregación meiótica en los ovocitos de una mujer heterocigota portadora de una mutación localizada en un área cromosómica sin recombinación genética

Figura 9. Esquema de los dos posibles escenarios de segregación meiótica en los ovocitos de una mujer heterocigota portadora de una mutación localizada en un área cromosómica con recombinación genética

Figura 10. Patrones de segregación meiótica (Figura extraída de Ottolini et al., 2015)

METODOLOGÍA

Figura 11. Complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO) obtenidos en la punción folicular

Figura 12. Imágenes de diferentes estadios madurativos del ovocito tras la decumulación (a: metafase II; b: metafase I; c: vesícula germinal; d: degenerado/atrésico)

Figura 13. Soluciones de vitrificación, desvitrificación, Cryotops® y placa Replate® comercializado por Kitazato-Dibimed

Figura 14. Fase de equilibrado para la vitrificación de ovocitos

Figura 15. Fase de lavados durante el paso por la solución VS para la vitrificación de ovocitos

Figura 16. Procedimiento de carga en el Cryotop®

Figura 17. Bancos criogénicos CBS en fase vapor de nitrógeno, parte externa (izquierda) e interna (derecha)

Figura 18. Procedimiento de desvitrificación de ovocitos

Figura 19. Biopsia de CP1

Figura 20. Biopsia de CP2

Figura 21. Biopsia de partenocitos

Figura 22. Fijación de partenocitos

Figura 23. Distribución de ovocitos MII para los diferentes estudios de la tesis doctoral

Figura 24. Diagrama de flujo del estudio 1

Figura 25. Diagrama de flujo del estudio 2

RESULTADOS

Figura 26. Tasas de supervivencia ovocitaria a la vitrificación (%) obtenidas en la primera fase del estudio 1, en función del grupo experimental

Figura 27. Representación gráfica comparada de la tasa de supervivencia ovocitaria a la vitrificación (%) entre las fases experimentales 1 (azul claro) y 2 (azul oscuro) en función de los grupos de estudio

Figura 28. Representación gráfica comparada de la tasa de supervivencia ovocitaria a la vitrificación (%) entre las fases experimentales 1 (azul claro) y 2 (azul oscuro), agrupando en ovocitos vitrificados tras la biopsia (G2 y G5) vs. ovocitos sin biopsia de CP previa a su vitrificación (G4, G6 y G7)

Figura 29. Tasa de AOA normal (NOAR, %) obtenida en la fase 1 en los diferentes grupos experimentales

Figura 30. Comparación de la tasa de AOA normal (NOAR, %) entre las fases experimentales 1 y 2 en función de los grupos de estudio

Figura 31. Imágenes de FISH de los diferentes resultados de ploidía obtenidos en los partenocitos individuales generados a partir de los ovocitos de la donante #7

Figura 32. Esquema del cromosoma X (arriba) donde se resalta, en rojo, la localización genómica del gen *F9* (Fuente: GeneCards) y detalle en zoom (abajo) de la localización de la variante patogénica (fuente: NCBI)

Figura 33. Representación esquemática del genotipo heterocigoto de la donante #7 (círculo medio sombreado) y sus fases: la fase genética wild-type (izquierda, color azul) y la asociada a la variante patogénica (derecha, color rojo)

Figura 34. Imágenes de FISH de los diferentes resultados de ploidía obtenidos en los partenocitos individuales generados a partir de los ovocitos de la donante #8

Figura 35. Esquema del cromosoma 7 (arriba) donde se resalta, en rojo, la localización genómica del gen *CFTR* (Fuente: GeneCards) y detalle en zoom (bajo) de la localización de la variante patogénica (fuente: NCBI)

Figura 36. a) Electroferograma de los marcadores STR informativos flanqueantes a la variante patogénica (c.1521_1523); b) Electroferograma de los marcadores STR informativos localizados en el cromosoma X y 18, usados como control de ploidía

Figura 37. Representación esquemática del genotipo de los progenitores (arriba) y de la donante #8 (abajo) y sus fases: la fase genética wild-type (izquierda, color azul) y la asociada a la variante patogénica (derecha, color rojo)

DISCUSIÓN

Figura 38. Localización cromosómica de los marcadores genéticos (en amarillo) y las variantes patogénicas (en rojo) de estudio

Figura 39. Esquema de los posibles modelos de división meiótica propuestos a partir del estudio genético de las tríadas meióticas completas, considerando el escenario de recombinación genética

Figura 40. Opciones de diagnóstico genético ovocitario preconcepción tras análisis de CP1/CP2

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades monogénicas, también conocidas como enfermedades de herencia mendeliana, se producen por una alteración en la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) de un gen. Aunque son relativamente poco frecuentes si las consideramos aisladamente, las enfermedades monogénicas afectan a millones de personas en todo el mundo, considerándose un problema sanitario de primer orden (Kingsmore, 2012). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), su prevalencia global en el nacimiento es de 10 casos por cada 1000 recién nacidos (World Health Organization, 2005).

Desgraciadamente, las soluciones terapéuticas son escasas y solamente existe tratamiento específico para determinados trastornos. Por todo ello, resulta de gran importancia identificar aquellas parejas que presentan un elevado riesgo de transmitir la enfermedad a la descendencia, para poder realizar un buen asesoramiento genético y evitar el nacimiento de bebés afectados, previniendo la sobrecarga social y económica del sistema sanitario.

1. Enfermedades monogénicas

1.1. Prevalencia y detección de variantes patogénicas

Las variaciones en la secuencia de un gen pueden dar lugar a variantes patogénicas que se relacionan con enfermedades genéticas recesivas o dominantes. Con la incorporación de las nuevas tecnologías de cribado genético o *carrier screening*, se ha reportado que el 92% de la población es portadora, en heterocigosis, de alguna variante patogénica, habiéndose obtenido una portabilidad media de 2,3 variantes patogénicas por individuo (Martín et al., 2015).

La probabilidad de que un individuo sea portador de una variante patogénica particular viene determinada por su prevalencia en la población, la cual puede variar para determinadas enfermedades monogénicas, siendo de 1/25 para la

fibrosis quística en la población caucásica general (revisión: Bobadilla et al., 2002) o de 1/5.000 para la hemofilia en los varones (revisión: Berntorp y Shapiro, 2012). En este sentido, se estima que del 1-2% (Ropers, 2012) al 5% (Martín et al., 2015) de las parejas asintomáticas comparten variantes patogénicas que les confieren un elevado riesgo de transmitir la enfermedad a la descendencia. Lamentablemente, la identificación de esta incompatibilidad genética en las parejas suele ocurrir después de haber tenido un hijo afecto.

Afortunadamente, durante los últimos años se han desarrollado estudios de cribado genético preconcepción mediante análisis del compartimento somático, permitiendo identificar aquellas parejas con elevado riesgo de transmisión de la enfermedad a la descendencia, antes de iniciar sus planes reproductivos. En la actualidad, se comercializan diferentes tests genéticos o paneles de portadores (del inglés, *Carrier Genetic Test* o *Carrier Screening*), también llamados Test de Compatibilidad Genética, TCG® o GCT®, Carrier Map®, Carrier DNA Insight®, HERES® o Recombine®, entre otros, que permiten analizar los genes involucrados en estas enfermedades genéticas de alta prevalencia. Cada laboratorio de análisis genético ha desarrollado su propio test, difiriendo en la tecnología usada para la detección de la variante patogénica (genotipado y/o secuenciación); además, cada panel incorpora un número distinto de genes, variantes patogénicas y enfermedades genéticas.

En cualquier caso, la SEF (Sociedad Española de Fertilidad) recomienda que todos incluyan enfermedades cuyo fenotipo esté definido y sea grave, con elevada penetrancia y frecuencia de portadores; además de existir una relación causal entre variante patogénica y fenotipo (Castilla et al., 2019).

Los tests de cribado genético presentan algunas limitaciones. En primer lugar, no están incluidas todas las enfermedades monogénicas recesivas, ni tampoco las enfermedades de herencia dominante, mitocondrial, no mendeliana o enfermedades de herencia compleja (poligénicas o multifactoriales) como la

diabetes, el párkinson, el alzhéimer o la obesidad; existiendo un riesgo residual de ser portador de otras variantes patogénicas no analizadas o variantes de significado incierto o sin evidencias clínicas sobre su efecto patogénico. Igualmente, como en cualquier prueba de laboratorio o estudio genético, cabe la posibilidad de que un individuo sea portador y no sea posible detectarlo (falso negativo). Además, existen cambios en el ADN que pueden no ser detectados dependiendo de la tecnología empleada, como variantes localizadas fuera de las regiones génicas de estudio (exones), grandes duplicaciones, expansiones y deleciones. Por último, estos tests de cribado genético no permiten identificar mutaciones *de novo* que afecten a la línea germinal de los progenitores, siendo imposible llevar a cabo ninguna estrategia de prevención durante la planificación familiar.

1.2. Técnicas de diagnóstico

Aunque la mayoría de las enfermedades monogénicas se detectan en el periodo neonatal y/o en la vida adulta, actualmente, tras el diagnóstico molecular de los progenitores, existe la posibilidad de prevenir el nacimiento de niños afectados durante el embarazo (prenatal), en los primeros días de desarrollo embrionario (preimplantación) o incluso antes de producirse la fecundación (preconcepción).

Diagnóstico genético neonatal

El estudio de cribado neonatal, coloquialmente conocido como la prueba del talón, es un análisis que permite detectar de manera precoz algunas enfermedades genéticas en el recién nacido, especialmente las metabólicas. Consiste en la obtención de una muestra de sangre del talón del bebé en sus primeras 48-72 horas de vida. En España, está recomendado realizar el cribado neonatal para, al menos, 8 enfermedades: hipotiroidismo congénito,

fenilcetonuria, deficiencia de acil CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media, deficiencia de 3-hidroxi acil CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga, aciduria glutárica tipo I, deficiencia de biotinidasa, fibrosis quística y anemia de células falciformes (Grupo de trabajo de protocolos de cribado neonatal de la Ponencia de cribado poblacional, 2020). No obstante, hay una considerable variabilidad en el listado de enfermedades incluidas en los diferentes programas de cribado neonatal, variando entre comunidades autónomas e incluso también entre los diferentes países de la Unión Europea.

Diagnóstico genético prenatal

En lo que se refiere a enfermedades monogénicas, debido a que la mayoría no cursan con defectos estructurales en el feto o anomalías bioquímicas (o al menos no se han caracterizado en los programas de cribado prenatal), la única indicación para la realización de pruebas invasivas (amniocentesis o biopsia de corion) son los casos de progenitor(es) portador(es) o afecto(s) de enfermedades monogénicas (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2018). En ese caso, si el análisis revela un feto afecto, los progenitores pueden elegir entre detener precozmente el embarazo o continuarlo a término. En muchos casos, estas parejas suelen sufrir varios abortos, algunas veces en estadios muy avanzados del embarazo, antes de lograr concebir un hijo sano; con la carga emocional que ello conlleva, así como las cuestiones éticas asociadas. Además, el diagnóstico prenatal, por ser una técnica invasiva, lleva asociado el inconveniente del riesgo de pérdida fetal, establecido aproximadamente en un 1% (Akolekar et al., 2015; Wulff et al., 2016).

Actualmente, un *screening* prenatal no invasivo es posible a través del análisis del ADN fetal libre circulante (ADN-lc) en la sangre materna (Lo et al., 1997), evitando las posibles pérdidas fetales debidas a la propia intervención sobre el feto durante la amniocentesis. Sin embargo, este test no invasivo permite la detección

de un número limitado de enfermedades monogénicas, en función de su origen paterno, materno o *de novo* (Chitty et al., 2015; Hill et al., 2015). Por otra parte, la fracción de ADN-1c y otros factores biológicos pueden variar en función de algunos parámetros propios del embarazo, como la edad gestacional, afectando al análisis. Es por ello que esta prueba no reemplaza a los procedimientos convencionales de diagnóstico prenatal, por lo que cada resultado positivo debe ser confirmado mediante el procedimiento invasivo antes de decidir sobre el curso del embarazo. Del mismo modo, un resultado negativo no garantiza tener un niño sano.

Diagnóstico genético preimplantación

Previamente a la planificación del embarazo, cuando una pareja es conocedora de su “incompatibilidad genética”, tiene la opción de someterse a un diagnóstico genético preimplantación. Esta tecnología consiste en generar embriones recurriendo a un tratamiento de FIV (fecundación in vitro) y analizarlos genéticamente mediante el test genético preimplantación para enfermedades monogénicas (PGT-M, del inglés *Preimplantation Genetic Test for Monogenic disorders*).

Tras la caracterización genómica de la variante patogénica responsable de dicha enfermedad y su estudio familiar, se procede a la generación de preembriones (en adelante, embriones) mediante tecnología de FIV y su subsiguiente biopsia embrionaria, con el fin de identificar y seleccionar aquellos embriones sanos o portadores de la(s) variante(s) patogénica(s) a testar para su ulterior transferencia intrauterina, descartando los afectos.

En estos casos, la inseminación se realiza mediante la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, del inglés *Intracytoplasmic Sperm Injection*), que consiste en la inyección de un único espermatozoide capacitado en el interior del citoplasma de un ovocito maduro (en estadio de metafase II,

MII); previniendo la posible contaminación paterna por la presencia de espermatozoides que pudieran quedar adheridos a la zona pelúcida tras una FIV convencional (incubación conjuntamente de ambos gametos). Además, esta estrategia requiere de una cuidadosa decumulación ovocitaria para evitar la presencia de células de la granulosa y, por ende, posibles contaminaciones genéticas de origen materno.

Para el análisis genético embrionario se requiere de la obtención de unas pocas células del embrión, extraídas mediante biopsia embrionaria; técnica usualmente realizada en día 3 o día 5/6 de desarrollo embrionario. La biopsia de embriones en día 3 de desarrollo consiste en la retirada de una o dos blastómeras del embrión, que contiene de 6 a 10 células de rango. Por otra parte, la biopsia de blastocistos de día 5/6 post-inyección se realiza mediante extracción de una porción (aproximadamente 5-7 células) del compartimento trofodérmico del blastocisto.

A pesar de ser las técnicas de biopsia rutinariamente empleadas en los laboratorios de diagnóstico genético preimplantación (DGP), la elección de uno u otro estadio embrionario para la biopsia supone la eliminación de células embrionarias, pudiendo comprometer el desarrollo y viabilidad del embrión. Además, se trata de procedimientos que no están permitidos en algunos países debido a sus estrictas leyes y regulaciones (Harton et al., 2011).

Recientemente, se han propuesto nuevos métodos de PGT bajo el término de «no invasivos», ni-PGT, del inglés *Non Invasive Preimplantation Genetic Test*. Estos enfoques se basan en la obtención de ADN representativo del embrión, sin establecer contacto (o con una intervención mínima) con las estructuras embrionarias, gracias a la existencia de ADN embrionario en el interior del embrión o en su entorno. Un creciente número de estudios proponen la recogida de líquido de la cavidad interna del blastocisto (blastocentesis) o del medio de cultivo donde fue cultivado el embrión, para obtener ADN libre de células con el

fin de evaluar el estado genético de los embriones. No obstante, la fiabilidad de esta atractiva idea debe ser validada antes de su aplicación clínica, puesto que existe una gran variabilidad en los resultados publicados de concordancia genética entre las muestras y el tejido embrionario, además de una falta de reproducibilidad/estandarización entre los protocolos aplicados por los distintos laboratorios. La tasa de detección de ADN y la contaminación con ADN no embrionario son algunos de los factores limitantes de esta técnica. Además, queda pendiente de esclarecer el origen biológico de este ADN: qué células embrionarias secretan este ADN y cuáles son sus características (Vendrell y Escribá, 2021).

Diagnóstico genético preconcepción

La caracterización genética directa de los gametos antes de producirse la fecundación es posible; sin embargo, las técnicas actualmente disponibles llevan implícita la pérdida de su viabilidad ulterior. Alternativamente, y en el caso particular de los ovocitos, inferir su contenido genético es posible, a partir del estudio de los subproductos de la meiosis femenina, no funcionales reproductivamente: los corpúsculos polares.

La biopsia del primer corpúsculo polar (CP1) y su subsiguiente análisis cromosómico fue inicialmente propuesta en 1995 por Verlinsky (Verlinsky et al., 1995) a fin de realizar un diagnóstico para el cribado de aneuploidías mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH), usando un conjunto de sondas cromosómicamente específicas (Verlinsky et al., 1995; Verlinsky et al., 1996; Verlinsky et al., 2001a; Wells et al., 2002; Kuliev et al., 2003). Posteriormente, esta metodología ha sido sustituida, primero por la hibridación genómica comparada (CGH) clásica y posteriormente por la técnica de microarrays, que se basa en el uso de secuencias clonadas de ADN que cubren la totalidad del genoma humano (Geraedts et al., 2011; Capalbo et al., 2013; Christopikou et al., 2013;

Montag et al., 2013). Sin embargo, no hay consenso en los resultados obtenidos: algunos autores afirman que ésta es una técnica lo suficientemente efectiva para la detección de anomalías numéricas y estructurales en ovocitos (Geraedts et al., 2011; Christopikou et al., 2013; Montag et al., 2013), mientras que otros no detectan un alto porcentaje de concordancia en los resultados genéticos obtenidos del estudio del CP1 con diferentes estadios embrionarios (Delhanty 2011; Capalbo et al., 2013; Salvaggio et al., 2014; Grifo et al., 2015); posiblemente debido a que la composición del futuro embrión dependerá de cómo se resuelva la segunda segregación meiótica ovocitaria, de la aportación genética paterna y de las ulteriores mitosis embrionarias.

Por su lado, la biopsia y análisis de los CP1 previamente al diagnóstico genético prenatal fue propuesto por la OMS a principios de la década de los 80 (Kuliev 1985), y fue aplicado clínicamente por primera vez a principios de los años 90 en pacientes portadoras en heterocigosis de una variante patogénica concreta, como alternativa a la biopsia embrionaria en día 3 de desarrollo (Verlinsky et al., 1990; Verlinsky et al., 1992).

En los inicios del PGT-M ovocitario, se demostró que, en más de la mitad de los ovocitos, el haplotipo ovocitario no se podía predecir, debido a la naturaleza heterocigota del CP1, requiriéndose del posterior análisis del segundo corpúsculo polar (CP2) (Verlinsky et al., 1997; Kuliev et al., 2005). Para solventar esta limitación, se introdujo el análisis combinado del CP1 y CP2, con el objetivo de identificar aquéllos hemigóticos libres de la mutación tras la segunda división meiótica (Verlinsky et al., 1997; Kuliev et al., 2005).

Muchos son los desórdenes de origen mendeliano para los que se ha aplicado el análisis de CP a nivel clínico (Tabla 1).

Tabla 1: Estudios que han llevado a cabo el diagnóstico genético de diferentes enfermedades a partir del análisis de CP

Enfermedad	Autores
AUTOSÓMICAS RECESIVAS	
Deficiencia de alfa-1-antitripsina	Verlinsky et al., 1990
Fibrosis quística	Verlinsky et al., 1992; Verlinsky et al., 1997; Verlinsky et al., 1999; Griesinger et al., 2009
Talasemias	Verlinsky et al., 1999
Fenilcetonuria	Verlinsky et al., 1999
Atrofia muscular espinal	Griesinger et al., 2009
LIGADAS AL CROMOSOMA X	
Hemofilias	Verlinsky et al., 1997; Verlinsky et al., 1999
Mucopolisacaridosis	Kuliev y Rechitsky 2011; Griesinger et al., 2009
Incontinencia pigmentaria	Kuliev y Rechitsky 2011; Griesinger et al., 2009
TIPIFICACIÓN DEL ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO (HLA)	
Varios desórdenes asociados	Verlinsky et al., 2001b; Rechitsky et al., 2004; Kuliev et al., 2005; Rechitsky et al 2006

Históricamente, la biopsia y análisis genético del CP1 (exclusivamente, o en combinación con el CP2) se realizaba como alternativa a la biopsia embrionaria, para evitar la eliminación de células embrionarias (Verlinsky et al., 1990; Verlinsky et al., 1997) o por prohibición legal como ocurría en Alemania (Küpker et al., 2001). Se utilizaba como diagnóstico preimplantación, de forma que era en día 3 o día 5/6 de desarrollo embrionario cuando requerían tener los resultados genéticos para decidir el destino del embrión (Verlinsky et al., 1990; Verlinsky et al., 1997; Küpker et al., 2001; Fiorentino et al., 2008; Naether et al., 2008; Gianaroli et al., 2010; Harton et al., 2011; Macas et al., 2011; Magli et al., 2011).

Actualmente, este abordaje se encuentra mayoritariamente en desuso debido a que las técnicas moleculares permiten el estudio genético del embrión en estadios preimplantación (segmentación o blastulación) y a los cambios en la legislación de algunos países, como Japón, Alemania, Suiza o Austria, que han demostrado una creciente aceptación del PGT embrionario, aunque con fuertes restricciones (Ginoza e Isasi 2020). No obstante, en aquellos países en los que el análisis o las manipulaciones sobre embriones están legisladas negativamente, el diagnóstico genético sólo es posible antes de que se produzca la fecundación.

2. El óvulo: foliculogénesis y ovogénesis

El gameto femenino u óvulo es una célula altamente especializada. Su génesis comienza en la vida fetal con la migración de las células germinales primordiales al ovario en desarrollo, aproximadamente en la cuarta semana de desarrollo embrionario. Estas células germinales proliferan y dan lugar a las ovogonias, ya localizadas en la gónada madura. En la mayoría de las especies de mamífero, la población de ovogonias inicia la meiosis en el ovario fetal. Previamente al inicio de la meiosis, las ovogonias replican su ADN en una fase S pre-meiótica y resultan en ovocitos primarios, en los cuales cada par de cromosomas homólogos está compuesto de dos cromátidas; resultando en un haplotipo diploide con cuatro complementos cromosómicos ($2n$, $4C$) (Figura 1).

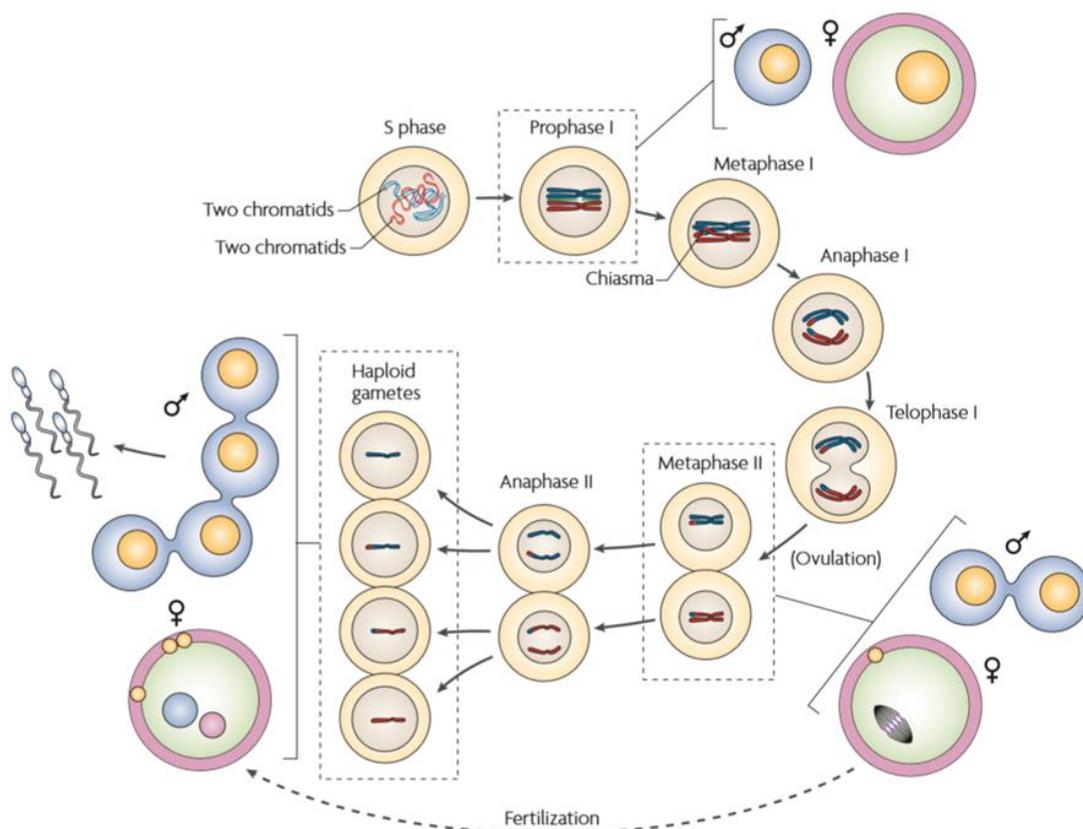


Figura 1: Esquema de la meiosis (color amarillo), y gametogénesis masculina (azul) y femenina (rosa) (Imagen extraída de Handel y Schimenti, 2010)

La fase S pre-meiótica es seguida por una larga profase de la meiosis I, que consta de 5 subfases: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. Durante la profase I, los cromosomas homólogos se emparejan en una estructura meiótica especializada, el complejo sinaptonémico, una matriz de bucles de cromatina cuyas bases, de origen proteico (cohesinas, condensinas y otras proteínas específicas de la meiosis), comprenden un eje estructural longitudinal que permite la unión de las cromátidas hermanas. La creación de estos complejos es la responsable del fenómeno conocido como recombinación genética (Panizza et al., 2011). En esencia, la recombinación es un proceso de reparación de ADN que se basa en la formación programada de roturas de doble cadena del ADN (DSBs: del inglés, *double-strand breaks*), seguida de su reparación a través de diferentes mecanismos (Gray y Cohen 2016; Ma et al., 2019), resumidos en la Figura 2.

El resultado es el intercambio de material genético entre los cromosomas homólogos heredados de los progenitores, proporcionando variabilidad genética en las especies de reproducción sexual. Además, se considera esencial para la correcta consecución de la meiosis (Tease et al., 2002; Cheng et al., 2009; Ottolini et al., 2015; Ma et al., 2019).

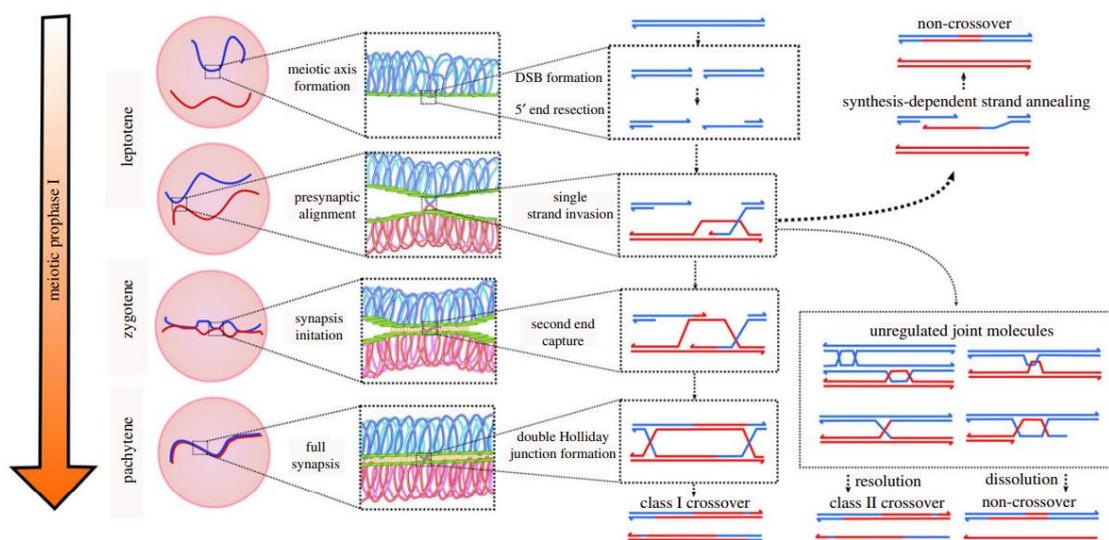


Figura 2: Mecanismos de recombinación meiótica (Imagen extraída de Morgan et al., 2017)

INTRODUCCIÓN

En la especie humana, en el momento del nacimiento, los ovocitos primarios se quedan detenidos, secuestrados en la profase I, concretamente en la etapa de diplotene, donde los cromosomas permanecen descondensados y empaquetados en un núcleo conocido como vesícula germinal (VG). En este estado, los ovocitos primarios son rodeados por una capa de células foliculares, formando los llamados folículos primordiales (Gougeon 1996). Estos ovocitos primarios, contenidos en los folículos primordiales, pueden permanecer detenidos en la meiosis durante toda la vida fértil de la mujer o reanudarla en un posterior ciclo menstrual.

Con la llegada de la pubertad, a intervalos regulares se recluta una cohorte de folículos que inician la foliculogénesis (Figura 3). A partir de este momento, los folículos crecen por aumento de tamaño ovocitario y folicular, por la proliferación de las células de la granulosa, adquiriendo el nombre de folículos secundarios. Una vez el ovocito alcanza su máximo tamaño (aproximadamente 120 μm), se detiene, y en el interior de los folículos empieza a acumularse fluido entre las células de la granulosa, dando lugar a los llamados folículos antrales. Con la proliferación de las células de la granulosa, se diferencian las células de la teca, momento en el que los folículos son susceptibles a la acción hormonal. Siguiendo con el proceso de crecimiento folicular, el ovocito se prepara para la reanudación de la meiosis. En las especies monovulares, el folículo de mayor tamaño recibe el nombre de folículo preovulatorio o folículo de Graff. Del grupo de folículos reclutados en cada ciclo menstrual, se produce la selección de uno de ellos, llamado folículo dominante, el cual será destinado a la ovulación, con la consecuente atresia del resto de la cohorte folicular.

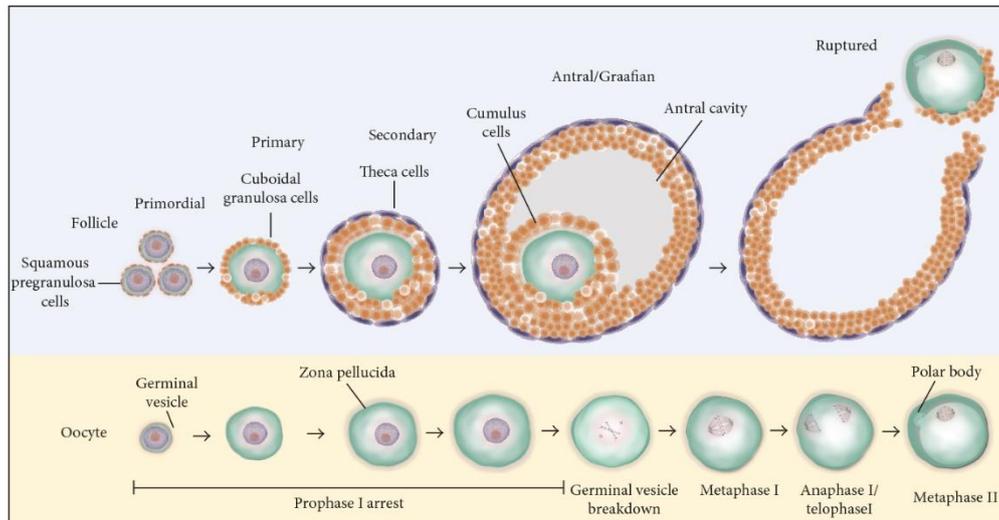


Figura 3: Proceso de foliculogénesis (arriba) y ovogénesis (abajo) (imagen extraída de Mihalas et al., 2017)

El mantenimiento del secuestro en profase I está regulado por una serie de factores, siendo el más común y ampliamente estudiado el factor promotor de la metafase (MPF, del inglés, *M-phase promoting factor*). Su actividad es responsable de la inducción de la fase M del ciclo celular. Con el pico ovulatorio de la hormona luteinizante (LH), comienza la activación de toda una ruta molecular, que culmina con la activación del MPF, desencadenando la eliminación del secuestro meiótico y la reanudación de la meiosis. En la metafase de la primera división meiótica (metafase I), los quiasmas mantienen los cromosomas homólogos en una orientación bipolar. La primera división meiótica es reduccional y separa los cromosomas homólogos (anafase I y telofase I).

Tras esta primera división, caracterizada por una citoquinesis asimétrica (Figura 1), se produce: (i) el ovocito secundario u ovocito MII; el ovocito maduro propiamente dicho, susceptible de ser fecundado y detenido en la metafase de la segunda meiosis (MII), y (ii) el primer corpúsculo polar (CP1 ó 1PB, del inglés *1st polar body*); subproducto de la meiosis que no participa en absoluto en el proceso reproductivo, quedando confinado dentro de la zona pelúcida que rodea al ovocito, en el espacio perivitelino, y yuxtapuesto al ovocito pero individualizado

por la membrana plasmática que le rodea. En este momento, ambas estructuras (ovocito MII y CP1) son, teóricamente, haploides y alélicamente complementarias, conformando el genotipo de un individuo. Cada estructura contiene cromosomas homólogos, siendo por tanto haploides (n); sin embargo, cada homólogo está compuesto por dos cromátidas hermanas (2C).

3. Respuesta ovocitaria de activación

En las mujeres, el ovocito MII queda detenido en este estadio metafásico estable con una actividad MPF alta, gracias al llamado factor citostático (CSF; del inglés, *cytostatic factor*) hasta que un estímulo eficiente de activación, que en condiciones normales es el espermatozoide fecundante, produzca un incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular y se induzca la reanudación de la meiosis II.

3.1. Mecanismo bioquímico de activación ovocitaria

El bloqueo en metafase II parece depender de una actividad identificada en el ovocito, denominada CSF (Masui y Markert 1971). Uno de los componentes del CSF es el producto proto-oncogénico c-mos (Mos), que induce la inhibición del ciclo celular (Yew et al., 1992) mediante la estabilización del MPF, complejo formado por CDK1 y la ciclina B1 (Figura 4a). Muchos trabajos sugieren que Mos controla la acción de MPF, previniendo su inactivación, a través de su actividad MAPkinasa. Algunos estudios realizados en ranas también postulan que el mecanismo de acción del CSF podría ser la inhibición del complejo promotor de la anafase (APC, del inglés *Anaphase-Promoting Complex*) y el control del ensamblaje del huso meiótico, de forma que se preserve la actividad MPF (Liu et al. 2006). Recientemente, se ha descubierto una molécula, Emi2, un inhibidor del APC específico de ovocitos y cuya degradación es dependiente de Ca^{2+} . Así,

parece que el secuestro en MII, estabilizado por el CSF, es inicialmente inducido por Emi2, mediando la inhibición del APC (Madgwick y Jones 2007) (Figura 4a).

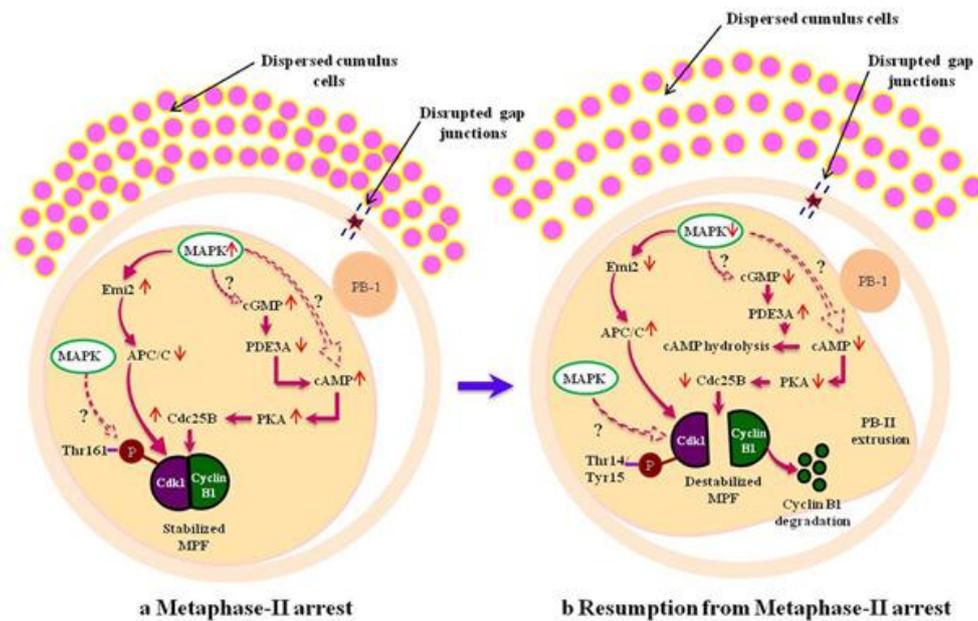


Figura 4: Modelo propuesto para la reanudación meiótica a partir de la detención en el estadio de MII en los ovocitos de mamífero (Figura extraída de Tiwari et al., 2018)

Tras la penetración del espermatozoide, se produce un incremento transitorio y puntual en la concentración de Ca^{2+} intracitoplasmático, seguido de oscilaciones periódicas intraovocitarias, provocando un conjunto de eventos que se conocen como respuesta ovocitaria de activación.

Históricamente, se han propuesto varios factores espermáticos como candidatos de la activación ovocitaria (SOAFs, del inglés *Sperm Oocyte Activating Factors*), y responsables del desencadenamiento de la liberación de los almacenes de calcio del retículo endoplásmico (Sette et al., 1997; Harada et al., 2007; Wu et al., 2007; Amdani et al., 2015). Particularmente, una fosfolipasa C específica del espermatozoide, concretamente la fosfolipasa C-zeta ($\text{PLC}\zeta$) es la principal responsable de esta ruta molecular (Saunders et al., 2002; Swann et al., 2006; Swann y Lai, 2013). El mecanismo de acción supone que tras la fusión de las

INTRODUCCIÓN

membranas espermática y ovocitaria, la PLC ζ espermática se libera al ooplasma y produce la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), el cual está almacenado en compartimentos vesiculares intraovocitarios. Esta reacción genera inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). IP₃ desencadena la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático a través del receptor IP₃R. La estimulación de DAG activa la ruta de proteína quinasa C (PKC), la cual debe estar involucrada en la decodificación y transformación de las señales de Ca²⁺ en respuestas celulares (Swann y Yu 2008).

El incremento inicial de calcio intracitoplasmático provoca la liberación de los gránulos corticales y activación de la ruta de la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII). A través de esta ruta se inhibe el CSF y se libera el APC, el cual subsiguientemente reduce los niveles de Ciclina B del complejo MPF (Figura 4b). La degradación de la ciclina y la defosforilación de CDK1 inactiva el MPF, que conduce a la reanudación de la meiosis y la extrusión del CP2 (Lorca et al., 1991) (Figura 5).

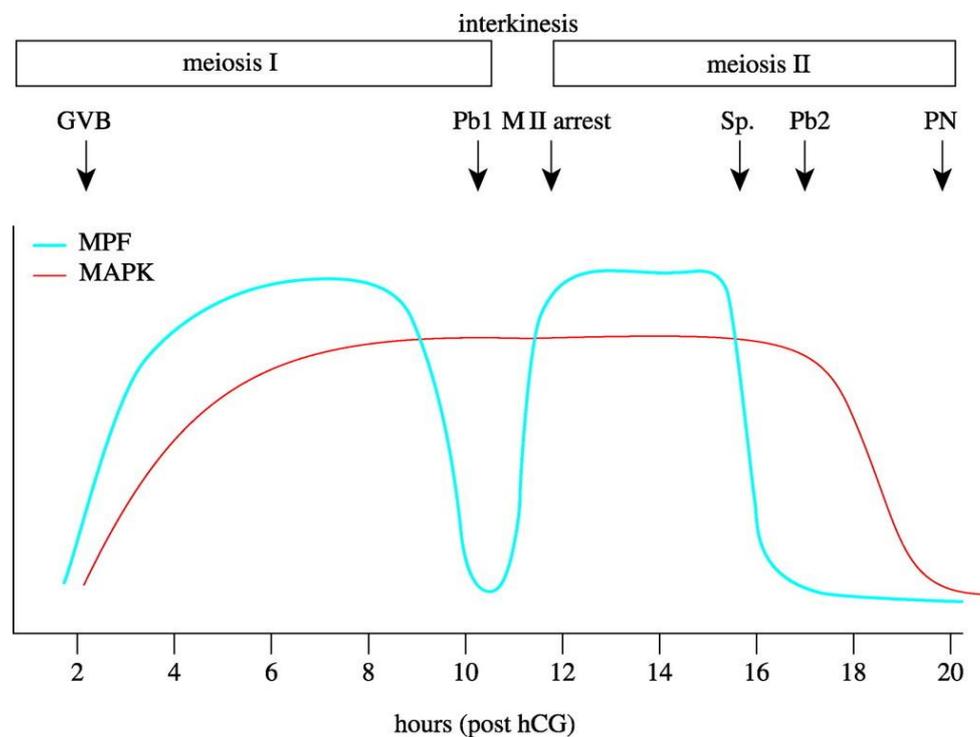


Figura 5: Niveles de actividad MPF y MAP kinasa (MAPK) durante los principales eventos de la meiosis ovocitaria I y II (Figura extraída de Jones 2005)

Además, las oscilaciones de calcio, inducidas tras la fecundación, establecen la formación de los pronúcleos (PN) y son cruciales para los principales acontecimientos que ocurren durante la activación ovocitaria y subsecuente embriogénesis (Swann y Yu 2008).

El resultado de esta activación ovocitaria es la reanudación y culminación de la segunda división meiótica, que supone la segregación equitativa de las cromátidas hermanas. Tras una segunda citoquinesis asimétrica, se producen dos estructuras que contienen un número de cromosomas haploide (n) y un contenido de ADN $1C$ (un complemento cromosómico): i) el segundo corpúsculo polar (CP2 o 2PB, del inglés *2nd polar body*) y (ii) el pronúcleo materno (PNM); conteniendo ambos un haplotipo 23,X.

Concomitante con estos eventos ovocitarios, el espermatozoide fecundante va a experimentar una remodelación morfológica y funcional pasiva, al exponerse al ambiente ovocitario metafásico, quedando finalmente las 23 cromátidas paternas confinadas en una estructura pronuclear, el PN paterno.

4. Fecundación

El cigoto se caracterizará morfológicamente por contener dos CP y dos PN (en algunos casos, puede que el CP1, a su vez, también se divida; Figura 1). El primer ciclo celular mitótico se inicia con la extrusión del CP2 y finaliza con la primera división mitótica (segmentación) del cigoto dando lugar a un par de células hijas idénticas o blastómeras, momento en el que se produce la verdadera fecundación.

En términos generales, la fecundación se define como la unión/combinación del material genético haploide materno y paterno para formar una nueva entidad genética. Hasta hace poco se suponía que un solo sistema de microtúbulos bipolares se autoensamblaba alrededor de ambos genomas parentales en el

estadio de cigoto (Schuh y Ellenberg, 2007; Fitzharris 2009; Kitajima et al., 2011; Courtois et al., 2012; Coelho et al., 2013; Holubcová et al., 2015); recientemente, Reichmann y colaboradores (Reichmann et al., 2018) han descubierto, mediante microscopía de luz invertida y técnicas de fluorescencia en 3D, que los genomas parentales permanecen espacialmente separados a lo largo de la primera mitosis debido a la presencia de dos husos bipolares independientes para cada genoma parental. Por tanto, la fecundación, propiamente dicha, tiene lugar en la etapa de segmentación; concretamente en el estadio de dos células (Figura 6).

