

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALENCIA

“San Vicente Mártir”

**UNA PROPUESTA ÉTICAMENTE ACEPTABLE PARA LA
PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS ASOCIADAS
AL ADN MITOCONDRIAL.**

Máster Oficial en Bioética

Presentado por:

Dña. Lucía Gómez Tatay

Director:

Dr. D. José Miguel Hernández Andreu

Valencia, a 16 de Junio de 2014

D. José Miguel Hernández Andreu

Profesor de la Universidad Católica de Valencia

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: “Propuesta ética en la prevención de enfermedades hereditarias asociadas al ADN mitocondrial”, ha sido realizado bajo mi dirección por la alumna Dña. Lucía Gómez Tatay

Valencia, 16 de Junio de 2014

Índice

RESUMEN	p. 5
1. INTRODUCCIÓN	p. 7
1.1 Mitocondrias y ADN mitocondrial	p. 8
1.2 Transmisión variable de la heteroplasmia	p. 10
1.3 Enfermedades mitocondriales	p. 15
1.3.1 Diagnóstico	p. 18
1.4 Prevención de la transmisión de desórdenes del ADNmt	p. 20
1.4.1 Diagnóstico prenatal (PND)	p. 21
1.4.2 Diagnóstico genético preimplantacional (PGD)	p. 24
1.4.3 Transferencia citoplasmática (CT)	p. 29
1.4.4 Transferencia nuclear (NT)	p. 31
1.4.5 <i>Germinal Vesicle Transfer</i> (GVT)	p. 32
1.4.6 <i>Pronuclear Transfer</i> (PNT)	p. 34
1.4.7 <i>Maternal Spindle Transfer</i> (MST)	p. 35
1.4.8 <i>Aggregated Chromosomes Transfer</i> (ACT)	p. 36
1.5 Marco jurídico y normativo de la PNT y la MST	p. 37
2. OBJETIVOS	p. 39
3. MATERIAL Y MÉTODOS	p. 41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	p. 45
4.1 Consideraciones previas al análisis ético	p. 46
4.1.1 El estatuto biológico del embrión humano	p. 46
4.1.2 Ética de la procreación humana	p. 47
4.1.3 Valoración ética de la fecundación <i>in vitro</i> con transferencia de embriones (FIVET)	p. 48

4.1.4 Aspectos éticos de la donación de mitocondrias	p. 49
4.1.4.1 Manipulación genética de la línea germinal	p. 49
4.1.4.2 Relación receptor-donante	p. 51
4.2 Donación de óvulos y adopción	p. 52
4.3 Diagnóstico prenatal (PND)	p. 52
4.4 Diagnóstico genético preimplantacional (PGD)	p. 53
4.5 Transferencia citoplasmática (CT)	p. 54
4.6 Transferencia nuclear (NT)	p. 55
4.7 <i>Germinal Vesicle Transfer</i> (GVT)	p. 56
4.8 <i>Pronuclear Transfer</i> (PNT)	p. 56
4.9 <i>Maternal Spindle Transfer</i> (MST)	p. 57
4.10 <i>Aggregated Chromosomes Transfer</i> (ACT)	p. 57
4.11 Transferencia intratubárica de gametos (GIFT)	p. 57
4.12 Low tubal oocyte transfer (LTOT)	p. 58
5. CONCLUSIONES	p. 60
6. BIBLIOGRAFÍA	p. 63
7. ANEXO 1	p. 79

RESUMEN

A día de hoy, las enfermedades debidas a alteraciones en el ADNmt no tienen cura. No obstante, existe una variedad de técnicas, más o menos desarrolladas, que podrían evitar la transmisión madre-hijo de estas enfermedades hereditarias. Sin embargo, estas técnicas requieren de la manipulación y destrucción de numerosos embriones y vulneran la unidad procreación-sexualidad.