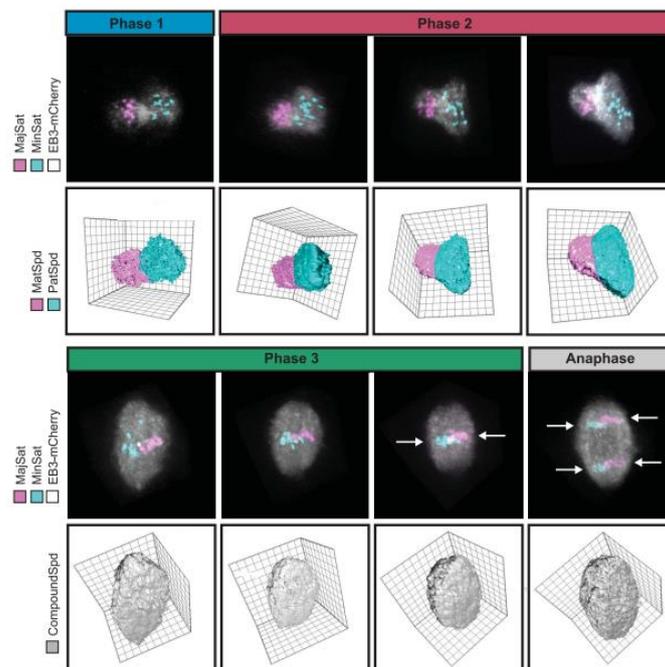


Figura 6: Formación de dos husos bipolares en el cigoto y posterior segregación independiente de los genomas materno y paterno, ocupando compartimentos nucleares separados en el embrión de dos células (Figura extraída de Reichmann et al., 2018)

5. Partenogénesis

El término partenogénesis (del griego, “nacimiento virgen”) se define como la producción de un constructo uniparental a partir de un gameto femenino, en ausencia de cualquier contribución de un gameto masculino, con o sin el eventual desarrollo a adulto. Esta estrategia de reproducción asexual es típica de algunas especies de invertebrados e insectos como moscas, hormigas y abejas, y de algunos vertebrados como lagartos, serpientes, peces y anfibios (Hipp y Atala, 2004).

A pesar de que la partenogénesis no es una forma natural de reproducción en mamíferos, sí que se ha reportado la formación de embriones partenogenotas a partir de la activación espontánea de ovocitos, empleando determinados estímulos externos (Tachibana et al., 2009; Tachibana et al., 2013). Sin embargo, los embriones partenogenotas de mamífero presentan un limitado desarrollo y no prosperan a término (Brevini y Gandolfi 2008). La mayoría de los partenogenotas se bloquean poco después de la implantación, debido a los mecanismos operantes de *imprinting*, siendo necesaria la presencia complementaria de ambos parentales (Lin et al., 2007).

Particularmente, la activación partenogenética se ha descrito en ovocitos humanos tanto *in vivo*, pudiendo producir de forma excepcional teratomas ováricos, como *in vitro*. En este último caso, la activación partenogenética de ovocitos humanos puede ocurrir de forma ocasional y espontánea en ovocitos recuperados durante los ciclos de FIV (Plachot et al., 1984), por ejemplo, tras su envejecimiento *in vitro* (Abramczuk y Lopata, 1990).

Asimismo, la partenogénesis se puede inducir de forma intencionada mediante la aplicación de diversos estímulos con la finalidad de producir la activación ovocitaria artificial (AOA, del inglés *Artificial Oocyte Activation*). Se trata de un mecanismo que permite la reanudación meiótica del ovocito y su subsiguiente desarrollo sin la intervención del espermatozoide. El resultado de esta activación

es la formación de un partenogenota, que mimetiza el desarrollo embrionario en sus fases más tempranas.

5.1. Tipos de respuestas ovocitarias de activación

La aplicación de los diferentes tratamientos de activación ovocitaria puede inducir una respuesta ovocitaria diferente de aquella propia del ovocito fecundado correctamente (i.e. expulsión del CP2 y formación del PNM) y, por tanto, obtener partenogenotas con composición genética diferente (Figura 7).

Si la activación se realiza en ovocitos MII, el resultado esperado (el que obtendríamos de la fecundación) es la expulsión del CP2, la formación de una única estructura pronuclear y, con ello, la constitución de un partenogenota haplo-haploide (haploide uniforme), con una única cromátida por cromosoma (Brevini y Gandolfi 2008) (Figura 7B). Por ejemplo, la incubación de los ovocitos detenidos en la metafase II con ionóforo de calcio solamente (Winston et al., 1991; Taylor y Braude, 1994a; Taylor y Braude, 1994b; Rhoton-Vlasak et al., 1996; Rinaudo et al., 1997; Paffoni et al., 2011) o en combinación con un inhibidor de la síntesis proteica, como la puromicina (Johnson et al., 1990; Rhoton-Vlasak et al., 1996; Yamano et al., 2000; Nakagawa et al., 2001a; Nakagawa et al., 2001b; Sengoku et al., 2004; Escrich et al., 2011; Escrich et al., 2012), permite la activación ovocitaria de forma que en la mayoría (del 60% al 75%) se produce la extrusión del CP2 y se forma una única estructura pronuclear con contenido de ADN compatible con un set haploide de cromosomas (Taylor y Braude, 1994a; Taylor y Braude, 1994b; Rhoton-Vlasak et al., 1996; Nakagawa et al., 2001b; Escrich et al., 2011; Paffoni et al., 2011).

Por su parte, la respuesta ovocitaria haplo-diploide (diploide uniforme), haploide con dos cromátidas hermanas, supone la activación ovocitaria que cursa con la retención del CP2 (Figura 7C). Así, la activación del ovocito en MII suele combinarse con la exposición a un inhibidor de la extrusión del CP2, sin afectar a

la formación y al movimiento de los pronúcleos (Balakier y Tarkowski, 1976). Por ejemplo, se suele combinar la activación de los ovocitos MII con su ulterior incubación en presencia de un inhibidor de la polimerización de la actina, como la citocalasina B (CCB). Este compuesto se une al extremo positivo de la actina F y bloquea la adición de monómeros de actina G, impidiendo la extrusión del CP2 y, por tanto, la extrusión de las cromátidas hermanas. También se puede conseguir esta misma respuesta ovocitaria mediante la exposición a la 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), un inhibidor de la síntesis proteica que interfiere en la segregación de los cromosomas meióticos al bloquear la citocinesis y la extrusión del CP2.

Alternativamente, la activación puede cursar con la retención del CP1, dando lugar a embriones partenogénéticos diplo-diploides (diploides con 2 cromátidas por homólogo) (Figura 7A). Este tipo de partenogenotas se pueden generar por medio del tratamiento con citocalasina D o B (inhibidores de la polimerización de los filamentos de actina) durante la maduración *in vitro* ovocitaria antes de la activación. Este protocolo conduce a la formación de ovocitos diploides 4C y el estado haplo-diploide podría restablecerse con la extrusión del CP2 (Kubiak et al., 1991).

Por último, un partenogenota haplo-haploide (obtenido mediante la extrusión ovocitaria del CP1 y CP2) puede sufrir una diploidización espontánea, dando lugar a un partenogenota haplo-diploide (Figura 7D).

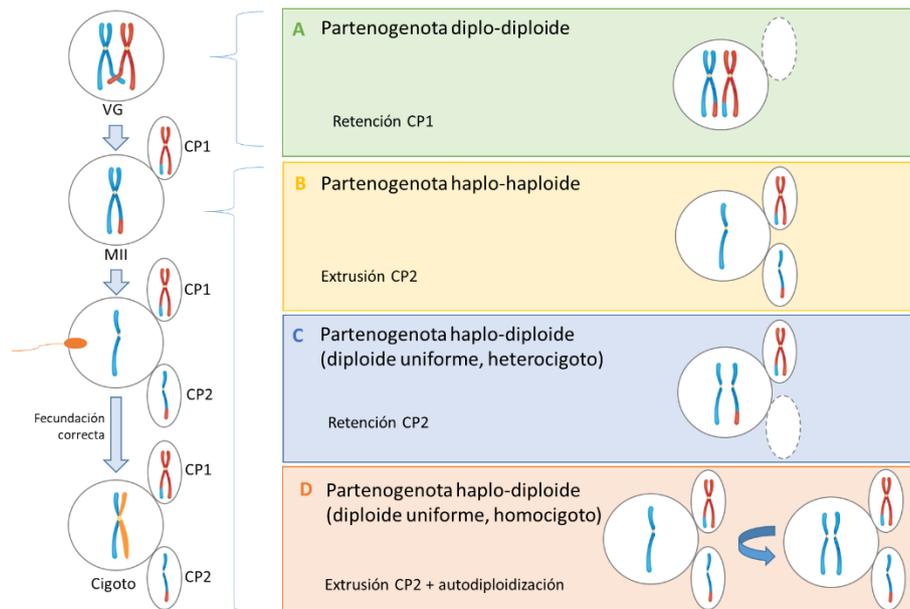


Figura 7: Respuesta ovocitaria donde se muestra la ploidía del cigoto/partenogenota resultante tras el proceso de fecundación normal (izquierda) y de diferentes protocolos de activación ovocitaria artificial (derecha) (Adaptado de Bos-Mikich et al., 2016)

5.2. Producción de partenogénotos

5.2.1. Protocolos de AOA

Los partenogénotos pueden producirse *in vitro* de forma artificial mediante diversos estímulos físicos, químicos, eléctricos o combinaciones de éstos.

Entre las técnicas físicas se incluye: la simple manipulación del ovocito, punción con una aguja en presencia de Ca^{2+} en el medio, calor, choque eléctrico, osmolaridad del medio de cultivo (hipertónico o hipotónico) y presión negativa (Vallejo et al., 2003).

Por su parte, existe una gran variedad de estímulos químicos: soluciones enzimáticas (hialuronidasa, pronasa y tripsina), variaciones en la composición iónica del medio (Ca^{2+} , Ba^{2+} y Sr^{2+}), inyección de iones (Ca^{2+} , Br^{2+} , Mg^{2+} y La^{2+}) o una breve exposición a ionóforo de calcio, etanol, alcohol bencílico, 1,2-propanodiol, solución de ácido de Tyrode, anestésicos y tranquilizantes *in vivo* (éter, cloroformo, cloruro etílico, alcohol etílico, paraldehído, óxido nitroso, nembutal y avertin) (Tabla 2).

A excepción del Sr^{2+} , la mayoría de agentes artificiales descritos en la literatura inducen un incremento único y transitorio en los niveles de calcio intracitoplasmático, y no de manera repetitiva y continua en forma de oscilaciones como lo haría el espermatozoide durante la fecundación (Kline y Kline, 1992). Estudios de AOA han mostrado que la aplicación de un único estímulo puede inactivar el MPF existente, permitiendo a los ovocitos MII reanudar la meiosis y culminarla con la expulsión del CP2; sin embargo, una síntesis proteica activa o una elevada actividad de fosforilación característica de ovocitos de temprana edad post-ovulatoria, determinan un rápido restablecimiento de la actividad MPF mediante la MAPK (Collas et al., 1993), forzando al material nuclear a entrar de nuevo en metafase (metafase III). Los ovocitos MIII habrían experimentado las modificaciones de la zona pelúcida y la reacción cortical, siendo, sin embargo, incapaces de inducir la consecución de los eventos tardíos de la activación tales como el reclutamiento de ARNm (ácido ribonucleico mensajero), reanudación y culminación de la meiosis, formación pronuclear, síntesis de ADN y segmentación.

La administración de inhibidores de la fosforilación o de la síntesis proteica, previene el restablecimiento de la condición metafásica, manteniendo inactivos los niveles de MPF, con la consiguiente consecución del ciclo celular. Concretamente, los inhibidores de la síntesis proteica (siendo los más utilizados la cicloheximida y puromicina) previenen la síntesis de la ciclina, mientras que los inhibidores de la fosforilación proteica (por ejemplo, el 6-DMAP) impiden la fosforilación de la fosfatasa cdc25, inhibiendo de esta forma la MAPK en los ovocitos de ratón (Verlhac et al., 1993) y bovino (Liu y Yang 1998).

Adicionalmente, inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa, inhibidores de la fosfodiesterasa, estimulación de proteínas G, activación de proteína quinasa o medio deficiente en piruvato (Vallejo et al., 2003), entre otros, previenen de igual forma la reactivación del MPF (Collas et al., 1993) de tal manera que el proceso de activación se pueda completar íntegramente.

5.2.2. Tasa de activación y desarrollo ulterior

Las estrategias de activación partenogenética han presentado diversos grados de éxito, en cuanto a tasas de activación y posterior desarrollo embrionario, según el protocolo empleado y la especie (Tabla 2).

Tabla 2: Principales protocolos de activación ovocitaria aplicados por diversos autores en diferentes especies

Especies	Autores	Agentes	% Blastocisto
Vaca	Liu et al., 1998	Etanol + DMAP	36%
		Ionomicina + DMAP	40%
		Ionomicina + cicloheximida	7%
		Ionomicina + clorhexidina + CCD	36%
	Méo et al., 2004	Etanol y Sr ²⁺	0% - 6,3%
	Méo et al., 2005	Sr ²⁺ o ionomicina	8% - 13%
Oveja	Loi et al., 1998	Ionomicina + DMAP	58,4%
		Etanol + DMAP	19,1%
	Alexander et al., 2006	Tratamiento eléctrico y/o ionomicina 6-DMAP Cicloheximida	0% 21% 14,9%
Cabra	Buell et al., 2015	Ionomicina + DMAP	23% - 26%
	Hao et al., 2015	Ionomicina + 6-DMAP	15% - 27,9%
	Ongeri et al., 2001	Ionomicina + DMAP	50,1%
		Etanol + DMAP	49,8%
	Lan et al., 2005	Ionomicina + DMAP	41,9%
	Guo et al., 2010	Ionomicina + 6-DMAP	16,2% - 24,8%
		Sr ²⁺ + CCB Pulsos eléctricos CCB	0% - 15,6% 11,1%
	Malik et al., 2015	Etanol	14,6% - 18,3%
Ionóforo de Ca ²⁺		16,2% - 20,5%	
Ionóforo de Ca ²⁺ + etanol		14,2% - 20,5%	
Pathak et al., 2017	Etanol + DMAP	5,3%	
	Ionomicina + DMAP Ionóforo de Ca ²⁺ + DMAP	1,8% 7,1%	
Dua et al., 2019	Ionóforo de Ca ²⁺ + DMAP	22,9%	
	Etanol + DMAP	19%	
Menéndez-Blanco et al., 2020	Ionomicina + 6-DMAP	15,2% - 20,8%	

Especies	Autores	Agentes	% Blastocisto
Cerdo	Zhu et al., 2002	Pulsos eléctricos	15% - 41%
	Gruppen et al., 2002	Pulsos eléctricos + DMAP	20% - 34%
	Lee et al., 2004	Diferente intensidad corriente continua	29,7% - 50%
		Diferente intensidad y número de pulsos	27,0% - 56,3%
		Corriente + CCB y/o CCD y/o cicloheximida	18,8% - 57,5%
	Yi y Park 2005	Etanol + cicloheximida + CCB + DMAP	25%
	Miyoshi et al., 2008	Ultrasonidos + Ca ²	3,3% - 21,3%
	Mori et al., 2008	Cicloheximida	8,2% - 43,9%
Varga et al., 2008	Cloruro de Sr ²⁺	0% - 2,9%	
	6-DMAP	6%	
	Cicloheximida	0%	
	Cloruro de Sr ²⁺ + 6-DMAP	0%	
Petr et al., 2010	Cloruro Sr ²⁺ + 6-DMAP + cicloheximida	8,5%	
	Ionóforo de Ca ² S-nitroso-N-acetilpenicilamina	20,8% 0% - 6,7%	
Conejo	Ozil 1990	22 pulsos dobles de duración gradualmente decreciente	89%
	Escribá y García-Ximénez 1999	Diferente tonicidad y [Ca ²⁺]	0% - 74%
		Diferente duración y número de pulsos	0% - 90%
	Mitalipov et al., 1999	Electroporación de 25 mM IP3 + DMAP	50%
		Ionomicina + DMAP	5,7%
		Múltiples pulsos	30%
	Chesné et al., 2002	Pulsos eléctricos + clorhexidina + DMAP	90%
	Liu et al., 2002	A23187 + DMAP	36%
Etanol + DMAP		47%	
Liu et al., 2004	Pulsos eléctricos + clorhexidina + DMAP	64%	
Liu et al., 2005	Pulsos + pulsos + IP3 + DMAP	72,7%	
Zhang et al., 2019	Diferente intensidad de pulso	7,3% - 14,5%	
	Diferente número de pulsos	5,7% - 11,8%	
	Diferente duración de pulso	6,4% - 14,1%	
	Ionomicina + 6-DMAP	8,6%	
	Ionomicina + cicloheximida	1,2%	
	Ionomicina + 6-DMAP + cicloheximida	12,1%	
Eléctrica + DMAP + cicloheximida	13,7%		
Rata	Jiang et al., 2002	Etanol + 6-DMAP	14% - 21%
		Estimulación eléctrica + 6-DMAP	50%
	Krivokharchenko et al., 2003	Pulsos eléctricos + CCB	29,6%
		Etanol + CCB	25%
Sr ²⁺ (2h) + CCB		19,6%	
Roh et al., 2003	Sr ²⁺ + CCB + clorhexidina	28,2%	
Mizutani et al., 2004	Pulsos eléctricos + DMAP	42%	
	Ionomicina + DMAP	42%	
Ratón	Cuthbertson 1983	8,6% etanol 8'	62,2%
		0,32% alcohol bencílico 8'	85,1%
	Uranga et al., 1996	A23187 + OAG + CCD	55%
Bos-Mikich et al., 1997	Sr ²⁺ (diferentes tiempos)	73% - 87%	

INTRODUCCIÓN

Especies	Autores	Agentes	% Blastocisto
Ratón	Ozil et al., 2005	Pulsos eléctricos	75% - 79%
	Rogers et al., 2006	Sr ²⁺ + CCD	71%
		Cicloheximida + CCD	24%
		Sr ²⁺ + Cicloheximida + CCD	68%
		Etanol + CCD	71%
		Etanol + cicloheximida + CCD	63%
	Versieren et al., 2010	Ionomicina + cicloheximida	70%
		Ionomicina + DMAP	71%
		Pulsos eléctricos + DMAP	88%
		Pulsos eléctricos + ionomicina + DMAP	82%
		Cloruro de Sr ²⁺	89%
Pulsos eléctricos + cloruro de Sr ²⁺ + DMAP		90%	
Lu et al., 2018	Diferentes concentraciones de Ca ²⁺ y ionomicina	0% - 79%	
	Sr ²⁺	90%	
Ferrer-Buitrago et al., 2020	Cloruro de Sr ²⁺ + CCD	87%	
Mono	Mitalipov et al., 2001	Ionomicina + DMAP	58%
		Electroporación + clorhexidina + CCB	48%
Ionomicina + roscovitina		25%	
Cibelli et al., 2002a	Ionomicina + DMAP	22%	
Humano	Cibelli et al., 2002b	Ionomicina + DMAP	27%
	Lin et al., 2003	Ionóforo + DMAP	28,6%
		Ionóforo + puromicina	1 morula (20%)
		ICSI falso + 50 µM ionóforo 15'	1 blast (16,67%)
	Rogers et al., 2004	Inyección 0.1 µg/ml PLCz cRNA	16,7%
	Mai et al., 2007	Pulsos eléctricos + Ionomicina +6-DMAP	25%
	Paffoni et al., 2007	Ionomicina + 6-DMAP	12,8%
	Revazova et al., 2007	Ionomicina + 6-DMAP	57,5%
	Polak de Fried et al., 2008	Ionomicina + 6-DMAP	16,7%
Versieren et al., 2010	Ionomicina + cicloheximida	0%	
	Pulsos eléctricos + DMAP	0%	

A pesar de que, tras aplicar la AOA, la mayoría de los ovocitos humanos son capaces de activarse de forma exitosa, gran parte de los partenogenotas detienen su desarrollo de forma temprana (Winston et al., 1991; De Sutter et al., 1992; Taylor y Braude, 1994a; Taylor y Braude, 1994b; Rinaudo et al., 1997; Nakagawa et al., 2001a; Nakagawa et al., 2001b), interrumpiéndose en el estadio de 4 células (De Sutter et al., 1992; Nakagawa et al., 2001a) o de 8 células (Winston et

al., 1991; Taylor y Braude, 1994a; Taylor y Braude, 1994b; Escribá et al., 2016). No obstante, unos pocos estudios han obtenido blastocistos partenogenéticos (Lin et al., 2003; Mai et al., 2007; Paffoni et al., 2007; Revazova et al., 2007; Polak De Fried et al., 2008; Versieren et al., 2010); existiendo una limitada competencia tras una respuesta haplo-haploide (Polak De Fried et al., 2008; Sagi et al., 2016; Zhong et al., 2016; Safier et al., 2020; Bar et al., 2021; Soler et al., 2021), debido, principalmente, a su tendencia a la auto-diploidización (Leng et al., 2017).

Las diferencias observadas en los trabajos de investigación respecto al potencial de desarrollo de los partenogenotas pueden ser debidas a la variación en la calidad ovocitaria, principalmente determinada por la edad de las mujeres incluidas en los estudios, la efectividad del protocolo de AOA aplicado o, más probablemente, por la distinta ploidía de los partenogenotas, como ya se ha reportado en otras especies de mamífero (Henery y Kaufman, 1992; Kim et al., 1997; Escribá y García-Ximénez 1999; Escribá y García-Ximénez 2000a; Escribá y García-Ximénez 2000b; Latham et al., 2002; Lagutina et al., 2004). Concretamente, experimentos en otras especies indican que los partenogenotas diploides tienen una competencia para el desarrollo superior que los haploides. En particular, embriones partenogenéticos diploides con dos genomas maternos, originados por un estímulo artificial, pueden desarrollarse hasta el estadio de somitas; sin embargo, faltan tejidos extraembrionarios y cursan en aborto (Kaufman et al., 1977; Surani y Barton 1983).

6. Diagnóstico genético ovocitario

En el ámbito de la reproducción humana asistida, el diagnóstico molecular de los ovocitos, permitiría seleccionar aquéllos libres de una variante patogénica particular, previamente a la fecundación; maximizando las probabilidades de obtener descendencia sana o portadora, según el escenario particular de cada pareja.

Actualmente, el estudio molecular directo del ovocito fecundable no es posible ya que su diagnóstico implica su compromiso en viabilidad. Alternativamente, la inferencia diagnóstica es posible mediante estudio de los corpúsculos polares, subproductos de la meiosis.

La posibilidad de estudiar los subproductos de la meiosis, ha sido abordada tras la inseminación ovocitaria (Hou et al., 2013; Capalbo et al., 2013). Capalbo y colaboradores (Capalbo et al., 2013) analizaron el embrión resultante de la fecundación, donde ambos genomas parentales ya han sido fusionados y, por tanto, no pudiendo analizar independientemente el tercer elemento de la tríada meiótica, el ovocito. Por su lado, la principal limitación que plantea el modelo de Hou (Hou et al., 2013) es la necesidad de destruir el embrión, reproductivamente viable, mediante la eliminación del PN paterno, para obtener y analizar el ginogenota resultante.

Por su parte, Paffoni (Paffoni et al., 2011) y Ottolini (Ottolini et al., 2015) sugirieron el estudio genético de los productos de la meiosis empleando el modelo partenogenota, evitando la destrucción del embrión y pudiendo estudiar los 3 productos de la meiosis ovocitaria (CP1, CP2 y PNM).

6.1. Fundamento

En el diagrama adjunto (Figura 8) se muestra, de modo esquemático, un ovocito en estadio de vesícula germinal (VG), procedente de una paciente heterocigota

(Aa) para un determinado gen, no implicado en ningún evento de recombinación. Se representa al ovocito inmaduro conteniendo un par cromosómico con sus cromátidas duplicadas y, por tanto, con su haplotipo heterocigótico duplicado para un determinado gen (AAaa).

Una vez resuelta la primera división meiótica, dos opciones son posibles: en el supuesto 1, un homólogo (aa, por ejemplo) es expulsado en el CP1; o bien, en el caso 2, el CP1 contiene el haplotipo homocigoto salvaje "AA". Bajo este escenario de segregación alélica homocigota, el análisis exclusivo del CP1 para un gen en concreto nos permitirá inferir el haplotipo residente en el ovocito y, por tanto, determinar el haplotipo materno para dicho gen, contribuyente en el futuro embrión. De esta forma, si la variante patogénica fuera detectada en el CP1, se podría deducir que el ovocito no sería portador (caso 1); si no se identifica en el CP1, entonces el ovocito sería el portador (caso 2).

Tras un estímulo eficiente de activación, como el espermatozoide fecundante, el ovocito reanuda la meiosis y la completa con la extrusión del CP2; alélicamente equivalente al PNM, conteniendo sendas cromátidas hermanas ("A" en el caso 1 o "a" en el caso 2). En este supuesto particular, el análisis del CP2 reforzaría la inferencia del haplotipo presente en el cigoto, siendo, en este hipotético escenario, idénticos para el gen estudiado.

Bajo estas premisas, en el caso de las enfermedades monogénicas recesivas o dominantes, donde los genes estudiados no estuvieran implicados en eventos de recombinación, se podrían identificar aquellos ovocitos que potencialmente constituirían embriones sanos, portadores o no de la variante patogénica, dependiendo del haplotipo espermático.

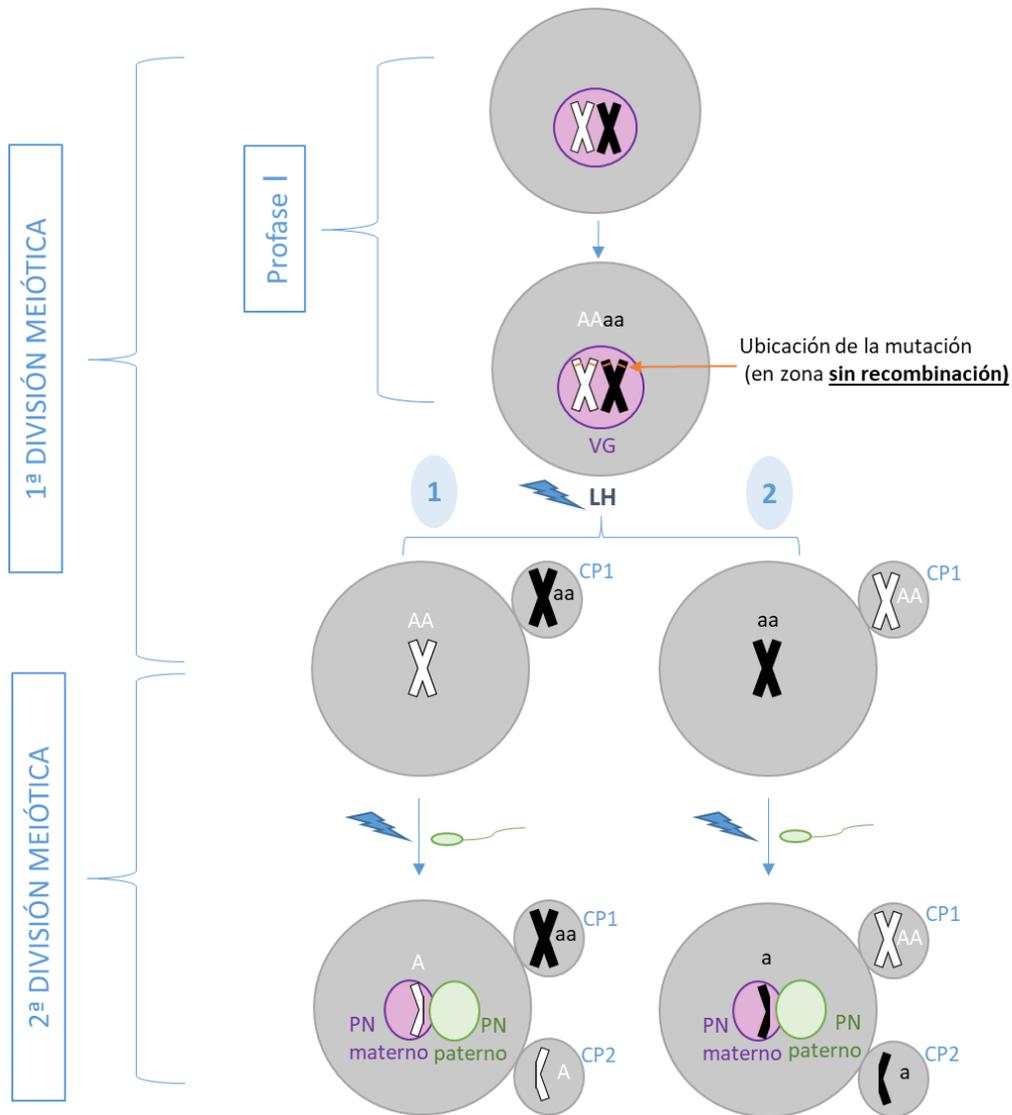


Figura 8: Esquema de los dos posibles escenarios de segregación meiótica en los ovocitos de una mujer heterocigota portadora de una mutación localizada en un área cromosómica sin recombinación genética

6.2. Estudio molecular

La amplificación del ADN es un paso previo necesario para cualquier procedimiento de análisis genético, puesto que su cantidad en las muestras suele ser muy baja, más aún cuando se trata de células individuales como los CP.

La técnica utilizada por excelencia para la amplificación del material genético es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), que permite copiar determinadas secuencias de ADN mediante el

diseño de *primers* específicos, gracias a la enzima ADN polimerasa. La amplificación también se puede realizar mediante la técnica de amplificación del genoma completo o WGA (del inglés, *Whole Genome Amplification*), cuya base técnica es la misma que la de la PCR, pero en este caso se amplifica todo el genoma, en lugar de una región específica.

Tras amplificar la determinada región, se pueden aplicar diferentes protocolos (tanto específicos como de todo el genoma), como la PCR, los arrays de polimorfismos de nucleótido simple (SNP, del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*) o NGS (del inglés, *Next-Generation Sequencing*) para determinar la presencia o no de la variante patogénica.

El principio de la mayoría de estos métodos se basa en el haplotipo, es decir, la determinación del grupo de alelos dentro de un segmento genético en un mismo cromosoma que se hereda conjuntamente. Para ello, además de estudiar el sitio específico de la variante patogénica también se analizan los marcadores genéticos asociados a ella. Estos marcadores son variaciones en una determinada secuencia de ADN que, generalmente, no tienen ningún efecto en el fenotipo. El tipo más común de marcador consiste en la variación en un solo par de bases, los llamados SNP. Son mayoritariamente bialélicos y su frecuencia es de un SNP por cada 300-1.000 pb. Los marcadores genéticos también pueden ser más grandes y afectar a largos segmentos de ADN, como los STR. Los STR, del inglés *Short Tandem Repeats*, son secuencias cortas de ADN repetidas en tándem (los dinucleótidos son los más comunes) que son altamente polimórficas, cuya frecuencia en el genoma humano es un poco menor que los SNP (un STR por cada 2.000-10.000 pb).

En protocolos de PGT-M y durante el estudio preclínico, se genotipan los marcadores genéticos situados cercanos a la variante patogénica de estudio en muestras de ADN de la pareja y de los miembros de la familia con un estado genético conocido. Estos marcadores flanquean el locus de interés y se dice que

están vinculados a la variante patogénica, puesto que se van a heredar juntos en los llamados haplobloques o fases. Los marcadores genéticos que son informativos, es decir, permiten discriminar los haplotipos de alto riesgo o mutante (haplotipo que aparece con la variante patogénica) de los salvajes o de bajo riesgo (no contienen la variante patogénica), hacen posible el estudio de segregación alélica y son seleccionados para su uso en la prueba clínica. En algunos casos, no será posible determinar el haplotipo de alto riesgo durante el estudio preclínico; por ejemplo, cuando no se pueden obtener muestras de ADN de familiares relevantes. En estos casos, se puede determinar durante el ciclo clínico, basándose en los resultados de las muestras biopsiadas (Kokkali et al., 2020; Carvalho et al., 2020a; Carvalho et al., 2020b).

No obstante, las técnicas moleculares no están exentas de limitaciones técnicas. En particular, la cantidad de ADN presente en el CP es muy baja. Concretamente, el CP1 tiene un contenido haplo-diploide, y el CP2, haplo-haploide, ambos con menor cuantía de cromatina por estar en fase M. Se calcula que la tasa estimada de diagnóstico no concluyente en el análisis de CP es inferior al 10% (Kokkali et al., 2020; Carvalho et al., 2020a; Carvalho et al., 2020b). Esto puede ser debido a diferentes problemas, inherentes a cualquier procedimiento de análisis genético, siendo más acusado cuando se realiza un diagnóstico en célula única; es el caso del fallo de amplificación, la contaminación del ADN o el fenómeno de pérdida de alelo o *allele drop out* (ADO) o de ganancia de alelo o *allele drop in* (ADI).

El ADO se debe a un fallo de amplificación de uno de los dos alelos presentes en una célula heterocigota, causando la no detección de la variante patogénica o de la copia sana en un haplotipo heterocigoto. Por su parte, el ADI consiste en la aparición de un nuevo alelo en un determinado loci no polimórfico. Estas circunstancias tienen una gran repercusión, ya que pueden provocar un diagnóstico erróneo. Particularmente, el ADO es un fenómeno relativamente frecuente en los análisis genéticos de célula única, como es el caso del CP o la

blastómera, pudiendo afectar desde el 5% al 10% de las amplificaciones (Rechitsky et al., 1999; Rechitsky et al., 2001).

Debido al impacto negativo que pueden tener en la fiabilidad del resultado del diagnóstico, deben tomarse medidas para minimizar la ocurrencia de estos riesgos o mejorar su detección. Los marcadores polimórficos deben presentar un elevado grado de heterocigosidad y producir un patrón de picos claramente interpretable, y preferiblemente ser intragénicos. Cuando se usan marcadores extragénicos, se recomiendan mantener a una distancia de 1 megabase (Mb), equivalente a aproximadamente 1 centimorgan (cM) de la variante patogénica de interés. Por otro lado, se recomienda incluir al menos un STR o tres SNP proximales y un STR o 3 SNP distales a la región de interés, junto con la variante patogénica. Los marcadores van a poder informar de que, aunque la variante patogénica no se haya amplificado debido a un ADO, sí que está presente; y del mismo modo para los marcadores asociados al haplotipo normal. Por tanto, cuanto mayor sea el número de marcadores, más robusto será el test, ya que permitirá definir y reforzar el diagnóstico de la presencia o no de un haplotipo, además de reducir el riesgo de un diagnóstico erróneo debido a un ADO (Kokkali et al., 2020; Carvalho et al., 2020a; Carvalho et al., 2020b).

6.3. Ventajas

La inferencia genética ovocitaria abre la posibilidad a realizar un diagnóstico genético preconcepción (previamente a la fecundación), ofreciendo numerosas ventajas éticas y legales.

En primer lugar, la biopsia y análisis genético del CP1 requiere de manipulaciones a realizar sobre los gametos, no sobre embriones potencialmente viables; más aún, esta técnica supone el estudio de un subproducto que no participa de ninguna manera en el proceso reproductivo y no tiene efecto deletéreo sobre las tasas de fecundación y desarrollo embrionario (Magli et al., 2004; Schenk et al.,

2018). En este sentido, se trata de la única alternativa de PGT-M en aquellos países en los que el cribado embrionario para enfermedades monogénicas es ilícito y solamente se permite antes de que ocurra la fecundación.

Además, la posibilidad de seleccionar aquellos ovocitos libres de una variante patogénica previamente a su fecundación y, por tanto, desestimar exclusivamente los ovocitos diagnosticados como afectados, maximizaría las probabilidades de obtener descendencia sana o portadora (dependiendo del escenario particular de cada *pareja*). Esto evitaría la producción y descarte de embriones afectados y relajaría las objeciones éticas referentes a la controversia sobre cómo proceder con los embriones portadores de una variante patogénica, excedentes de un programa de PGT-M.

6.4. Limitaciones

La propia metodología de diagnóstico genético ovocitario, mediante la biopsia de CP, es en sí misma una limitación, ya que se realiza una inferencia/deducción del contenido ovocitario a partir del CP1 y/o CP2, por lo que se trata de un análisis indirecto. Además, existen otras limitaciones debidas a la logística de diagnóstico molecular sin menoscabo de la viabilidad ovocitaria y a la propia naturaleza de la meiosis, que puede estar involucrada en el mecanismo de recombinación, así como alteraciones en la segregación meiótica que impliquen a la región de interés.

6.4.1. Logística

Un aspecto a tener en cuenta es la logística del proceso de biopsia y diagnóstico en asociación al curso biológico natural de los ovocitos; particularmente en relación a su edad post-MII. Algunos ovocitos con un CP1 aparentemente extruido (jóvenes post-meióticos), pueden estar aún en telofase I, quedando

remanente del huso meiótico entre el CP1 y el ovocito; de igual forma ocurre después de la extrusión del CP2. En este sentido, se aconseja no realizar la biopsia de CP demasiado temprano después de su extrusión, puesto que existe un riesgo de extraer también el material genético del ovocito, resultando en una enucleación ovocitaria (Montag et al., 2013). Igualmente, si se biopsia a edades post-metafásicas tardías, el CP1 bien pudiera haber iniciado el proceso de fragmentación o degeneración, con la subsiguiente merma en calidad del ADN.

Otra consideración, referente a la aplicabilidad clínica del estudio del CP1 como método de test genético preconcepción (TGPC) ovocitario, es el tiempo requerido para obtener el resultado del *screening* ovocitario, antes de su microinyección espermática. En términos generales, los ovocitos se suelen inseminar tras 2-4 horas desde la punción o 2 horas después de su desvitrificación. Sin embargo, el protocolo de análisis genético para el CP es muy superior (en promedio de 12 horas; Christopikou et al., 2013) a la edad ovocitaria recomendada para la inseminación. La demora en la inseminación lleva asociada un envejecimiento ovocitario no cuantificable, pero que redundará en una menor tasa de fecundación y un ulterior desarrollo embrionario comprometido. Por este motivo y hasta la fecha, en la mayoría de los casos, el diagnóstico genético ovocitario se ha llevado a cabo después de la inseminación, ya sea mediante el análisis único del CP1 (Verlinsky et al., 1990; Verlinsky et al., 1992) o análisis secuencial del CP1 y CP2 (Verlinsky et al., 1997; Kuliev y Rechitsky, 2011). Una excepción es el estudio publicado por Fiorentino y colaboradores (Fiorentino et al., 2008), que desarrollaron un protocolo de diagnóstico rápido que permitió obtener los resultados del CP1 en 4 horas, llevando a cabo la inseminación exclusivamente de los ovocitos predichos como no portadores, en un tiempo post-punción (6 horas) compatible con la viabilidad ovocitaria.

Tras la biopsia del o de los CP(s), y dependiendo de la legislación propia de cada país, se permite culminar la fecundación (primera división de segmentación) a aquéllos ovocitos inferidos como no portadores de la variante patogénica

(Fiorentino et al., 2008; Gianaroli et al., 2010); o bien, se congelan en estadio de cigoto aquellos ovocitos inferidos como portadores (Kuliev y Rechitsky, 2011); alternativamente, tras el cultivo embrionario *in vitro*, sólo se transfieren al útero o criopreservan aquellos embriones inferidos como no portadores tras estudio del CP1, y se confirma el diagnóstico patogénico mediante análisis genético de los embriones provenientes de ovocitos predichos como afectados (Verlinsky et al., 1992; Verlinsky et al., 1999).

Teniendo en cuenta la duración del acto de biopsia del CP1 más el mínimo tiempo exigido para la realización de un protocolo de biología molecular, la vitrificación individualizada de los ovocitos con el CP1 biopsiado se presenta como la mejor estrategia que pudiera conservar la viabilidad y competencia ovocitaria, al tiempo que se obtiene un diagnóstico genético preconcepción real. Bajo una estrategia logística similar opera el PGT-A/M en blastocisto, último estadio preimplantación *in vitro*, al que los medios y sistemas de cultivo convencionales no soportan su desarrollo más allá de día 6/7, lo que supone la implícita crioconservación de los blastocistos biopsiados, a espera de los resultados genéticos.

No obstante, la mayoría de los grupos de investigación que han realizado la biopsia de CP1 (Harton et al., 2011; Magli et al., 2011) no realizan la vitrificación ovocitaria post-biopsia, ya que obtienen los resultados genéticos en las horas siguientes a su fecundación.

Los escasos grupos de investigación que han realizado la biopsia de CP y su posterior crioconservación en estadio de ovocito MII (Keskintepe et al., 2009; Greco et al., 2015) y cigoto (Naether et al., 2008; Macas et al., 2011), muestran que la combinación de las técnicas de biopsia y vitrificación no presenta un efecto deletéreo en la supervivencia, fecundación o potencial del desarrollo embrionario ulterior (Greco et al., 2015). De hecho, las tasas de supervivencia de los ovocitos (97-99% - Keskintepe et al., 2009) y cigotos humanos (89% - Naether et al., 2008) son comparables a aquéllas reportadas para especímenes intactos

(Cobo et al., 2016; Al-Hasani et al., 2007), sin comprometer además su ulterior competencia para ser fecundados (91-97% - Keskintepe et al., 2009), dividirse a 2 células (80,6% - Naether et al., 2008) y desarrollarse a blastocisto (mayor del 45% - Keskintepe et al., 2009).

6.4.2. Eventos de recombinación

Una de las limitaciones más importantes del diagnóstico genético ovocitario mediante análisis del CP1 es la ocurrencia del fenómeno de recombinación en el área donde se localiza la variante patogénica objeto de estudio, ya que esta circunstancia no permite realizar un diagnóstico fiable mediante el estudio exclusivo del CP1 (Rechitsky et al., 2011).

En ese caso, el ovocito inmaduro, representado en la Figura 9, presenta un haplotipo heterocigoto y recombinado para el gen de estudio (AaAa). En este escenario, tras la primera división meiótica, la única opción posible es que un homólogo sea confinado en el CP1 rindiendo un haplotipo heterocigoto para el gen de interés “Aa”; conteniendo una copia de la variante patogénica y otra salvaje. Puesto que el CP1 es alélicamente complementario a la información contenida en el ovocito MII, éste también será heterocigoto “Aa” para la variante estudiada. Por tanto, la portabilidad o no de la variante patogénica en el ovocito no puede inferirse hasta que no se resuelva la segunda meiosis y se analice complementariamente el CP2.

Finalizada la segunda división meiótica y extruido el CP2, dos opciones son posibles: o bien la variante patogénica se ha expulsado en el CP2 (haplotipo mutante “a” en el caso 1) o, por el contrario, se ha extruido el haplotipo salvaje (“A” en el caso 2). Esto determinará que el cigoto será portador del haplotipo salvaje (“A” en el caso 1) o del haplotipo patogénico (“a” en el caso 2). Por tanto, en este caso, el CP2 y el PNM no son genéticamente equivalentes para la variante estudiada.

INTRODUCCIÓN

Bajo este supuesto en el que el CP1 fuera heterocigoto, probablemente debido a que el gen de interés se ha visto implicado en un proceso de recombinación, la inferencia del contenido genético del ovocito solamente es posible mediante el análisis combinado del CP1 y CP2 y, por tanto, en ningún caso se permitiría constituir embriones electivos antes de la realización del ICSI.

La extrusión del CP2 se produce cuando el ovocito reanuda la meiosis en respuesta a un estímulo eficiente de activación, lo cual se consigue, en condiciones normales, mediante la interacción y penetración de la membrana ovocitaria por el espermatozoide. Por ello, este análisis no debiera considerarse TGPC en sentido estricto, ya que requerimos del subproducto activado del ovocito (CP2) para inferir el contenido materno del futuro embrión. No obstante, mientras el diagnóstico se pueda realizar antes de que tenga lugar el momento preciso de la fecundación, estrictamente hablando, es decir, cuando se combinan los dos genomas parentales (primera división mitótica), se continuaría rigurosamente considerando un diagnóstico preconcepción. Si se diera la circunstancia de que el resultado del test genético ovocitario se obtuviera después de la fecundación, el diagnóstico sería postconcepción.

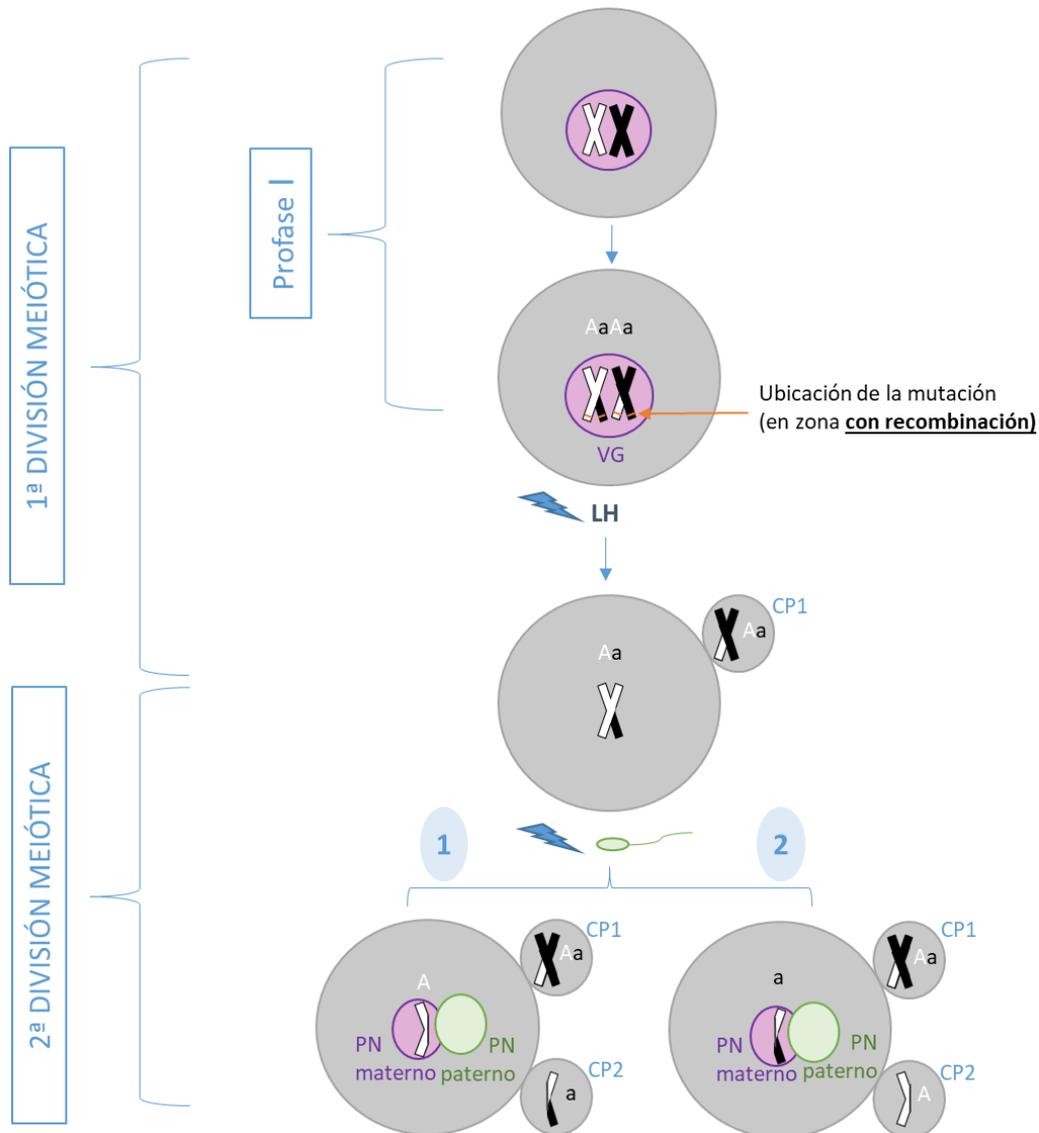


Figura 9: Esquema de los dos posibles escenarios de segregación meiótica en los ovocitos de una mujer heterocigota portadora de una mutación localizada en un área cromosómica con recombinación genética

6.4.3. Alteraciones en la segregación meiótica

Los errores de segregación meiótica son los principales responsables de las aneuploidías parentales; siendo también posible un origen mitótico, a lo largo del desarrollo embrionario.

Además de la edad materna, un factor importante que predispone a un error en la segregación meiótica es una recombinación genética alterada, que provoca un

INTRODUCCIÓN

defecto o exceso de cohesión entre cromátidas, DSBs u otras lesiones que ocurren durante la larga meiosis de los gametos femeninos (Tease et al., 2002; Cheng et al., 2009; Ottolini et al., 2015; Ma et al., 2019).

Como resultado, pueden aparecer diferentes patrones de segregación (Figura 10), como la no disyunción de los cromosomas homólogos en la meiosis I o de las cromátidas hermanas en la meiosis II, la separación prematura de las cromátidas hermanas (Pellestor et al., 2002) o el patrón de segregación reversa, descrito por Ottolini et al., 2015, que supone la segregación de cromátidas hermanas en la meiosis I. Este tipo de segregaciones, solas o combinadas, pueden resultar en un CP1 y/o CP2 nulisómicos o con una dotación cromosómica distinta de la que se obtendría de una segregación normal.

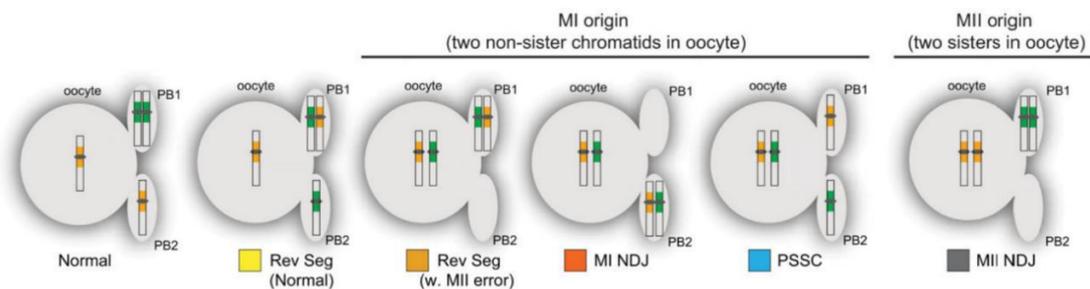


Figura 10: Patrones de segregación meiótica (Figura extraída de Ottolini et al., 2015)

Si bien el TGPC que planteamos en la presente tesis doctoral no tiene por objeto la detección de aneuploidías, los errores en la segregación meiótica pueden redundar en casos de heterocigosidad en el CP o en un diagnóstico molecular erróneo o no concluyente cuando el cromosoma portador de la variante patogénica estuviera implicado en una inestabilidad cromosómica.

JUSTIFICACIÓN

La existencia de un elevado riesgo de transmitir una enfermedad genética a la descendencia exige la disponibilidad de una técnica que permita el análisis genético de los gametos antes de que ocurra la fecundación, bien en el ovocito (si solamente la madre es la portadora de la variante patogénica), bien en el espermatozoide (si únicamente el padre es el portador de la variante patogénica) o bien en ambos gametos (cuando la pareja fuera portadora coincidente para la misma variante patogénica). Disponer de dicha tecnología tiene un papel de incalculable repercusión emocional, social y económica, obviando los problemas legales respecto a la biopsia embrionaria existente en algunos países, y también aquéllos éticos referentes al destino de los embriones excedentes de un programa de PGT-M. Esta tecnología permitiría seleccionar aquéllos gametos libres de la variante patogénica y poder generar exclusivamente embriones sanos. En consecuencia, en tales escenarios, tendríamos la posibilidad de erradicar la variante patogénica de la línea familiar.

El TGPC constituye en sí mismo un reto de difícil abordaje, ya que el análisis de los gametos progenitores (óvulo y espermatozoide) es incompatible con su viabilidad ulterior. La estrategia para analizar los gametos está condicionada por las particularidades de cada origen parental. En la gametogénesis masculina, cada espermatogonia da lugar a 4 espermatozoides, resultando imposible su trazabilidad y siendo, por tanto, inviable la inferencia genética en ellos. Actualmente, el estudio espermático se restringe a inferencias poblacionales o empleando estrategias alternativas de clonación espermática (androgenotas: Escribá et al., 2022). Sin embargo, en la gametogénesis femenina, cada ovogonia culmina con la formación de una única célula reproductivamente útil, el ovocito maduro MII, y otras 2 estructuras celulares, llamadas corpúsculos polares; subproductos de la meiosis, cuyo estudio permitiría inferir la composición genética del ovocito.

JUSTIFICACIÓN

El único grupo de investigación que ha realizado la biopsia de CP1 como método preconcepción es Fiorentino y colaboradores (Fiorentino et al., 2008). Estos autores obtuvieron diagnóstico rápido de CP (4 horas tras la biopsia) e infirieron el contenido genético ovocitario antes de su inseminación. Otras aproximaciones, incluyeron el desarrollo de la metodología de biopsia de CP sin diagnóstico (Keskintepe et al., 2009); con diagnóstico posterior a la inseminación (Harton et al., 2011; Magli et al., 2011); y finalmente, un *case report* basado en el fallido análisis del CP1 y, por tanto, diagnóstico en día 3 de desarrollo embrionario (Greco et al., 2015).

Así, proponemos el desarrollo y validación de una novedosa estrategia de TGPC ovocitario en asociación a enfermedades monogénicas, empleando el modelo partenogenota. Para ello, se pretende estudiar la inferencia genética de los ovocitos, basada en el análisis genético de las tríadas meióticas (CP1, CP2 y células que constituyen los partenogenotas haploides, partenocitos).

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de la presente tesis doctoral es: poner a punto y validar una metodología de test genético preconcepción (TGPC) ovocitario, en asociación a enfermedades monogénicas, mediante la biopsia del primer corpúsculo polar, empleando el modelo partenogenota.

Para ello, se abordan los siguientes **objetivos secundarios**:

- 1.- Puesta a punto de la metodología de biopsia de corpúsculo polar, evaluando su eficiencia en términos de supervivencia a la vitrificación y activación ovocitaria (estudio 1).

- 2.- Validación del test genético ovocitario, determinando la inferencia del contenido genético del ovocito a partir del análisis genético de las tríadas meióticas (CP1, CP2 y partenocitos) (estudio 2).

METODOLOGÍA

1. Aprobación, consentimientos y lugar de ejecución

Este proyecto se realizó de acuerdo al marco legal recogido en el Real Decreto 223/2004 y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

Los ovocitos se emplearon con fines de investigación o experimentación, no destinándose para su transferencia a la mujer ni para originar embriones con fines reproductivos.

La presente tesis doctoral cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de IVI-RMA Valencia (“Estudio piloto: Diagnóstico genético ovocitario mediante análisis del primer corpúsculo polar”; código UAGI: 1602-VLC-008-ME) aprobado el 23 de febrero del 2016 (ver anexo 1).

Asimismo, todas las muestras biológicas empleadas pertenecen a mujeres donantes de IVI-RMA Valencia, informadas de los pormenores del estudio y consintiendo participar mediante lectura y firma de la hoja de información al paciente y consentimiento informado (HIP-CI) (ver anexo 2).

Los experimentos descritos en el presente documento de tesis doctoral fueron desarrollados en los laboratorios de Fecundación in Vitro (FIV) y de Diagnóstico Genético Preimplantación (DGP), de la clínica IVI-RMA Valencia; sito en Plaza de la Policía Local nº3 de Valencia. Por su parte, los análisis de genética molecular y los estudios genéticos de las muestras biológicas fueron realizados por diferentes empresas de genética: Seqplexing (INCLIVA) - OverGenes (Parque Científico de la Universitat de València - Vivero Empresarial; sito en Calle Catedrático José Beltrán, nº2, laboratorios 19-22, Paterna, Valencia) y Sistemas Genómicos (Parque Tecnológico de Valencia; sito en Ronda de Guillermo Marconi, nº 6, Paterna, Valencia).

2. Donantes de ovocitos

Los ovocitos empleados en la presente investigación fueron obtenidos de mujeres sanas que, de manera voluntaria y altruista, decidieron acudir a una clínica de reproducción asistida para donar sus ovocitos con fines de reproducción. Estas mujeres cumplieron con los requisitos preliminares para ser donantes de óvulos: mayores de edad y menores de 36 años, cariotipo normal, serologías negativas para sífilis, hepatitis B, hepatitis C y HIV, índice de masa corporal (IMC) $< 28 \text{ kg/m}^2$, además de presentar un recuento de folículos antrales en día 2-3 del ciclo superior a 20. Sin embargo, tras la realización del test genético de portadores (CGT 600, Igenomix, Valencia), que formaba parte del protocolo de selección de donantes de la clínica, fueron rechazadas por ser portadoras en heterocigosis de alguna variante patogénica asociada al cromosoma X y/o a algunos cromosomas autosomas, detectada bajo demanda de la receptora.

En la siguiente tabla, se recoge la relación de donantes identificadas como portadoras en heterocigosis de diferentes variantes patogénicas e incluidas en la investigación (Tabla 3).

Tabla 3: Características de las variantes patogénicas (enfermedad que provoca, gen donde se localiza y tipo de herencia) que presentan las donantes de ovocitos incluidas en el estudio

Donante	Enfermedad	Gen	Variante cHGVS	Variante pHGVS	Herencia
1	Déficit de biotinidasa	BTD	c.664G>A	p.Asp222Asn	AR
	Distrofia muscular de Becker	DMD	del	del exón 49	XR
2	Acromatopsia tipo 3	CNGB3	c.1208G>A	p.Arg403Gln	AR
	Disqueratosis congénita tipo 1	NOP10	c.34G>C	p.Asp12His	AR
	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos	AR	c.2395C>G	p.Gln799Glu	XR
	Alfa talasemia	HBA	$\alpha\alpha/-\alpha$ 3.7	-	AR
3	Síndrome de Omenn	DCLRE1C	c.1558_1559insA	-	AR
	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos	AR	c.2395C>G	p.Gln799Glu	XR
	Fibrosis quística; mucoviscidosis	CFTR	c.1399C>T	p.Leu467Phe	AR
	Retinosis pigmentaria 12	CRB1	c.936T>G	p.Asn312Lys	AR
	Distrofia muscular de Duchenne	DMD	del	-	XR
4	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 4C	SH3TC2	c.505T>C	p.Tyr169His	AR
	Síndrome de Walker-Warburg	POMT1	c.1611C>G	p.Ser537Arg	AR
	Sordera tipo 1A autosómica	GJB3	c.94C>T	p.Arg32Trp	AR
5	Hemofilia A	F8	Inv22	-	XR
	Hiperplasia suprarrenal congénita clásica por déficit de 21-hidroxilasa	CYP21A2	Large gene conversion	-	AR
	Miopatía de Miyoshi	DYSF	c.3892A>G	p.Ile1298Val	AR

Donante	Enfermedad	Gen	Variante cHGVS	Variante pHGVS	Herencia
6	Déficit de plasminógeno tipo 1	<i>PLG</i>	c.112A>G	p.Lys38Glu	AR
	Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	c.1210-7_1210-6delTT-12TG	-	AR
7	Retinosis pigmentaria 12	<i>CRB1</i>	c.498_506delAAATTGATGG	p.Ile167_Gly169del	AR
	Déficit de alfa-1 antitripsina	<i>SERPINA1</i>	c.863A>T	p.Glu288Val	AR
	Hemocromatosis tipo 1	<i>HFE</i>	c.187C>G	p.His63Asp	AR
	Hemofilia B	<i>F9</i>	c.1345C>T	p.Arg449Trp	XR
	Amaurosis congénita de Leber	<i>A/PL1</i>	c.286G>A	p.Val96Ile	AR
8	Miopatía de Miyoshi	<i>DYSF</i>	c.4820T>C	p.Ile1607Thr	AR
	Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	AR
	Hiperplasia suprarrenal congénita clásica por déficit de 21-hidroxilasa	<i>CYP21A2</i>	c.955C>T + CYP21A2dup.	p.Gln319Ter + CYP21A2dup	AR
	Miopatía de Miyoshi	<i>DYSF</i>	c.3181_3182insAGGCCGG	p.Gln1092_Ala1093insAlaGlu	AR

NOTA: AR=autosómica recesiva; XR= recesiva ligada al cromosoma X

Para la puesta a punto de la metodología de biopsia de corpúsculo polar (estudio 1; objetivo secundario 1) se seleccionaron las donantes de la #1 a la #6. Por su parte, para la validación de la metodología del test genético ovocitario mediante el estudio genético de las tríadas meióticas (estudio 2; objetivo secundario 2), se seleccionaron la donante #7 y #8.

3. Obtención de ovocitos

Las donantes de ovocitos recibieron una estimulación ovárica controlada (del inglés, *controlled ovarian stimulation*: COS), siguiendo el protocolo estándar aplicado rutinariamente por el equipo médico de IVI-RMA Valencia, y descrito por Giles y colaboradores (Giles et al., 2021).

En síntesis, dicho protocolo persigue acompañar el crecimiento y maduración del número de folículos reclutados. El tratamiento de estimulación ovárica se inicia tras comprobar la presencia de ovarios en reposo mediante ecografía vaginal en día 2-3 de ciclo menstrual o tras 5 días de la última pastilla de anticonceptivo oral (ACO).

La dosis inicial de hormona foliculoestimulante humana recombinante o rFSH (folitropina alfa - Bemfolá; Gedeon Richter Ibérica, España) fue de 150-225 UI, dependiendo de la edad, el IMC y los resultados de las pruebas de reserva ovárica (Nardo et al., 2009; la Marca y Sunkara, 2014). El pico preovulatorio endógeno fue reprimido con la administración oral de acetato de medroxiprogesterona (MPA; Progevera; Pfizer, España) en una única dosis diaria de 10 mg, administrada a lo largo de la estimulación, desde su inicio hasta el día de inducción de la ovulación (inclusive). La inducción de la ovulación se realizó cuando se contabilizaron 8 o más folículos de diámetro mayor o igual a 17 mm, mediante la

administración de una única dosis subcutánea de 0,2 mg de triptorelina (0,1 mg; decapeptyl, Ipsen, Francia).

Transcurridas 36 horas tras la inducción de la ovulación, se realizó la recuperación ecoguiada de los ovocitos contenidos en los folículos mediante el protocolo de punción y aspiración folicular (OPU, del inglés *Ovum Pick-Up*), rutinariamente empleado en la clínica IVI-RMA Valencia. El procedimiento se realizó bajo sedación, para lo que se emplea propofol y fentanilo, así como ventilación asistida por mascarilla con oxígeno. Técnicamente consiste en la introducción de la sonda transvaginal protegida con una funda estéril y con una guía asociada que permite el acoplamiento de la aguja de aspiración. Después de localizar el ovario, se inicia la punción de cada folículo a través del fondo del saco vaginal. La conexión de este sistema de punción a una bomba de vacío de regulación continua, permite el aspirado del contenido folicular, el cual es recogido en un tubo de poliestireno (Falcon, Becton-Dickison-Maryland, EE. UU.) de 10 cm con un diámetro interno de 1,7 cm y una capacidad de 15 ml que se deposita en un bloque térmico regulado a 37 °C en el laboratorio. Finalizada la punción de todos los folículos de un ovario, se extrae la aguja y se procede de igual forma con el ovario contralateral.

El contenido folicular aspirado y recolectado en tubos estériles son transferidos al laboratorio de FIV, ubicado en un espacio contiguo al quirófano. En una cabina de flujo laminar tipo incubadora *isolate* con superficie calefactada a 37 °C y concentración de CO₂ al 6% (ASTECC Smart Station SS250, ASTEC, EE. UU.), el aspirado folicular se vierte sobre placas Petri de 90 mm (NUNC 150270, Sigma-Aldrich, Dinamarca) precalentadas. Bajo visión estereoscópica binocular, se inspecciona el aspirado e identifican los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO; Figura 11).



Figura 11: Complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO) obtenidos en la punción folicular

Identificado cada CCO, se capta con una pipeta Pasteur estéril y se transfiere a una placa de lavado, conteniendo 4-7 ml de medio Fert (Fertilization Medium, Cook Medical, Sydney IVF, Australia) cubierto con 8 ml de aceite mineral ligero (Kitazato, Dibimed – Biomedical Supply, España). Los CCO son lavados y, con ayuda de agujas y jeringas, se recortan los CCO y se eliminan los restos de moco, sangre, exceso de granulosa o presencia de teca interna. Los CCO limpios son entonces transferidos a una placa de cultivo nueva de las mismas características que aquélla de lavado anteriormente descrita, distribuyendo un máximo de 10 CCO por placa, donde permanecen en condiciones de cultivo (37 °C, 6% CO₂ y 5% O₂ en aire) durante 2-4 horas. El tiempo total de incubación de los CCO depende de las técnicas ulteriores al que se sometan los ovocitos según el grupo experimental al que pertenezcan. Los CCO destinados a ser biopsiados su CP1 y/o vitrificados son cultivados por dos horas desde la punción, mientras que cuando el destino ovocitario es la AOA, el tiempo de cultivo se extiende a 4 horas.

Transcurrido el tiempo particular de cultivo, los CCO son decumulados. En síntesis, la decumulación consiste en la eliminación de las células del cúmulo-corona, un evento necesario para evaluar el estado madurativo de los ovocitos. Técnicamente implica una breve incubación (máximo un minuto) de los CCO en una solución enzimática de hialuronidasa (40 UI/ml; Sage IVF, CooperSurgical,

España), asistida de manipulación mecánica con ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Con la eliminación de las células de la granulosa, los ovocitos aún rodeados de la corona radiada son transferidos a gotas individuales de 50 μ l de medio Fert (Fertilization Medium, Cook Medical, Sydney IVF, Australia) cubiertas con 8 ml de aceite mineral ligero (Kitazato, Dibimed – Biomedical Supply, España), donde se pipetea nuevamente, empleando capilares del dispositivo Stripper o Denudation Pipettes de calibres cada vez más pequeños, desde 275 μ m a 140 μ m (Cook Flexipet Pipette, Cook Medical, Sydney IVF, Australia) hasta desprender el resto de células de la granulosa. Los ovocitos, totalmente decumulados, son lavados e inspeccionados bajo visión microscópica, a fin de evaluar su estadio de maduración nuclear.

Según esta evaluación, se seleccionan los ovocitos maduros (metafase II, MII), morfológicamente identificables por la presencia del primer corpúsculo polar (CP1) en el espacio perivitelino y la ausencia de estructuras nucleares en el citoplasma, descartando aquéllos inmaduros, ya sea en estadio de vesícula germinal (VG) o en metafase I (MI), así como los degenerados (Figura 12).

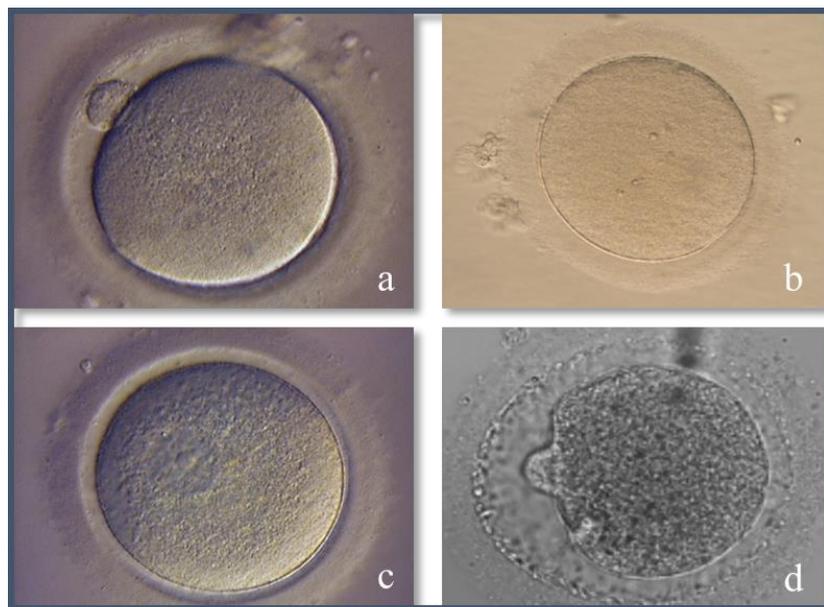


Figura 12: Imágenes de diferentes estadios madurativos del ovocito tras la decumulación (a: metafase II; b: metafase I; c: vesícula germinal; d: degenerado)

4. Crioconservación ovocitaria

La vitrificación y desvitrificación ovocitaria se realizó con el método Cryotop® (Kitazato BioPharma, Dibimed Biomedical Supply, España) descrito por Kuwayama (Kuwayama et al., 2005). Este dispositivo consiste en una fina lengüeta de polipropileno (0,4 mm de ancho x 20 mm de largo x 0,1 mm de grosor) unida a un mango de plástico. La fina lengüeta permite disponer las muestras biológicas en un volumen mínimo (0,1 µl), proporcionando elevadas tasas de enfriamiento (23000°C/min) y calentamiento (42000°C/min).

Las soluciones comerciales de agentes crioprotectores (ACP), empleadas en la vitrificación y desvitrificación, son las siguientes (Figura 13):

Soluciones de vitrificación

- Solución de lavado; *Basic Solution (BS)*: medio tampón HEPES TCM199 (M199) suplementado con 0,06 mg/ml de hidroxipropilcelulosa (HPC).
- Solución de equilibrio; *Equilibration Solution (ES)*: 7,5% de EG; 7,5% de DMSO en solución BS.
- Solución de vitrificación; *Vitrification Solution (VS)*: 15% de EG; 15% de DMSO en solución BS.

Soluciones de desvitrificación

- Solución de calentamiento, *Thawing solution (TS)*: 0,1 M trehalosa en solución de lavado (WS).
- Solución de dilución; *Dilution Solution (DS)*: 0,5 M trehalosa en solución WS.
- Solución de lavado; *Washing Solution (WS)*: medio tampón HEPES TCM199 (M199) suplementado con 0,06 mg/ml HPC.



Figura 13: Soluciones de vitrificación, desvitrificación, Cryotops® y placa Replate® comercializado por Kitazato-Dibimed

Tanto el procedimiento de vitrificación como de desvitrificación se realizan en campana de flujo laminar a temperatura ambiente. Las soluciones se atemperaron a 22-25 °C, excepto el TS a 37 °C, al menos 1 hora antes de realizar el procedimiento.

El protocolo de vitrificación se divide en 4 etapas: equilibrado o carga de los ACP, carga en el dispositivo, enfriamiento de la muestra y almacenaje.

Inicialmente, se pipetea 20 µl de BS en el primer pocillo y 300 µl de VS en el segundo y tercer pocillo de la placa Replate®. Seguidamente, se aspiran los ovocitos (hasta un máximo de 16) con un capilar de 140 µm y se colocan en el fondo del pocillo de BS con el mínimo medio posible. Se observa el ancho del espacio perivitelino y el grosor de la zona pelúcida. A continuación, se agregan 20 µl de ES lentamente alrededor de la gota BS anterior. Tras 3 minutos, se agregan igualmente otros 20 µl de ES y se espera 3 minutos. Finalmente, se agregan 240 µl de ES y se espera entre 6-9 minutos. El equilibrio finaliza cuando el volumen de los ovocitos se recupera prácticamente al 90% (Figura 14).

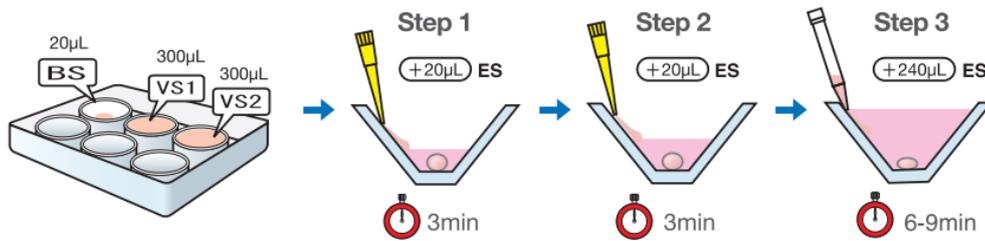


Figura 14: Fase de equilibrado para la vitrificación de ovocitos

Tras esta fase de equilibrado, se aspiran los ovocitos (4 como máximo) y se colocan en el pocillo de VS con el mínimo medio posible por un tiempo máximo de 30 segundos, tiempo durante el cual la solución ES que rodea a los ovocitos, se aspira y desecha; se lavan los ovocitos por diferentes zonas del pocillo, continuando con la eliminación de restos de solución ES, fácilmente distinguibles por la diferente densidad. A continuación, se aspiran los ovocitos y se colocan en la base del segundo pocillo de VS (Figura 15).

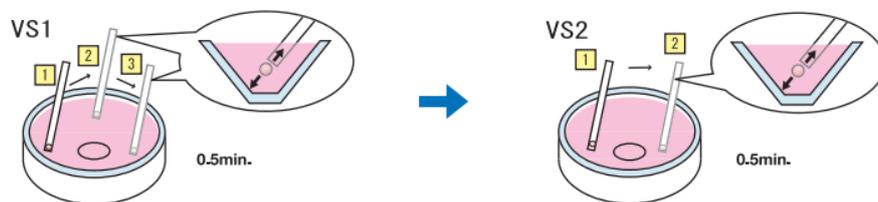


Figura 15: Fase de lavados durante el paso por la solución VS para la vitrificación de ovocitos

Durante 1 minuto, se lavan en sendos pocillos y finalmente, los ovocitos se aspiran con el mínimo medio posible y se depositan en la lengüeta del Cryotop® bajo la lupa binocular, aspirando el exceso de crioprotector (Figura 16).

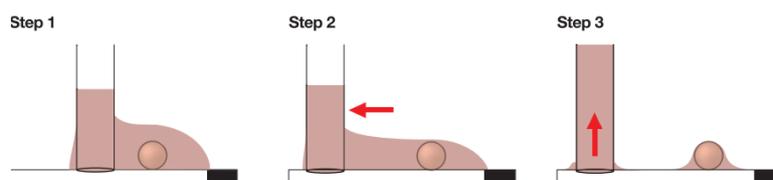


Figura 16: Procedimiento de carga en el Cryotop®

METODOLOGÍA

Una vez aspirado el exceso de crioprotector, se sumerge el Cryotop® rápidamente en una cubeta especializada que contiene nitrógeno líquido, moviéndolo enérgicamente para evitar la formación de burbujas. Finalmente, se protege la lengüeta con una pajuela protectora y se almacena, cada Cryotop®, en bancos en fase vapor de nitrógeno destinados a tal efecto (CBS V-1500AB; Biolife solutions, EE. UU.) (Figura 17), logrando temperaturas por debajo de -180°C en el nivel superior y -195°C en la parte inferior.



Figura 17: Bancos criogénicos CBS en fase vapor de nitrógeno, parte externa (izquierda) e interna (derecha)

Los ovocitos permanecieron crioconservados durante un máximo de 15 días y, tras este tiempo, fueron desvitrificados y devueltos a las condiciones de cultivo.

El procedimiento de desvitrificación se divide en 3 etapas: desvitrificación/calentamiento de la muestra, dilución de los ACP e hidratación y cultivo.

Para la preparación de la placa de dilución/hidratación, se pipetea $300\ \mu\text{l}$ de la solución DS en el primer pocillo de la Reproplate® y $300\ \mu\text{l}$ de la solución WS en el segundo y tercer pocillo, ambas soluciones a temperatura ambiente. El

contenido de la solución TS (2 ml) se vierte en una placa Falcon 1008, ambos previamente calentados a 37°C.

Tras identificar y retirar el Cryotop® del tanque criogénico de almacenaje, éstos se trasladan al laboratorio de FIV sumergidos en el interior de una cubeta con nitrógeno líquido. Ya en la cabina de flujo, se retira la pajuela protectora del Cryotop® y, a continuación, con un movimiento rápido y directo, se sumerge el extremo más distal de la lengüeta del Cryotop® en la placa de TS (Figura 18). Tras visualizar los ovocitos bajo visión estereoscópica, se deja que se desprendan por si solos. Si pasados 40 segundos no se desprenden, se desliza el Cryotop® suavemente por el fondo de la placa. Tras 1 minuto de deshidratación, se aspiran los ovocitos y aproximadamente 1 cm de columna en el capilar de solución TS. Seguidamente, se transfieren las muestras al pocillo con DS. Tras 3 minutos de hidratación y dilución, se aspiran los ovocitos junto con una columna de 1 cm de solución DS. A continuación, las muestras se transfieren al fondo del primer pocillo de WS, asegurándonos de verter primero la columna de DS. Después de 5 minutos, se aspiran los ovocitos y se colocan en la superficie del segundo pocillo de WS. Por último, tras 1 minuto se transfirieren a su placa de cultivo. Después de 2 horas, su supervivencia fue evaluada y anotada, permitiendo estimar la tasa de supervivencia a la crioconservación.

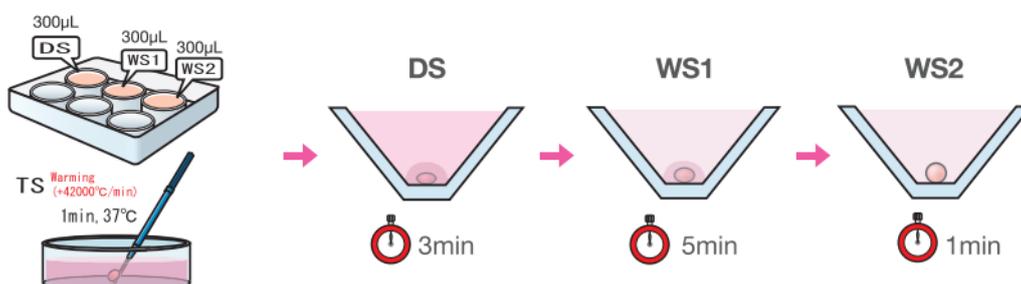


Figura 18: Procedimiento de desvitrificación de ovocitos

La vitrificación de los ovocitos se llevó a cabo 2 horas después de la decumulación, o bien inmediatamente después de la biopsia de CP1, según el grupo experimental asignado.

La vitrificación y desvitrificación de los ovocitos cuyo CP1 había sido biopsiado se realizó de la misma manera que para aquéllos no biopsiados, con la diferencia de que, en este caso, cada ovocito se vitrificó/desvitrificó individualmente, a fin de mantener su trazabilidad.

5. Producción de partenogenotas y cultivo

Los ovocitos MII fueron activados artificialmente a fin de producir una respuesta ovocitaria de activación normal (NOAR, del inglés *Normal Oocyte Activation Response*) y producir partenogenotas haploides uniparentales.

La activación ovocitaria artificial (AOA) se realizó según el protocolo original de Nakagawa y colaboradores (Nakagawa et al., 2001b) con las modificaciones implementadas por Escrich y colaboradores (Escrich et al., 2011). En síntesis, consiste en una incubación químico enzimático seriada; siendo activados tras 4 horas desde la punción ovárica o 2 horas después de su desvitrificación, según fueran ovocitos frescos o vitrificados, respectivamente.

En primer lugar, se practicó un pequeño orificio en la zona pelúcida en aquellos ovocitos que no hubieran sido previamente biopsiados (los ovocitos biopsiados ya lo presentaban). A continuación, cada ovocito fue individualmente incubado durante 5 minutos en una solución de ionóforo de calcio (A23187, Sigma, España), seguida de una incubación de 10 µg/ml de puromicina (P8833, Sigma, España) durante 5 horas.

La concentración de A23187 fue una de las principales variables experimentales, siendo de diferente molaridad en función de la fase de estudio (primera fase: 8 μM ; segunda fase: 6 μM).

Las placas de activación constaron de gotas de 50 μL de las soluciones de incubación preparadas en medio de cultivo embrionario one-step (GEMS, Genea Biomedx[®], Australia), cubiertas con aceite mineral ligero. Durante el periodo de incubación, los ovocitos se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (37°C, 6% CO_2 y 5% de O_2 en aire) en incubador convencional (MCO-5M-PE, Panasonic).

Tras estas incubaciones, los ovocitos fueron lavados en medio de cultivo embrionario one-step (GEMS, Genea Biomedx[®], Australia) e individualmente cultivados en placas EmbryoSlides (UnisenseFertiliTech, Dinamarca) y en sistema time-lapse, Embryoscope[®] (Unisense FertiliTech, Dinamarca) en condiciones estándar de laboratorio (37°C, 6% CO_2 y 5% de O_2 en aire); finalizando el cultivo en día 1 (estudio 1) o en día 3 de desarrollo (estudio 2).

Transcurridas 16-20 horas desde la primera incubación en A23187, la respuesta ovocitaria de activación (OAR; del inglés *Oocyte Activation Response*) fue evaluada. Diversas respuestas de activación ovocitaria han sido reportadas (Kaufman 1978; Ozil 1990; Escribá y García-Ximénez 1999; Escribá y García-Ximénez 2000a; Escribá y García-Ximénez 2000b). Solamente aquellos partenogenotas que expulsaron el CP2 y presentaron un único PN, es decir, mostraron una respuesta de activación normal (NOAR), potencialmente haploides y uniformes, conformaron el cuerpo de esta investigación.

La tasa de NOAR fue contabilizada y calculada como el porcentaje de ovocitos que desarrollan una NOAR por el número de ovocitos MII activados. Por otra parte, aquellos ovocitos que mostrasen cualquier otro tipo de respuesta de activación,

diferente de aquella NOAR, fueron registrados y descartados de esta investigación.

Del total de 174 ovocitos con NOAR, 131 finalizaron el cultivo en día 1 (estudio 1) y 43 fueron cultivados hasta día 3 (estudio 2).

El número de partenocitos en día 3 de desarrollo fue contabilizado a fin de proporcionar una media.

6. Biopsia de corpúsculo polar y partenocitos

El procedimiento de biopsia descrito en este apartado es común, con algunas particularidades, a todas las muestras biológicas, que comprenden: primer y segundo corpúsculo polar y partenocitos. Las biopsias se realizaron empleando técnicas de micromanipulación y bajo visión microscópica (Olympus IX, Japón), con tecnología OCTAX Laser y pletina calefactada.

Las placas de biopsia de CP1 se prepararon con gotas de 10 μ l de medio Fert (Fertilization Medium; Cook Medical, Sydney IVF, Australia) para cada ovocito individual, con un máximo de 2-3 ovocitos por placa. Las placas se cubrieron con 8-10 ml de aceite mineral (Cook Medical, Sydney IVF, Australia).

Cada ovocito MII fue posicionado con el CP1 en una disposición horaria correspondiente a las 12h. Con el ovocito así fijado con la pipeta de sujeción o holding (HP-100-35; Sunlight Medical, Dibimed, España), y presión negativa, se practicó un orificio en la zona pelúcida mediante pulsos de láser (Octax, MTG Medical Technology, Alemania). A través de esta apertura, la pipeta de biopsia de CP (MPB-FP-30; TPC, CooperSurgical, España) accede al espacio intrazonal, aspirando el CP1, que fue cuidadosamente ubicado en la misma gota de biopsia (Figura 19).

El tamaño del orificio fue una de las principales variables experimentales, siendo de diferente medida en función de la fase de estudio (primera fase: 20-25 μm ; segunda fase: 10-15 μm).



Figura 19: Biopsia de CP1

La biopsia de CP1 se realizó 2 horas tras la decumulación o 2 horas tras su desvitrificación, dependiendo del grupo experimental al que fueron asignados. El ovocito biopsiado fue devuelto a las condiciones de cultivo (37°C, 6% CO₂ y 5% O₂ en aire, en medio Fert) a esperas de su activación ovocitaria artificial (AOA) o crioconservación, según el grupo experimental al que pertenezcan. Tras la AOA (explicada en detalle en el siguiente apartado), aquéllos ovocitos que expulsaron el CP2 y mostraron un único PN, fueron transitoriamente retirados del cultivo a fin de biopsiar el CP2 (estudio 2).

La metodología llevada a cabo para la biopsia del CP2 es idéntica a aquella descrita para el CP1, aprovechando, cuando fuera posible, el orificio anteriormente practicado. No obstante, cuando la ubicación del CP2 no permitió dicha intervención, se practicó una segunda apertura en la zona, a fin de biopsiar tal estructura corpuscular (Figura 20). Finalizado el acto de biopsia, el partenogenota fue devuelto al sistema de cultivo en time-lapse, empleando para ello la misma placa original de cultivo.

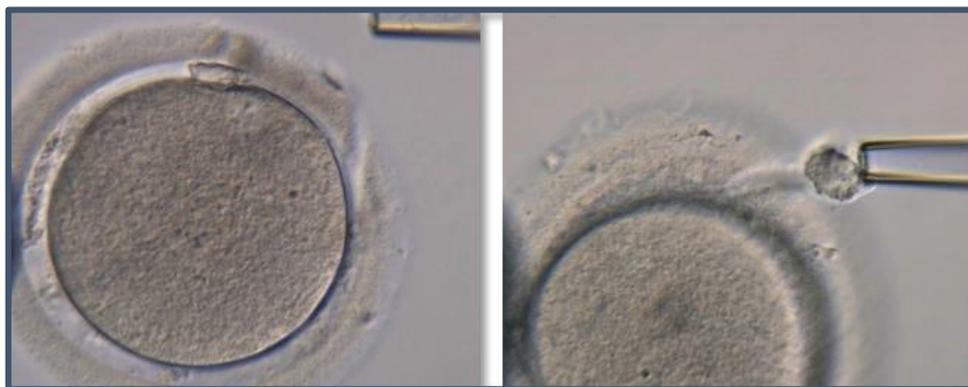


Figura 20: Biopsia de CP2

En día 3 de desarrollo, los partenocitos fueron obtenidos mediante biopsia de los partenogenotas, que contuviesen 6 o más células y menos de un 15-20% de fragmentación. Para ello, las placas de biopsia se prepararon con gotas de 20 μ l de medio tamponado con MOPS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (G-PGD, Vitrolife), suplementado al 5% con albúmina sérica humana (HSA-solution, Vitrolife), que permite debilitar las uniones intercelulares existentes, para la biopsia de células partenogénicas. Cada partenogenota fue desagregado en sus células constituyentes (partenocitos), que fueron individualmente ubicadas en cada gota. Las placas se cubrieron con 8-10 ml de aceite mineral (Cook Medical, Sydney IVF, Australia). Para ello, el partenogenota es fijado mediante presión negativa, ejercida con la pipeta de sujeción o holding (HP-100-30; Sunlight Medical, Dibimed, España). A las células del partenogenota se accede tras practicar un agujero de unos 35-40 μ m de diámetro mediante aplicación de pulsos de láser en la zona pelúcida. Con ayuda de una pipeta de biopsia (MBB-BP-M-30; Origio, CooperSurgical, España) y mediante aspiración controlada, se extraen todas las células del partenogenota o partenocitos, una a una, situándolas debidamente ordenadas y separadas entre sí en el lado opuesto de la misma gota de manipulación (Figura 21). La tasa de biopsia fue calculada como el número de partenogenotas biopsiados en día 3 de desarrollo, respecto del total de ovocitos con NOAR.



Figura 21: Biopsia de partenocitos

Con la biopsia individual de cada partenogenota completada, los partenocitos fueron transportados hasta la sala de tubing y fijación, destinándose uno/dos partenocitos para determinación de ploidía y el resto individualmente para genotipado.

7. Análisis genéticos

Los análisis genéticos competen al estudio 2 e incluyen las donantes #7 y #8; comprenden los estudios de informatividad a partir del ADN de las donantes y los análisis de las tríadas meióticas generadas a partir de los ovocitos.