En este trabajo se revisan las distintas técnicas disponibles para posteriormente desarrollar una valoración ética de las mismas. Así, se definieron como moralmente inaceptables el diagnóstico genético preimplantacional (PGD), la transferencia nuclear (NT) y la *pronuclear transfer* (PNT). La transferencia citoplasmática (CT) y la *aggregated chromosomes transfer* (ACT), por su parte, no son éticamente ilícitas en sí mismas, pero sí lo es su aplicación práctica tal y como se desarrollaría actualmente. En cuanto al diagnóstico prenatal (PND), puede darse un doble uso del mismo, bueno o malo, pero su aplicabilidad es limitada. Finalmente, la *germinal vesicle transfer* o *injection* (GVT/I) y la *maternal spindle transfer* (MST) no presentan problemas éticos por sí mismas y su aplicación en este campo podría ser lícita siempre y cuando se le asociara una técnica de reproducción asistida moralmente aceptable, como pueden ser la transferencia intratubárica de gametos (GIFT) o la *low tubal oocyte transfer* (LTOT).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mitocondrias y ADNmt

Las mitocondrias son pequeños orgánulos presentes en el citoplasma de la mayoría de células eucariotas. Su principal función es la producción de energía celular mediante un sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), aunque también tienen un papel importante en otros procesos vitales, como la señalización por calcio, la regulación del metabolismo celular, el desarrollo embrionario o la muerte celular programada (1).

Estos orgánulos contienen su propio ADN, el llamado ADN mitocondrial (ADNmt), que es distinto del ADN nuclear (2). Pueden existir desde unos cientos hasta varios miles de copias de este ADNmt en cada célula, número que probablemente esté sujeto a los requerimientos energéticos de cada tipo celular (3). El ADNmt contiene un 93% de región codificante; no contiene regiones intrónicas y algunos genes se superponen unos con otros. Por otra parte, el código genético mitocondrial es ligeramente distinto del nuclear. Se trata de moléculas de ADN de doble hebra circular que en humanos contienen 37 genes, es decir, aproximadamente un 0.1% del genoma total, cuya función parece estar restringida al ámbito mitocondrial. De estos genes, 13 codifican para un polipéptido implicado en la cadena respiratoria (Fig. 1), 22 para ARNts y 2 para ARNr, todos encargados de la traducción de estos 13 péptidos (4).

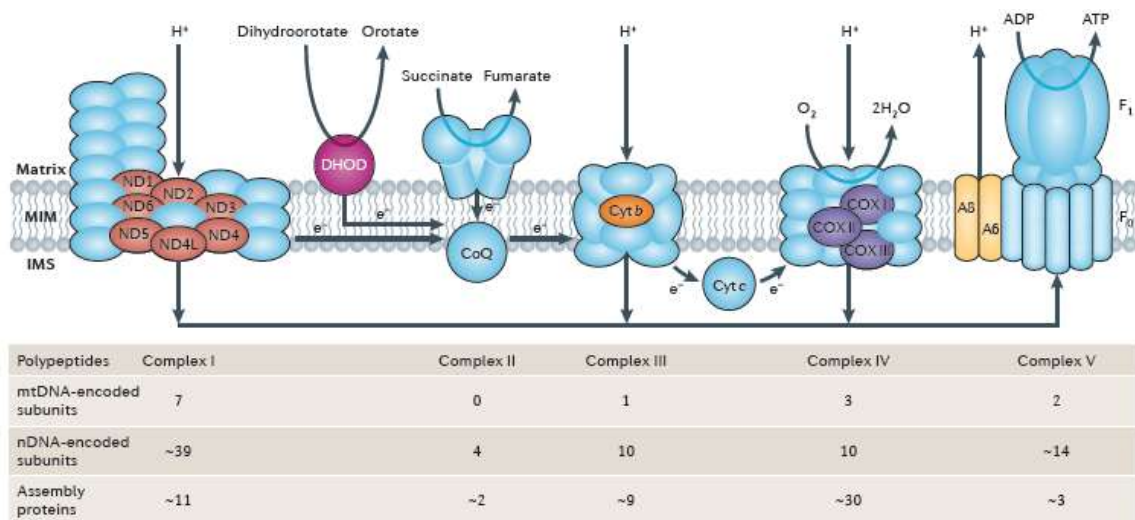


Figura 1. Cadena respiratoria humana. El sistema OXPHOS consta de cinco complejos y dos transportadores de electrones, el coenzima Q y el citocromo C. Los complejos I, III, IV y V están formados por subunidades codificadas por ambos genomas, el nuclear (color azul claro) y el mitocondrial (color rojo, naranja, azul oscuro y amarillo), mientras que el complejo II está codificado exclusivamente por el ADNn. DHOD es un enzima codificado por el ADNn que transmite electrones al CoQ. *Modificado de (5).*