7.1. Estudio de informatividad

En primer lugar, tras la selección de las donantes #7 y #8 para llevar a cabo el estudio 2, se realizó el estudio de informatividad, el cual determina la viabilidad y fiabilidad de las técnicas empleadas para la detección de la variante patogénica en células únicas de las donantes. Esto permite evaluar la idoneidad de la batería de marcadores genéticos disponibles, como apoyo para la determinación de la fase de segregación.

METODOLOGÍA

De esta manera, se confirmaron y caracterizaron genéticamente las variantes patogénicas; se llevó a cabo la secuenciación de los loci implicados en el diagnóstico y se desarrolló y validó el protocolo molecular asociado al diagnóstico genético en célula única. Para ello, se obtuvieron muestras de ADN de sendas donantes. En el caso de la donante #8, fue posible, además, incluir el análisis de ADN de sus progenitores, obteniendo el estudio familiar de herencia y los haplotipos parentales, facilitando el estudio de segregación alélica.

Para la obtención de las muestras de ADN, se extrajo una muestra de sangre periférica mediante un pinchazo en el antebrazo (según la metodología estándar), siendo mantenida en un tubo de 10 ml con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). De estas muestras se aislaron linfocitos y se aplicaron protocolos de extracción y purificación del ADN genómico.

Para el estudio de informatividad de la donante #7, portadora sana en heterocigosis de la variante patogénica c.1345C>T (rs757996262) en el gen *F9*, localizado en el cromosoma X (Xq27.1) y causante de la hemofilia B, se llevó a cabo la siguiente metodología:

- Amplificación inespecífica de todo el genoma (WGA).
- Amplificación específica por PCR mediante oligos específicos de la región de interés y que incluye la variante patogénica, detallados en la tabla 4.
- Visualización de resultados mediante el sistema Qiaxcel.
- Secuenciación masiva mediante el sistema MiSeq (Illumina).
- Genotipado mediante pipeline propia y verificado mediante el software IGV.

Para la interpretación de los resultados, se eliminaron aquellas secuencias que no corresponden con la región de interés o fueron considerados subproductos de amplificación (menor tamaño del esperado, no mapearon en la región de interés completamente, etc.) para evitar analizar posibles artefactos de la PCR.

Tabla 4: Descripción de la variante patogénica (subrayada) y polimorfismos de nucleótido simple (SNP) específicos de la región de interés del gen F9 de la donante #7

Posición en genoma (hg38)	Polimorfismos y variante patogénica
chrX:139550700	rs422187
chrX:139551121	rs6048
chrX:139555357	rs413957
chrX:139560350	rs413536
chrX:139562030	<u>rs757996262</u>
chrX:139562758	rs440051
chrX:139562898	rs369183993
chrX:139564266	rs434144
chrX:139564385	rs434447
chrX:139564587	rs445691
chrX:139564683	rs35633927
chrX:139583698	rs3128284

NOTA: Se han ordenado en dirección de centrómero a telómero.

Con respecto al estudio de informatividad de la donante #8, portadora sana en heterocigosis de la variante patogénica c.1521_1523delCTT (dF508) en el gen *CFTR*, localizado en el cromosoma 7 (7q31.2) y causante de la fibrosis quística, se aplicó la siguiente metodología:

- Amplificación específica mediante PCR “heminested” de la región donde se encuentra la variante patogénica y de los marcadores microsatélite, detallados en la tabla 5, utilizando oligonucleótidos fluorescentes.
- Electroforesis de las muestras y detección fluorescente de los fragmentos obtenidos.
- Análisis bioinformático mediante software específico.

Tabla 5: Descripción de la variante patogénica (subrayada) y marcadores microsatélite (STR) específicos de la región de interés del gen CFTR de la donante #8

Posición en genoma (hg38)	Microsatélites y variante patogénica
chr7:112061672-112061903	D7S523
chr7:114807831-114807923	D7S2554
chr7:115818109-115818349	D7S2502
chr7:116254708-116254849	D7S486
chr7:116767934-116768126	D7S2460
chr7:117214711-117215155	22xTG
chr7:117239371-117239814	CFTR-22xAC
chr7:117322337-117322772	CFTR-18xAC
chr7:117370731-117370900	D7S633
chr7:117490113-117490555	CFTR-I1-21xAC
chr7:117499360-117499638	D7S677
chr7:117548268-117548445	IVS8CA
chr7: 117559591-117559593	<u>dF508</u>
chr7:117566049-117566486	CFTR-I11-19xAC
chr7:117611802-117612116	IVS17bTA
chr7:117685524-117685974	25xAC
chr7:117773449-117773908	30xAC
chr7:118236185-118236327	AFMA073ZB9
chr7:119179393-119179667	D7S2847
chr7:119984555-119984865	GGAA2G12
chr7:121325019-121325211	D7S480
chr7:121414857-121415176	D7S650

NOTA: Se han ordenado en dirección de centrómero a telómero.

Tras la determinación de los polimorfismos (donante #7) y marcadores microsatélites (donante #8) informativos para cada donante (alelos en heterocigosis, detallados en el apartado de resultados), y tras determinar las fases, asociadas o no a la variante patogénica, se validó la técnica de análisis genético en célula única. Esta validación es necesaria, realizándose en linfocitos individuales de cada donante y de CP1 y CP2 de ovocitos sobrantes, aproximándonos a la eficiencia de amplificación en célula única y las tasas de ADO para todos los *primers* utilizados.

7.2. Determinación de ploidía

El análisis citogenético de la cromatina de los núcleos interfásicos hace posible determinar un limitado número de alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, y determinar la ploidía de una célula. Para ello, se llevó a cabo la tecnología de hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre los núcleos fijados de las células partenogenéticas o partenocitos. En síntesis, consiste en marcar los núcleos celulares con sondas de ADN fluorescentes, dirigidas a secuencias centroméricas (CEP) y específicas de locus (LSI).

La fijación de los núcleos, con la correcta eliminación del citoplasma, es un tratamiento previo a la aplicación de la FISH. Para su procesamiento, se siguió el método de Tarkowski modificado (Tarkowski 1966; Rubio et al., 2007). En primer lugar, y tras constatar la presencia de un núcleo, cada partenocito se lavó individualmente en medio tamponado sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (G-PGD, Vitrolife) suplementado al 5% con albúmina sérica humana (HSA-solution, Vitrolife) para retirar cualquier resto de aceite y se depositó sobre un portaobjetos previamente desengrasado en el mínimo volumen de medio; proceso realizado bajo visión estereoscópica. El exceso de medio fue cuidadosamente retirado, al tiempo que se valoraba la expansión celular sobre el portaobjetos. Bajo microscopía de contraste de fases (10x), se añadió, verticalmente, una primera gota de solución de fijación (metanol-ácido acético 3:1) sobre la extensión (Figura 22). Tras su evaporación, el proceso se repitió hasta la completa eliminación de los restos de citoplasma, quedando el núcleo extendido sobre el portaobjetos. En algunas ocasiones es necesario soplar ligeramente de forma tangencial para eliminar el citoplasma en su totalidad. Finalmente se deja secar y se conserva a -20°C hasta el momento de su hibridación.

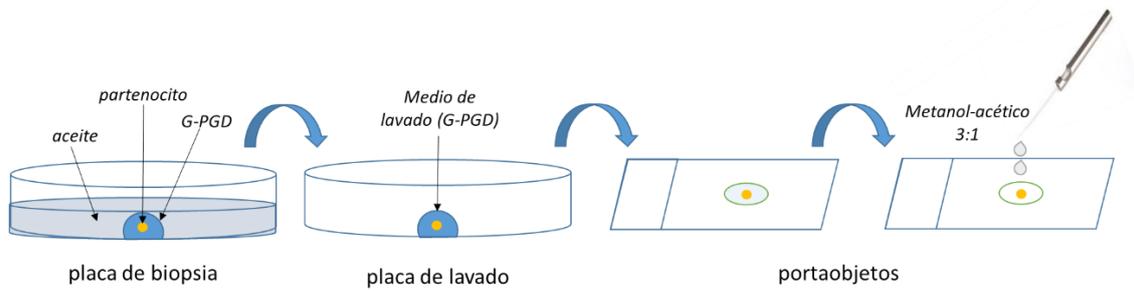


Figura 22: Fijación de partenocitos

Las determinaciones de ploidía por FISH se realizaron en el laboratorio de Citogenómica de Sistemas Genómicos. La hibridación in situ fluorescente se realizó empleando diferentes sondas y kits comerciales en función del cromosoma analizado:

- Cromosomas X, Y y 18: Se empleó el kit comercial AneuVysion CEP X/Y/18 (Vysis Inc., Downers Grove, IL, EE. UU.), que consta de una mezcla de sondas CEP para los cromosomas X (Spectrum Green; Vysis®), Y (Spectrum Orange; Vysis®) y 18 (Spectrum Aqua; Vysis®).
- Cromosomas 13 y 21: Se usaron sondas LSI para los cromosomas 13 (Spectrum Orange, Vysis®) y 21 (Spectrum Green, Vysis®).
- Cromosoma 7: Se utilizó una mezcla de 3 sondas, concretamente las sondas 7pter TxRed (Cytocell®), Tel 7q SO (Vysis®) y CEP 7 SA (Vysis®), que permiten marcar ambas regiones subtelómericas, del brazo p y q, respectivamente, y el centrómero del cromosoma (CEP).

Los cromosomas X, Y y 18 se analizaron en los partenocitos procedentes de ambas donantes, mientras que los cromosomas 13 y 21 se analizaron exclusivamente para la donante #7, y el cromosoma 7 se examinó únicamente en la donante #8. Inicialmente, y tras marcar el área donde se ha fijado el núcleo con lápiz de tungsteno en el reverso del portaobjetos, las extensiones fueron deshidratadas mediante incubaciones de 1 minuto en soluciones crecientes de etanol (70%, 85% y 100% v/v); finalmente las muestras se dejan secar al aire, a temperatura ambiente.

Para la hibridación, se aplica el kit/mezcla de sondas (detallados anteriormente) de forma individual, sobre el área marcada, y se coloca un cubreobjetos de 10 mm de diámetro y se sella con cola. Para la correcta hibridación de las sondas con el ADN partenogenético, es necesaria una co-desnaturalización de las sondas y los núcleos, lográndose mediante calor; así, las preparaciones se incuban en una placa calefactora (Hybrite, Vysis Inc. Downers Grove, IL, EE. UU.) durante 5 minutos a 73°C y se hibrida durante 3-5 horas a 37°C. Finalizada la hibridación, se retira la cola y el cubre con cuidado, se sumergen los portaobjetos durante 2 minutos en una cubeta Coplin con 0,4xSSC (Vysis Inc. Downers Grove, IL, EE. UU.) atemperado a 37°C en un baño térmico, y se realiza un segundo lavado de 30 segundos en una cubeta con 2x SSC/0,1% NP-40 (0,4xSSC (Vysis Inc. Downers Grove, IL, EE. UU.)) a temperatura ambiente. Sin dejar secar, se aplican 7 µl de DAPI II (Vysis Inc. Downers Grove, IL, EE. UU.) sobre el área de hibridación para poder visualizar toda la cromatina. Finalmente, la muestra es protegida con un cubreobjetos de 20x20 mm, quedando disponibles para su análisis bajo fluorescencia.

Realizada y contabilizada la primera ronda de hibridación (siendo para los cromosomas X, Y y 18 en la donante #7; y para el cromosoma 7, en el caso de la donante #8), se procede con la segunda hibridación (siendo para los cromosomas 13 y 21 en la donante #7; y para los cromosomas X, Y y 18 en el caso de la donante #8). Para ello, las preparaciones son desprotegidas del cubreobjetos e incubadas en 2Xssc/0,1% NP-40 durante 3 minutos, agitando ligeramente y a temperatura ambiente. A continuación, se repite el mismo procedimiento que para la primera hibridación, empezando de nuevo con la deshidratación en una serie creciente de alcoholes.

La visualización e interpretación de las señales de hibridación se realizó bajo microscopía de fluorescencia Imager Z2 (Zeiss, IZASA, España) equipado con un filtro de triple banda para 6-diamino-2-fenilindol/Rojo de Texas/fluoresceína y

filtros de banda única para isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas y azul Aqua. Las imágenes se grabaron con una cámara de vídeo Olympus DP-70.

Las determinaciones de la ploidía se realizaron contabilizando el número de marcas fluorescentes observadas en el núcleo para cada uno de los cromosomas. Se observaron señales de color verde para el cromosoma X, naranja para el Y y azul para el 18. Por su lado, y en otra ronda de hibridación, se observaron señales de color naranja y verde para los cromosomas 13 y 21, respectivamente. Por último, en la ronda de hibridación para el cromosoma 7, se diferenciaron distintos colores en función de la sonda y su posición cromosómica (rojo para 7pter TxRed, naranja para Tel7Qso y azul para CEP 7 SA).

Una muestra se consideró informativa cuando se observó señal fluorescente para al menos dos autosomas. La ploidía se definió como sigue: haploide, cuando se detectó una señal por cromosoma; diploide, cuando se detectaron 2 señales; triploide, 3 señales; tetraploide, 4 señales y; pentaploide, 5 señales.

7.3. Genotipado de las tríadas meióticas

El análisis molecular de las tríadas meióticas (CP1, CP2 y partenocitos aislados) requiere del aislamiento y amplificación del ADN; para ello, las muestras se transfieren y depositan en tubos de PCR; procedimiento referido como tubing. Técnicamente, implica la recogida de cada espécimen con un capilar de vidrio de 130 μm de diámetro (Synga, Dibimed, España) y su transferencia con el mínimo volumen de medio posible (menos de 0,5 μl) a un tubo de PCR de 0,2 ml. Identificado el espécimen en el interior del tubo de PCR, el medio sobrante del capilar se depositó en un segundo tubo de PCR que hará las veces de control negativo o blanco.

Finalizado el tubing, las muestras biopsiadas fueron refrigeradas a 4°C y remitidas al laboratorio de análisis genético para su procesamiento y análisis.

Se aplicaron diferentes protocolos de análisis molecular en función de la donante de la que procedían las tríadas meióticas:

Donante #7

- Amplificación inespecífica de todo el genoma (WGA).
- Amplificación específica por PCR mediante oligonucleótidos específicos de la región de interés y que incluye la variante rs757996262 y los polimorfismos informativos rs422187 y rs6048. Para la amplificación se utilizó el procedimiento convencional para el estudio de amplicones por NGS (amplificación específica en una primera PCR seguida de una amplificación para incluir los barcodes).
- Visualización de resultados mediante el sistema Qiaxcel.
- Secuenciación masiva mediante el sistema MiSeq (Illumina).
- Genotipado mediante pipeline propia y verificado mediante el software IGV.

Para la interpretación de los resultados, se eliminaron aquellas secuencias que no correspondieron a la región de interés o fueron considerados subproductos de amplificación (menor tamaño del esperado, no mapearon en la región de interés completamente, etc.) para evitar analizar posibles artefactos de la PCR.

Donante #8

- Amplificación específica mediante PCR “heminested” de la región donde se encuentra la variante patogénica (dF508) y de los marcadores microsatélite informativos asociados a ella (*CFTR*-18xAC, D7S633, D7S677, IVS8CA, IVS17bTA, 25xAC, 30xAC), utilizando oligonucleótidos fluorescentes. Adicionalmente, se analizaron microsatélites presentes en

el cromosoma X (DXS8025, DXS1068) y cromosoma 18 (D18S61, D18S1127), como novedad en el control de ploidía.

- Electroforesis de las muestras y detección fluorescente de los fragmentos obtenidos.
- Análisis bioinformático mediante un software específico.

Tras genotipar cada elemento de las tríadas meióticas, su haplotipo fue determinado y anotado, pudiendo encontrarse un único haplotipo o combinación de ambos, sugiriendo homocigosidad o heterocigosidad, respectivamente.

8. Capacidad diagnóstica ovocitaria por análisis de CP1: variables de estudio

La capacidad diagnóstica ovocitaria por análisis de CP1 consiste en evaluar la eficiencia de cada una de las etapas técnicas implícitas al protocolo de biopsia de CP, que incluye el rendimiento técnico y el análisis genético.

Para el rendimiento técnico, contemplaremos la tasa de supervivencia a la vitrificación, la tasa de activación normal, la tasa de biopsia en día 3 y la tasa de informatividad, todo lo cual nos permite estimar el número de tríadas meióticas completas e informativas respecto del total de ovocitos MII empleados.

Por su lado, el diagnóstico genético ovocitario por análisis del CP1 se realiza mediante inferencia y es fuertemente dependiente del grado de homocigosidad/heterocigosidad del gen interrogado. Para ello, se calculó el grado de homocigosidad en CP1 (%) como el número de CP1 homocigotos entre el total de CP1 informativos, determinando el grado de heterocigosidad en CP1

(%) como su valor inverso (1-grado de homocigosidad), es decir, el número de CP1 heterocigotos entre el total de CP1 informativos.

Aquellas tríadas informativas para las tres muestras estudiadas (CP1, CP2 y partenocitos) nos permiten calcular la especificidad y la sensibilidad, dos variables necesarias para evaluar la confianza en la estimación del diagnóstico genético ovocitario a partir del CP1, exclusivamente o en combinación con el CP2, estimando la aplicabilidad de la técnica.

Para su cálculo, se definieron previamente los conceptos de verdadero positivo, verdadero negativo, falso positivo y falso negativo de la siguiente manera:

- Verdadero positivo o TP (del inglés, *true positive*): cuando el CP1/CP2 contiene el haplotipo portador de la variante patogénica y se confirma el haplotipo wild-type en el partenogenota.
- Verdadero negativo o TN (del inglés, *true negative*): cuando el CP1/CP2 contiene el haplotipo wild-type y el partenogenota es portador de la variante patogénica.
- Falso positivo o FP (del inglés, *false positive*): cuando el análisis del CP1/CP2 muestra el haplotipo portador de la variante patogénica, pero realmente el partenogenota está afectado.
- Falso negativo o FN (del inglés, *false negative*): cuando el análisis del CP1/CP2 no presenta el haplotipo portador de la variante patogénica, pero realmente el partenogenota es wild-type.

A partir de los valores anteriores, se calcularon las variables de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad (S) se define como la capacidad de un test para identificar correctamente una muestra positiva para lo que se está testando; por su lado, la especificidad (E) es la habilidad de un test para identificar adecuadamente una muestra negativa para lo que se está testando. Además, la razón de verosimilitud (LR, del inglés *likelihood ratio*) es otra potente medida de la precisión de una prueba diagnóstica; se describe como la razón entre la

posibilidad de observar un resultado en muestras positivas para lo que se está testando *versus* la posibilidad de ese resultado en muestras realmente negativas (Deeks y Altman 2004).

Estas variables se calcularon de la siguiente manera:

- Sensibilidad (S): probabilidad de encontrar un TP entre los casos positivos para lo que se está testando; $S=TP/(TP+FN)$.
- Especificidad (E): probabilidad de tener un TN entre los casos negativos para lo que se está testando; $E=TN/(TN+FP)$.
- Razón de verosimilitud positiva (LR+): probabilidad de que el resultado de una prueba determinada se espere en una muestra positiva para lo que se está testando; $LR+=S/(1-E)$.
- Razón de verosimilitud negativa (LR-): probabilidad de que el resultado de una prueba determinada se espere en una muestra negativa para lo que se está testando; $LR-=(1-S)/E$.

Por último, se calculó el rendimiento diagnóstico de CP1, exclusivamente, y de CP1 en combinación con CP2, como el número de ovocitos con inferencia genética correcta a partir del análisis del CP1, y del CP1 con CP2, respectivamente, respecto del total de ovocitos MII empleados.

9. Diseño experimental

A fin de abordar el objetivo principal, poner a punto el test genético ovocitario, los ovocitos MII objeto de la presente investigación fueron asignados a los dos estudios principales que conforman esta tesis doctoral, correspondientes a los dos objetivos secundarios. Se trata de un estudio prospectivo y experimental.

De un total de 279 ovocitos MII, 225 se destinaron al estudio 1 (puesta a punto y optimización técnica de la metodología de biopsia de CP); siendo 108 de ellos, MII frescos y 117 MII criopreservados. El grupo de ovocitos criopreservados nos permite evaluar el escenario de aquellas mujeres que, habiendo recurrido a la criopreservación de la fertilidad, hubieran sido informadas posteriormente de la portabilidad de alguna variante patogénica y que podrían beneficiarse del diagnóstico genético ovocitario por CP1. Por otro lado, 54 ovocitos MII se emplearon en el estudio 2 (validación del análisis genético mediante el estudio de las tríadas meióticas), siendo 25 tríadas propias de la donante #7 y 29 de la donante #8 (Figura 23).

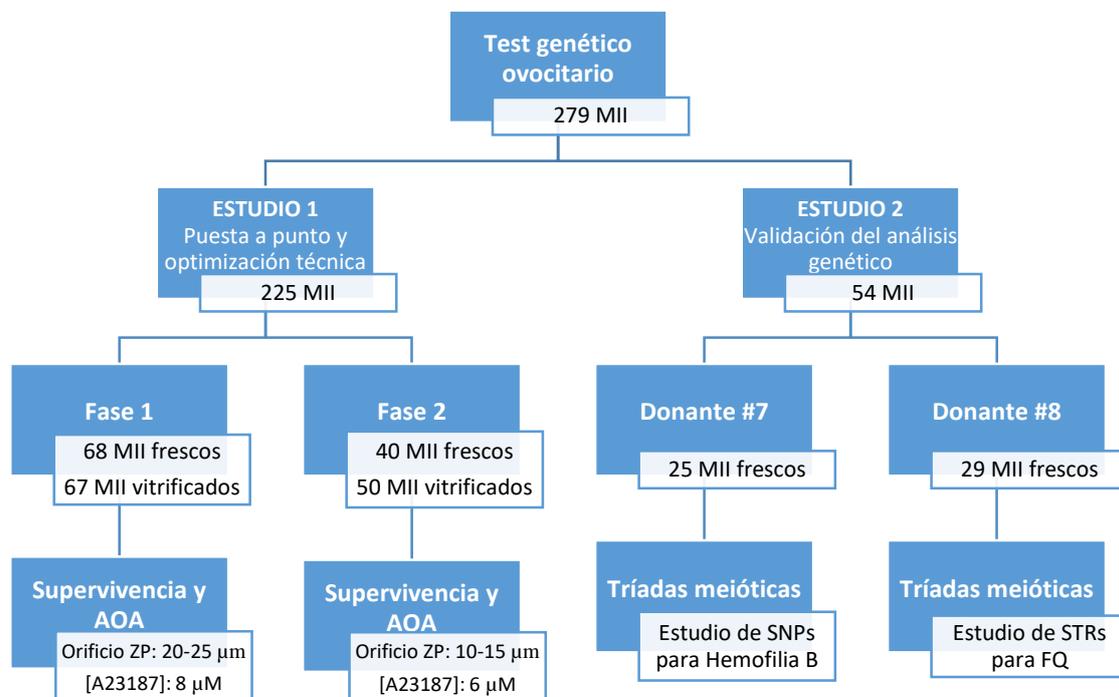


Figura 23: Distribución de ovocitos MII para los diferentes estudios de la tesis doctoral

METODOLOGÍA

Los 225 ovocitos MII incluidos en el estudio 1 fueron aleatoriamente asignados a diferentes grupos experimentales. Para ello, se llevó a cabo una asignación aleatoria simple mediante generación de una lista de aleatorización para los grupos.

La evaluación técnica de la metodología de biopsia de CP requiere evaluar la tasa de supervivencia y la tasa de activación ovocitaria normal, en función de: origen ovocitario (fresco o vitrificado); aplicación o no de la biopsia de CP1; ulterior vitrificación. Por ello, definimos los siguientes 7 grupos experimentales, incluyendo sus controles (Figura 24):

- Grupo 1: Ovocitos frescos con biopsia de CP (control biopsia)
- Grupo 2: Ovocitos frescos con biopsia de CP y posterior vitrificación (grupo experimental con origen ovocitario fresco).
- Grupo 3: Ovocitos frescos sin biopsia ni vitrificación (control activación).
- Grupo 4: Ovocitos vitrificados y posterior biopsia de CP (control vitrificación y biopsia)
- Grupo 5: Ovocitos vitrificados con posterior biopsia de CP y subsiguiente ronda de vitrificación (grupo experimental con origen ovocitario crioconservado).
- Grupo 6: Ovocitos vitrificados (control activación con vitrificación).
- Grupo 7: Ovocitos vitrificados seguidos de una segunda ronda de vitrificación, sin biopsia de CP (control doble vitrificación).

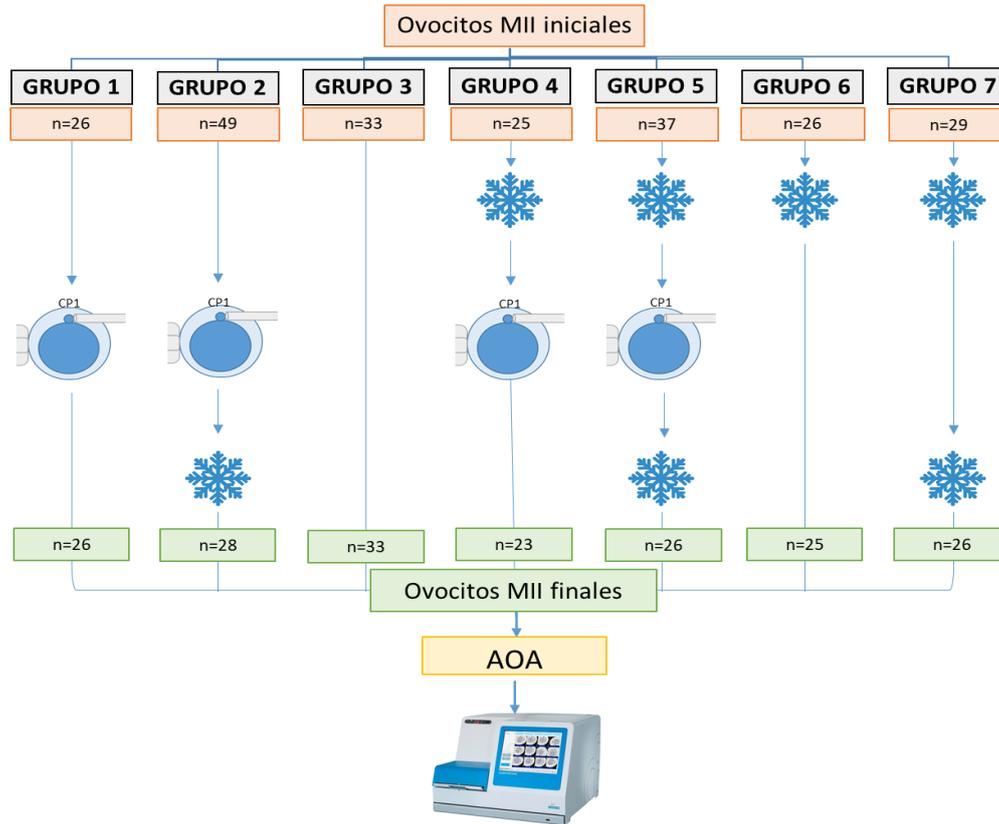


Figura 24: Diagrama de flujo del estudio 1

Por su lado, los restantes 54 ovocitos MII de las donantes #7 y #8 se destinaron íntegramente a la generación de las tríadas meióticas (CP1, CP2 y partenocitos) para la validación de la metodología de diagnóstico genético ovocitario por análisis de CP1 (Figura 25).

METODOLOGÍA

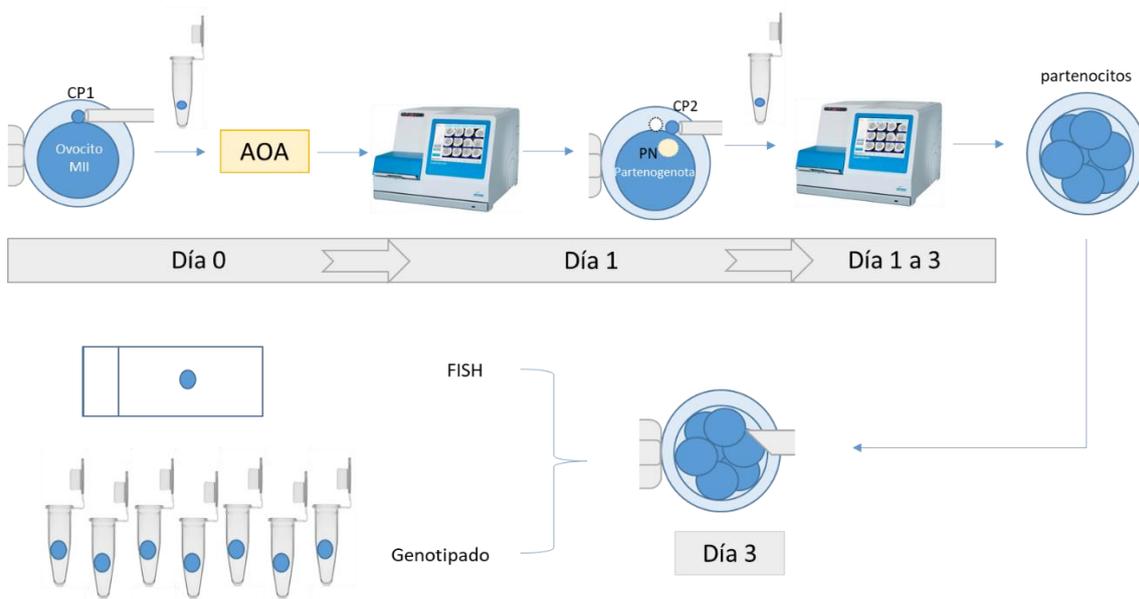


Figura 25: Diagrama de flujo del estudio 2

10. Análisis estadístico

Las variables discretas relativas a la supervivencia ovocitaria y ulterior respuesta normal de activación fueron comparadas estadísticamente entre los distintos grupos experimentales, empleando el test de Chi-cuadrado. Se aplicó la corrección de Yates para continuidad cuando había un grado de libertad. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

Las variables relativas al desarrollo de partenogenotas (número de partenocitos en día 3) y las variables relativas al estudio del CP1 como técnica diagnóstica del ovocito (grado de heterocigosidad/homocigosidad en el CP1, sensibilidad, especificidad, índice de verosimilitud, rendimiento) fueron descritas, no llevándose a cabo ningún análisis estadístico.

Los datos fueron analizados empleando el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences 26 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

1. Estudio 1: Puesta a punto de la metodología de biopsia de CP

En este estudio tenemos como objetivo la puesta a punto del protocolo de biopsia de CP, evaluando su eficiencia en términos de supervivencia y activación ovocitaria (objetivo secundario 1).

1.1. Tasa de supervivencia

1.1.1. Primera fase

En la primera fase, un total de 135 ovocitos, obtenidos de la donante #1 a la donante #6, fueron randomizados entre los grupos fresco (n=68) y vitrificado (n=67) (Figura 23). A su vez, los ovocitos frescos fueron aleatoriamente asignados a los grupos experimentales 1 (control biopsia), 2 (grupo experimental con origen ovocitario fresco) y 3 (control activación) (Figura 24). Por su parte, los ovocitos vitrificados (n=67) fueron igualmente distribuidos entre los grupos experimentales 4 (control vitrificación y biopsia), 5 (grupo experimental con origen ovocitario criopreservado), 6 (control activación con vitrificación) y 7 (control doble vitrificación) (Figura 24).

Las tasas de supervivencia ovocitaria fueron comparables, independientemente de que los ovocitos hubieran experimentado uno o dos procedimientos de criopreservación (grupos 4, 6 y 7; media: 95,8%; $p>0,05$). Sin embargo, el hecho de aplicar una biopsia de CP previamente a la vitrificación ovocitaria, mostró una merma significativa en las tasas de supervivencia, independientemente del origen fresco o vitrificado de los ovocitos (grupos 2 y 5; media: 50,9%; $p>0,05$), respecto a aquéllos no biopsiados o, que siendo biopsiados no fueron nuevamente vitrificados (95,8% vs. 50,9%; $p<0,00001$; Figura 26).

RESULTADOS

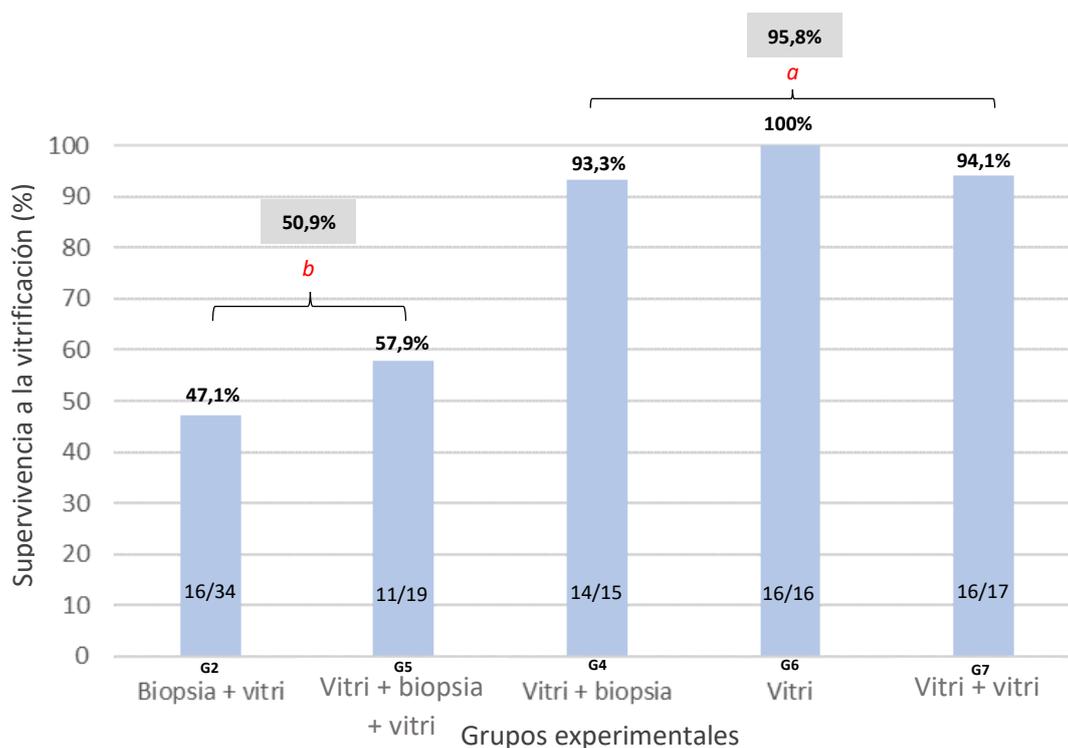


Figura 26: Tasas de supervivencia ovocitaria a la vitrificación (%) obtenidas en la primera fase del estudio 1, en función del grupo experimental

NOTA: G2: biopsia CP y vitrificación; G5: vitrificación, biopsia y vitrificación; G4: vitrificación y biopsia; G6: vitrificación; G7: doble vitrificación. Se han omitido los grupos experimentales 1 y 3 por no aplicarse la vitrificación sobre ellos. Las diferentes letras indican diferencias significativas en las tasas de supervivencia ovocitaria ($p \leq 0,05$). El número de efectivos supervivientes, respecto a los iniciales, se detalla en el interior de cada barra.

De acuerdo a los resultados observados:

- (i) las tasas de supervivencia ovocitaria a la vitrificación están fuertemente condicionadas por la previa biopsia del CP1, independientemente del origen vitrificado o fresco de los ovocitos (50,9% vs. 95,8%).
- (ii) la aplicación de una segunda vitrificación, en ausencia de biopsia previa, no compromete la ulterior supervivencia ovocitaria (94,1%).

1.1.2. Segunda fase

En la segunda fase, planteamos mejorar las tasas de supervivencia de los ovocitos biopsiados mediante una modificación en el protocolo de biopsia. En síntesis, consistió en reducir el tamaño del orificio practicado en la zona pelúcida, de 20-25 μm a 10-15 μm .

En esta fase, un total de 90 ovocitos, de la donante #1 a la donante #6, fueron randomizados entre los grupos fresco (n=40) y vitrificado (n=50) (Figura 23). A su vez, los ovocitos frescos fueron aleatoriamente asignados a los grupos experimentales 1 (control biopsia), 2 (grupo experimental con origen ovocitario fresco) y 3 (control activación) (Figura 24). Por su parte, los ovocitos vitrificados (n=50) fueron igualmente distribuidos entre los grupos experimentales 4 (control vitrificación y biopsia), 5 (grupo experimental con origen ovocitario crioconservado), 6 (control activación con vitrificación) y 7 (control doble vitrificación) (Figura 24).

Los resultados muestran que, al reducir el tamaño del orificio, las tasas de supervivencia ovocitaria fueron comparables en todos los grupos (media: 84,6%; $p>0,05$, Figura 27).

RESULTADOS

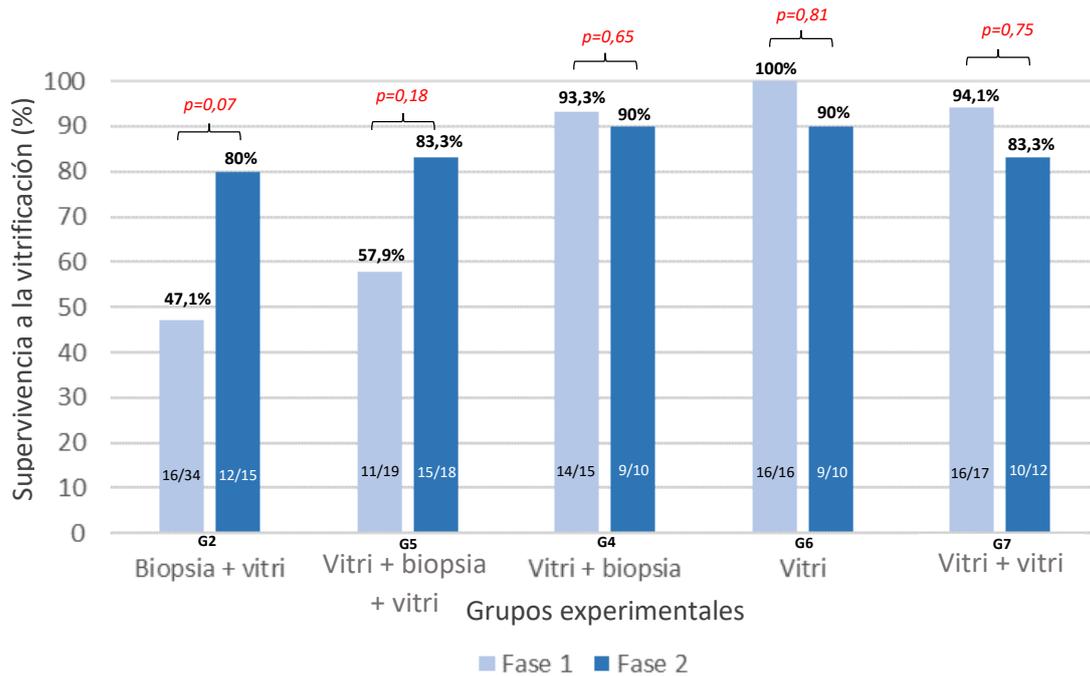


Figura 27: Representación gráfica comparada de la tasa de supervivencia ovocitaria a la vitrificación (%) entre las fases experimentales 1 (azul claro) y 2 (azul oscuro) en función de los grupos de estudio

NOTA: G2: biopsia CP y vitrificación; G5: vitrificación, biopsia y vitrificación; G4: vitrificación y biopsia; G6: vitrificación; G7: doble vitrificación. Se han omitido los grupos experimentales 1 y 3 por no aplicarse la vitrificación sobre ellos. Se indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre fases experimentales cuando $p \leq 0,05$. El número de efectivos supervivientes, respecto a los iniciales, se detalla en el interior de cada barra.

Además, reducir el tamaño del orificio de la biopsia incrementó las tasas de supervivencia de los ovocitos frescos (grupo 2; 47,1% vs. 80%; $p=0,07$) y vitrificados (grupo 5; 57,9% vs. 83,3%; $p=0,18$) aunque de forma no significativa (Figura 27), posiblemente debido al bajo tamaño muestral. No obstante, si sumamos los efectivos de los grupos 2 y 5 de sendas fases, estas diferencias sí que alcanzan niveles de significación ($p=0,008$; Figura 28).

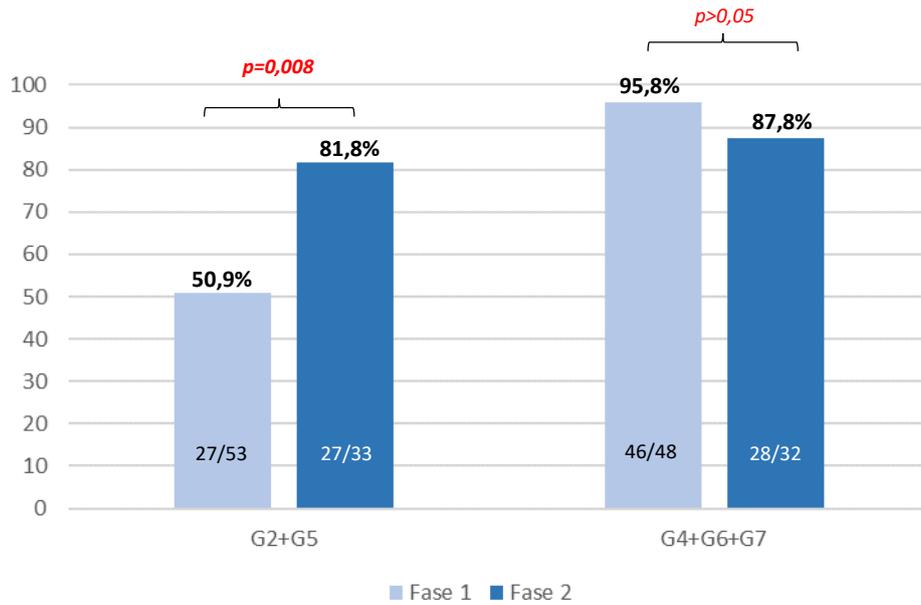


Figura 28: Representación gráfica comparada de la tasa de supervivencia ovocitaria a la vitrificación (%) entre las fases experimentales 1 (azul claro) y 2 (azul oscuro), agrupando en ovocitos vitrificados tras la biopsia (G2 y G5) vs. ovocitos sin biopsia de CP previa a su vitrificación (G4, G6 y G7)

NOTA: Grupos 2 y 5: grupos con biopsia de CP previa a la vitrificación; Grupos 4, 6 y 7: grupos sin biopsia de CP previa a su vitrificación. Se han omitido los grupos experimentales 1 y 3 por no aplicarse la vitrificación sobre ellos. Se indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre fases experimentales cuando $p \leq 0,05$. El número de efectivos supervivientes, respecto a los iniciales, se detalla en el interior de cada barra.

De acuerdo a los resultados observados, la reducción del tamaño del orificio de la ZP:

- (i) mejoró la supervivencia de los ovocitos previamente biopsiados.
- (ii) equiparó la tasa de supervivencia ovocitaria post-biopsia a aquélla sin biopsia previa de CP.

1.2. Tasa de activación ovocitaria

1.2.1. Primera fase

En la fase 1, las tasas de respuesta normal de activación ovocitaria (NOAR, expulsión del CP2 y formación de una única estructura pronuclear) fueron variables en función del número de vitrificaciones realizadas, asociadas o no a la biopsia de CP (Figura 29).