Existen distintos subgrupos estables de ADNmt en la población, conocidos como haplogrupos. Se diferencian por determinadas variaciones en su secuencia, la mayoría de las cuales se produjeron hace más de 10000 años y se han ido transmitiendo a lo largo de las generaciones. Más del 95% de los europeos pertenecen a 1 de 10 haplogrupos mayoritarios (H, J, T, U, K, M, I, V, W, o X) (6). Aunque estas variaciones no son perjudiciales, razón por la cual se han fijado en la población, diferentes haplogrupos parecen estar asociados con enfermedades como la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (7), Parkinson (8), Alzheimer (9), (10) o degeneración macular asociada a la edad (11), aunque esta relación todavía no se puede afirmar con certeza (5).

El mantenimiento mitocondrial, así como el cumplimiento de sus funciones, no es autosuficiente, sino que depende del genoma nuclear. Así, la replicación del ADNmt, su empaquetamiento en nucleoides (complejos ADN-proteicos), su transcripción y su traducción, son procesos que dependen, en mayor o menor medida, del ADN nuclear (12). Por otra parte, los procesos de fusión y fisión mitocondrial, que posibilitan la cooperación intermitocondrial y la compartimentalización organular respectivamente, están controlados por productos que provienen, en su totalidad, del ADNn (13). En cuanto a la función mitocondrial, 79 de las 92 subunidades que componen el sistema OXPHOS están codificadas por el ADNn (12) (Fig. 1). Así, las alteraciones en la cadena respiratoria primaria pueden deberse a alteraciones hereditarias del ADNmt (se trata de deleciones, reorganizaciones o mutaciones puntuales) o de genes del ADNn que codifican subunidades para este sistema, así como a mutaciones somáticas, resultado de la acción de los radicales libres que, o bien causan un daño directo sobre el ADNmt, o bien impiden la correcta reparación del mismo (14).

Las múltiples copias de ADNmt que contienen las células de un organismo suelen ser idénticas, lo que se conoce como homoplasmia. No obstante, cuando existen mutaciones, el ADNmt alterado normalmente coexiste, en diferentes proporciones, con el ADNmt *wild-type*, lo que se denomina heteroplasmia. Una población homoplásmica de mitocondrias mutadas es muy inusual, ya que normalmente el organismo en cuestión no sería viable. Sin embargo, puede darse el caso de que un portador homoplásmico no manifieste síntomas y que sus hijos se vean notablemente afectados (15).

El ADNmt es heredado exclusivamente vía materna. Solo se ha registrado un caso de transmisión paterna en humanos (16). El mecanismo concreto por el cual no se

da la transmisión paterna se desconoce, pero se barajan tres teorías: (i) al ser el número de copias de ADNmt tan reducido en el espermatozoide comparado con el óvulo (100 frente a 100000 copias), se produce un efecto de dilución, (ii) el ADNmt paterno es eliminado por ubiquitinación o (iii) el efecto “cuello de botella” elimina este ADN minoritario (17).

1.2 Transmisión variable de la heteroplasmia

Como se explica anteriormente, en el caso de una población mitocondrial heteroplásmica, el ADNmt mutado coexiste en diferentes proporciones con el ADNmt *wild-type*. Esta proporción puede variar entre tejidos y a lo largo del tiempo. Dependiendo de los niveles de mutación, la manifestación de los síntomas de la enfermedad será más acusada. En general, a mayor proporción de mitocondrias mutadas, más severos serán los síntomas de la enfermedad. La proporción necesaria para que se manifieste la enfermedad varía dependiendo de la mutación, del tejido e incluso del individuo, ya que factores ambientales, el ejercicio físico o la propia carga genética nuclear también pueden influir (18). En el caso de las mutaciones puntuales más comunes, la enfermedad se manifiesta a nivel celular si se supera un umbral del 80-90% de mitocondrias mutadas (19), (20). El fenotipo clínico depende de la proporción a nivel de tejido (12).

El nivel de heteroplasmia varía entre individuos descendientes de la misma madre portadora de ADNmt mutado. Esto es debido al efecto de “cuello de botella” que se da en la transmisión mitocondrial. Solo un número limitado y aleatorio de las mitocondrias de la madre pasa a la descendencia, lo que explica la variación en el nivel de heteroplasmia entre distintas generaciones y entre hermanos (21).

El momento específico en el que se produce el efecto de cuello de botella ha sido discutido por diferentes investigadores. Inicialmente se pensó que en la línea germinal femenina temprana existían cantidades relativamente altas de ADNmt (22). Sin embargo, esto fue posteriormente puesto en entredicho por dos grupos independientes cuyas investigaciones señalaban una reducción en el contenido de ADNmt intracelular poco después de la especificación de las células germinales (23), (24). El primero de ellos concluía que la herencia de niveles de heteroplasmia distintos se debía a la división de las moléculas de ADNmt en células diferentes, que ocurría antes y después de la implantación, y a la posterior segregación del ADNmt replicado entre las células

germinales primordiales en proliferación. Es decir, según este trabajo, la distribución de las moléculas de ADNmt se producía durante la ovogénesis embrionaria (23). El otro grupo, en cambio, defendía que el cuello de botella genético ocurría durante la foliculogénesis postnatal a través de la replicación de una subpoblación de genomas mitocondriales en las células de la línea germinal (24). Sin embargo, las muestras utilizadas en estos estudios eran demasiado pequeñas, por lo que estas conclusiones no podían considerarse robustas (25). Un estudio más reciente sugiere que los niveles de heteroplasma del ADNmt se establecen principalmente antes de nacer, dentro de la línea germinal femenina en desarrollo (21).

En cuanto al mecanismo por el cual se produce el efecto de cuello de botella, se ha discutido si se trata de una deriva genética aleatoria, una selección contra alelos perjudiciales o ambas, pero actualmente no se tiene ninguna certeza sobre este punto (26).

La herencia de la heteroplasma del ADNmt puede describirse como la distribución de la probabilidad esperada para los valores de heteroplasma en un grupo de hermanos. Conocer esta distribución es importante para el asesoramiento genético de las futuras madres (27), (28), (29). Inicialmente solo se podían calcular el valor medio y la varianza para predecir las distribuciones de la heteroplasma (30). Así, en base a la deriva genética neutra y a la genética de poblaciones haploides estándar, la heteroplasma media en la descendencia debería ser igual a la heteroplasma de la madre, y la varianza de la heteroplasma en la descendencia debería ser (31):

$$V(t) = p_0(1 - p_0) [1 - e^{-t/N_{\text{eff}}}]$$

$$\approx p_0(1 - p_0) \left[1 - \left(1 - \frac{1}{N_{\text{eff}}} \right)^t \right]$$

Ecuación 1. Fórmula Sewell-Wright.

Donde:

V = Varianza de la heteroplasma en un grupo de individuos descendientes de la misma madre

t = número de generaciones transcurridas

p₀ = frecuencia génica inicial

N_{eff} = tamaño efectivo de la población

Estas ecuaciones se basan en la suposición de que el mecanismo por el cual se da el efecto de cuello de botella es la deriva genética aleatoria.

Estos parámetros, la media y la varianza de la distribución de la heteroplasma, proporcionan una información útil pero limitada, ya que no proporciona la distribución de probabilidad de heteroplasma en sí misma (30). Motoo Kimura resolvió este problema en 1955. Aunque su solución era para las probabilidades de frecuencia génica en poblaciones diploides (32), su teoría puede aplicarse en este contexto. Además, la varianza de la ecuación 1 se puede derivar de la teoría de Kimura, por lo que no desplaza el trabajo previo que se ha hecho en genética mitocondrial sobre la base de esta ecuación. Kimura derivó tres ecuaciones para explicar la distribución de la frecuencia génica en poblaciones bajo deriva genética aleatoria, asumiendo que las generaciones no se superponen, que no se da ninguna selección, migración ni ninguna mutación de novo, y que el tamaño de la población es finito y constante (32):

$$f(0,t) = (1 - p_0) + \sum_{i=1}^{\infty} (2i + 1)p_0(1 - p_0)(-1)^i F(1 - i, i + 2, 2, 1 - p_0) e^{-(i(i+1)/2N_{eff})t}$$