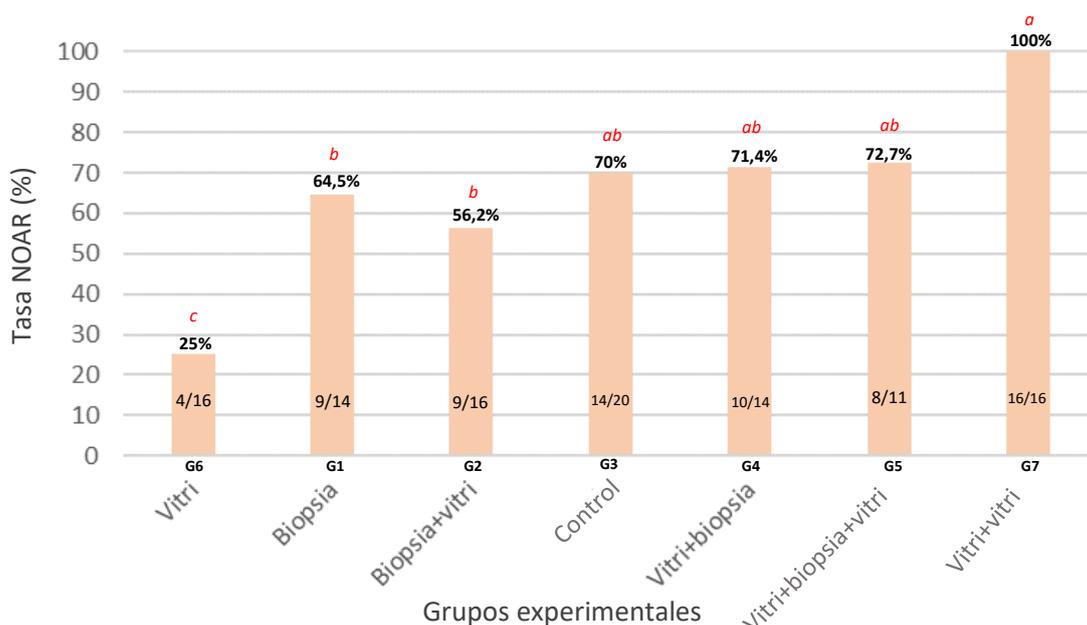


Figura 29: Tasa de AOA normal (NOAR, %) obtenida en la fase 1 en los diferentes grupos experimentales

NOTA: G6: vitrificación; G1: biopsia CP; G2: biopsia y vitrificación; G3: grupo control sin biopsia ni vitrificación; G4: vitrificación y biopsia; G5: vitrificación, biopsia y vitrificación; G7: doble vitrificación. Las diferentes letras indican diferencias significativas en las tasas de NOAR ($p \leq 0,05$).

En los ovocitos frescos, el grupo control (grupo 3) mostró una tasa de NOAR del 70%; porcentaje comparable al observado en ovocitos biopsiados, y posteriormente vitrificados o no (grupos 2 y 1, respectivamente; media: 60,0%; $p > 0,05$) y, también comparable a aquéllos inicialmente crioconservados, independientemente de las manipulaciones posteriores (grupos 4, 5 y 7; media: 82,9%; $p > 0,05$; Figura 29).

La biopsia no ejerce ningún efecto sobre la tasa de activación (grupos 1, 2, 4 y 5 - biopsiados-: 65,4% vs. grupos 3, 6 y 7 -no biopsiados-: 65,4%; $p>0,05$). No obstante, la aplicación de una o dos vitrificaciones, sí parece afectar a la tasa de NOAR (una vitrificación -grupos 2, 4 y 6-: 50% vs. dos vitrificaciones -grupos 5 y 7-: 88,9%; $p=0,002$).

Referente al grupo 6 (control activación con vitrificación), se observó la más baja tasa de NOAR (25%; $p=0,0007$), fenómeno considerado como algo aislado y que requiere de confirmación.

De los resultados obtenidos en esta primera fase, y referidos a las tasas de NOAR, se deduce que:

- (i) La biopsia de CP1 no afecta a la tasa de NOAR.
- (ii) El número de procedimientos de vitrificación afecta a la tasa de NOAR, aumentándola.

RESULTADOS

1.2.2. Segunda fase

En la segunda fase del estudio 1, incluimos, además de la modificación en el orificio de biopsia, una ligera variación en el protocolo de AOA, reduciendo la concentración de A23187 de 8 μ M a 6 μ M. En términos generales, esto supuso un incremento y unificación en las tasas de NOAR, desapareciendo la diferencia entre grupos (tasa NOAR global: 80,3%; $p>0,05$); siendo estadísticamente significativo el incremento en el grupo 6 ($p=0,03$) (Figura 30).

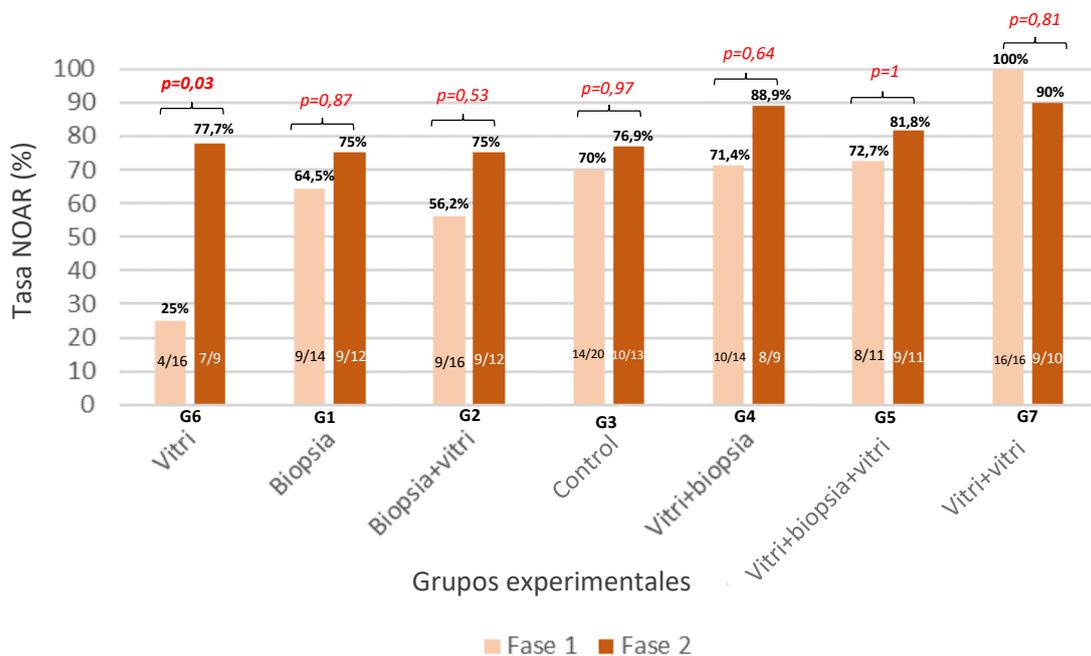


Figura 30: Comparación de la tasa de AOA normal (NOAR, %) entre las fases experimentales 1 y 2 en función de los grupos de estudio

NOTA: G6: vitrificación; G1: biopsia CP; G2: biopsia y vitrificación; G3: grupo control; G4: vitrificación y biopsia; G5: vitrificación, biopsia y vitrificación; G7: doble vitrificación). Se indican que existen diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio, indicados cuando $p<0,05$, en función de las diferentes fases.

Comparando los resultados de activación de las dos fases, concluimos que la disminución en la apertura de la ZP y/o la reducción de la concentración de ionóforo de calcio, aumentaron las tasas de activación en los grupos experimentales, equiparándolas al grupo control.

2. Estudio 2: Validación del test genético ovocitario mediante análisis de las tríadas meióticas

La validación de la metodología del test genético ovocitario, mediante la generación y estudio molecular de las tríadas meióticas (CP1, CP2 y partenogenotas haploides) (Figura 25), se realizó empleando 54 ovocitos frescos, obtenidos de dos donantes, #7 y #8, portadoras en heterocigosis de diferentes variantes patogénicas (Figura 23).

2.1. Donante #7

La donante #7 es portadora en heterocigosis de una variante patogénica responsable de la hemofilia B. Se trata de una mujer de 31 años con IMC de 25,8 kg/m² que se sometió a 4 ciclos de estimulación, obteniéndose un total de 42 ovocitos, siendo 25 MII y lográndose finalmente 24 partenogenotas. Tras su cultivo, el 70,8% (n=17) mostró un desarrollo temprano óptimo, contando en día 3, en promedio, con $7,3 \pm 1,1$ partenocitos (95% IC: 6,8-7,8 partenocitos).

2.1.1. Estudio de ploidía

La ploidía de los partenogenotas fue analizada por estudio de un partenocito aislado mediante FISH. Los estudios de ploidía realizados en los 17 partenocitos informaron que el 64,7% presentaban una fórmula cromosómica haploide (23,X), apareciendo, adicionalmente, eventos de auto-diploidización (6/17; 35,3%) (Tabla 6, identificados con un asterisco), compatibles con un contenido cromosómico diploide y tetraploide (Figura 31).

RESULTADOS

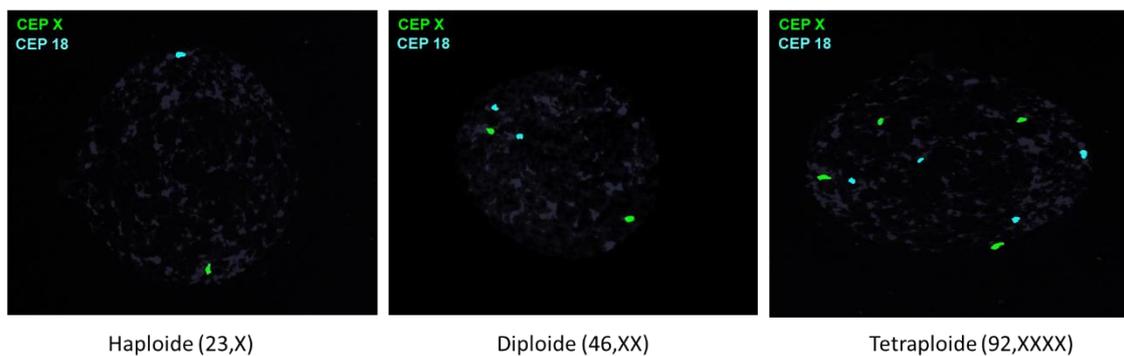


Figura 31: Imágenes de FISH de los diferentes resultados de ploidía obtenidos en los partenocitos individuales generados a partir de los ovocitos de la donante #7

Tabla 6: Resultados de ploidía inferidos tras hibridación in situ fluorescente (FISH) para 5 cromosomas (cromosoma 13, 21, X, Y y 18) sobre partenocitos individuales

Partenocito	Núm. núcleos	Núm. señales cromosómicas					Ploidía	Fórmula cromosómica
		13	21	X	Y	18		
1	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
2	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
3*	1	2	2	2	0	2	Diploide	46,XX
4	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
5*	1	2	2	2	0	2	Diploide	46,XX
6	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
7	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
8	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
9*	1	2	2	2	0	2	Diploide	46,XX
10	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
11	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
12	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
13	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
14*	1-2	4	4	4	0	4	Tetraploide	92,XXXX
15	1	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
16*	1	2	2	2	0	2	Diploide	46,XX
17*	1	2	2	2	0	2	Diploide	46,XX

NOTA: *eventos de auto-diploidización.

2.1.2. Estudio de informatividad y segregación alélica

En primer lugar, se caracterizó genéticamente la variante patogénica: se trata de una sustitución simple o sustitución de base, c.1345C>T (p.Arg499Trp), localizada en el gen *F9*, ubicado en el exón 8 del brazo largo del cromosoma X (Xq27.1), y cuya posición en el genoma V38 es 139562030, nombrada como rs757996262, causante de la hemofilia B (Figura 32).

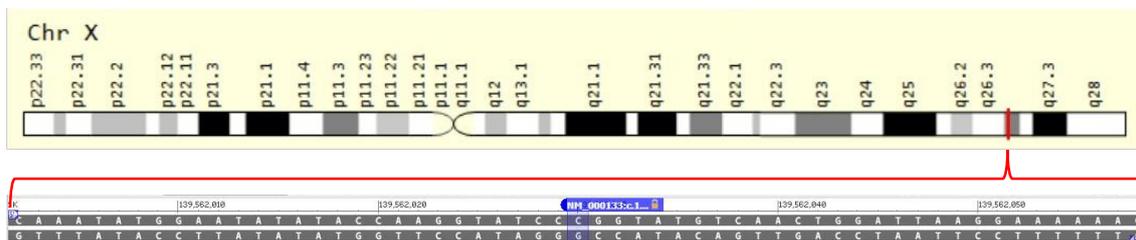


Figura 32: Esquema del cromosoma X (arriba) donde se resalta, en rojo, la localización genómica del gen *F9* (Fuente: GeneCards) y detalle en zoom (abajo) de la localización de la variante patogénica (fuente: NCBI)

En el estudio de informatividad, 11 variantes no patogénicas (en adelante polimorfismos) flanqueando a c.1345C>T fueron interrogadas (Tabla 7). Sin embargo, solamente 2 (rs422187 y rs6048, resaltadas de color verde en la Tabla 7) fueron informativas, seleccionándose como apoyo en el análisis. Desafortunadamente, ambos polimorfismos se localizaban únicamente en el lado centromérico de la variante patogénica y no flanqueándola, sin proporcionar, por tanto, un control telomérico en la descripción haplotípica.

RESULTADOS

Tabla 7: Descripción de la variante patogénica (en cursiva y subrayada; resaltada en amarillo) y polimorfismos específicos de la región de interés del gen F9 de la donante #7 (se resaltan en verde los informativos)

Posición en genoma (hg38)	Polimorfismos y variante patogénica
chrX:139550700	rs422187
chrX:139551121	rs6048
chrX:139555357	rs413957
chrX:139560350	rs413536
chrX:139562030	<u>rs757996262</u>
chrX:139562758	rs440051
chrX:139562898	rs369183993
chrX:139564266	rs434144
chrX:139564385	rs434447
chrX:139564587	rs445691
chrX:139564683	rs35633927
chrX:139583698	rs3128284

NOTA: Se han ordenado en dirección de centrómero a telómero.

Caracterizado el genotipo asociado a la posición c.1345C>T, no se pudo realizar el estudio de segregación alélica por no disponer de ningún referente familiar (Tabla 8).

Tabla 8: Polimorfismos informativos y variante patogénica de la donante #7

Origen sangre	Polimorfismos		Variante patogénica
	rs422187	rs6048	c.1345C>T
Donante	AC	AG	CT

NOTA: En rojo se señala la variante patogénica (T) y los alelos de los polimorfismos asociados a ella (C y G), y en verde la variante wild-type. En el genotipo solo se han considerado como presentes aquellos alelos que están en más del 1% de las copias secuenciadas. Se incluye 1 alelo con un mínimo del 10% de lecturas.

El haplotipo asociado y no asociado a la variante patogénica (Figura 33), se determinó tras estudio de los haplotipos secuenciados en las tríadas (Tabla 9).

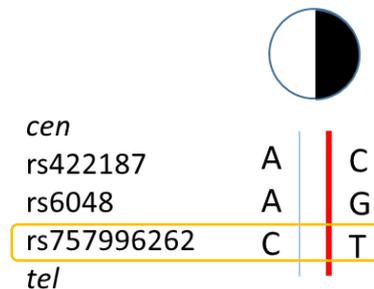


Figura 33: Representación esquemática del genotipo heterocigoto de la donante #7 (círculo medio sombreado) y sus fases: la fase genética wild-type (izquierda, color azul) y la asociada a la variante patogénica (derecha, color rojo)

NOTA: A la izquierda de la figura se detalla la variante patogénica (rs757996262), resaltada en amarillo, y los polimorfismos específicos e informativos de la región de interés (rs6048 y rs422187), ordenados verticalmente de centrómero (cen) a telómero (tel).

2.1.3. Análisis genético de las tríadas meióticas e inferencia del contenido genético ovocitario

Un total de 25 ovocitos MII fueron procesados para los estudios genéticos, obteniendo finalmente resultado genético de los elementos constituyentes de la tríada meiótica (CP1, CP2 y partenocitos) en 17 casos (68%, rendimiento técnico; Tabla 9). En las 8 tríadas restantes no se obtuvieron resultados concluyentes en alguno o varios de los componentes, bien por dificultades técnicas inherentes al protocolo de obtención de las tríadas, que incluye: fallo de activación ovocitaria (n=1) o desarrollo partenogenético (n=3); o bien, asociadas a la técnica de análisis molecular, principalmente debido a fallos de amplificación (n=4). Por tanto, estas muestras fueron excluidas para la determinación del potencial diagnóstico del CP1.

RESULTADOS

Del total de informativas, no siempre se obtuvo dato en todas las variantes interrogadas. Se considera válido cuando al menos se obtuvo genotipado en 2 de las 3 variantes estudiadas. En particular, la tasa de ADO resultó ser diferente en función del polimorfismo estudiado y de la unidad meiótica analizada. Todos los ADO se observaron en el polimorfismo rs6048, siendo de un 3,9% (2/51) para el CP1, 2% (1/51) para el CP2 y 1,5% (5/333) para el partenocito.

Tabla 9: Genotipo de la variante patogénica (rs757996262; amarillo) y de los 2 marcadores SNP informativos asociados a ella (rs422187 y rs6048; verde) para los componentes analizados de las tríadas meióticas

Componente de la tríada	Inferencia genética	Marcadores SNP y variante patogénica								
		rs422187			rs6048			rs757996262		
		genotipo	nº lecturas	% alelo A	genotipo	nº lecturas	% alelo A	genotipo	nº lecturas	% alelo C
1CP1	HETERO (NI)	AC	943	77	ADO	ADO	ADO	CT	30	40
1CP2	TN	A	7304	100	A	3710	100	C	15639	99
P1 (x7; 2FA)		C	7470	0	G	7951	1	T	22710	1
2CP1	HETERO (NI)	AC	302	48	AG	60	47	CT	4439	41
2CP2	TN	A	4501	100	A	368	98	C	118	100
P2 (x6; 1FA)		C	13801	0	G	10757	0	T	22289	1
3CP1	TN	A	6245	100	A	4028	100	C	16770	99
3CP2		A	6996	100	A	1446	100	C	21609	98
P3 (x6)		C	4225	0	G	903	1	T	14678	1
4CP1	FN	A	5598	97	ADO	ADO	ADO	C	8190	100
4CP2		C	4452	4	G	471	0	T	24636	9
P4 (x7; 1FA)		A	11727	100	A	3133	100	C	1345	99
5CP1	HETERO (NI)	AC	14593	34	AG	692	38	CT	716	31
5CP2	TP	C	11748	0	G	265	3	T	10786	0
P5 (x6)		A	15426	100	A	5608	100	C	19494	99
6CP1	TP	C	10239	1	G	1762	1	T	582	0
6CP2		AC	3308	87	ADO	ADO	ADO	CT	7769	70
P6 (x7; 1FA)		A	12109	100	A	4907	100	C	4537	99
7CP1	TN	A	5011	96	A	631	97	C	10354	100
7CP2		AC	1237	77	AG	22	77	CT	6857	71
P7 (x6)		C	11049	0	G	5087	1	T	5295	2
8CP1	HETERO (NI)	AC	6130	37	AG	3603	43	CT	14943	10
8CP2	TP	C	4594	0	G	3398	0	T	10352	0
P8 (x5; 3FA)		A	3655	91	ADO	ADO	ADO	C	6203	100
9CP1	HETERO (NI)	AC	11530	75	AG	4085	79	CT	14101	87
9CP2	TP	C	5629	7	G	216	0	T	12685	0
P9 (x7; 1FA)		A	3600	100	A	932	100	C	2074	100
10CP1	TP	C	882	8	G	1958	2	T	3077	6
10CP2		A	21643	100	A	11756	99	C	9062	99
P10 (x6)		A	26789	99	A	23550	99	C	15864	99
11CP1	TN	A	17288	100	A	16152	99	C	7734	99
11CP2		C	74	5	G	47	3	T	8681	1
P11 (x9; 2FA)		C	16540	1	G	13050	1	T	13124	2
12CP1	TN	A	30698	100	A	27927	99	C	11262	99
12CP2		C	32552	1	G	7676	0	T	16105	0
P12 (x7; 2FA)		C	30214	0	G	27482	0	T	13999	0
13CP1	HETERO (NI)	AC	24662	17	AG	23322	14	CT	12279	33
13CP2	TN	A	27519	99	A	24438	99	C	14525	99
P13 (x6)		C	25837	6	G	24308	7	T	12913	4
14CP1	FP	C	22785	9	G	19440	6	T	8011	6
14CP2		A	37036	100	A	35863	99	C	19450	95
P14 (x6; 1FA)		AC	33921	53	AG	33606	71	CT	17782	29
15CP1	TP	C	15951	2	G	15403	9	T	8471	2
15CP2		A	14225	100	A	14101	99	C	4990	100
P15 (x7)		A	21844	100	A	21597	99	C	12821	92
16CP1	TP	C	29247	0	G	5684	0	T	8642	0
16CP2		A	23524	100	A	23471	99	C	10959	99
P16 (x8; 2FA)		A	14865	100	A	14902	99	C	9289	99
17CP1	HETERO (NI)	AC	24824	64	AG	23967	79	CT	12845	88
17CP2	TP	C	19481	0	G	20701	0	T	11029	1
P17 (x5; 2FA)		A	28847	100	A	29373	99	C	12671	99

RESULTADOS

NOTA: Se han ordenado de izquierda a derecha en dirección centrómero a telómero. Se especifica el número de lecturas y el porcentaje alélico detectado para cada polimorfismo. En el genotipo solo se han considerado como presentes aquellos alelos que están en más del 1% de las copias secuenciadas. Se incluye 1 alelo con un mínimo del 10% de lecturas. Se indica la inferencia genética a partir del CP1 y/o CP2 y/o partenocito (HETERO-NI: heterocigoto, no informativo; TP= "True Positive"; TN= "True Negative"; FP= "False Positive"; FN= "False Negative". Se indica entre paréntesis el número de partenocitos (x) analizados con resultado y con fallo de amplificación (FA) del partenogenota (P).

Del total de 17 tríadas informativas, el CP1 fue homocigoto en 10 de ellas (grado de homocigosidad en CP1 del 58,8%); en los siete CP1 restantes, por su carácter heterocigoto (grado de heterocigosidad en CP1 del 41,2%), se hace necesario el estudio molecular del CP2 a fin de poder inferir el haplotipo del partenogenota.

El estudio de los diez CP1s homocigotos mostró 4 con haplotipo salvaje (TN, *true negative*) y otros 4 con haplotipo portador de la variante patogénica (TP, *true positive*). Asimismo, con la información derivada de las tríadas, pudimos identificar un CP1 falso positivo (FP, #14) y un falso negativo (FN, #4). Así, el estudio del gen *F9*, mediante análisis exclusivo del CP1, nos ofrece una sensibilidad y especificidad del 80%, rindiendo una razón de verosimilitud positiva de 4 y negativa de 0,25.

Por lo que respecta a los siete CP1 diagnosticados como heterocigotos (#1, #2, #5, #8, #9, #13 y #17), el análisis complementario de sus respectivos CP2 permitió el rescate de las 7 tríadas, de los cuales 3 fueron compatibles con el haplotipo wild-type (TN) y 4 con aquél asociado de la variante patogénica (TP). Con ello, en 15 ovocitos fue posible inferir el diagnóstico para el gen estudiado (88,2%); incrementándose los parámetros de sensibilidad (88,9%), especificidad (87,9%), razón de verosimilitud positiva (7,35) y negativa (0,13).

El estudio de los partenocitos individuales mostró que el 94,1% (16/17) de los partenogenotas contenía uno de los dos haplotipos, siendo el 41,2% portadores de la variante patogénica (n=7) y el 52,9% wild-type (n=9). Uno de los 17

partenogenotas analizados (#P14) mostró una fórmula cromosómica compatible con la diploidía, siendo heterocigoto. Tras analizar 111 partenocitos, correspondientes a 17 partenogenotas, obtuvimos amplificación en 93 de ellos (fallo de amplificación del 16,2%). Los resultados sugieren isogenicidad intra-partenogenota, cualquiera que fuera su genotipo.

Para el gen *F9*, y respecto del total de 25 ovocitos MII procesados, el diagnóstico a partir del CP1 fue posible en 8 casos (32%, rendimiento diagnóstico de CP1); incrementándose a 15 casos cuando se analizó el CP1 en combinación con el CP2 (60%, rendimiento diagnóstico de CP1 y CP2).

2.2. Donante #8

La donante #8 es portadora en heterocigosis de una variante patogénica responsable de la fibrosis quística. Se trata de una mujer de 22 años con IMC de 18,59 kg/m² que se sometió a 2 ciclos de estimulación, obteniéndose un total de 39 ovocitos y empleándose 29 MII para la generación de las tríadas meióticas. Tras generar y cultivar 19 partenogenotas, el 68,4% (n=13) progresaron en la etapa de segmentación, presentando en promedio $6,5 \pm 0,8$ partenocitos (95% IC: 5,9-7,1), en día 3 de desarrollo.

2.2.1. Estudio de ploidía

De la misma forma que para la donante anterior, la ploidía de los partenogenotas fue analizada por estudio de un partenocito aislado mediante FISH. De los 13 partenogenotas, 10 fueron analizados para estudio de ploidía (de los que obtuvimos información de los CP), siendo 9 informativos (90% informatividad). Siete partenocitos mostraron una condición haploide (23X: 77,8%); el 22,2% restante atendió a eventos de auto-diploidización (Tabla 10, identificados con un asterisco), compatibles con una fórmula cromosómica diploide y pentaploide (Figura 34).

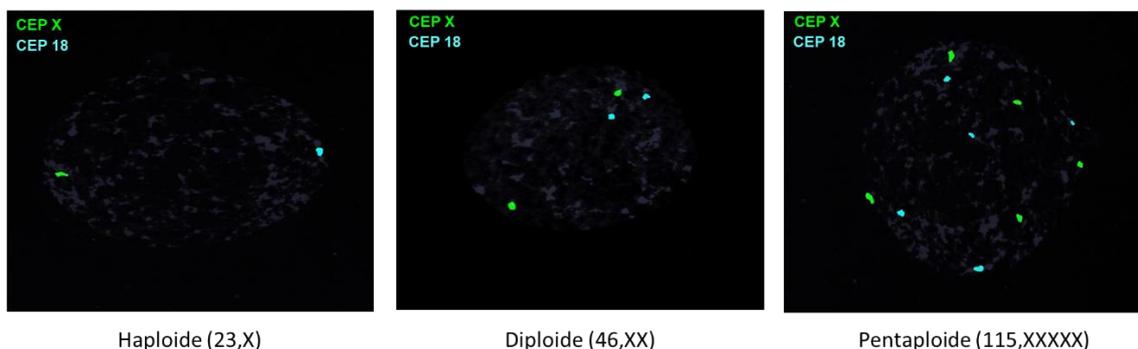


Figura 34: Imágenes de FISH de los diferentes resultados de ploidía obtenidos en los partenocitos individuales generados a partir de los ovocitos de la donante #8

Tabla 10: Resultados de ploidía inferidos tras hibridación in situ fluorescente (FISH) para 4 cromosomas (cromosoma 7, X, Y y 18) sobre partenocitos individuales

Partenocito	Núm. núcleos	Núm. señales cromosómicas				Ploidía	Fórmula cromosómica
		7	X	Y	18		
1	NN	NS	NS	NS	NS	-	-
2	1	NS	1	0	1	Haploide	23,X
3	1	NS	1	0	1	Haploide	23,X
4	1	NS	1	0	1	Haploide	23,X
5*	1	NS	2	0	2	Diploide	46,XX
6	1	NS	1	0	1	Haploide	23,X
7	2	1	1	0	1	Haploide	23,X
8*	1	5	5	0	5	Pentaploide	115,XXXXX
9	1	1	1	0	1	Haploide	23,X
10	1	1	1	0	1	Haploide	23,X

NOTA: NN = no núcleo; NS = no señal; *eventos de auto-diploidización.

2.2.2. Estudio de informatividad y segregación alélica

En primer lugar, se caracterizó genéticamente la variante patogénica: se trata de una delección, c.1521_1523delCTT (p.Phe508del), localizada en el gen *CFTR*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31.2), y cuya posición en el genoma V38 es 117559591–117559593, nombrada como DF508, responsable de la fibrosis quística (FQ) (Figura 35).

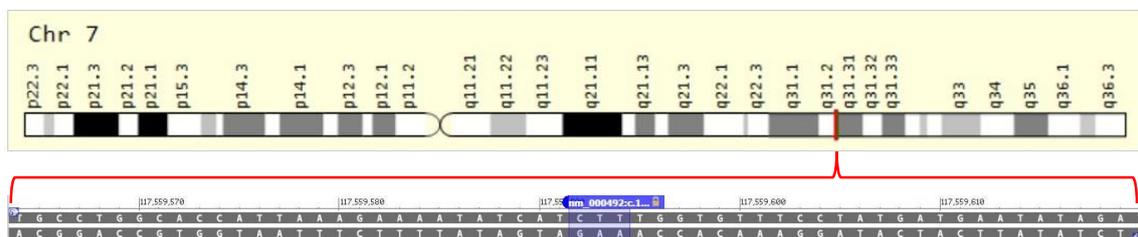


Figura 35: Esquema del cromosoma 7 (arriba) donde se resalta, en rojo, la localización genómica del gen *CFTR* (Fuente: GeneCards) y detalle en zoom (bajo) de la localización de la variante patogénica (fuente: NCBI)

RESULTADOS

Adicionalmente, se estudiaron 21 variantes no patogénicas (en adelante microsatélites o marcadores STR), flanqueando específicamente la región de interés (Tabla 11).

Tabla 11: Descripción de la variante patogénica (en cursiva y subrayada; resaltada en amarillo) y microsatélites específicos de la región de interés del gen *CFTR* de la donante #8 (se resaltan en verde los informativos)

Posición en genoma (hg38)	Microsatélites y variante patogénica
chr7:112061672-112061903	D7S523
chr7:114807831-114807923	D7S2554
chr7:115818109-115818349	D7S2502
chr7:116254708-116254849	D7S486
chr7:116767934-116768126	D7S2460
chr7:117214711-117215155	22xTG
chr7:117239371-117239814	<i>CFTR</i> -22xAC
chr7:117322337-117322772	<i>CFTR</i> -18xAC
chr7:117370731-117370900	D7S633
chr7:117490113-117490555	<i>CFTR</i> -11-21xAC
chr7:117499360-117499638	D7S677
chr7:117548268-117548445	IVS8CA
chr7: 117559591-117559593	<u><i>ΔF508</i></u>
chr7:117566049-117566486	<i>CFTR</i> -111-19xAC
chr7:117611802-117612116	IVS17bTA
chr7:117685524-117685974	25xAC
chr7:117773449-117773908	30xAC
chr7:118236185-118236327	AFMA073ZB9
chr7:119179393-119179667	D7S2847
chr7:119984555-119984865	GGAA2G12
chr7:121325019-121325211	D7S480
chr7:121414857-121415176	D7S650

NOTA: Se han ordenado en dirección de centrómero a telómero.

Siete marcadores microsatélite (*CFTR*-18xAC, D7S633, D7S677, IVS8CA, IVS17bTA, 25xAC, 30xAC), resaltados en verde en la Tabla 11, fueron informativos e incluidos finalmente en el análisis de las tríadas meióticas. Adicionalmente, y empleándose como control de ploidía, se han incluido 2 microsatélites localizados en el cromosoma X y otros 2 en el cromosoma 18 (Tabla 12; Figura 36).

Tabla 12: Marcadores STR informativos y variante patogénica de la donante #8

Origen sangre	Marcadores microsatélite (STR) y variante patogénica											
	CFR-18xAC	D7S633	D7S677	IVS8CA	c.1521_1523	IVS17bTA	25xAC	30xAC	DXS8025	DXS1068	D18S61	D18S1127
Donante	88+84	175+169	267+263	184+182	148+145	185+138	124+119	136+130	176+174	147+145	159+155	117+110
Madre	88+88	173+169	263+263	197+184	148+145	187+185	119+119	138+136	174+164	145+138	157+155	119+110
Padre	84+84	175+175	273+267	182+182	148+148	138+138	130+124	130+124	176	147	159+159	121+117

NOTA: Los rellenos en verde son los flanqueantes a la variante patogénica, resaltada en amarillo; en azul, claro y oscuro, se indican los usados como control en el cromosoma X y 18, respectivamente. En rojo se señala la variante patogénica y los alelos de los microsatélites asociados a ella, y en verde la variante wild-type y los alelos de los microsatélites asociados a ella. Nomenclatura de los alelos según el tamaño obtenido del amplificado. La exactitud es de ± 1 pb.

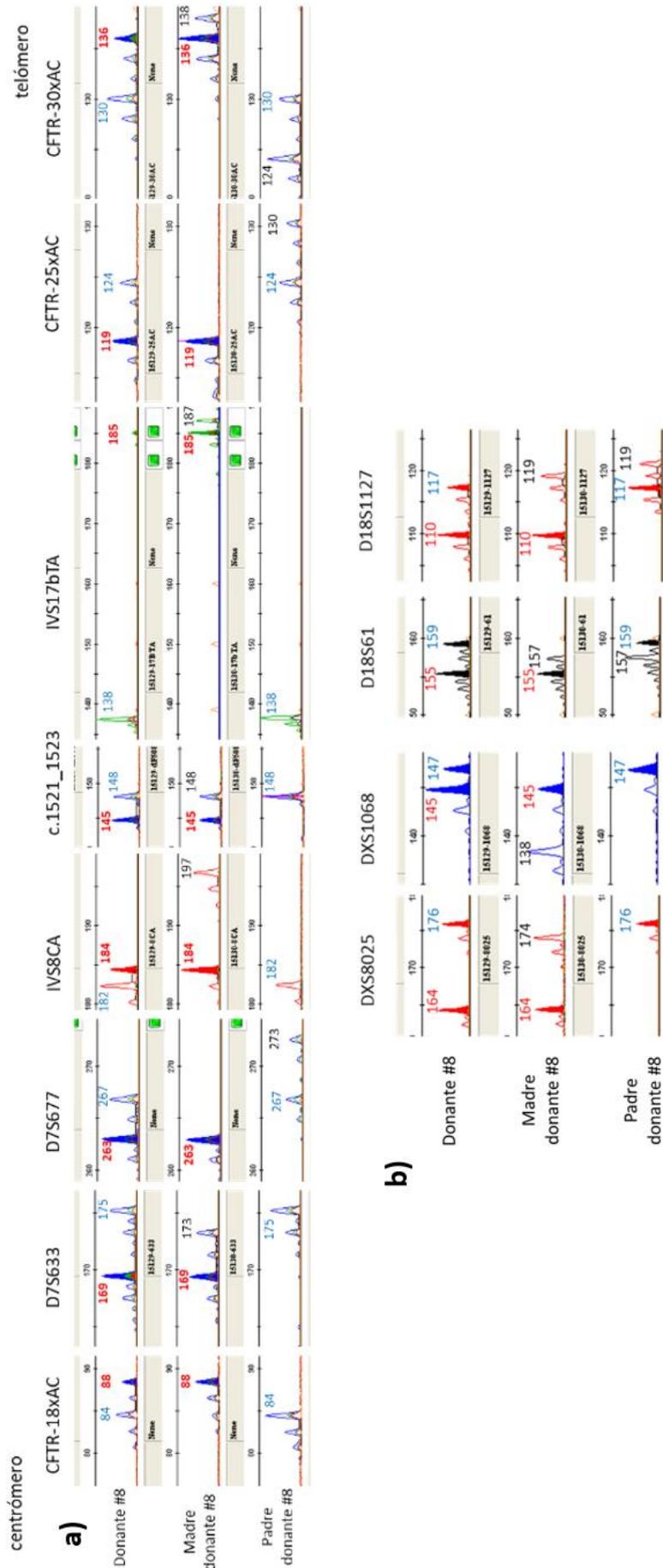


Figura 36: a) Electroferograma de los marcadores STR informativos flanqueantes a la variante patogénica (c.1521_1523); b) Electroferograma de los marcadores STR informativos localizados en el cromosoma X y 18, usados como control de ploidía

NOTA: En rojo se señala la variante patogénica y los alelos de los microsatélites asociados a ella, y en azul la variante wild-type y los alelos de los microsatélites asociados a ella. Se detallan en ambas imágenes (a y b) los STR informativos de la donante #8 y sus progenitores. Nomenclatura de los alelos según el tamaño obtenido del amplificado. La exactitud es de ± 1 pb.

RESULTADOS

Disponer del ADN de los progenitores de la donante #8 permitió realizar el estudio de segregación alélica y determinar las fases de segregación: haplotipo asociado y haplotipo no asociado a la variante patogénica, detallados en la siguiente figura (Figura 37).

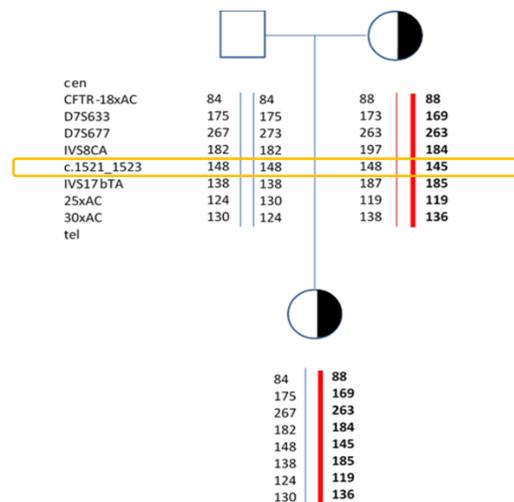


Figura 37: Representación esquemática del genotipo de los progenitores (arriba) y de la donante #8 (abajo) y sus fases: la fase genética wild-type (izquierda, color azul) y la asociada a la variante patogénica (derecha, color rojo)

NOTA: símbolo padre: cuadro vacío, no portador; símbolo madre: círculo medio sombreado arriba a la derecha, portadora y sus fases; símbolo donante (hija): círculo medio sombreado localizado bajo, portadora y sus fases. Sólo se muestran aquellos microsatélites que resultaron informativos para la variante dF508. En rojo se señala la fase genética que contiene la variante patogénica; en azul la salvaje. La nomenclatura de los alelos responde al tamaño obtenido tras su amplificación. La exactitud es de $\pm 1\text{pb}$; ordenados de centrómero a telómero.

2.2.3. Análisis genético de las tríadas meióticas e inferencia del contenido genético ovocitario

Del total de 29 ovocitos MII inicialmente incluidos en el estudio, obtuvimos resultado molecular de las tríadas completas en diez ovocitos (34,5%, rendimiento técnico; Tabla 13); en los 19 ovocitos restantes, no pudo obtenerse información genética de algún o varios de los componentes de la tríada; bien por dificultades técnicas inherentes al protocolo de biopsia, que incluye: fallo de

activación ovocitaria (n=10) o mal desarrollo partenogenético (n=6); o bien, asociadas a la técnica de análisis molecular debido, principalmente, a fallos de amplificación genética (n=3).

Del total de tríadas informativas, se observó ADO en diferentes marcadores y según la unidad meiótica analizada; no habiéndose observado en más de un marcador por componente de la tríada. La frecuencia de ADO fue del 3,7% (3/80) para el CP1 y de 2,5% (2/80) para el CP2, no habiéndose reportado ningún caso en los partenocitos (Tabla 13).

RESULTADOS

Tabla 13: Genotipo de la variante patológica (dF508), los marcadores STR informativos asociados a ella (CFTR-18xAC, D7S633, D7S677, IVS8CA, IVS17bTA, 25xAC y 30xAC) y los de los cromosomas X (DXS8025 y DXS1068) y 18 (D18S61 y D18S1127), para los componentes analizados de las tríadas meióticas

Componente de la tríada	Inferencia genética	Variante patológica y marcadores STR											
		CFTR-18xAC	D7S633	D7S677	IVS8CA	dF508	IVS17bTA	25xAC	30xAC	DXS8025	DXS1068	D18S61	D18S1127
1CP1	HETERO (NI)	88+85	175+170	267+263	184+182	148+145	185+139	124+119	136+130	164	145	155	117+110
1CP2	TP	88	169	263	185	145	185	119	136	176	147	159	117
P1 (x5; 1FA)		84	175	267	182	148	137	124	130	176	147	159	110
2CP1	HETERO (NI)	88+85	175+169	267+263	184+182	148+145	185+139	125+119	136+130	176	147	159+155	117+110
2CP2	TP	88	169	263	184	145	185	119	136	164	145	159	117
P2 (x4)		85	175	267	182	148	138	124	130	164	145	155	110
3CP1	HETERO (NI)	88+84	ADO+170	267+263	185+182	148+145	185+139	124+119	136+130	176+164	147+145	159	117
3CP2	TN	85	175	267	182	148	139	124	130	176	147	156	110
P3 (x5)		88	169	263	184	145	185	119	136	164	145	155	110
4CP1	HETERO (NI)	88+85	175+169	267+263	184+182	148+145	185+139	125+118	136+130	176	147	159+155	117+110
4CP2	TN	85	175	267	182	148	138	125	130	164	145	159	117
P4 (x6; 3FA)		88	170	263	184	145	185	118	136	164	145	155	110
5CP1	HETERO (NI)	88+85	175+170	267+263	185+182	148+145	185+139	125+119	136+130	164	147	155+ADO	117+110
5CP2	TN	85	175	267	182	148	138	125	ADO	176	147	ADO	117
P5 (x5)		89	170	263	185	145	185	119	136	164	145	160	110
6CP1	TP	88	169	263	184	145	185	119	136	176+164	145	159+156	117+110
6CP2		84	175	267	182	148	138	124	130	164	145	159	117
P6 (x6)		84	175	267	182	148	138	124	130	176	147	155	110
7CP1	HETERO (NI)	88+84	175+169	267+263	184+182	148+145	185+139	124+119	136+130	176+164	ADO	159+155	110
7CP2	TP	88	169	263	184	145	185	119	136	176	147	155	117
P7 (x7)		85	175	267	182	148	138	125	130	164	145	159	117
8CP1	HETERO (NI)	88+84	175+169	267+263	184+182	148+ADO	185+139	124+119	136+130	176	147	ADO	110
8CP2	TP	88	169	263	184	145	ADO	119	136	ADO	145	155	117
P8 (x5)		84	175	267	182	148	137	124	130	164	145	159	117
9CP1	HETERO (NI)	88+84	175+169	267+263	184+182	148+145	185+139	124+119	136+130	176	147	159+155	110
9CP2	TN	84	175	267	182	148	137	124	130	165	145	159	117
P9 (x7; 4FA)		88	169	263	184	145	185	119	136	164	145	159	117
10CP1	HETERO (NI)	88+84	175+169	267+263	184+ADO	148+145	185+139	124+119	136+130	164	147+145	159+155	117+110
10CP2	TP	88	169	263	184	145	185	119	136	164	145	155	110
P10 (x6; 1FA)		85	175	267	182	148	138	125	130	176	147	159	117

NOTA: Se han ordenado de izquierda a derecha en dirección centrómero a telómero. Nomenclatura de los alelos según el tamaño del amplificado. La exactitud es de ± 1 pb. Se indica la inferencia genética a partir del CP1 o en combinación con el CP2 (HETERO: heterocigoto; NI= no informativo; TP= "True Positive"; TN= "True Negative"; FP= "False Positive"; FN= "False Negative". Se indica entre paréntesis el número de partenocitos (x) analizados con resultado y con fallo de amplificación (FA) del partenogenota (P).

Del total de 10 tríadas completas e informativas, el CP1 fue homocigoto en un único caso (grado de homocigosidad en CP1 del 10%), siendo portador de la variante patogénica (TP, *true positive*). En los nueve CP1 restantes, por su carácter heterocigoto (grado de heterocigosidad en CP1 del 90%), se hace necesario el estudio molecular del CP2 a fin de poder inferir el haplotipo del ovocito/partenogenota, no pudiendo calcular las variables de sensibilidad ni especificidad a partir del análisis exclusivo del CP1.