Ecuación 2. Probabilidad de perder un alelo.

$$\phi(x,t) = \sum_{i=1}^{\infty} i(i + 1)(2i + 1)p_0(1 - p_0)F(1 - i, i + 2, 2, x) F(1 - i, i + 2, 2, p_0) e^{-(i(i+1)/2N_{eff})t}$$

Ecuación 3. Función de la distribución de la probabilidad de que el alelo esté presente con una frecuencia x en la población.

$$f(1,t) = p_0 + \sum_{i=1}^{\infty} (2i + 1)p_0(1 - p_0)(-1)^i F(1 - i, i + 2, 2, p_0) e^{-(i(i+1)/2N_{eff})t}$$

Ecuación 4. Probabilidad para la fijación de ese alelo.

Dado que se trata de una distribución de probabilidad, la integración de estas tres ecuaciones es igual a 1.

$$f(0,t) + \int_0^1 \phi(x,t)dx + f(1,t) = 1$$

Ecuación 5. Integración de las 3 ecuaciones de la distribución de Kimura.

En la aplicación de la distribución de Kimura al caso de la heteroplasma mitocondrial, el significado de las distintas variables es el siguiente (30):

t = número de generaciones transcurridas

p₀ = nivel de heteroplasma del ADNmt en el fundador del linaje materno = heteroplasma media en la distribución de la descendencia

f(0,t) = probabilidad de fijación del ADNmt *wild-type*

f(1,t) = probabilidad de fijación del ADNmt mutado

x = nivel de heteroplasma en la descendencia

N_{eff} = tamaño efectivo de la población

Los parámetros **t** y **N_{eff}** pueden agruparse en un solo parámetro, **b**, de manera que:

$$V = p_0(1 - p_0) [1 - e^{-t/N_{eff}}] = p_0(1 - p_0)(1 - b)$$

Ecuación 6. Fórmula Sewell-Wright con $b = e^{-t/N_{eff}}$.

$$b = e^{-t/N_{eff}}$$

Ecuación 7. Parámetro **b**.

$$f(0) = (1 - p_0) + \sum_{i=1}^{\infty} (2i + 1)p_0(1 - p_0)(-1)^i F(1 - i, i + 2, 2, 1 - p_0) b^{i(i+1)/2}$$

Ecuación 8. Probabilidad de perder un alelo, con $b = e^{-t/N_{eff}}$.

$$\phi(x) = \sum_{i=1}^{\infty} i(i + 1)(2i + 1)p_0(1 - p_0)F(1 - i, i + 2, 2, x) F(1 - i, i + 2, 2, p_0) b^{i(i+1)/2}$$

Ecuación 9. Función de la distribución de la probabilidad de que el alelo esté presente con una frecuencia **x** en la población, con $b = e^{-t/N_{eff}}$.

$$f(1) = p_0 + \sum_{i=1}^{\infty} (2i + 1)p_0(1 - p_0)(-1)^i F(1 - i, i + 2, 2, p_0) b^{i(i+1)/2}$$

Ecuación 10. Probabilidad para la fijación de ese alelo, con $b = e^{-t/N_{eff}}$.

Así, para un conjunto de datos de heteroplasma del ADNmt en individuos provenientes de la misma madre, pueden calcularse los parámetros **p₀** y **b**. **p₀** es igual al

valor medio de heteroplasmia del conjunto de datos y **b** se obtiene, previo cálculo de la varianza, a partir de la ecuación 6.

La distribución de Kimura ha sido validada con éxito contrastándola con conjuntos de datos de heteroplasmia en ratones, *Drosophila* y humanos, en este último caso para la común variación patogénica m.3243A>G (30).

Esta herramienta teórica puede usarse para calcular la probabilidad de manifestar una enfermedad en base a su umbral límite de heteroplasmia, a partir del cual aparece el fenotipo clínico, lo cual puede ser muy útil para el asesoramiento genético de las futuras madres (30). Actualmente se están desarrollando nuevas técnicas para prevenir la transmisión madre-hijo de enfermedades debidas a mutaciones en el ADNm. Estas técnicas evitan la transmisión de las mitocondrias maternas al hijo, que contaría con mitocondrias sanas de donante. Sin embargo, siempre hay un escape (*carry over*) que, debido al efecto de cuello de botella, puede suponer la reaparición de la enfermedad en generaciones posteriores. La distribución de Kimura también puede utilizarse para estimar el potencial que tienen estas técnicas de evitar que esto suceda (33).

En este sentido, un estudio reciente utiliza la distribución de Kimura para calcular la probabilidad de desarrollar un nivel de heteroplasmia superior al umbral de manifestación de la enfermedad en base a la cantidad de ADNmt mutado transferido de la madre (33). Para determinar los parámetros de la distribución se utilizaron 87 pares madre-hijo, de los que las madres tenían un nivel de heteroplasmia del 40-60% (25). Se calculó que, para un umbral clínico del 60%, reducir el ADNmt mutado transferido por debajo del 5% erradicaría la enfermedad para siempre en ese linaje, mientras que, si se supera esta cifra, la probabilidad de reaparición de la enfermedad en generaciones posteriores es elevada (figura 2A). Así, es importante limitar la transmisión del ADNmt mutado a niveles por debajo del 3% (figura 2B) (33). Estos bajos niveles ya se han conseguido con la técnica *Maternal Spindle Transfer* (MST) en primates (34), (35) y con la *Pronuclear Transfer* (PNT) en embriones humanos preimplantatorios (36), por lo que parece que estas nuevas técnicas pueden evitar con efectividad la transmisión de determinadas enfermedades mitocondriales a la descendencia.

Los mismos cálculos se simularon para umbrales clínicos del 20%, 40% y 80% (figura 3), observándose que, a menor umbral, mayor riesgo de reaparición de la enfermedad y menor impacto de las técnicas de transferencia génica.

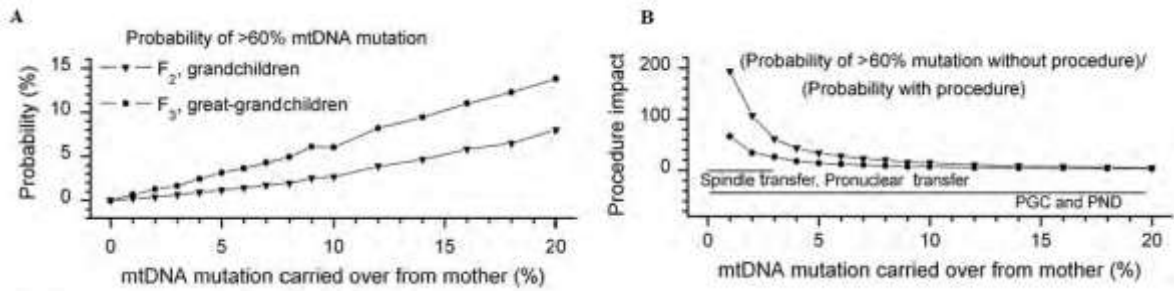


Figura 2. Efecto del escape de ADNmt mutado al embrión en generaciones posteriores para un umbral clínico del 60%. (A) Probabilidad de que un descendiente de la madre desarrolle un nivel de mutación por encima del umbral clínico (60%) en función de la cantidad de ADNmt mutado presente en el embrión tratado. (B) Impacto de la técnica en generaciones posteriores. En la parte inferior de la gráfica se señalan los rangos conocidos de escape de ADNmt materno en las técnicas de MST, PNT, PGD y PND. Los rangos indicados para PGD y PND corresponden a valores de heteroplasmia que se consideraron suficientemente seguros como para seguir con el embarazo. *Modificado de* (33).