Por lo que respecta a los nueve CP1 diagnosticados como heterocigotos, el análisis complementario de sus respectivos CP2 permitió su rescate, de los cuales 4 fueron compatibles con el haplotipo wild-type (TN) y 5 con aquél asociado de la variante patogénica (TP), posibilitando la inferencia del contenido genético en la totalidad de los ovocitos, ofreciendo una sensibilidad y especificidad del 100%.

El estudio de los partenocitos individuales mostró que el 100% (10/10) de los partenogenotas contenía uno de los dos haplotipos, siendo el 40% portadores de la variante patogénica (n=4) y el 60% wild-type (n=6). Tras analizar 56 partenocitos, correspondientes a 10 partenogenotas, obtuvimos amplificación en 47 de ellos (fallo de amplificación del 16,1%). Los resultados sugieren isogenicidad intra-partenogenota, cualquiera que fuera su genotipo.

Para el gen *CFTR*, y respecto del total de 29 ovocitos MII inicialmente usados para la generación de tríadas meióticas y sus análisis genéticos, se obtuvo una inferencia fiable del contenido genético ovocitario a partir del análisis del CP1 en 1 caso (rendimiento diagnóstico de CP1, 3,4%). Completando el diagnóstico del CP1 con aquél del CP2 logramos rescatar 9 casos más, alcanzando un rendimiento diagnóstico de CP1 y CP2 del 34,5%.

DISCUSIÓN

La biopsia y análisis genético del CP1 (individual o combinado con el CP2) es una aproximación diagnóstica, generalmente aplicada como alternativa a la biopsia embrionaria, que permite inferir el contenido genético materno en día 3 o día 5/6 de desarrollo embrionario (Verlinsky et al., 1990; Verlinsky et al., 1997; Küpker et al., 2001; Fiorentino et al., 2008; Naether et al., 2008; Gianaroli et al., 2010; Harton et al., 2011; Macas et al., 2011; Magli et al., 2011).

Según el planteamiento de esta tesis doctoral, la biopsia y análisis genético del CP1 como método de diagnóstico genético ovocitario previo a la fecundación o la combinación genética de ambos parentales, requiere de la vitrificación del ovocito tras la biopsia de su CP1. De este modo, se puede obtener un primer resultado genético sin que la edad post-metafásica del ovocito y, por tanto, su viabilidad, se vean comprometidas.

A lo largo de esta investigación hemos observado cómo el acto de la biopsia condiciona negativamente la ulterior supervivencia ovocitaria a la vitrificación. En esta tesis doctoral se recoge cómo una ligera modificación en el protocolo de biopsia, consistente en reducir el tamaño de la apertura practicada en la ZP, incrementó significativamente la tasa de supervivencia a la vitrificación al 81,8%, equiparándola a aquella observada en ovocitos no biopsiados (87,8%).

La continuidad de la ZP es una variable que bien pudiera relacionarse con la tasa de supervivencia tras la vitrificación. La posible acción protectora de la ZP, frente a la vitrificación, ha sido descrita; reportándose una merma significativa en la tasa de supervivencia en embriones biopsiados en estadio de segmentación (día 3; Zhang et al., 2009), blastocisto eclosionando o totalmente eclosionado (Cobo et al., 2012; Coello et al., 2021; Oliva et al., 2021); así como en blastómeras aisladas (Escribá et al., 2010; Valbuena et al., 2012) o en ovocitos desprovistos de la ZP (Choi et al., 2015). No obstante, la continuidad de la ZP no parece ejercer efecto alguno sobre las tasas de supervivencia embrionaria cuando la vitrificación de los embriones biopsiados se demora en el desarrollo un día (Kahraman y Candan

DISCUSIÓN

2010; Aizer et al., 2020) o en estadios más avanzados como blastocisto (Zech et al., 2005; Cimadomo et al. 2018a).

De acuerdo con nuestra investigación, cerca del 82% de los ovocitos biopsiados sobreviven a la vitrificación según la metodología de Cryotop; nuestros resultados, aunque inferiores, están en línea con aquéllos reportados por Keskinetepe et al. (2009), quienes reportaron tasas de supervivencia entre el 89% y 99%, tanto en ovocitos humanos como de bovino, empleando el CryoLoop como método de criopreservación (Mukaida et al., 2005). Estas diferencias en las tasas de supervivencia bien pudieran deberse al tamaño del orificio de biopsia (de dimensiones desconocidas) o al diferente protocolo de vitrificación (crioprotectores, temperatura de adición de crioprotectores y soporte de vitrificación; Keskinetepe et al., 2009).

Por su parte, Macas y colaboradores (2011) compararon el efecto que el tamaño y método de apertura de la ZP ejerce sobre la tasa de supervivencia de cigotos vitrificados, empleando el método de Cryotop. Sus resultados sugieren que, cualquiera que fuere la metodología de apertura de la zona pelúcida (láser o mecánica) y el tamaño del orificio practicado (15-16 μm y 1 μm , respectivamente), las tasas de supervivencia cigótica fueron comparables y estimadas en el 95%. El tamaño del orificio practicado por el equipo de Macas (Macas et al., 2011) es comparable al practicado durante la segunda fase de la puesta a punto de nuestro protocolo (10-15 μm), rindiendo un porcentaje de supervivencia del 82%. Así, las diferencias observadas en las tasas de supervivencia bien pudieran deberse a las características propiamente ovocitarias (nuestra experiencia) frente a aquéllas de los ovocitos pre-activados o cigóticos (Macas et al., 2008; Macas et al., 2011); como se ha observado en bovino (Suzuki et al., 1994), hámster (Stewart-Savage y Bavister, 1991) y también en la especie humana (Ghetler et al., 2005). Efectivamente, pese a que ovocitos y cigotos son similares en forma y tamaño, la exocitosis de gránulos corticales,

resultado de la activación ovocitaria, cambia la composición del oolema (Ghetler et al., 2005), pudiendo ofrecer mayor resistencia de los cigotos al estrés térmico/osmótico, comparado con los ovocitos (Ghetler et al., 2005), reflejando una mayor tasa de supervivencia cigótica.

Por otro lado, la aplicación de una segunda vitrificación, en ausencia de biopsia, no comprometió la ulterior supervivencia ovocitaria, tanto en la primera como en la segunda fase del estudio 1 (94,1% y 83,3%, respectivamente). Adicionalmente, estas observaciones se corresponden con aquéllas previamente reportadas por otros autores, que indican que la doble vitrificación, ya sea dilatada o no en el tiempo, no afecta a la ulterior viabilidad de los especímenes crioconservados; puesto de manifiesto en distintas especies de mamífero (Sheehan et al., 2006; El-Gayar et al., 2010; Ito et al., 2010; Fathi et al., 2012; Majidi et al., 2016), incluida la humana, tanto en embriones de día 3 (Li et al., 2021) como en blastocistos (Cobo et al., 2013; Kang et al., 2013; Zhang et al., 2014; Cimadomo et al., 2018a; Cimadomo et al., 2018b; Neal et al., 2019; De Vos et al., 2020; Li et al., 2021; Oliva et al., 2021). No obstante, algunos autores reportaron un efecto negativo de la doble vitrificación, tanto sobre la supervivencia embrionaria como sobre la viabilidad clínica ulterior; particularmente evidente cuando los blastocistos fueron sometidos a una segunda biopsia (Taylor et al., 2014; Bradley et al., 2017; Parriego et al., 2018; De Vos et al., 2020; Oliva et al., 2021). En nuestro caso, tras reducir el orificio de la biopsia, la tasa de supervivencia ovocitaria a una segunda vitrificación no se vio afectada, rindiendo en promedio un 83,3%. Desafortunadamente, no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo referente a la doble vitrificación en ovocitos, con o sin biopsia de CP previa.

Además de la supervivencia de los ovocitos biopsiados a la vitrificación, la respuesta ovocitaria de activación es una variable clave para determinar el efecto que la biopsia de CP, la vitrificación o ambas ejercen sobre la competencia citoplasmática de los ovocitos. Adicionalmente, la activación ovocitaria artificial

DISCUSIÓN

(AOA) permite obtener las otras dos unidades meióticas, además del CP1, que conforman la tríada meiótica; necesarias para la validación de la inferencia genética ovocitaria mediante el análisis del CP1.

En condiciones normales, la respuesta ovocitaria de activación es provocada por el espermatozoide fecundante; no obstante, esta respuesta puede ser inducida mediante protocolos de AOA (Graham 1974, Kaufman 1978, Whittingham 1980). La AOA permite la reanudación y culminación de la meiosis, la segregación meiótica y las posteriores divisiones mitóticas sin necesidad de la participación espermática. El desarrollo partenogenético ha sido estudiado en diferentes especies de mamíferos, incluida la humana. En general, la mayoría de parámetros (tasa de activación o fecundación, número de células en día 2 y 3 de desarrollo) son similares en ovocitos fecundados y aquéllos activados, confirmando la utilidad diagnóstica de los protocolos de activación (Paffoni et al., 2007; Escrich et al., 2011; Escrich et al., 2012; Escribá et al., 2016).

En la primera fase de la puesta a punto del protocolo de AOA (estudio 1, fase 1), observamos una tasa de respuesta ovocitaria de activación normal (NOAR) superior (88,9%) en los ovocitos sometidos a una doble vitrificación, en comparación a aquéllos vitrificados una sola vez (50%). El mayor porcentaje de NOAR en los ovocitos con doble vitrificación podría deberse a un posible efecto activador de la vitrificación, tal y como apoyan otras investigaciones (Tian et al., 2007). No obstante, Bonte y colaboradores (2020) observaron cómo la vitrificación afecta negativamente a la liberación de calcio y a la capacidad de respuesta ovocitaria a la activación, en ratón (Bonte et al., 2020). Si bien es cierto que la crioconservación ovocitaria permite una logística reproductiva máxima; como todo procedimiento, la vitrificación no es inocua. De hecho, se ha observado que la vitrificación de ovocitos humanos altera la función mitocondrial a través de la fosforilación oxidativa, causando un desplazamiento del equilibrio redox hacia el estado oxidado de los ovocitos (Nohales-Córcoles et al., 2016;

Saadeldin et al., 2020; Mateo-Otero et al., 2021; Ruihuan et al., 2021); afectando, además de a la respuesta de activación ovocitaria, a su perfil transcriptómico (Chamayou et al., 2011; Monzo et al., 2012; Huo et al., 2021; Zhuan et al., 2022). En nuestro caso, el aparente efecto preactivador de la criopreservación se ve mermado en la segunda fase del estudio, donde, reduciendo la concentración de A23187 o la intensidad del primer estímulo de AOA, observamos tasas de NOAR comparables en todos los grupos experimentales, mostrando un porcentaje promedio del 80%. La reducción en la concentración de A23187 de 8 μ M a 6 μ M incrementó la tasa de NOAR en todos los grupos experimentales de estudio; siendo ese incremento significativo en el grupo de ovocitos vitrificados una única vez (77,7%); posiblemente debido a la baja tasa obtenida en la primera fase del estudio (25%). El efecto favorable que la reducción en la concentración de A23187 ejerce sobre la NOAR está en consonancia con el trabajo desarrollado en ovocitos de conejo, donde se registró que un exceso de activación puede inducir degeneración ovocitaria, división inmediata, retención del CP o incluso, fallo de activación (Escribá y García-Ximénez 1999).

Tras la modificación del protocolo de AOA, observamos que los ovocitos frescos, vitrificados, biopsiados o no, mostraron aproximadamente una tasa de NOAR del 80%; similar a aquellas tasas de NOAR reportadas previamente por otros autores (60-90%; Graham 1974; de Sutter et al., 1992; Balakier y Casper 1993, de Sutter et al., 1994; Paffoni et al., 2011; Capalbo et al., 2016), incluido nuestro grupo de investigación (Escrich et al., 2011; Escrich et al., 2012; Escribá et al., 2016), todo lo cual refuerza la solidez del método de AOA, desarrollado por nuestro equipo de investigación, que rinde una tasa de respuesta ovocitaria comparable a la tasa de fecundación *in vitro* obtenida habitualmente en los protocolos de FIV. Además, nuestros resultados demuestran que, si bien la biopsia del CP1 sí afecta a la supervivencia tras la vitrificación, las tasas de NOAR no se muestran en absoluto comprometidas. Estas observaciones van en consonancia con lo reportado por Verlinsky y Kuliev (1996), que afirmaron que la biopsia de CP no

DISCUSIÓN

afecta a la tasa de fecundación ni a la viabilidad embrionaria posterior (revisión: Verlinsky y Kuliev, 1996).

Como resultado del primer estudio desarrollado en la presente tesis doctoral, podemos concluir que hemos logrado poner a punto una nueva metodología de diagnóstico genético ovocitario, que incluye los pormenores metodológicos de la biopsia de CP1 y la posterior vitrificación ovocitaria, empleando el modelo partenogenota.

La aplicabilidad de una técnica de análisis genético ovocitario por estudio del CP1 depende, en primera instancia, de su rendimiento técnico y diagnóstico.

A lo largo del segundo estudio, recogido en el presente documento de tesis doctoral, la metodología de diagnóstico genético ovocitario preconcepción propuesto, mediante estudio del CP1, requiere de su validación genética. Para ello, hemos evaluado la inferencia genética ovocitaria a partir del estudio del CP1. Adicionalmente, la inferencia diagnóstica fue verificada, completando el genotipo de la mujer interrogada con la información obtenida de las otras dos unidades que constituyen la tríada meiótica: el CP2 y los partenogenotas derivados; particularmente, las células partenogénicas constituyentes o partenocitos. La generación y el estudio de las tríadas meióticas ovocitarias originadas por AOA fue llevado a cabo en dos escenarios genéticos; dos mujeres heterocigotas para diferentes variantes patogénicas.

En nuestra estrategia de estudio, entendemos como rendimiento técnico aquella proporción de tríadas meióticas completas e informativas (CP1, CP2 y partenocitos con resultado genético), calculadas respecto al total de ovocitos MII biopsiados; siendo diferente en función de la donante estudiada. En el caso de la donante #7 (heterocigota para el gen *HBB*), obtuvimos resultado genético de la tríada completa en el 68% de los ovocitos; por su parte, en la donante #8 (heterocigota para el gen *CFTR*), el rendimiento técnico fue del 34,5%.

El análisis genético de tríadas meióticas fue estudiado previamente por el Dr. Ottolini (Ottolini et al., 2015) y Paffoni (Paffoni et al., 2011), mediante la aplicación de AOA; por su parte, Hou (Hou et al., 2013) y Capalbo (Capalbo et al., 2013) estudiaron dichas tríadas tras la realización de la ICSI. La eficiencia técnica obtenida en la generación de las tríadas meióticas de la donante #8 (34,5%) es comparable a aquella reportada por Ottolini y colaboradores (Ottolini et al., 2015). Este equipo empleó 40 ovocitos vitrificados, procedentes de 5 donantes (4 de ellas con fertilidad probada). Tras la AOA, el 85% desarrolló una NOAR, obteniendo un total de 13 tríadas completas con resultado genético (32,5%; Ottolini et al., 2015). Tanto el rendimiento técnico obtenido de la donante #8 como aquél publicado por Ottolini y colaboradores han sido inferiores al reportado por otros autores, que describen otros protocolos de generación de las tríadas meióticas. Así, por su parte, el grupo de Paffoni (Paffoni et al., 2011), empleando 39 ovocitos MII de 13 mujeres donantes, obtuvieron una tasa de NOAR del 66,7%; disponiendo de resultado genético de únicamente dos unidades meióticas: los dos CPs de 20 ovocitos; lo que ofrece un rendimiento del 51,3%. Este rendimiento podría estar sobrevalorado, ya que ni el ovocito, ni el pronúcleo materno (PNM), ni el partenogenota resultante fueron analizados. Por otra parte, el equipo de Hou (Hou et al., 2013) empleó 70 cigotos; realizando biopsia del CP1, CP2 y PNM. Un total de 52 tríadas completas fueron obtenidas; alcanzando un rendimiento del 74,3%. Este valor bien puede estar sobreestimado, ya que dicho cálculo se realizó a partir de cigotos correctamente fecundados, y no a partir del número de ovocitos MII de partida. Por último, Capalbo y colaboradores (Capalbo et al., 2013) emplearon 82 ovocitos MII procedentes de mujeres mayores de 40 años, que fueron microinyectados con espermatozoides y, sobre aquéllos correctamente fecundados, se realizó la biopsia del CP1, CP2, blastómera y trofoectodermo, obteniendo 21 sets con resultado genético completo (25,6% de rendimiento). Esta tasa de rendimiento corresponde a la más baja reportada, pudiendo deberse a que son cuatro las

DISCUSIÓN

unidades estudiadas, y no dos o tres como en los anteriores trabajos reseñados (Capalbo et al., 2013; Hou et al., 2013; Ottolini et al., 2015; esta tesis doctoral).

En la presente tesis doctoral, el diferente rendimiento técnico observado en los dos escenarios ovocitarios, podría deberse a la diferente tasa de NOAR obtenida o al fallo de amplificación genética. Por lo que respecta a la tasa de NOAR obtenida, ésta fue del 96% para la donante #7 y del 65,5% para la donante #8; una tasa de activación normal que, aun estando en el rango reportado en la literatura (60-90%; Graham 1974; de Sutter et al. 1992; Balakier y Casper 1993, de Sutter et al. 1994, Paffoni et al., 2011, Capalbo et al., 2016; Escrich et al., 2011; Escribá et al., 2016), es inferior a aquélla alcanzada en la puesta a punto de nuestro protocolo de activación (80,3%). Muchos factores condicionan la respuesta ovocitaria de activación, siendo la calidad ovocitaria un parámetro fundamental. En este sentido, pese a la supuesta buena calidad ovocitaria dada por la edad de las donantes, solamente la donante #7 es de fertilidad probada. Por lo que respecta al desarrollo partenogenético, éste fue comparable en ambas mujeres, con cerca del 70% de los partenogenotas conteniendo un promedio de $6,9 \pm 0,9$ partenocitos (IC: 5,9-7,8), en día 3 de desarrollo.

Otro elemento determinante en el rendimiento técnico es el fallo de amplificación genética en alguna de las unidades de la tríada meiótica, siendo del 16% para la donante #7 y del 10% en el caso de la donante #8. Esta variable, bien puede ser dependiente del protocolo de biopsia o tubing, o del procesamiento molecular de las muestras. En este sentido, Paffoni y colaboradores (Paffoni et al., 2011), aplicando un protocolo de diagnóstico molecular similar al llevado a cabo en la presente tesis doctoral y desarrollado para las tríadas meióticas de la donante #8 (PCR multiplex fluorescente de marcadores STR), obtuvieron un 12% de fallo de amplificación, especialmente en los CP2, y un ADO del 4%; tasas similares a las obtenidas en nuestro escenario ovocitario (10% y 3,1%, respectivamente). Por su lado, los grupos de Ottolini, Hou y Capalbo llevaron a

cabo la amplificación y análisis genético de las tríadas meióticas mediante diferentes protocolos moleculares como el Meiomapping/karyomapping y a-CGH (Ottolini et al., 2015); MALBAC (del inglés *Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycle*; Hou et al., 2013) y a-CGH con análisis de microsatélites (Capalbo et al., 2013), por lo que los resultados no son extrapolables a los obtenidos en la presente investigación. De hecho, dichas técnicas les permitieron obtener información simultánea de aneuploidía y recombinación (Ottolini et al., 2015); número de copia de cromosoma y estado de ploidía (Capalbo et al., 2013); número de cromosomas y variantes de nucleótido simples (SNVs, del inglés *single-nucleotide variants*; Hou et al., 2013). Cualquiera que fueran las combinaciones, una doble información cuantitativa y cualitativa permitió establecer diferentes modelos de segregación y recombinación. En la experimentación descrita en el presente documento de tesis doctoral, al tratarse de un test dirigido a la detección puntual de una variante patogénica, únicamente obtenemos información de la presencia o ausencia de un haplobloque, permitiéndonos solamente inferir los haplotipos asociados a un gen determinado (longitud de los haplobloques de estudio: 11.330 pb para el gen *F9*; 451.571 pb para el gen *CFTR*; Figura 38), no así ploidía o variaciones numéricas en los cromosomas.

La posibilidad de inferir y confirmar/validar el haplotipo ovocitario mediante estudio del CP1, además de estar sujeto al rendimiento técnico antes discutido (respuesta ovocitaria de activación normal y resultado informativo), es fuertemente dependiente del grado de heterocigosidad experimentado en la región génica interrogada. Así, la inferencia genética ovocitaria es fiel cuando el CP1 es homocigoto y, por tanto, el análisis pormenorizado de las unidades complementarias de la tríada meiótica nos permitirá estimar su potencial aplicación. Sin embargo, ante un CP1 heterocigoto, la inferencia del complemento genético ovocitario no es posible (rendimiento diagnóstico del CP1

DISCUSIÓN

nulo); siendo el análisis del CP2 obligado y el del partenogenota derivado, recomendable.

La naturaleza heterocigota del CP1 puede deberse a eventos de recombinación, ocurridos en esa región génica, o bien a alteraciones en el patrón de segregación meiótica; ambos fenómenos asociados a los genes analizados o a las mujeres estudiadas; resultando, en última instancia, en la proporción esperada y observada de ovocitos portadores de las variantes patogénica y wild-type, según los principios de segregación mendeliana.

A fin de discutir la resolución de la meiosis, observada en los dos escenarios ovocitarios estudiados en la presente tesis doctoral, establecemos como primer supuesto, un patrón de segregación correcto y, en segundo lugar, un patrón de segregación anómalo, a fin de revisar en qué medida, la heterocigosidad observada en el CP1 se debe a recombinación.

Si asumimos que el patrón de segregación cromosómica atiende al modelo clásico de separación de homólogos y ulterior segregación de cromátidas hermanas (reduccional y ecuacional, respectivamente), la tasa de heterocigosidad observada en los CP1 podría tener su origen, con mucha probabilidad, en la recombinación. De ser así, y asumiendo que los eventos de recombinación fueran independientes y aleatorios, los dos modelos ovocitarios analizados en la presente tesis doctoral, deberían tener similares tasas de recombinación, lo que no ha sido observado; así, el gen *F9* presenta una tasa de heterocigosidad o recombinación del 41,2%; inferior al 90% observado para el gen *CFTR*.

La frecuencia de recombinación es dependiente de varias variables. De acuerdo con distintas investigaciones, el tipo y el tamaño de cromosoma incide directamente en la frecuencia de entrecruzamiento; siendo más elevada en los cromosomas más pequeños (Kong et al., 2002; Farré et al., 2013). En el presente trabajo de investigación se incluye el estudio de regiones génicas localizadas en el cromosoma X (donante #7) y cromosoma 7 (donante #8). Ambos son

cromosomas sub-metacéntricos de tamaño comparable (cromosoma 7: 159 Mb; cromosoma X: 156 Mb; fuente NCBI); habiéndose reportado, además, una tasa media de recombinación similar (1,09 cM/Mb y 1,19 cM/Mb, respectivamente; Kong et al., 2002).

La localización intra-cromosómica del gen puede ser también un factor relevante en la resolución de la meiosis. Efectivamente, aquellas regiones más alejadas de los centrómeros son más activas en recombinación; mientras que aquellas próximas a los centrómeros, tienden a suprimir este evento (Broman et al., 1998; Kong et al., 2002; Tease et al., 2002; Lenzi et al., 2005; Cheng et al., 2009; Gruhn et al., 2013; Hou et al., 2013). En el presente estudio de investigación, ambos genes se localizan en el brazo largo (q-arm) de sus correspondientes cromosomas. La distancia del gen *F9* al centrómero es de 79 Mb y de 56 Mb para el gen *CFTR*; habiéndose reportado una tasa de recombinación del 2,5% para el gen *F9* (Davies et al., 1985) y 1,9% para *CFTR* (Vecchio-Pagán et al., 2016). En nuestro trabajo de investigación, hemos observado, sin embargo, una mayor tasa de recombinación para el gen *CFTR* (*CFTR*: 90% vs. *F9*: 41,2%). Estos resultados contrastan, no sólo con la tasa previamente reportada, sino también con la hipótesis de la recombinación como posible mecanismo molecular de cohesión entre cromátidas; por el que la presencia de quiasmas o sobrecruzamientos bien pudiera ser necesario en aquellas regiones distantes del cinetocoro, facilitando la correcta segregación. Esta ausencia de correlación ha sido también previamente reportada. Paffoni y colaboradores (2011) presentaron una tasa de recombinación del 55% para el gen *HBB* (Paffoni et al., 2011), pese a localizarse en una posición telomérica del cromosoma 11 (posición 11p15.5), distante del centrómero y de la que cabría esperar una mayor tasa de recombinación.

Además de la localización o distancia del gen respecto del centrómero/telómero, existen otras circunstancias que pueden influir en la mayor o menor tasa de recombinación genética, como son las zonas hot-spots o de interferencia de

DISCUSIÓN

entrecruzamiento, respectivamente (Dumont y Payseur 2008; Hussin et al., 2011; Wang et al., 2012), fenómenos no considerados en la presente investigación.

La tasa de recombinación también puede verse condicionada por la naturaleza de la variante patogénica estudiada. Así, estudios previos en fibrosis quística llevados a cabo por el equipo de Verlinsky y colaboradores mostraron tasas de recombinación diferentes cuando se estudió la variante DeltaF508 (26%; Verlinsky et al., 1992), en comparación con otras alteraciones genéticas (N1303K, G551D, 349V) causantes de la misma patología (58,3%; Verlinsky et al., 1999). Por su parte, este mismo grupo de investigación reporta un caso clínico para el gen *F9*, donde observan una tasa de heterocigosidad en el CP1 del 61,9% (Verlinsky et al., 1999). Desafortunadamente, la literatura es escasa y variable, dependiendo de la variante estudiada y metodología empleada.

Alternativamente a las causas propiamente biológicas, la tasa de recombinación observada puede deberse a la técnica de análisis genético aplicada en las unidades meióticas. En el presente documento de tesis doctoral hemos descrito el empleo de marcadores genéticos, próximos a las variantes patogénicas de interés; siendo diferentes en número, distancia respecto a una variante patogénica particular y tipología.

Para el caso de la donante #7, se utilizaron dos marcadores SNP informativos intragénicos, localizados en el lado centromérico de la variante patogénica del gen *F9*. La distancia de los dos SNP informativos respecto a la variante patogénica fue de aproximadamente 11.000 pb; encontrándose relativamente cerca uno de otro (420 pb de distancia). Por su parte, en el estudio de la donante #8 se emplearon siete marcadores STR, tres intragénicos y cuatro extragénicos, flanqueando la variante de estudio. Además, los STR informativos se encontraban a diferentes distancias, siendo de aproximadamente 11.000 pb la más cercana a la variante patogénica del gen *CFTR*, llegando hasta más de los 230.000 pb, la más alejada (Figura 38).

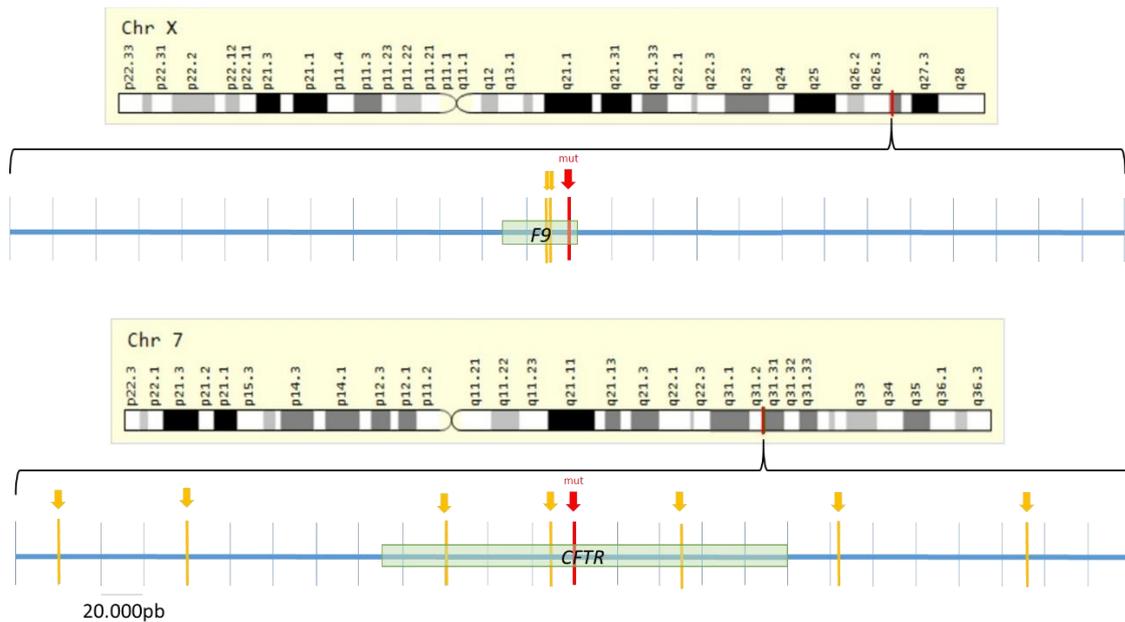


Figura 38: Localización cromosómica de los marcadores genéticos (en amarillo) y las variantes patogénicas (en rojo) de estudio

Además de estas consideraciones, podríamos asumir dos situaciones: que el fenómeno de recombinación incluya todo el haplobloque analizado, o no lo incluya. Obviamente, cuanto mayor sea el tamaño del haplobloque analizado, como ha sido el caso del análisis de la variante patogénica en *CFTR*, mayor será la probabilidad de detectar un posible evento de recombinación. Sin embargo, hemos de considerar que los marcadores deben estar lo suficientemente cercanos a la variante patogénica para asegurarse que se heredan junto a ella, en el mismo haplobloque. De hecho, según directrices internacionales, los marcadores deben ser preferiblemente intragénicos; de emplearse aquéllos extragénicos, se recomienda mantenerse a una distancia de 1 Mb de la variante patogénica de interés (aproximadamente 1 cM). En caso de no disponer de marcadores adecuados en un radio de 1 Mb, los marcadores ubicados dentro de 2 Mb son aceptables, pero no aconsejables. Por tanto, se deben usar marcadores informativos en la región flanqueante a 1-2 Mb (Carvalho et al., 2020a; Carvalho et al., 2020b; Kokkali et al., 2020).

DISCUSIÓN

Por otro lado, la naturaleza de las variantes no patogénicas condiciona la calidad de la información respuesta. Así, los SNP, como aquéllos empleados en la donante #7, son mayoritariamente bialélicos (1 pb) y tienen un menor contenido de información por marcador, en comparación con los STR (fragmentos más robustos, de generalmente más de 100 pb); en general, podemos asumir que tres SNP informativos proporcionan una información equivalente a la de un único STR informativo. De hecho, una aplicación diagnóstica clínica efectiva requiere de, al menos, 1 STR o 3 SNP proximales y 1 STR o 3 SNP distales, informativos y flanqueando la variante patogénica (Carvalho et al., 2020a; Carvalho et al., 2020b; Kokkali et al., 2020). Según estas premisas, no podemos descartar una posible estimación a la baja en la tasa de recombinación/ADO en las tríadas meióticas analizadas mediante SNP, como fue el caso de la donante #7; lo que podría explicar la menor frecuencia de recombinación observada.

Si bien los discutidos orígenes de heterocigosidad, que asumen un patrón de segregación meiótico tradicionalmente reduccional y ecuacional, se explican por la recombinación; no podemos descartar que el origen de heterocigosidad observada en el CP1 se deba a alteraciones en el patrón de segregación meiótica. La predisposición a errores en la segregación meiótica, asociados a una baja tasa de recombinación, ha sido previamente sugerida (Tease et al., 2002; Cheng et al., 2009; Ottolini et al., 2015; Ma et al., 2019). En particular, Ottolini y colaboradores (2015) observaron que las cromátidas no recombinantes presentan un mayor riesgo de sufrir separación precoz de cromátidas hermanas o PSSC (del inglés, *Premature Separation of Sister Chromatids*), por su mayor probabilidad de disociarse del resto del bivalente. Si bien las alteraciones en el patrón de segregación meiótica son responsables de la mayoría de las aneuploidías embrionarias de origen materno, dicha variable (tasa de aneuploidías) no ha sido investigada en este trabajo de tesis doctoral; siendo nuestro objetivo el genotipado más que la estabilidad cromosómica. No obstante, si el origen de la heterocigosidad fuese debido a errores en la segregación, una de las variables

clave sería la edad materna (Handyside et al., 2012). Así, una excesivamente permanencia de los ovocitos, detenidos en estadio de dictiato, bien puede relacionarse con un mayor deterioro en la cohesión de las cromátidas hermanas. De esta forma, la recombinación, como mecanismo de cohesión, podría estar bajo selección negativa en mujeres entradas en la década de los 30 (Ottolini et al., 2015). Esta posibilidad, se ajustaría a los escenarios ovocitarios estudiados en la presente tesis doctoral, donde la donante #7, de 31 años, mostró una menor tasa de heterocigosidad en el CP1 (41,2%) que la donante #8, de 22 años de edad (90%). De hecho, en la donante #8 no se observaron errores en la segregación meiótica; al menos en la región génica estudiada, desconociendo el estatus del resto del genoma. Por su parte, en la donante #7, observamos 5/17 ovocitos (29,4%) que habrían seguido algún tipo de error en la primera división meiótica, corrigiéndose el contenido final del partenogenota en el CP2 en tres casos (Figura 39).

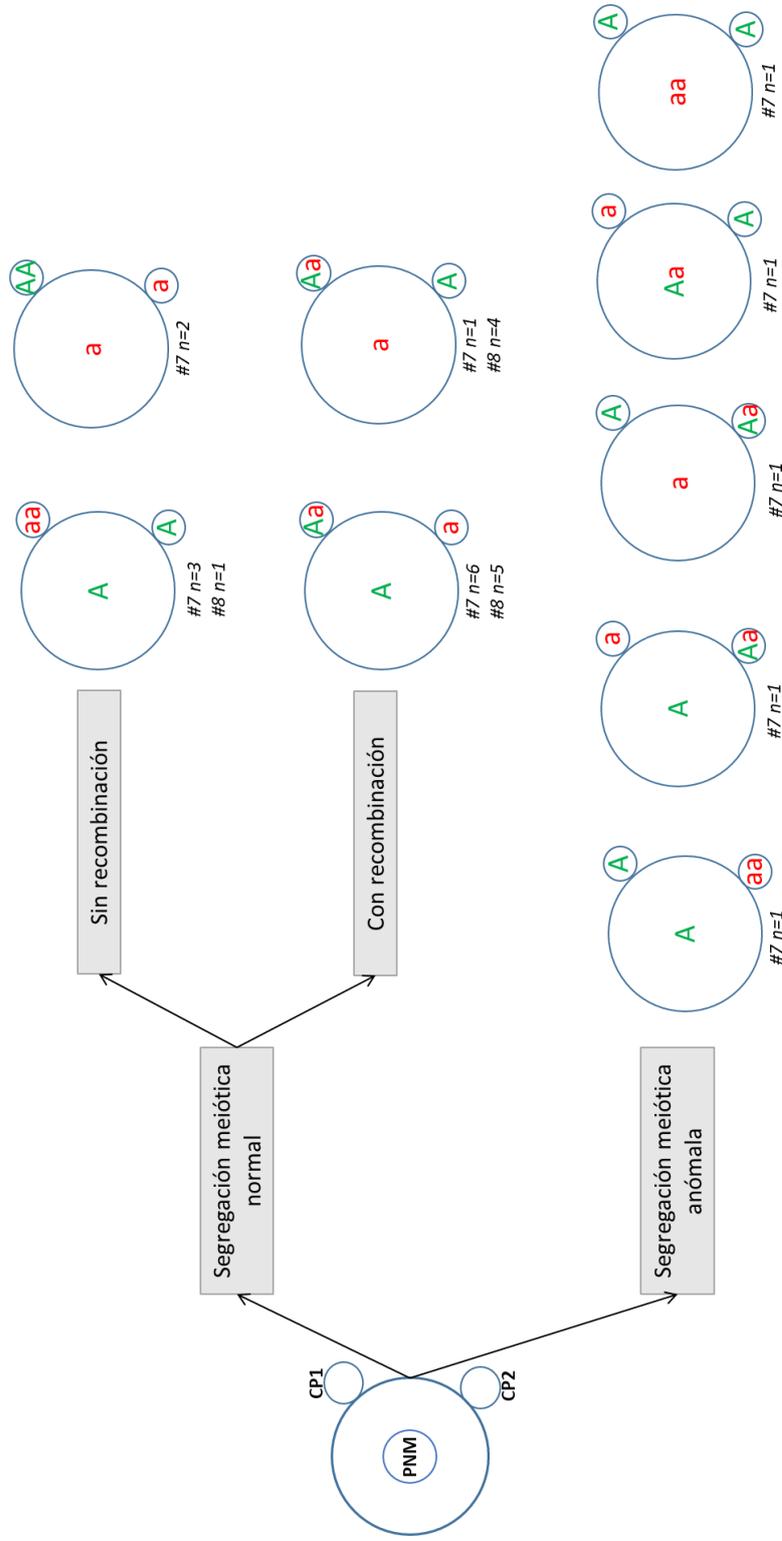


Figura 39: Esquema de los posibles modelos de división meiótica propuestos a partir del estudio genético de las tríadas meióticas completas, considerando el escenario de recombinación genética

NOTA: Se indica el número de casos (n) por tipo de segregación en función de la donante (#) de estudio.

Por todo lo anterior, con el abordaje desarrollado en la presente tesis doctoral, no es posible determinar cuál es el principal mecanismo que da origen a los errores de segregación en la primera meiosis, en primera instancia, y del partenogenota, en segundo. Generalmente, se acepta que más del 90% de las aneuploidías maternas detectadas en embarazos y abortos tienen su origen en la primera división meiótica (Nicolaidis y Petersen, 1998), e incluso definen la separación prematura de cromátidas hermanas y la no disyunción de cromosomas homólogos como principales mecanismos de error (Angell 1997; Pellestor et al., 2002; Handyside et al., 2012; Hou et al., 2013; Ottolini et al., 2015); siendo poco frecuente en ovocitos de mujeres jóvenes (Fragouli et al., 2009).

Tras el estudio de 27 tríadas meióticas, sólo en 2 partenogenotas se identificó un haplotipo compatible con errores en la segregación de la región estudiada; desconociendo el estatus del resto del genoma. Este porcentaje de aneuploidía “local” representa un 7,4%, similar a la observada en otras investigaciones, como la de Ottolini, donde la incidencia reportada de este fenómeno fue del 3,7% al 8,7% en ovocitos de pacientes de edad media de 37,3 años (Ottolini et al., 2015) o como la de Pellestor, que reportó una frecuencia de aneuploidía del 10,8% en ovocitos de 33,7 años de media (Pellestor et al., 2002); incidencia que se vio incrementada al 47,6% en ovocitos de mujeres mayores de 40 años (Capalbo et al., 2013); siendo la segunda división meiótica la causa más plausible de errores relacionados con la edad (Fragouli et al., 2011; Capalbo et al., 2013).

Por todo lo anteriormente citado, creemos que los CP1 heterocigotos obtenidos en la presente tesis doctoral tienen su origen en la recombinación genética más que en errores en la segregación meiótica; hecho que bien pudiera ser detectado mediante meiomapping. En síntesis, esta estrategia se basa en la generación de mapas genómicos de recombinación y patrones de segregación cromosómica a partir del genotipado de millones de SNPs informativos (Ottolini et al., 2015). Esta

DISCUSIÓN

tecnología permite inferir no sólo la composición genética de los ovocitos (haplotipo) sino también su composición numérica.

La capacidad diagnóstica ovocitaria mediante análisis del CP1 requiere de aquellos parámetros que miden la fiabilidad y precisión de un test diagnóstico: sensibilidad (S), especificidad (E) y la razón de verosimilitud (LR), permitiéndonos valorar la confianza en la estimación del diagnóstico genético ovocitario a partir del CP1.

Según nuestros datos, la sensibilidad y especificidad diagnóstica del CP1 de los ovocitos de la donante #7 fueron del 80%; con una verosimilitud positiva de 4 y negativa de 0,25. Por su parte, debido al 90% de heterocigosidad observado en el CP1 de los ovocitos de la donante #8 (9 de los 10 CP1), estos parámetros no pudieron ser calculados. Considerando conjuntamente los resultados del CP1 y CP2, la sensibilidad y especificidad calculadas fueron del 88,9% y 87,5%, respectivamente, para la donante #7; alcanzando el 100% para la donante #8. Por su lado, la verosimilitud positiva para la donante #7 aumenta a 7,1 y la negativa baja a 0,1; lo que indica que es 7,1 veces más verosímil que una muestra positiva (en este caso, CP1/CP2 portador de la variante patogénica) obtenga un resultado positivo que una muestra negativa. Por lo que respecta a la donante #8, la verosimilitud positiva y negativa no pueden calcularse debido al 100% estimado en la tasa de sensibilidad y especificidad.

En definitiva, y considerando su potencial aplicación clínica, el test genético ovocitario preconcepción que proponemos, requiere de la vitrificación ovocitaria tras su biopsia de CP1, puesto que se dispone de 2 horas (máximo 4) para obtener los resultados genéticos y poder realizar la ICSI sobre aquellos ovocitos inferidos como “sanos”, sin que la edad ovocitaria post ovulatoria se vea afectada. Según esta estrategia, obtenido el resultado genético del análisis del CP1, emergen principalmente dos posibilidades:

(i) el CP1 es homocigoto, ya sea portador o no de la variante patogénica, pudiendo inferir correctamente el contenido genético del ovocito y, por tanto, seleccionando o descartando (respectivamente) los ovocitos para realizar la ICSI (Figura 40);

(ii) el CP1 resulta heterocigoto, haciéndose imprescindible la biopsia y análisis del CP2 para inferir la composición genética del PNM.

En este sentido, y teniendo en cuenta el enfoque de diagnóstico preconcepción que planteamos, el tiempo transcurrido desde la biopsia del CP2 (aproximadamente 6-8 horas tras la activación ovocitaria/ICSI) hasta el momento preciso de la fecundación propiamente dicha, es decir, momento de la combinación de genomas parentales (aproximadamente 28-30 horas post-activación, en la primera metafase mitótica; Reichmann et al., 2018), se disponen de aproximadamente 24 horas para poseer el resultado genético de los CP.

Si este intervalo de tiempo fuera insuficiente para la obtención de los resultados genéticos, proponemos la vitrificación del partenogenota/cigoto tras la biopsia de CP2; metodología no objeto inicial de este estudio y, por ende, no incluida en la presente tesis doctoral.

Con los resultados genéticos de sendos corpúsculos polares, aquellos ovocitos inferidos como no portadores de la variante patogénica, serán desvitrificados, permitiendo la consecución de la fecundación y ulterior desarrollo (Figura 40).

DISCUSIÓN

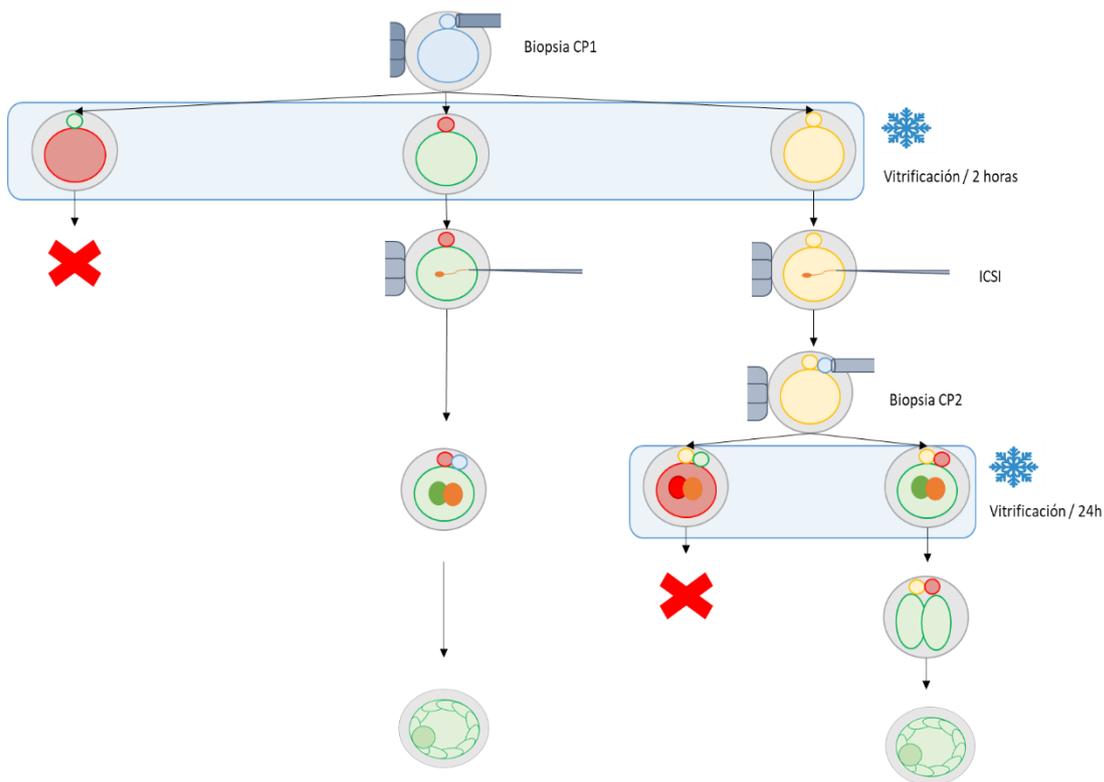


Figura 40: Opciones de diagnóstico genético ovocitario preconcepción tras análisis de CP1/CP2

NOTA: Se indica el color de la unidad meiótica femenina (CP1, CP2 y PNM) en función del resultado genético de la variante de estudio (verde: wild-type; rojo: patogénica; amarillo: heterocigoto; azul: sin analizar).

Independientemente del origen, la heterocigosidad en CP1 es una variable determinante del rendimiento diagnóstico del CP1. De acuerdo con los resultados preliminares, se confirma que el rendimiento diagnóstico viene determinado: (1) por el rendimiento técnico, es decir, por los pormenores en la generación y análisis de las tríadas meióticas, anteriormente discutidos; y (2) por el grado de heterocigosidad en CP1, siendo inversamente proporcional a éste. Asumiendo como mejor aproximación a la realidad los resultados obtenidos en la donante #8, el rendimiento diagnóstico en CP1 es del 3,4%, debido, especialmente, al elevado grado de heterocigosidad (90%). En el mejor escenario, donde el grado de heterocigosidad en CP1 fuera nulo, la capacidad diagnóstica estaría determinada por el rendimiento técnico, siendo del 34,5% y, por tanto, igualmente escaso.

No obstante, dicha limitación diagnóstica está totalmente soslayada cuando la información genética del CP1 se completa con el análisis del CP2, aunque con las mermas en efectivos y las limitaciones como estrategia de TGPC asociadas (Grifo et al., 2015; Cimadomo et al., 2020), cuestionando igualmente su posible traslación clínica.

En el estudio de las tríadas meióticas, se incluye un tercer componente, el partenogenota (Paffoni et al., 2011; Ottolini et al., 2015) o el PNM, en el caso de los cigotos (Capalbo et al., 2013; Hou et al., 2013). En el estudio preliminar de la puesta a punto de esta metodología de diagnóstico desarrollada y descrita en esta tesis doctoral, el análisis del tercer elemento de la tríada permite la confirmación de la inferencia genética obtenida; sin embargo, su viabilidad se pierde en el diagnóstico. En la estrategia presentada en el presente proyecto de tesis doctoral, el estudio derivado de las células constituyentes de los partenogenotas, los partenocitos, ha permitido plantear una nueva estrategia: el estudio directo (y no por inferencia) del elemento partícipe de la fecundación en un nuevo formato, el partenocito.

Con la aplicación del protocolo de activación partenogenética y cultivo a día 3 de desarrollo, los partenogenotas contienen una media de siete partenocitos; siendo el genotipo de todos ellos idéntico; resultando ser, *a priori*, réplicas del PNM. Así, de demostrarse la uniformidad e isogenicidad, en términos de ploidía, fórmula cromosómica completa y caracterización transcriptómica (objeto de proyectos en activo) entre partenocitos, el cultivo partenogenota permitiría amplificar la información genética del PNM y soslayar los inconvenientes técnicos relacionados con el manejo, amplificación y estrategia logística de diagnóstico ovocitario basado en análisis de los CPs, especialmente debidos a la pobre calidad del ADN corpuscular y/o las limitaciones propias de la técnica de vitrificación, biopsia y activación ovocitaria.

DISCUSIÓN

De este modo, la partenogénesis constituiría en sí mismo un método de clonación gamética y, por tanto, un novedoso y transgresor abordaje de diagnóstico genético preconcepción, que permitiría seleccionar aquellos orígenes maternos exentos de aneuploidías o con un determinado genotipo para una futura y ulterior fecundación, como ha sido propuesto por otros autores en otras especies de mamífero (ratón: Surani et al., 1986; Barra y Renard, 1988; conejo: Escribá y García-Ximénez; 2001).

CONCLUSIONES

- La biopsia y análisis molecular del CP1 es técnicamente posible.
- Cuando el diagnóstico molecular de los CP requiera de la vitrificación de los ovocitos biopsiados; reducir el tamaño del orificio practicado en la zona pelúcida, es clave a fin de no comprometer su supervivencia.
- La capacidad diagnóstica del CP1 depende mayoritariamente, aunque no exclusivamente, del grado de heterocigosidad génica en la región interrogada.
- La biopsia del CP2 es obligada ante CP1 heterocigotos, y recomendada en aquéllos que solo se detecte un haplotipo.
- La baja capacidad diagnóstica del CP1 hace necesario el estudio de sendos corpúsculos o subproductos de la meiosis; limitando su práctica preconcepcional.
- El genotipado de una región genómica no permite discernir entre eventos de recombinación o errores de segregación; otros abordajes diagnósticos son requeridos.
- La isogenicidad intrapartenogenota sugiere que, el estudio de los partenocitos ofrece un diagnóstico directo del genoma potencialmente útil en el proceso de fecundación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramczuk, J. W., Lopata, A. (1990). Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained in vitro. *Human Reproduction*, 5(5), 578–581.
- Aizer, A., Shimon, C., Dratviman-Storobinsky, O., Shani, H., Harel Inbar, N., Maman, E., Orvieto, R. (2020). Timing day-3 vitrification for PGT-M embryos: pre- or post-blastomere biopsy? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(10), 2413–2418.
- Akolekar, R., Beta, J., Picciarelli, G., Ogilvie, C., D'Antonio, F. (2015). Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 45(1), 16–26.
- Al-Hasani, S., Ozmen, B., Koutlaki, N., Schoepper, B., Diedrich, K., Schultze-Mosgau, A. (2007). Three years of routine vitrification of human zygotes: Is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reproductive BioMedicine Online*, 14(3), 288–293.
- Alexander, B., Coppola, G., di Berardino, D., Rho, G. J., St John, E., Betts, D. H., King, W. A. (2006). The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 73(1), 20–28.
- Amdani, S. N., Yeste, M., Jones, C., Coward, K. (2015). Sperm factors and oocyte activation: Current controversies and considerations. *Biology of Reproduction*, 93(2), 1–8.
- Angell, R. (1997). First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *The American Journal of Human Genetics*, 61, 23–32.
- Balakier, H., Tarkowski, A. K. (1976). Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and Cytochalasin B. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35(1), 25–39.
- Balakier, H., Casper, R. F. (1993). Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Human Reproduction*, 8(5), 740–743.
- Bar, S., Vershkov, D., Keshet, G., Lezmi, E., Meller, N., Yilmaz, A., Yanuka, O., Nissim-Rafinia, M., Meshorer, E., Eldar-Geva, T., Benvenisty, N. (2021). Identifying regulators of parental imprinting by CRISPR/Cas9 screening in haploid human embryonic stem cells. *Nature Communications*, 12(1), 6718.
- Barra, J., Renard, J. P. (1988). Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development*, 102(4), 773–779.

BIBLIOGRAFÍA

- Berntorp, E., Shapiro, A. D. (2012). Modern haemophilia care. *Lancet*, 379(9824), 1447–1456.
- Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P., Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutation*, 19(6), 575–606.
- Bonte, D., Thys, V., de Sutter, P., Boel, A., Leybaert, L., Heindryckx, B. (2020). Vitrification negatively affects the Ca²⁺-releasing and activation potential of mouse oocytes, but vitrified oocytes are potentially useful for diagnostic purposes. *Reproductive BioMedicine Online*, 40(1), 13–25.
- Bos-Mikich, A., Whittingham, D. G., Jones, K. T. (1997). Meiotic and mitotic Ca²⁺ oscillations affect cell composition in resulting blastocysts. *Developmental Biology*, 182(1), 172–179.
- Bos-Mikich, A., Bressan, F. F., Ruggeri, R. R., Watanabe, Y., Meirelles, F. v. (2016). Parthenogenesis and human assisted reproduction. *Stem Cells International*, 2016.
- Bradley, C. K., Livingstone, M., Traversa, M. v., McArthur, S. J. (2017). Impact of multiple blastocyst biopsy and vitrification-warming procedures on pregnancy outcomes. *Fertility and Sterility*, 108(6), 999–1006.
- Brevini, T. A. L., Gandolfi, F. (2008). Parthenotes as a source of embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, Suppl 1, 20–30.
- Broman, K. W., Murray, J. C., Sheffield, V. C., White, R. L., Weber, J. L. (1998). Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *The American Journal of Human Genetics*, 63, 861–869.
- Buell, M., Chitwood, J. L., Ross, P. J. (2015). cAMP modulation during sheep in vitro oocyte maturation delays progression of meiosis without affecting oocyte parthenogenetic developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 154, 16–24.
- Capalbo, A., Bono, S., Spizzichino, L., Biricik, A., Baldi, M., Colamaria, S., Ubaldi, F. M., Rienzi, L., Fiorentino, F. (2013). Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: Insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Human Reproduction*, 28(2), 509–518.
- Capalbo, A., Ottolini, C. S., Griffin, D. K., Ubaldi, F. M., Handyside, A. H., Rienzi, L. (2016). Artificial oocyte activation with calcium ionophore does not cause a widespread increase in chromosome segregation errors in the second meiotic division of the oocyte. *Fertility and Sterility*, 105(3), 807–814.

- Carvalho, F., Coonen, E., Goossens, V., Kokkali, G., Rubio, C., Meijer-Hoogeveen, M., Moutou, C., Vermeulen, N., de Rycke, M. (2020a). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Human Reproduction Open*, 2020(3), 1–20.
- Carvalho, F., Moutou, C., Dimitriadou, E., Dreesen, J., Giménez, C., Goossens, V., Kakourou, G., Vermeulen, N., Zuccarello, D., de Rycke, M. (2020b). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Human Reproduction Open*, 2020(3), 1–18.
- Castilla, J. A., Abellán-García, F., Alamá, P., Aura, M., Bassas, L., Clúa, E., de la Fuente, L. A., Guillén, J. J., Manau, D., Rueda, J., Ruiz, M., Vendrell, X. Cribado genético en donación de gametos. Grupo de trabajo de Donación de Gametos y Embriones de la SEF, en colaboración con ASES, AEEM-ML, ASEBIR y AEGH. Madrid: Fase 20 S.L.; 2019. 64p.
- Chamayou, S., Bonaventura, G., Alecci, C., Tibullo, D., di Raimondo, F., Guglielmino, A., Barcellona, M. L. (2011). Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology*, 62(2), 130–134.
- Cheng, E. Y., Hunt, P. A., Nalwai-Cecchini, T. A., Fligner, C. L., Fujimoto, V. Y., Pasternack, T. L., Schwartz, J. M., Steinauer, J. E., Woodruff, T. J., Cherry, S. M., Hansen, T. A., Vallente, R. U., Broman, K. W., Hassold, T. J. (2009). Meiotic recombination in human oocytes. *PLoS Genetics*, 5(9), e1000661.
- Chesné, P., Adenot, P. G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard, J. P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 2002 20:4, 20(4), 366–369.
- Chitty, L. S., Mason, S., Barrett, A. N., McKay, F., Lench, N., Daley, R., Jenkins, L. A. (2015). Non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia and thanatophoric dysplasia: Next-generation sequencing allows for a safer, more accurate, and comprehensive approach. *Prenatal Diagnosis*, 35(7), 656–662.
- Choi, J. K., Yue, T., Huang, H., Zhao, G., Zhang, M., He, X. (2015). The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology*, 71(2), 350–355.
- Christopikou, D., Tsorva, E., Economou, K., Shelley, P., Davies, S., Mastrominas, M., Handyside, A. H. (2013). Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Human Reproduction*, 28(5), 1426–1434.

BIBLIOGRAFÍA

- Cibelli, J. B., Grant, K. A., Chapman, K. B., Cunniff, K., Worst, T., Green, H. L., Walker, S. J., Gutin, P. H., Vilner, L., Tabar, V., Dominko, T., Kane, J., Wettstein, P. J., Lanza, R. P., Studer, L., Vrana, K. E., West, M. D. (2002a). Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science*, 295(5556), 819.
- Cibelli, J. B., Lanza, R. P., West, M. D., Ezzell, C. (2002b). The first human cloned embryo. *Scientific American*, 286(1), 44–51.
- Cimadomo, D., Capalbo, A., Levi-Setti, P. E., Soscia, D., Orlando, G., Albani, E., Parini, V., Stoppa, M., Dovere, L., Tacconi, L., Ievoli, E., Maggiulli, R., Ubaldi, F. M., Rienzi, L. (2018a). Associations of blastocyst features, trophoctoderm biopsy and other laboratory practice with post-warming behavior and implantation. *Human Reproduction*, 33(11), 1992–2001.
- Cimadomo, D., Rienzi, L., Romanelli, V., Alviggi, E., Levi-Setti, P. E., Albani, E., Dusi, L., Papini, L., Livi, C., Benini, F., Smeraldi, A., Patassini, C., Ubaldi, F. M., Capalbo, A. (2018b). Inconclusive chromosomal assessment after blastocyst biopsy: Prevalence, causative factors and outcomes after re-biopsy and re-vitrification. Multicenter experience. *Human Reproduction*, 33(10), 1839–1846.
- Cimadomo, D., Rienzi, L., Capalbo, A., Rubio, C., Innocenti, F., García-Pascual, C. M., Ubaldi, F. M., Handyside, A. (2020). The dawn of the future: 30 years from the first biopsy of a human embryo. The detailed history of an ongoing revolution. *Human Reproduction Update*, 26(4), 453–473.
- Cobo, A., de Los Santos, M. J., Castellò, D., Gámiz, P., Campos, P., Remohí, J. (2012). Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: Evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1138–1146.
- Cobo, A., Castelló, D., Vallejo, B., Albert, C., de Los Santos, J. M., Remohí, J. (2013). Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: Double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertility and Sterility*, 99(6), 1623–1930.
- Cobo, A., García-Velasco, J. A., Coello, A., Domingo, J., Pellicer, A., Remohí, J. (2016). Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and Sterility*, 105(3), 755–764.
- Coelho, P. A., Bury, L., Sharif, B., Riparbelli, M. G., Fu, J., Callaini, G., Glover, D. M., Zernicka-Goetz, M. (2013). Spindle formation in the mouse embryo requires Plk4 in the absence of centrioles. *Developmental Cell*, 27(5), 586–597.
- Coello, A., Nohales, M., Meseguer, M., de los Santos, M. J., Remohí, J., Cobo, A. (2021). Prediction of embryo survival and live birth rates after cryotransfers of vitrified blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*, 42(5), 881–891.

- Collas, P., Sullivan, E. J., Barnes, F. L. (1993). Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Molecular Reproduction and Development*, 34, 224–231.
- Courtois, A., Schuh, M., Ellenberg, J., Hiiragi, T. (2012). The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *Journal of Cell Biology*, 198(3), 357–370.
- Cuthbertson, K. S. R. (1983). Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *The Journal of Experimental Zoology*, 226, 311–314.
- Davies, K. E., Mattei, M. G., Mattei, J. F., Veenema, H., McGlade, S., Harper, K., Tommerup, N., Nielsen, K. B., Mikkelsen, M., Beighton, P., Drayna, D., White, R., Pembrey, M. E. (1985). Linkage studies of X-linked mental retardation: high frequency of recombination in the telomeric region of the human X chromosome (fragile site/linkage/recombination/X chromosome). *Human Genetics*, 70(3), 249–255.
- de Sutter, P., Dozortsev, D., Cieslak, J., Wolf, G., Verlinsky, Y., Dyban, A. (1992). Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9(4), 328–337.
- de Sutter, P., Ozortsev, D. I., Vrijens, P., Desmet, R., Dhont, M. (1994). Cytogenetic analysis of human oocytes parthenogenetically activated by puromycin. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 11(8), 382–388.
- de Vos, A., van Landuyt, L., de Rycke, M., Verdyck, P., Verheyen, G., Buysse, A., Belva, F., Keymolen, K., Tournaye, H., Verpoest, W. (2020). Multiple vitrification-warming and biopsy procedures on human embryos: Clinical outcome and neonatal follow-up of children. *Human Reproduction*, 35(11), 2488–2496.
- Deeks, J. J., Altman, D. G. (2004). Statistics Notes: Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *British Medical Journal*, 329(7458), 168–169.
- Delhanty, J. D. A. (2011). Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening? *Placenta*, 32(Suppl 3), S268–270.
- Dua, D., Nagoorvali, D., Chauhan, M. S., Palta, P., Mathur, P., Singh, M. K. (2019). Calcium ionophore enhanced developmental competence and apoptotic dynamics of goat parthenogenetic embryos produced in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 55(3), 159–168.
- Dumont, B. L., Payseur, B. A. (2008). Evolution of the genomic rate of recombination in mammals. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 62(2), 276–294.

BIBLIOGRAFÍA

- El-Gayar, M., Gauly, M., Holtz, W. (2010). In vitro and in vivo survival of mouse blastocysts after repeated vitrification with the open pulled straw (ops) method. *CryoLetters*, 31(6), 454–459.
- Escribá, M. J., García-Ximénez, F. (1999). Electroactivation of rabbit oocytes in an hypotonic pulsing medium and parthenogenetic in vitro development without cytochalasin B-diploidizing pretreatment. *Theriogenology*, 51(5), 963–973.
- Escribá, M. J., García-Ximénez, F. (2000a). Influence of sequence duration and number of electrical pulses upon rabbit oocyte activation and parthenogenetic in vitro development. *Animal Reproduction Science*, 59(1–2), 99–107.
- Escribá, M. J., García-Ximénez, F. (2000b). Use of a variable electrical pulsing sequence in rabbit oocyte activation. *Reproduction, Nutrition, Development*, 40(3), 261–269.
- Escribá, M. J., García-Ximénez, F. (2001). Reconstruction of the heteroparental diploid condition in rabbit zygotes by nuclear transfer. *Theriogenology*, 55(3), 771–784.
- Escribá, M. J., Grau, N., Escrich, L., Pellicer, A. (2010). Vitrification of isolated human blastomeres. *Fertility and Sterility*, 93(2), 669–671.
- Escribá, M. J., Escrich, L., Galiana, Y., Grau, N., Galán, A., Pellicer, A. (2016). Kinetics of the early development of uniparental human haploid embryos. *Fertility and Sterility*, 105(5), 1360-1368.
- Escribá, M.J., Bautista-Llàcer, R., Grau, N., Oller, A., Escrich, L., Vendrell, X. (2022). Clonación gamética por generación de androgenotas humanos: caracterización genética y edición genómica por Crispr-Cas9. *REVISTA ASEBIR Embriología Clínica y Biología de la Reproducción*, 27(2), 34–42.
- Escrich, L., Grau, N., Mercader, A., Rubio, C., Pellicer, A., Escribá, M. J. (2011). Spontaneous in vitro maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(2), 111–117.
- Escrich, L., Grau, N., de Los Santos, M. J., Romero, J. L., Pellicer, A., Escribá, M. J. (2012). The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1147–1151.
- Farré, M., Micheletti, D., Ruiz-Herrera, A. (2013). Recombination rates and genomic shuffling in human and chimpanzee—a new twist in the chromosomal speciation theory. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 853–864.
- Fathi, R., Valojerdi, M. R., Yazdi, P. E., Ebrahimi, B., Alipour, H., Hassani, F. (2012). Development of 4-cell mouse embryos after re-vitrification. *Cryobiology*, 64(1), 23–26.

- Ferrer-Buitrago, M., Tilleman, L., Thys, V., Hachem, A., Boel, A., van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Leybaert, L., de Sutter, P., Parrington, J., Heindryckx, B. (2020). Comparative study of preimplantation development following distinct assisted oocyte activation protocols in a PLC-zeta knockout mouse model. *Molecular Human Reproduction*, 26(11), 801–815.
- Fiorentino, F., Biricik, A., Nuccitelli, A., de Palma, R., Kahraman, S., Sertyel, S., Karadayi, H., Cottone, G., Baldi, M., Caserta, D., Moscarini, M. (2008). Rapid protocol for pre-conception genetic diagnosis of single gene mutations by first polar body analysis: A possible solution for the Italian patients. *Prenatal Diagnosis*, 28(1), 62–64.
- FitzHarris, G. (2009). A shift from kinesin 5-dependent metaphase spindle function during preimplantation development in mouse. *Development*, 136(12), 2111–2119.
- Fragouli, E., Escalona, A., Gutiérrez-Mateo, C., Tormasi, S., Alfarawati, S., Sepulveda, S., Noriega, L., Garcia, J., Wells, D., Munné, S. (2009). Comparative genomic hybridization of oocytes and first polar bodies from young donors. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(2), 228–237.
- Fragouli, E., Alfarawati, S., Goodall, N. N., Sánchez-García, J. F., Colls, P., Wells, D. (2011). The cytogenetics of polar bodies: Insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Molecular Human Reproduction*, 17(5), 286–295.
- Geraedts, J., Montag, M., Magli, M. C., Repping, S., Handyside, A., Staessen, C., Harper, J., Schmutzler, A., Collins, J., Goossens, V., van der Ven, H., Vesela, K., Gianaroli, L. (2011). Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: Clinical results. *Human Reproduction*, 26(11), 3173–3180.
- Ghetler, Y., Yavin, S., Shalgi, R., Arav, A. (2005). The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Human Reproduction*, 20(12), 3385–3389.
- Gianaroli, L., Magli, M. C., Cavallini, G., Crippa, A., Capoti, A., Resta, S., Robles, F., Ferraretti, A. P. (2010). Predicting aneuploidy in human oocytes: Key factors which affect the meiotic process. *Human Reproduction*, 25(9), 2374–2386.
- Giles, J., Alama, P., Gamiz, P., Vidal, C., Badia, P., Pellicer, A., Bosch, E. (2021). Medroxyprogesterone acetate is a useful alternative to a gonadotropin-releasing hormone antagonist in oocyte donation: a randomized, controlled trial. *Fertility and Sterility*, 116(2), 404–412.
- Ginoza, M. E. C., Isasi, R. (2020). Regulating preimplantation genetic testing across the world: A comparison of international policy and ethical perspectives. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(5), a036681.
- Gougeon, A. (1996). Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17(2), 121–155.

BIBLIOGRAFÍA

- Graham, C. F. (1974). The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biological Reviews*, 49, 399–422.
- Gray, S., Cohen, P. E. (2016). Control of meiotic crossovers: from double-strand break formation to designation. *Annual Review of Genetics*, 50, 175–210.
- Greco, E., Biricik, A., Cotarelo, R. P., Iammarone, E., Rubino, P., Tesarik, J., Fiorentino, F., Minasi, M. G. (2015). Successful implantation and live birth of a healthy boy after triple biopsy and double vitrification of oocyte-embryo-blastocyst. *SpringerPlus*, 4(1), 1–5.
- Griesinger, G., Bündgen, N., Salmen, D., Schwinger, E., Gillissen-Kaesbach, G., Diedrich, K. (2009). Polar body biopsy in the diagnosis of monogenic diseases: the birth of three healthy children. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106(33), 533–538.
- Grifo, J., Adler, A., Lee, H. L., Morin, S. J., Smith, M., Lu, L., Hodes-Wertz, B., McCaffrey, C., Berkeley, A., Munné, S. (2015). Deliveries from trophectoderm biopsied, fresh and vitrified blastocysts derived from polar body biopsied, vitrified oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(2), 210–216.
- Gruhn, J. R., Rubio, C., Broman, K. W., Hunt, P. A., Hassold, T. (2013). Cytological studies of human meiosis: Sex-specific differences in recombination originate at, or prior to, establishment of double-strand breaks. *PLoS ONE*, 8(12), e85075.
- Gruppen, C. G., Mau, J. C., McIlpatrick, S. M., Maddocks, S., Nottle, M. B. (2002). Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated in vitro matured porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 62(3), 387–396.
- Grupo de trabajo de protocolos de cribado neonatal de la Ponencia de cribado poblacional. Requisitos y Recomendaciones para el desarrollo del Programa de Cribado Neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas en el SNS. Ministerio de Sanidad, 2020.
- Guo, J., Liu, F., Guo, Z., Li, Y., An, Z., Li, X., Li, Y., Zhang, Y. (2010). In vitro development of goat parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer embryos derived from different activation protocols. *Zygote*, 18(1), 51–59.
- Handel, M. A., Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: Regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics*, 11(2), 124–136.
- Handyside, A. H., Montag, M., Magli, M. C., Repping, S., Harper, J., Schmutzler, A., Vesela, K., Gianaroli, L., Geraedts, J. (2012). Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *European Journal of Human Genetics*, 20(7), 742–747.

- Hao, R., Zhang, C., Lv, L., Shi, L., Yue, W. (2015). Effects of AY9944 A-7 on gonadotropin-induced meiotic resumption of oocytes and development of parthenogenetic embryos in sheep. *Theriogenology*, 83(1), 30–37.
- Harada, Y., Matsumoto, T., Hirahara, S., Nakashima, A., Ueno, S., Oda, S., Miyazaki, S., Iwao, Y. (2007). Characterization of a sperm factor for egg activation at fertilization of the newt *Cynops pyrrhogaster*. *Developmental Biology*, 306(2), 797–808.
- Harton, G. L., Magli, M. C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., Harper, J. C. (2011). ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group - Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction*, 26(1), 41–46.
- Henery, C. C., Kaufman, M. H. (1992). Cleavage rate of diandric triploid mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular reproduction and development*, 32(3), 251–258.
- Hill, M., Twiss, P., Verhoef, T. I., Drury, S., McKay, F., Mason, S., Jenkins, L., Morris, S., Chitty, L. S. (2015). Non-invasive prenatal diagnosis for cystic fibrosis: Detection of paternal mutations, exploration of patient preferences and cost analysis. *Prenatal Diagnosis*, 35(10), 950–958.
- Hipp, J., Atala, A. (2004). Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: New paradigms for therapy. *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction*, 1(1), 3.
- Holubcová, Z., Blayney, M., Elder, K., Schuh, M. (2015). Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science*, 348(6239), 1143–1147.
- Hosseini, S. M., Hajian, M., Moulavi, F., Shahverdi, A. H., Nasr-Esfahani, M. H. (2008). Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, 108(1–2), 122–133.
- Hou, Y., Fan, W., Yan, L., Li, R., Lian, Y., Huang, J., Li, J., Xu, L., Tang, F., Xie, X. S., Qiao, J. (2013). Genome analyses of single human oocytes. *Cell*, 155(7), 1492–1506.
- Huo, Y., Yuan, P., Qin, Q., Yan, Z., Yan, L., Liu, P., Li, R., Yan, J., Qiao, J. (2021). Effects of vitrification and cryostorage duration on single-cell RNA-Seq profiling of vitrified-thawed human metaphase II oocytes. *Frontiers of Medicine*, 15(1), 144–154.
- Hussin, J., Roy-Gagnon, M. H., Gendron, R., Andelfinger, G., Awadalla, P. (2011). Age-dependent recombination rates in human pedigrees. *PLoS Genetics*, 7(9), 1002251.
- Ito, J., Kuramochi, M., Inoue, A., Yabe, K., Fujiwara, K., Nishikawa, O., Arishima, K., Sonoki, S., Masaoka, T., Kashiwazaki, N. (2010). Cryotop facilitates high developmental ability of re-vitrified mouse embryos. *Journal of Reproduction Engineering*, 13, 21–26.

BIBLIOGRAFÍA

- Jiang, J. Y., Mizuno, S., Mizutani, E., Sasada, H., Sato, E. (2002). Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 61(1), 120–125.
- Johnson, M. H., Pickering, S. J., Braude, P. R., Vincent, C., Cant, A., Currie, J. (1990). Acid Tyrode's solution can stimulate parthenogenetic activation of human and mouse oocytes. *Fertility and Sterility*, 53(2), 266–270.
- Jones, K. T. (2005). Mammalian egg activation: From Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130(6), 813–823.
- Kahraman, S., Candan, Z. N. (2010). Outcomes of vitrified-warmed day-4 embryos after day-3 cleavage-stage biopsy. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(5), 636–641.
- Kang, S. M., Lee, S. W., Yoon, S. H., Kim, J. C., Lim, J. H., Lee, S. G. (2013). Comparison of clinical outcomes between single and double vitrified-warmed blastocyst embryo transfer according to the day of vitrification. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(6), 779–785.
- Kaufman, M. H., Barton, S. C., Surani, M. A. H. (1977). Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature*, 265(5589), 53–55.
- Kaufman, M. H. (1978). The experimental production of mammalian parthenogenetic embryos. *Methods in Mammalian Reproduction*, 21–47.
- Keskintepe, L., Agca, Y., Sher, G., Keskintepe, M., Maassarani, G. (2009). High survival rate of metaphase II human oocytes after first polar body biopsy and vitrification: determining the effect of previtrification conditions. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1706–1715.
- Kim, N. H., Uhm, S. J., Ju, J. Y., Lee, H. T., Chung, K. S. (1997). Blastocoele formation and cell allocation to the inner cell mass and trophoctoderm in haploid and diploid pig parthenotes developing in vitro. *Zygote*, 5(4), 365–370.
- Kingsmore, S. (2012). Comprehensive carrier screening and molecular diagnostic testing for recessive childhood diseases. *PLoS Currents*, 4: e4f9877ab8ffa9.
- Kitajima, T. S., Ohsugi, M., Ellenberg, J. (2011). Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell*, 146(4), 568–581.
- Kline, D., Kline, J. T. (1992). Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental Biology*, 149(1), 80–89.

- Kokkali, G., Coticchio, G., Bronet, F., Celebi, C., Cimadomo, D., Goossens, V., Liss, J., Nunes, S., Sfontouris, I., Vermeulen, N., Zakharova, E., de Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human Reproduction Open*, 2020(3), 1–12.
- Kong, A., Gudbjartsson, D. F., Sainz, J., Jonsdottir, G. M., Gudjonsson, S. A., Richardsson, B., Sigurdardottir, S., Barnard, J., Hallbeck, B., Masson, G., Shlien, A., Palsson, S. T., Frigge, M. L., Thorgeirsson, T. E., Gulcher, J. R., Stefansson, K. (2002). A high-resolution recombination map of the human genome. *Nature Genetics*, 31(3), 241–247.
- Krivokharchenko, A., Popova, E., Zaitseva, I., Vil'ianovich, L., Ganten, D., Bader, M. (2003). Development of parthenogenetic rat embryos. *Biology of Reproduction*, 68(3), 829–836.
- Kubiak, J., Paldi, A., Weber, M., Maro, B. (1991). Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development*, 111(3), 763–769.
- Kuliev, A. M. (1985). [Hereditary disease program in the WHO strategy: “Health for all by 2000”]. *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR*, 10, 86–91.
- Kuliev, A., Cieslak, J., Ilkevitch, Y., Verlinsky, Y. (2003). Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(1), 54–59.
- Kuliev, A., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Tur-Kaspa, I., Kalakoutis, G., Angastiniotis, M., Verlinsky, Y. (2005). Preimplantation diagnosis and HLA typing for haemoglobin disorders. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(3), 362–370.
- Kuliev, A., Rechitsky, S. (2011). Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Molecular Human Reproduction*, 17(5), 275–285.
- Küpker, W., Huber, G., Ludwig, M., Diedrich, K. (2001). Preimplantation genetic diagnosis in Germany: ethical responsibility and law. *Reproductive BioMedicine Online*, 2(2), 84–87.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(3), 300–308.
- la Marca, A., Sunkara, S. K. (2014). Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Human Reproduction Update*, 20(1), 124–140.

BIBLIOGRAFÍA

- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Galli, C. (2004). Developmental potential of bovine androgenetic and parthenogenetic embryos: a comparative study. *Biology of Reproduction*, 70(2), 400–405.
- Lan, G. C., Han, D., Wu, Y. G., Han, Z. bin, Ma, S. F., Liu, X. Y., Chang, C. le, Tan, J. H. (2005). Effects of duration, concentration, and timing of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatment on activation of goat oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 71(3), 380–388.
- Latham, K. E., Akutsu, H., Patel, B., Yanagimachi, R. (2002). Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 67(2), 386–392.
- Lee, J. W., Tian, X. C., Yang, X. (2004). Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Molecular Reproduction and Development*, 68(1), 51–57.
- Leng, L., Ouyang, Q., Kong, X., Gong, F., Lu, C., Zhao, L., Shi, Y., Cheng, D., Hu, L., Lu, G., Lin, G. (2017). Self-diploidization of human haploid parthenogenetic embryos through the Rho pathway regulates endomitosis and failed cytokinesis. *Scientific Reports*, 7(1), 4242.
- Lenzi, M. L., Smith, J., Snowden, T., Kim, M., Fishel, R., Poulos, B. K., Cohen, P. E. (2005). Extreme heterogeneity in the molecular events leading to the establishment of chiasmata during meiosis I in human oocytes. *The American Journal of Human Genetics*, 76, 112–127.
- Li, J., Xiong, S., Zhao, Y., Li, C., Han, W., Huang, G. (2021). Effect of the re-vitrification of embryos at different stages on embryonic developmental potential. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 653310.
- Lin, G., Ouyang, Q., Zhou, X., Gu, Y., Yuan, D., Li, W., Liu, G., Liu, T., Lu, G. (2007). A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following in vitro fertilization procedure. *Cell Research*, 17(12), 999–1007.
- Lin, H., Lei, J., Wininger, D., Nguyen, M.-T., Khanna, R., Hartmann, C., Yan, W.-L., Huang, S. C. (2003). Multilineage Potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells*, 21, 152–161.
- Liu, C.-T., Chen, C.-H., Cheng, S.-P., Ju, J.-C. (2002). Parthenogenesis of rabbit oocytes activated by different stimuli. *Animal Reproduction Science*, 70(3-4), 267–276.
- Liu, J. L., Sung, L. Y., Du, F., Julian, M., Jiang, S., Barber, M., Xu, J., Tian, X. C., Yang, X. (2004). Differential development of rabbit embryos derived from parthenogenesis and nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 68(1), 58–64.

- Liu, J., Grimison, B., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. (2006). The anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor Emi2 is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 34736–34741.
- Liu, L., Ju, J.-C., Yang, X. (1998). Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biology of reproduction*, 59(3), 537–545.
- Liu, L., Yang, X. (1998). Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Molecular Reproduction and Development*, 49(3), 298–307.
- Liu, S. Z., Jiang, M. X., Yan, L. Y., Jiang, Y., Ouyang, Y. C., Sun, Q. Y., Chen, D. Y. (2005). Parthenogenetic and nuclear transfer rabbit embryo development and apoptosis after activation treatments. *Molecular Reproduction and Development*, 72(1), 48–53.
- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W. G., Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350(9076), 485–487.
- Loi, P., Ledda, S., Fulka, J., Cappai, P., Moor, R. M. (1998). Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biology of reproduction*, 58(5), 1177–1187.
- Lorca, T., Galas, S., Fesquet, D., Devault, A., Cavadore, J.-C., Doree, M. (1991). Degradation of the proto-oncogene product p39mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca²⁺-calmodulin dependent event exit from M phase. *The EMBO Journal*, 10(8), 2087–2093.
- Lu, Y., Bonte, D., Ferrer-Buitrago, M., Popovic, M., Neupane, J., van der Jeught, M., Leybaert, L., de Sutter, P., Heindryckx, B. (2018). Culture conditions affect Ca²⁺ release in artificially activated mouse and human oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(7), 991–1001.
- Ma, J. Y., Yan, L. Y., Wang, Z. B., Luo, S. M., Yeung, W. S. B., Ou, X. H., Sun, Q. Y., Qiao, J. (2019). Meiotic chromatid recombination and segregation assessed with human single cell genome sequencing data. *Journal of Medical Genetics*, 56(3), 156–163.
- Macas, E., Merki-Feld, G. S., Xie, M., Stiller, R., Pelczar, P., Imthurn, B. (2008). High survival and developmental rates of vitrified mouse zygotes following polar body biopsy. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(2), 271–275.
- Macas, E., Xie, M., Schaufelberger, S., Merki-Feld, G. S., Stiller, R., Imthurn, B. (2011). Vitrification of human single pronuclear oocytes following two approaches to polar body biopsy. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(4), 376–381.

BIBLIOGRAFÍA

- Madgwick, S., Jones, K. T. (2007). How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. *Cell Division*, 2, 4.
- Magli, M. C., Gianaroli, L., Ferraretti, A. P., Toschi, M., Esposito, F., Fasolino, M. C. (2004). The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Human Reproduction*, 19(5), 1163–1169.
- Magli, M. C., Montag, M., Kster, M., Muzi, L., Geraedts, J., Collins, J., Goossens, V., Handyside, A. H., Harper, J., Repping, S., Schmutzler, A., Vesela, K., Gianaroli, L. (2011). Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: Technical aspects. *Human Reproduction*, 26(11), 3181–3185.
- Mai, Q., Yu, Y., Li, T., Wang, L., Chen, M. J., Huang, S. Z., Zhou, C., Zhou, Q. (2007). Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Research*, 17(12), 1008–1019.
- Majidi, N., Sc, G. M., Movahedin, M., Highway, J.-A.-A. (2016). Alternation of apoptotic and implanting genes expression of mouse embryos after re-vitrification. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(8), 511–518.
- Malik, H. N., Singhal, D. K., Saugandhika, S., Dubey, A., Mukherjee, A., Singhal, R., Kumar, S., Kaushik, J. K., Mohanty, A. K., Das, B. C., Bag, S., Bhanja, S. K., Malakar, D. (2015). Generation of parthenogenetic goat blastocysts: effects of different activation methods and culture media. *Zygote*, 23(3), 327–335.
- Martin, J., Asan, Yi, Y., Alberola, T., Rodríguez-Iglesias, B., Jiménez-Almazán, J., Li, Q., Du, H., Alama, P., Ruiz, A., Bosch, E., Garrido, N., Simon, C. (2015). Comprehensive carrier genetic test using next-generation deoxyribonucleic acid sequencing in infertile couples wishing to conceive through assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*, 104(5), 1286–1293.
- Masui, Y., Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 129–145.
- Mateo-Otero, Y., Yeste, M., Damato, A., Giaretta, E. (2021). Cryopreservation and oxidative stress in porcine oocytes. *Research in Veterinary Science*, 135, 20–26.
- Menéndez-Blanco, I., Soto-Heras, S., Catalá, M. G., Roura, M., Izquierdo, D., Paramio, M. T. (2020). Effect of crocetin added to IVM medium for prepubertal goat oocytes on blastocyst outcomes after IVF, intracytoplasmic sperm injection and parthenogenetic activation. *Theriogenology*, 155, 70–76.
- Méo, S. C., Leal, C. L. V., Garcia, J. M. (2004). Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Animal Reproduction Science*, 80(1–2), 35–46.

- Méo, S. C., Yamazaki, W., Leal, C. L. V., de Oliveira, J. A., Garcia, J. M. (2005). Use of strontium for bovine oocyte activation. *Theriogenology*, 63(8), 2089–2102.
- Mihalas, B. P., Redgrove, K. A., McLaughlin, E. A., Nixon, B. (2017). Molecular mechanisms responsible for increased vulnerability of the ageing oocyte to oxidative damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 4015874.
- Mitalipov, S. M., White, K. L., Farrar, V. R., Morrey, J., Reed, W. A. (1999). Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biology of Reproduction*, 60(4), 821–827.
- Mitalipov, S. M., Nusser, K. D., Wolf, D. P. (2001). Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biology of Reproduction*, 65(1), 253–259.
- Miyoshi, K., Fujimoto, Y., Mori, H., Yoshida, M. (2008). Activation and parthenogenetic development of pig oocytes exposed to ultrasound in media containing different concentrations of Ca²⁺. *The Journal of Reproduction and Development*, 54(1), 42–45.
- Mizutani, E., Jiang, J.-Y., Mizuno, S., Tomioka, I., Shinozawa, T., Kobayashi, J., Sasada, H., Sato, E. (2004). Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 50(1), 139–146.
- Montag, M., Köster, M., Strowitzki, T., Toth, B. (2013). Polar body biopsy. *Fertility and Sterility*, 100(3), 603–607.
- Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S., Dechaud, H., Hamamah, S. (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(7), 2160–2168.
- Morgan, C. H., Zhang, H., Bomblies, K. (2017). Are the effects of elevated temperature on meiotic recombination and thermotolerance linked via the axis and synaptonemal complex? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1736), 20160470.
- Mori, H., Mizobe, Y., Inoue, S., Uenohara, A., Takeda, M., Yoshida, M., Miyoshi, K. (2008). Effects of cycloheximide on parthenogenetic development of pig oocytes activated by ultrasound treatment. *The Journal of Reproduction and Development*, 54(5), 364–369.
- Mukaida, T., Takahashi, K., Goto, T., Oka, C. (2005). Ultra-rapid vitrification using a cryoloop technique for human blastocyst cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 84, S476.