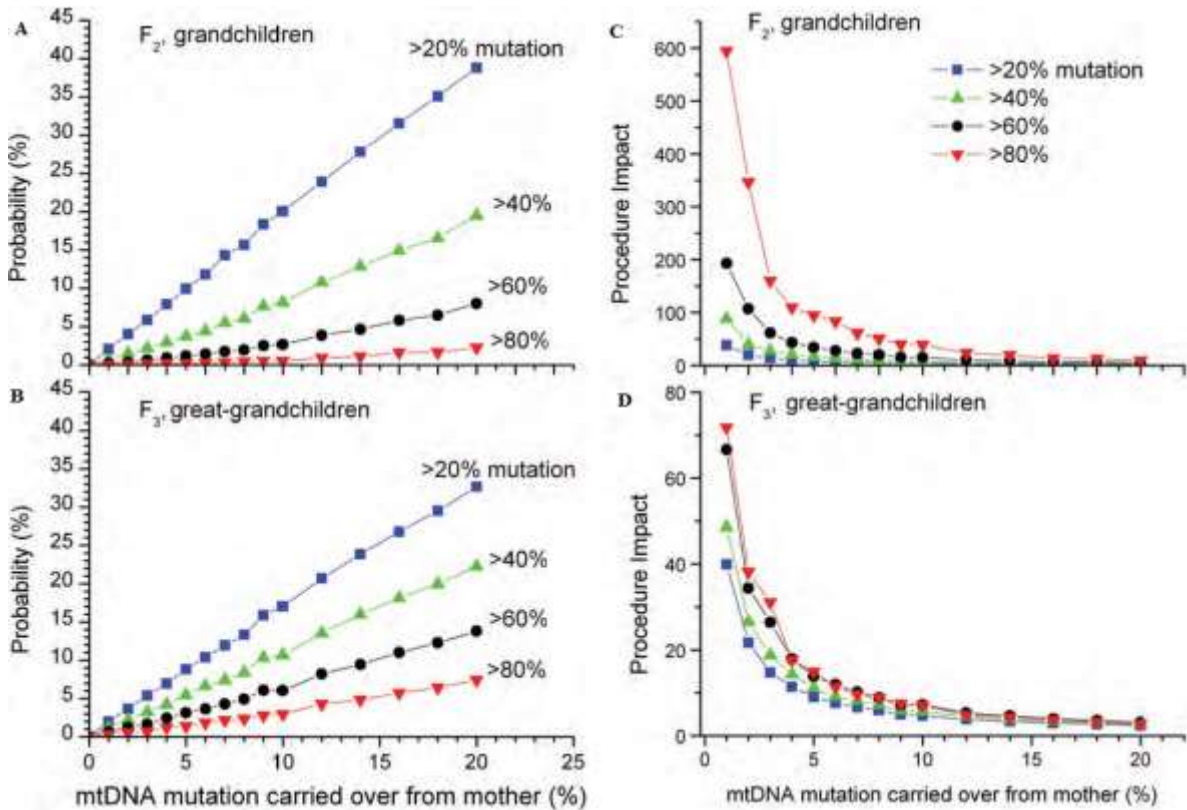


Figura 3. Efecto del escape de ADNmt mutado al embrión en generaciones posteriores para un umbral clínico del 20%, 40%, 60% (igual que en la figura 3) y 80%. Probabilidad de manifestación de la enfermedad en la segunda generación (A) y en la tercera (B) e impacto de la aplicación de la técnica en la segunda generación (C) y en la tercera (D). *Modificado de* (33).

1.3 Enfermedades mitocondriales

Las alteraciones mitocondriales provocan una carencia de energía celular que puede afectar a distintos órganos, manifestándose diversos fenotipos clínicos (Fig. 4)

(12). Actualmente no existe cura para estas enfermedades, pero se están desarrollando técnicas en la línea de prevenir la transmisión madre-hijo de enfermedades debidas a mutaciones en el ADNmt (18), las llamadas enfermedades mitocondriales primarias, que afectan directamente a la función del sistema OXPHOS. Estas enfermedades afectan aproximadamente a 1 persona de cada 5000 (37), (38), (39), (40), (41), (42), mientras que 1 de cada 200 personas sanas es portadora de una mutación mitocondrial patogénica que puede afectar a la descendencia de las mujeres portadoras (43). Actualmente, se tiene constancia de casi 600 mutaciones diferentes del ADNmt (44), (45). Estas mutaciones están asociadas con diversos síndromes. Los más comunes se explican a continuación (5).