BIBLIOGRAFÍA

- Naether, O. G. J., Rudolf, K., Fischer, R., Baukloh, V., Schmidt, C., Held, K. (2008). Pregnancy after vitrification of pronuclear stage oocytes biopsied for polar body aneuploidy screening. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(2), 268–270.
- Nakagawa, K., Yamano, S., Moride, N., Yamashita, M., Yoshizawa, M., Aono, T. (2001a). Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 76(1), 148–152.
- Nakagawa, K., Yamano, S., Nakasaka, H., Hinokio, K., Yoshizawa, M., Aono, T. (2001b). A combination of calcium ionophore and puromycin effectively produces human parthenogenones with one haploid pronucleus. *Zygote*, 9(1), 83–88.
- Nardo, L. G., Gelbaya, T. A., Wilkinson, H., Roberts, S. A., Yates, A., Pemberton, P., Laing, I. (2009). Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1586–1593.
- Neal, S. A., Sun, L., Jalas, C., Morin, S. J., Molinaro, T. A., Scott, R. T. (2019). When next-generation sequencing-based preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) yields an inconclusive report: diagnostic results and clinical outcomes after re biopsy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(10), 2103–2109.
- Nicolaidis, P., Petersen, M. B. (1998). Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Human Reproduction*, 13(2), 313–319.
- Nohales-Córcoles, M., Sevillano-Almerich, G., di Emidio, G., Tatone, C., Cobo, A. C., Dumollard, R., de Los Santos Molina, M. J. (2016). Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Human Reproduction*, 31(8), 1850–1858.
- Oliva, M., Briton-Jones, C., Gounko, D., Lee, J. A., Copperman, A. B., Sekhon, L. (2021). Factors associated with vitrification-warming survival in 6167 euploid blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(10), 2671–2678.
- Ongeri, E. M., Bormann, C. L., Butler, R. E., Melican, D., Gavin, W. G., Echelard, Y., Krisher, R. L., Behboodi, E. (2001). Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different methods. *Theriogenology*, 55(9), 1933–1945.
- Ottolini, C. S., Newnham, L. J., Capalbo, A., Natesan, S. A., Joshi, H. A., Cimadomo, D., Griffin, D. K., Sage, K., Summers, M. C., Thornhill, A. R., Housworth, E., Herbert, A. D., Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Handyside, A. H., Hoffmann, E. R. (2015). Genome-wide maps of recombination and chromosome segregation in human oocytes and embryos show selection for maternal recombination rates. *Nature Genetics*, 47(7), 727–735.

- Ozil, J. P. (1990). The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*, 109(1), 117–127.
- Ozil, J. P., Markoulaki, S., Toth, S., Matson, S., Banrezes, B., Knott, J. G., Schultz, R. M., Huneau, D., Ducibella, T. (2005). Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal in the mouse. *Developmental Biology*, 282(1), 39–54.
- Paffoni, A., Brevini, T. A. L., Somigliana, E., Restelli, L., Gandolfi, F., Ragni, G. (2007). In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 87(1), 77–82.
- Paffoni, A., Paracchini, V., Ferrari, S., Scarduelli, C., Seia, M., Coviello, D. A., Ragni, G. (2011). Use of parthenogenetic activation of human oocytes as an experimental model for evaluation of polar body based PGD assay performance. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(5), 461–470.
- Panizza, S., Mendoza, M. A., Berlinger, M., Huang, L., Nicolas, A., Shirahige, K., Klein, F. (2011). Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. *Cell*, 146(3), 372–383.
- Parriego, M., Coll, L., Vidal, F., Boada, M., Devesa, M., Coroleu, B., Veiga, A. (2018). Inconclusive results in preimplantation genetic testing: go for a second biopsy? *Gynecological Endocrinology*, 35(1), 90–92.
- Pathak, J., Kharche, S., Goel, A. (2017). Effects of different activation protocols on cleavage rate and blastocyst production of caprine oocytes. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(4), 243–248.
- Pellestor, F., Andréo, B., Arnal, F., Humeau, C., Demaille, J. (2002). Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Human Reproduction*, 17(8), 2134–2145.
- Petr, J., Chmelíková, E., Krejčová, T., Řehák, D., Novotná, B., Jílek, F. (2010). Parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with a nitric oxide donor. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 45(3), 493–499.
- Plachot, M., Mandelbaum, J., de Grouchy, J. (1984). [In vitro parthenogenesis in the human species]. *Annals of Human Genetics*, 158–161.
- Polak de Fried, E., Ross, P., Zang, G., Divita, A., Cunniff, K., Denaday, F., Salamone, D., Kiessling, A., Cibelli, J. (2008). Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. *Fertility and Sterility*, 89(4), 943–947.

BIBLIOGRAFÍA

- Rechitsky, S., Strom, C., Verlinsky, O., Amet, T., Ivakhnenko, V., Kukhareno, V., Kuliev, A., Verlinsky, Y. (1999). Accuracy of Preimplantation Diagnosis of Single-Gene Disorders by Polar Body Analysis of Oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16(4), 192–198.
- Rechitsky, S., Verlinsky, O., Amet, T., Rechitsky, M., Kouliev, T., Strom, C., Verlinsky, Y. (2001). Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 183, 65–68.
- Rechitsky S., S., Kuliev, A., Tur-Kaspa, I., Morris, R., Verlinsky, Y. (2004). Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(2), 210–221.
- Rechitsky, S., Kuliev, A., Sharapova, T., Lazuk, K., Ozen, S., Barksy, I., Verlinsky, O., Tur-Kaspa, I., Verlinsky, Y. (2006). Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(1), 89–100.
- Rechitsky, S., Pomerantseva, E., Pakhalchuk, T., Pauling, D., Verlinsky, O., Kuliev, A. (2011). First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for de-novo mutations. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(4), 350–361.
- Reichmann, J., Nijmeijer, B., Hossain, M. J., Eguren, M., Schneider, I., Politi, A. Z., Roberti, M. J., Hufnagel, L., Hiiragi, T., Ellenberg, J. (2018). Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science*, 361(6398), 189–193.
- Revazova, E. S., Turovets, N. A., Kochetkova, O. D., Kindarova, L. B., Kuzmichev, L. N., Janus, J. D., Pryzhkova, M. v. (2007). Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning and Stem Cells*, 9(3), 432–449.
- Rhoton-Vlasak, G., Lu, P. Y., Barud, K. M., Dewald, G. W., Hammitt, D. G. (1996). Efficacy of calcium ionophore A23187 oocyte activation for generating parthenotes for human embryo research. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13(10), 793–796.
- Rinaudo, P., Massobrio, M., Pepperell, J. R., Keefe, D. L., Buradgunta, S. (1997). Dissociation between intracellular calcium elevation and development of human oocytes treated with calcium ionophore. *Fertility and Sterility*, 68(6), 1086–1092.
- Rogers, N. T., Hobson, E., Pickering, S., Lai, F. A., Braude, P., Swann, K. (2004). Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*, 128(6), 697–702.
- Rogers, N. T., Halet, G., Piao, Y., Carroll, J., Ko, M. S. H., Swann, K. (2006). The absence of a Ca(2+) signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. *Reproduction*, 132(1), 45–57.

- Roh, S., Malakooti, N., Morrison, J. R., Trounson, A. O., Du, Z. T. (2003). Parthenogenetic activation of rat oocytes and their development in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 15(1–2), 135–140.
- Ropers, H. H. (2012). On the future of genetic risk assessment. *Journal of Community Genetics*, 3(3), 229–236.
- Ross, P. J., Beyhan, Z., Lager, A. E., Yoon, S. Y., Malcuit, C., Schellander, K., Fissore, R. A., Cibelli, J. B. (2008). Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C zeta. *BMC Developmental Biology*, 8, 16.
- Rubio, C., Rodrigo, L., Mercader, A., Mateu, E., Buendía, P., Pehlivan, T., Vilorio, T., de Los Santos, M. J., Simón, C., Remohí, J., Pellicer, A. (2007). Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenatal Diagnosis*, 27(8), 748–756.
- Ruihuan, G., Zhichao, L., Song, G., Jing, F., Yijuan, S., Xiaoxi, S. (2021). Oocyte vitrification temporarily turns on oxidation-reduction process genes in mouse preimplantation embryos. *Reproductive Sciences*, 28(5), 1307–1315.
- Saadeldin, I. M., Moulavi, F., Swelum, A. A. A., Khorshid, S. S., Hamid, H. F., Hosseini, S. M. (2020). Vitrification of camel oocytes transiently impacts mitochondrial functions without affecting the developmental potential after intracytoplasmic sperm injection and parthenogenetic activation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(35), 44604–44613.
- Safier, L. Z., Zuccaro, M. v., Egli, D. (2020). Efficient SNP editing in haploid human pluripotent stem cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(4), 735–745.
- Sagi, I., Chia, G., Golan-Lev, T., Peretz, M., Weissbein, U., Sui, L., Sauer, M. v., Yanuka, O., Egli, D., Benvenisty, N. (2016). Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 532(7597), 107–111.
- Salvaggio, C. N., Forman, E. J., Garnsey, H. M., Treff, N. R., Scott, R. T. (2014). Polar body based aneuploidy screening is poorly predictive of embryo ploidy and reproductive potential. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(9), 1221–1226.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. (2002). PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15), 3533–3544.
- Schenk, M., Groselj-Strele, A., Eberhard, K., Feldmeier, E., Kastelic, D., Cerk, S., Weiss, G. (2018). Impact of polar body biopsy on embryo morphokinetics—back to the roots in preimplantation genetic testing? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(8), 1521–1528.

BIBLIOGRAFÍA

- Schuh, M., Ellenberg, J. (2007). Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*, 130(3), 484–498.
- Sengoku, K., Takuma, N., Miyamoto, T., Yamauchi, T., Ishikawa, M. (2004). Nuclear dynamics of parthenogenesis of human oocytes: Effect of oocyte aging in vitro. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 58(3), 155–159.
- Sette, C., Bevilacqua, A., Bianchini, A., Mangia, F., Geremia, R., Rossi, P. (1997). Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development*, 124(11), 2267–2274.
- Sheehan, C. B., Lane, M., Gardner, D. K. (2006). The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Human Reproduction*, 21(11), 2978–2984.
- Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (2018). Cribado y diagnóstico precoz de anomalías genéticas. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 61(6):605–629.
- Soler, N., Bautista-Llàcer, R., Escrich, L., Oller, A., Grau, N., Tena, R., Insua, M. F., Ferrer, P., Escribà, M. J., Vendrell, X. (2021). Rescuing monopronucleated-derived human blastocysts: a model to study chromosomal topography and fingerprinting. *Fertility and Sterility*, 116(2), 583–596.
- Stewart-Savage, J., Bavister, B. D. (1991). Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. *Molecular Reproduction and Development*, 30(4), 390–395.
- Surani, M. A. H., Barton, S. C. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science*, 222(4627), 1034–1036.
- Surani, M. A. H., Barton, S. C., Norris, M. L. (1986). Nuclear transplantation in the mouse: Heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*, 45(1), 127–136.
- Suzuki, H., Yang, X., Foote, R. H. (1994). Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 38(4), 421–430.
- Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., Lai, F. A. (2006). PLC ζ : A sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(2), 264–273.
- Swann, K., Yu, Y. (2008). The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 585–594.

- Swann, K., Lai, F. A. (2013). PLC ζ and the initiation of Ca²⁺ oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium*, 53(1), 55–62.
- Tachibana, M., Sparman, M., Sritanaudomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., Mitalipov, S. (2009). Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 461(7262), 367–372.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Woodward, J., Sanchis, D. M., Ma, H., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Kang, E., Lee, H. S., Ramsey, C., Masterson, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stouffer, R., Mitalipov, S. (2013). Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 493(7434), 627–631.
- Tarkowski, A. K. (1966). An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetic and Genome Research*, 5(6), 394–400.
- Taylor, A. S., Braude, P. R. (1994a). The early development and DNA content of activated human oocytes and parthenogenetic human embryos. *Human Reproduction*, 9(12), 2389–2397.
- Taylor, A. S., Braude, P. R. (1994b). Fertilization and embryology: The early development and DNA content of activated human oocytes and parthenogenetic human embryos. *Human Reproduction*, 9(12), 2389–2397.
- Taylor, T. H., Patrick, J. L., Gitlin, S. A., Michael Wilson, J., Crain, J. L., Griffin, D. K. (2014). Outcomes of blastocysts biopsied and vitrified once versus those cryopreserved twice for euploid blastocyst transfer. *Reproductive BioMedicine Online*, 29(1), 59–64.
- Tease, C., Hartshorne, G. M., Hultén, M. A. (2002). Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *The American Journal of Human Genetics*, 70, 1469–1479.
- Tian, S. J., Yan, C. L., Yang, H. X., Zhou, G. bin, Yang, Z. Q., Zhu, S. E. (2007). Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Animal Reproduction Science*, 101(3–4), 365–371.
- Timlin, C. L., Lynn, A., Wooldridge, L. K., Uh, K., Ealy, A. D., White, R. R., Lee, K., Mercadante, V. R. G. (2021). Physical parameters of bovine activated oocytes and zygotes as predictors of development success. *Zygote*, 29(5).
- Tiwari, M., Gupta, A., Sharma, A., Prasad, S., Pandey, A. N., Yadav, P. K., Pandey, A. K., Shrivastav, T. G., Chaube, S. K. (2018). Role of mitogen activated protein kinase and maturation promoting factor during the achievement of meiotic competency in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 123–129.

BIBLIOGRAFÍA

- Uranga, J. A., Pedersen, R. A., Arechaga, J. (1996). Parthenogenetic activation of mouse oocytes using calcium ionophores and protein kinase C stimulators. *International Journal of Developmental Biology*, 40(2), 515–519.
- Valbuena, D., Póo, M. E., Aguilar-Gallardo, C., Martínez, S., Cobo, A. C., Pellicer, A., Simón, C. (2012). Comparison of Cryotip vs. Cryotop for mouse and human blastomere vitrification. *Fertility and Sterility*, 97(1), 209–217.
- Vallejo, J., Gómez-Piquer, V., Tarín, J. (2003). Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 20(3), 117–187.
- Varga, E., Pataki, R., Lorincz, Z., Koltai, J., Papp, Á. B. (2008). Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. *Animal Reproduction Science*, 105(3–4), 226–233.
- Vecchio-Pagán, B., Blackman, S. M., Lee, M., Atalar, M., Pellicore, M. J., Pace, R. G., Franca, A. L., Raraigh, K. S., Sharma, N., Knowles, M. R., Cutting, G. R. (2016). Deep resequencing of CFTR in 762 F508del homozygotes reveals clusters of non-coding variants associated with cystic fibrosis disease traits. *Human Genome Variation*, 3, 16038.
- Vendrell, X., Escribà, M.J. (2021). Non-invasive PGT. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 8(2), 100101.
- Verlhac, M. H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H., Clarke, H. J. (1993). MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*, 158(2), 330–340.
- Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J., Strom, C. M. (1990). Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human Reproduction*, 5(7), 826–829.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Evsikov, S., White, M., Cieslak, J., Lifchez, A., Valle, J., Moise, J., Strom, C. M. (1992). Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenatal Diagnosis*, 12(2), 103–110.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidine, M., Lvakhnenko, V., Wolf, G., Kovalinskaya, L., White, M., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J., Valle, J., Ginsberg, N., Strom, C., Kuliev, A. (1995). Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Molecular Human Reproduction*, 10(7), 1923–1927.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidine, M., Ivakhnenko, V., Wolf, G., Kovalinskaya, L., White, M., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J., Valle, J., Ginsberg, N., Strom, C., Kuliev, A. (1996). Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13(2), 157–162.

- Verlinsky, Y., Kuliev, A. (1996). Preimplantation polar body diagnosis. *Biochemical and Molecular Medicine*, 58(1), 13–17.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Wolf, G., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J., Walle, J., White, M., Ginsberg, N., Strom, C., Kuliev, A. (1997). Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochemical and Molecular Medicine*, 62(2), 182–187.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Ivachnenko, V., Lifchez, A., Moise, J., Valle, J., Borkowski, A., Nefedova, J., Goltsman, E., Strom, C., Kuliev, A. (1999). Prepregnancy testing for single-gene disorders by polar body analysis. *Genetic Testing*, 3(2), 185–190.
- Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Evsikov, S., Wolf, G., White, M., Lifchez, A., Kaplan, B., Moise, J., Valle, J., Ginsberg, N., Strom, C., Kuliev, A. (2001a). Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 183(Suppl 1), 47–49.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Schoolcraft, W., Strom, C., Kuliev, A. (2001b). Preimplantation diagnosis for fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA*, 285(24), 3130–3133.
- Versieren, K., Heindryckx, B., Lierman, S., Gerris, J., de Sutter, P. (2010). Developmental competence of parthenogenetic mouse and human embryos after chemical or electrical activation. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(6), 769–775.
- Wang, J., Fan, H. C., Behr, B., Quake, S. R. (2012). Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell*, 150(2), 402–412.
- Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J. D. A., Munné, S. (2002). First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertility and Sterility*, 78(3), 543–549.
- Whittingham, D. (1980). Parthenogenesis in mammals. *Subject Strain Bibliography 1980*. 3405.
- Winston, N., Johnson, M., Pickering, S., Braude, P. (1991). Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertility and Sterility*, 56(5), 904–912.
- World Health Organization (2005). Control of genetic diseases.

BIBLIOGRAFÍA

- Wu, A. T. H., Sutovsky, P., Manandhar, G., Xu, W., Katayama, M., Day, B. N., Park, K. W., Yi, Y. J., Yan, W. X., Prather, R. S., Oko, R. (2007). PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12164–12175.
- Wulff, C. B., Gerds, T. A., Rode, L., Ekelund, C. K., Petersen, O. B., Tabor, A. (2016). Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: A national cohort of 147 987 singleton pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 47(1), 38–44.
- Yamano, S., Nakagawa, K., Nakasaka, H., Aono, T. (2000). Fertilization failure and oocyte activation. *The Journal of Medical Investigation*, 47(1-2), 1–8.
- Yew, N., Mellini, M. L., vande Woude, G. F. (1992). Meiotic initiation by the mos protein in *Xenopus*. *Nature*, 355(6361), 649–652.
- Yi, Y. J., Park, C. S. (2005). Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science*, 86(3–4), 297–304.
- Zech, N. H., Lejeune, B., Zech, H., Vanderzwalmen, P. (2005). Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: Effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(3), 355–361.
- Zhang, S., Tan, K., Gong, F., Gu, Y., Tan, Y., Lu, C., Luo, K., Lu, G., Lin, G. (2014). Blastocysts can be rebiopsied for preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1641–1645.
- Zhang, S., Xiang, S., Yang, J., Shi, J., Guan, X., Jiang, J., Wei, Y., Luo, C., Shi, D., Lu, F. (2019). Optimization of parthenogenetic activation of rabbit oocytes and development of rabbit embryo by somatic cell nuclear transfer. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 54(2), 258–269.
- Zhang, X., Trokoudes, K. M., Pavlides, C. (2009). Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula and blastocyst stage. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(4), 526–531.
- Zhong, C., Zhang, M., Yin, Q., Zhao, H., Wang, Y., Huang, S., Tao, W., Wu, K., Chen, Z. J., Li, J. (2016). Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Research*, 26(6), 743–746.
- Zhu, J., Telfer, E. E., Fletcher, J., Springbett, A., Dobrinsky, J. R., de Sousa, P. A., Wilmut, I. (2002). Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 66, 635–641.

Zhuan, Q., Du, X., Bai, J., Zhou, D., Luo, Y., Liu, H., Sun, W., Wan, P., Hou, Y., Li, J., Fu, X. (2022). Proteomic profile of mouse oocytes after vitrification: A quantitative analysis based on 4D label-free technique. *Theriogenology*, *187*, 64–73.

ANEXOS

Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de IVI-RMA Valencia

**CERTIFICADO DEL CEIC IVI VALENCIA SOBRE EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
“ESTUDIO PILOTO: DIAGNÓSTICO GENÉTICO OVOCITARIO
MEDIANTE ANÁLISIS DEL PRIMER CORPÚSCULO POLAR” 1602-VLC-008-ME**

Miguel Moreno Albiñana, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica de IVI Valencia,

CERTIFICA

I.- Que este Comité ha evaluado la propuesta del Promotor del Proyecto de Investigación denominado:

- Título: *“Estudio Piloto: Diagnóstico Genético Ovocitario mediante Análisis del Primer Corpúsculo Polar”*
- Código del Protocolo del Promotor / Promotor: 1602-VLC-008-ME / IVI Valencia, S. L.
- Investigador Principal: Dr. María José Escribá Pérez
- Fecha del Protocolo: febrero 2016
- Hoja de Información al Sujeto / Consentimiento Informado: febrero 2016

II.- Que tomando en consideración:

- La pertinencia del Estudio, idoneidad de investigadores y colaboradores, idoneidad de instalaciones, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, de la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Asistida, el Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos; y las normas que las desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.

En su virtud, este Comité emite **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho Estudio.

Lo que firmo en Valencia, a 23 de febrero de 2016

FDO.: MIGUEL MORENO ALBIÑANA
SECRETARIO CEIC IVI VALENCIA

Hoja de información al paciente y Consentimiento Informado



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del estudio:

“Estudio Piloto: Diagnóstico Genético Ovocitario mediante Análisis del Primer Corpúsculo”

Código del estudio:

1602-VLC-008-ME

Promotor:

Instituto Universitario IVI Valencia

Investigador Principal:

Dra. M^a José Escribá Pérez

DNI: 24.344.244-D

e-mail: mariajose.escriba@ivi.es

Embrióloga.

Laboratorio de Fecundación in Vitro. Instituto Universitario IVI Valencia

INTRODUCCION

Nos dirigimos a Vd. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité de Ética, en el que se le invita a participar.

Nuestra intención es tan sólo que Vd. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio. Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, previamente a la realización de la punción folicular.



DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Usted accede a esta hoja informativa como mujer que acude a IVI Valencia con deseo de ser donante de ovocitos con fines reproductivos. Sin embargo, pese a cumplir con todos los requisitos necesarios para ser donante, no es posible incluirla en el programa de donación de óvulos por causas genéticas, tal y como recoge la ley española sobre técnicas de reproducción asistida (Ley 14/2006) en su artículo 5.6.

Tras haberle explicado la repercusión que sus antecedentes genéticos tienen para su salud y la de su descendencia, ponemos en su conocimiento e invitamos a participar en el proyecto de investigación Biomédica: “Estudio Piloto: Diagnóstico Genético Ovocitario mediante Análisis del Primer Corpúsculo Polar”.

Este proyecto de investigación tiene como objetivo obtener ovocitos maduros mediante estimulación ovárica y punción folicular a fin de analizarlos genéticamente sin que sean, en ningún caso empleado con fines reproductivos ni tampoco fecundados in vitro.

En síntesis, el trabajo de investigación que aquí se plantea, pretende extraer una parte del ovocito maduro (biopsia del corpúsculo polar), analizarlo genéticamente a fin de comprobar si dicho ovocito contiene o no la mutación genética de la que usted es portadora. Posteriormente, induciremos en tales ovocitos el desarrollo pre-embriionario de forma artificial, sin ser fecundado, a fin de validar el análisis genético realizado previamente.

Es también objeto de este proyecto estudiar el efecto que la vitrificación de los ovocitos biopsiados ejerce sobre su supervivencia y potencial de desarrollo posterior, empleando el modelo antes mencionado.

Para ello, se le solicita autorización para obtener una muestra de sangre mediante extracción convencional a fin de realizar estudios genéticos y desarrollar protocolos de diagnóstico genético asociados a la mutación genética de la que usted es portadora. También le solicitamos también autorización para recuperar los ovocitos obtenidos maduros tras la punción folicular, biopsiarlos, vitrificarlos, inducirles una activación artificial, cultivarlos durante tres días en laboratorio y analizarlos genéticamente a fin de poner a punto la técnica de diagnóstico genético ovocitario. No existiendo otro fin para ellos.

LAS MUESTRAS

A. Objetivo de la recolección de muestras:

Para la realización de este proyecto de investigación requerimos de 10 ML de sangre periférica, extraída por el procedimiento habitual, a fin de extraer su ADN y realizar estudios genéticos y la puesta a punto del protocolo de diagnóstico genético de la mutación de la que usted es portadora.

Además, se requiere de ovocitos, obtenidos mediante estimulación ovárica y punción folicular con la finalidad de desarrollar un protocolo de diagnóstico genético en ovocitos que ayude, en un futuro, a seleccionar aquellos ovocitos libres de mutaciones a fin de generar descendencia sana para la mutación objeto de estudio.

B. Método de obtención de las muestras:

La obtención de ovocitos para este estudio no supone ninguna molestia, inconveniente o riesgos adicionales a los que el equipo médico le ha explicado y que usted con la firma de este consentimiento, asiente a someterse. Referente al protocolo de estimulación ovárica y punción folicular, deberá acudir a

la clínica IVI Valencia en sesiones periódicas, establecidas por su médico a fin de realizar controles ecográficos y séricos del progreso de su estimulación ovárica, velando por su salud.

En el momento en que el equipo médico lo considere adecuado, será programada para una punción folicular bajo anestesia general, siendo las molestias y riesgos asociados a este procedimiento, igualmente explicados por el equipo médico y que usted acepta a someterse con la firma de este consentimiento, así como de aquéllos relativos a la donación de óvulos y anestesia. Por otro parte, las intervenciones que sobre sus ovocitos vayan a realizarse, no supondrán, en absoluto, molestias o inconvenientes para usted.

Desde el momento de la punción, los ovocitos obtenidos pertenecerán a IVI Valencia a fin de desarrollar esta investigación, no existiendo otro fin.

C. Método de identificación de las muestras:

Por lo que respecta al método de identificación de las muestras relativas a su información genética, éstas serán identificables, garantizándole que mantendremos la confidencialidad de los datos, de acuerdo con lo establecido en la LODP (Ley Orgánica de Protección de Datos), ya que los únicos concededores de dicha relación serán el Investigador principal y el personal adscrito a este proyecto de investigación. Por otro lado, los ovocitos y los productos biológicos de ellos obtenidos serán anonimizados mediante la asignación de un código, que será su única identificación. El código asignado no permitirá extraer ningún tipo de información sobre su identidad o patología.

D. Conservación:

El Investigador principal del proyecto custodiará el correcto manejo de sus muestras y sus datos genéticos hasta la finalización del proyecto, estimada en 3 años, destruyendo todas las muestras a la finalización del mismo.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Aceptando participar en este estudio, Vd. no van a obtener un beneficio inmediato con la consecución de este estudio, ni van a ver perjudicada su salud o reserva ovárica por participar en el mismo. No obstante, colaborará a beneficiar, en un futuro a parejas que requieran de esta metodología.

Referente a los riesgos y molestias derivados de la participación en este proyecto indicarle que tanto la obtención de la muestra de sangre para estudios genéticos, así como la obtención de los ovocitos tras estimulación y punción, no supone ningún riesgos o molestias adicional para usted, su salud o su posterior capacidad reproductiva.

SEGURO

El Promotor del Estudio, esto es, IVI Valencia, dispone de una Póliza de Seguros de Responsabilidad Civil en vigor que se ajusta a la legislación vigente y con cobertura para compensar e indemnizar supuestos de



menoscabo de la salud o lesiones de los sujetos, que pudieran producirse en relación con su participación en el Estudio.

CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal o su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo como nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias, al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

Las muestras de sangre y ADN de ellas obtenidas, así como los ovocitos y subproductos derivados de la activación ovocitaria son propiedad de IVI Valencia quien las custodiará y guardará durante la ejecución de este proyecto, que se estima en 3 años.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto, percibiendo una compensación económica establecida por Ley e idéntica a la recibida tras un acto de donación de óvulos con fines reproductivos (1.000 euros), en concepto de transporte y/o molestias ocasionadas, habiéndole sido explicado que la donación de ovocitos con fines de investigación es un acto altruista y gratuito.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información relevante referente al estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se



produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.





CONSENTIMIENTO INFORMADO

(a rellenar por el paciente)

Para investigación con muestras biológicas humanas ANONIMIZADAS

Código: **1602-VLC-008-ME**

Yo

con Nº de Historia

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Investigador/Médico del centro

Quien me ha explicado los pormenores del mismo, en particular de:

1. La finalidad de la investigación o de la línea de investigación para la que consiento.
2. De los beneficios esperados con la misma.
3. De los posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras.
4. De la identidad del responsable de esta investigación, el Dr.

.....

Investigador/Médico del centro

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información que se me ha entregado.



Análisis genético

Dado que se va a proceder a realizar pruebas genéticas a las muestras biológicas, se me ha informado debidamente de:

1. Que la finalidad del análisis genético para el que consiento es ...
.....
2. Que el análisis será realizado en las instalaciones de
..... en la ciudad de, y que al término del mismo la muestra biológica será:
 - destrucción de la muestra.
 - Otros destinos (indicar cuál):

Asimismo se me informa que, puesto que en este Proyecto las muestras biológicas van a ser anonimizadas, no será posible que se me informe acerca de los resultados concretos de estos análisis genéticos o posibles descubrimientos inesperados, ni que se me suministre el preceptivo asesoramiento genético posterior.

Firma del paciente

Firma del investigador

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:





CONSENTIMIENTO INFORMADO

(a rellenar por el paciente)

Para investigación con muestras biológicas humanas ANONIMIZADAS

Código: **1602-VLC-008-ME**

Yo

con Nº de Historia

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Investigador/Médico del centro

Quien me ha explicado los pormenores del mismo, en particular de:

1. La finalidad de la investigación o de la línea de investigación para la que consiento.
2. De los beneficios esperados con la misma.
3. De los posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras.
4. De la identidad del responsable de esta investigación, el Dr.

.....

Investigador/Médico del centro

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones.
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información que se me ha entregado.



Análisis genético

Dado que se va a proceder a realizar pruebas genéticas a las muestras biológicas, se me ha informado debidamente de:

1. Que la finalidad del análisis genético para el que consiento es ...
.....
2. Que el análisis será realizado en las instalaciones de
..... en la ciudad de, y que al término del mismo la muestra biológica será:
 - destrucción de la muestra.
 - Otros destinos (indicar cuál):

Asimismo se me informa que, puesto que en este Proyecto las muestras biológicas van a ser anonimizadas, no será posible que se me informe acerca de los resultados concretos de estos análisis genéticos o posibles descubrimientos inesperados, ni que se me suministre el preceptivo asesoramiento genético posterior.

Firma del paciente

Firma del investigador

Nombre:

Nombre:

Fecha:

Fecha:



RESUMEN

El desarrollo y uso de nuevas tecnologías de cribado genético informan que la mayoría de la población es portadora, en heterocigosis, de alguna variante patogénica causante de enfermedades monogénicas; generando la mitad de sus gametos libres de la mutación y la otra mitad portadores.

En el ámbito de la reproducción humana asistida, el diagnóstico molecular de los ovocitos permitiría seleccionar aquéllos libres de una variante patogénica particular, previamente a la fecundación; maximizando las probabilidades de obtener descendencia sana o portadora, según el escenario particular de cada pareja. Actualmente, el estudio molecular directo del ovocito fecundable no es posible, ya que su diagnóstico implica su compromiso en viabilidad.

Alternativamente, la inferencia diagnóstica es posible mediante estudio del primer corpúsculo polar (CP1): una pequeña estructura, rodeada de membrana y con escaso citoplasma, localizada en el espacio perivitelino del ovocito maduro MII; es resultado de la primera división reduccional de la meiosis, presentando un haplotipo alélicamente complementario a la información contenida en el ovocito MII, con la que forma el genotipo de un individuo. El CP1 no participa en el proceso reproductivo y contiene, teóricamente, cromosomas homólogos; siendo haploide (n), y estando cada homólogo constituido por dos cromátidas hermanas ($2C$).

El ovocito de prácticamente todas las especies de mamífero es ovulado en metafase de la segunda meiosis; permaneciendo en dicho secuestro hasta que el espermatozoide fecundante induzca la reanudación, culminación de la meiosis II, remodelación de la cromatina espermática y el inicio del desarrollo embrionario. La resolución de la meiosis ovocitaria comprende la segregación equitativa de las cromátidas hermanas, generando el segundo corpúsculo polar (CP2) y el pronúcleo materno (PNM); ambos conteniendo un haplotipo 23,X.

Alternativamente al espermatozoide fecundante, un estímulo eficiente y artificial puede inducir la respuesta ovocitaria de activación sin participación espermática;

permitiéndose la generación de constructos humanos uniparentales maternos o partenogenotas. El desarrollo partenogenético, aunque limitado y no dando en ningún caso gestaciones a término, progresa en las mitosis iniciales dando lugar a células, morfológicamente similares a las blastómeras, denominadas partenocitos.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal poner a punto y validar una metodología de test genético preconcepción (TGPC) ovocitario, en asociación a enfermedades monogénicas, mediante biopsia del CP1, empleando el modelo partenogenota. Para ello, planteamos como objetivos secundarios la puesta a punto de la metodología de biopsia de CP1 y valoración de su capacidad de inferencia diagnóstica mediante genotipado; cuantificación que requiere del análisis y estudio de las tríadas meióticas generadas por partenogénesis (CP1, CP2 y partenogenota o partenocito).

Los ovocitos se obtuvieron de mujeres rechazadas del programa de donación de óvulos con fines reproductivos, debido a su condición de portadoras en heterocigosis de alguna variante patogénica conocida. Tras la estimulación ovárica controlada, los ovocitos se recuperaron, seleccionando un total de 279 MII. Un conjunto de 225 MII, obtenidos de 6 mujeres, se destinaron a la puesta a punto del protocolo de biopsia de CP1 (estudio 1); por su parte, 54 MII de dos donantes fueron empleados para la constitución y análisis genético de las tríadas meióticas (estudio 2). Estas tríadas analizadas proceden de ovocitos que fueron recuperados de la donante #7; una mujer sana, portadora en heterocigosis de la variante patogénica c.1345 C>T (p.Arg499Trp), localizada en el gen *F9* y responsable de la hemofilia B. Por su parte, la donante #8 es una mujer sana, portadora igualmente en heterocigosis de la variante c.1521_1523delCTT o variante dF508 (p.Phe508delPhe), localizada en el gen *CFTR* y responsable de la fibrosis quística.

A lo largo del primer estudio, el desarrollo técnico del protocolo de diagnóstico genético ovocitario mediante análisis del CP1 se ha llevado a cabo empleando ovocitos frescos. Actualmente, su aplicación requiere de la criopreservación individualizada de los ovocitos biopsiados a fin de preservar su viabilidad y competencia, en tanto que se obtienen los resultados moleculares. Adicionalmente, en este primer estudio, decidimos incluir ovocitos MII previamente criopreservados; como aquél posible escenario que incluyera mujeres que, habiendo preservado su fertilidad, solicitaran el diagnóstico genético de sus ovocitos.

En este contexto, el estudio 1 incluyó ovocitos frescos biopsiados (grupo 1); biopsiados con posterior vitrificación (grupo 2) y control (grupo 3). Por lo que respecta a los ovocitos vitrificados, se aleatorizaron en 4 grupos: biopsiados (grupo 4); biopsiados con posterior vitrificación (grupo 5); control de una vitrificación (grupo 6); y control de dos rondas de vitrificación (grupo 7); estos dos últimos sin biopsia de CP1.

La vitrificación individual de cada ovocito se realizó 2 horas después de la decumulación, o bien inmediatamente después de la biopsia de CP1, según la metodología de Cryotop®. Los ovocitos criopreservados fueron almacenados por un mínimo de 15 días. Tras este tiempo, se desvitrificaron siguiendo también la metodología de Cryotop® y cultivados por 2 horas, momento en que se evaluó su supervivencia.

La biopsia de CP1 se realizó mediante técnicas de micromanipulación 2 horas tras la decumulación en los ovocitos frescos o tras la desvitrificación en aquéllos criopreservados.

En función del grupo experimental, 2 horas después de la desvitrificación o biopsia del CP1, el número de MII supervivientes fue registrado y artificialmente activados. La activación ovocitaria artificial (AOA) consistió en una incubación

RESUMEN

seriada en ionóforo de calcio (A23187, 5 minutos) y puromicina (5 horas). Transcurrido este tiempo, los ovocitos fueron individualmente cultivados en sistema time-lapse, a 37 °C, 6% CO₂ y 5% de O₂ en aire y sin humedad.

Tras 16-20 horas, se contabilizaron aquéllos ovocitos que además de haber expulsado el CP2 presentaban un único pronúcleo (1PN); respuesta de activación ovocitaria normal (NOAR). En el estudio 2, adicionalmente, se seleccionaron aquéllos ovocitos con NOAR para biopsiar el CP2, devolviendo a continuación el partenogenota al cultivo. En día 3 de desarrollo, el cultivo cesó y aquéllos partenogenotas que contuviesen 6 o más células y menos de un 15-20% de fragmentación fueron biopsiados y los partenocitos aislados. De cada partenogenota, 1-2 partenocitos se destinaron al análisis de ploidía mediante FISH y los restantes partenocitos fueron individualmente incluidos en tubos de PCR, al igual que sus respectivos CP1 y CP2. Las tríadas identificadas fueron remitidas al laboratorio de análisis genético para su genotipado, a fin de identificar el haplotipo asociado o no asociado a la variante patogénica en cada unidad de la tríada.

En una primera fase del estudio 1, un total de 68 ovocitos frescos y 67 criopreservados fueron aleatoriamente asignados a los grupos experimentales. Todos los ovocitos procesados sobrevivieron a la biopsia del CP1 y, en promedio, 95,8% sobrevivieron a la vitrificación; independientemente de haber experimentado uno o dos procedimientos de criopreservación. Sin embargo, la vitrificación de ovocitos biopsiados supuso una merma significativa en las tasas de supervivencia, rindiendo en promedio un 50,9%, independientemente del origen fresco o vitrificado.

Por su parte, la tasa de NOAR como variable diagnóstica de competencia ovocitaria fue variable en función del número de vitrificaciones más que de la aplicación adicional de la biopsia de CP. Los ovocitos frescos mostraron una media de NOAR del 70%, comparable en todos los grupos; lo que implica que la biopsia

no ejerce ningún efecto sobre la tasa de activación. No obstante, el origen vitrificado de los ovocitos afecta a la tasa de NOAR; siendo más llamativa si se replica este proceso (50% vs. 88,9%; respectivamente).

De los resultados obtenidos en esta primera fase del estudio 1 se deduce que: (i) las tasas de supervivencia ovocitaria a la vitrificación están fuertemente condicionadas por la previa biopsia del CP1; (ii) la aplicación de una segunda vitrificación no compromete la ulterior supervivencia ovocitaria; (iii) la biopsia de CP1 no afecta a la tasa de NOAR; (iv) el origen vitrificado de los ovocitos a biopsiar, aumenta las tasas de NOAR.

En la segunda fase del estudio 1, se incluyeron algunas modificaciones en la metodología de biopsia y en el protocolo de AOA. El nuevo protocolo fue testado en 90 ovocitos; siendo 40 de ellos de origen fresco y 50 vitrificados. Concretamente, la modificación en el protocolo de biopsia de CP1 consistió en disminuir el tamaño del orificio practicado en la zona pelúcida de 20-25 μm a 10-15 μm . Por su parte, la modificación en el protocolo de AOA conllevó una reducción en la concentración de ionóforo de calcio (A23187) de 8 μM a 6 μM .

Estas modificaciones incrementaron notablemente la supervivencia de los ovocitos biopsiados a la vitrificación, pasando de un 50,9% a un 81,8%; no observándose modificaciones en la tasa de supervivencia en el resto de ovocitos criopreservados en origen experimentales (fase 1: 95,8% y fase 2: 87,8%). Por otro lado, aumentaron las tasas de NOAR en todos grupos, equiparándolas al grupo control; siendo la tasa de NOAR global del 80%. Así, de este primer estudio podemos concluir que hemos logrado con éxito poner a punto la metodología del TGPC ovocitario.

El estudio 2 recogido en esta tesis doctoral tiene por objeto la validación del TGPC ovocitario, determinando la inferencia del contenido genético del ovocito a partir del análisis genético de las tríadas meióticas (CP1, CP2 y partenocitos). Para ello,

realizamos un estudio de informatividad de las donantes #7 y #8. A tal efecto, se evaluó la idoneidad de la batería de marcadores genéticos disponible para el estudio de segregación alélica y definir las fases. Tras la confirmación y caracterización de la variante patogénica, se secuenciaron los *loci* interrogados; se desarrolló el protocolo molecular asociado al diagnóstico genético en célula única. Según la donante, el genotipado de las tríadas meióticas se llevó a cabo con diferentes protocolos moleculares.

En las muestras procedentes de la donante #7, portadora de la variante patogénica en *F9*, se realizó una amplificación inespecífica de todo el genoma (WGA). A continuación, una amplificación específica por PCR mediante oligos de la variante de estudio rs757996262 y 2 polimorfismos, rs422187 y rs6048, localizados en el lado centromérico. Posteriormente, se realizó una amplificación específica en una primera PCR seguida de una amplificación para incluir los *barcodes*. Seguidamente se visualizaron los resultados y se realizó la secuenciación masiva, permitiendo proceder al genotipado de las muestras. Por otra parte, las muestras de la donante #8, portadora de la variante responsable de la fibrosis quística, se sometieron a una primera amplificación específica mediante PCR “heminested” de la región donde se encuentra la variante patogénica (dF508) y de los marcadores microsatélite informativos y flanqueantes a ella (D7S633, D7S677, IVS17bTA, IVS8CA, 25xAC, 30xAC, CFTR-18xAC), utilizando oligonucleótidos fluorescentes. A continuación, se realizó la electroforesis de las muestras y la detección fluorescente de los fragmentos obtenidos. Por último, se procedió al análisis bioinformático mediante un software específico. Además, también se realizó un análisis de microsatélites para control de ploidía en el cromosoma X (DXS8025, DXS1068) y 18 (D18S61, D18S1127).

En este segundo estudio, la eficiencia global diagnóstica del CP1 depende de varios aspectos: el rendimiento técnico y el diagnóstico.

En la donante #7, obtuvimos resultado genético de la tríada completa en 17 de los 25 ovocitos MII (rendimiento: 68%); un rendimiento superior al obtenido en la donante #8, donde 10 tríadas de 29 ovocitos MII tuvieron resultado genético completo (rendimiento: 34,5%). Estas diferencias en el rendimiento técnico parecen deberse a la diferente tasa de NOAR obtenida (96% en la donante #7 y 65,5% en la donante #8) o al fallo de amplificación genética (16% para la donante #7 y del 10% en el caso de la donante #8).

Por lo que respecta al rendimiento diagnóstico, la posibilidad de inferir el haplotipo ovocitario mediante estudio del CP1, es fuertemente dependiente del grado de heterocigosidad de la región génica interrogada, habiéndose obtenido un 41,2% para el gen *F9* y un 90% para el gen *CFTR*; resultando, en última instancia, la proporción esperada y observada de las variantes wild-type y patogénicas según los principios de segregación mendeliana. Las diferencias observadas en el grado de heterocigosidad pueden depender del protocolo de análisis molecular utilizado. No obstante, la detección de un CP1 heterocigoto puede atribuirse a la recombinación del alelo estudiado o bien a un patrón de segregación anómala, concretamente una separación precoz de las cromátidas hermanas en la meiosis I. El origen de esta heterocigosidad, si bien no puede esclarecerse con la aproximación molecular aquí ejecutada, creemos que la recombinación es el origen más probable.

Debido a la elevada tasa de heterocigosidad del CP1, la inferencia del contenido genético del ovocito mediante el CP1 fue posible en poco más de la mitad de los ovocitos de la donante #7, rindiendo una sensibilidad y especificidad del 80%. Sin embargo, en la donante #8 solamente pudimos inferir el haplotipo ovocitario en un caso (10%) debido a la elevada tasa de heterocigosidad de CP1.

Por tanto, aunque la biopsia y análisis de CP1 es técnicamente posible, el escaso rendimiento diagnóstico obtenido cuestiona su posible traslación clínica; siendo necesario completar dicha información con aquella derivada del CP2. En nuestro

RESUMEN

caso particular, esta doble información aumentó la sensibilidad y especificidad a casi el 90%, para la donante #7; y el 100% para la donante #8.

Finalmente, y consecuencia del estudio de la tercera unidad meiótica, planteamos una nueva estrategia: el estudio directo (y no por inferencia) del elemento partícipe de la fecundación en un nuevo formato, el partenocito. Tras la AOA y cultivo, los partenogenotas contienen una media de siete partenocitos; siendo el genotipo de todos ellos idéntico; resultando ser, *a priori*, réplicas del pronúcleo materno. De este modo, nos planteamos si la partenogénesis constituiría en sí misma un método de clonación gamética y, por tanto, un novedoso y transgresor abordaje de diagnóstico genético preconcepción, que permitiría seleccionar aquéllos orígenes maternos exentos de aneuploidías o con un determinado genotipo para una futura y ulterior fecundación.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA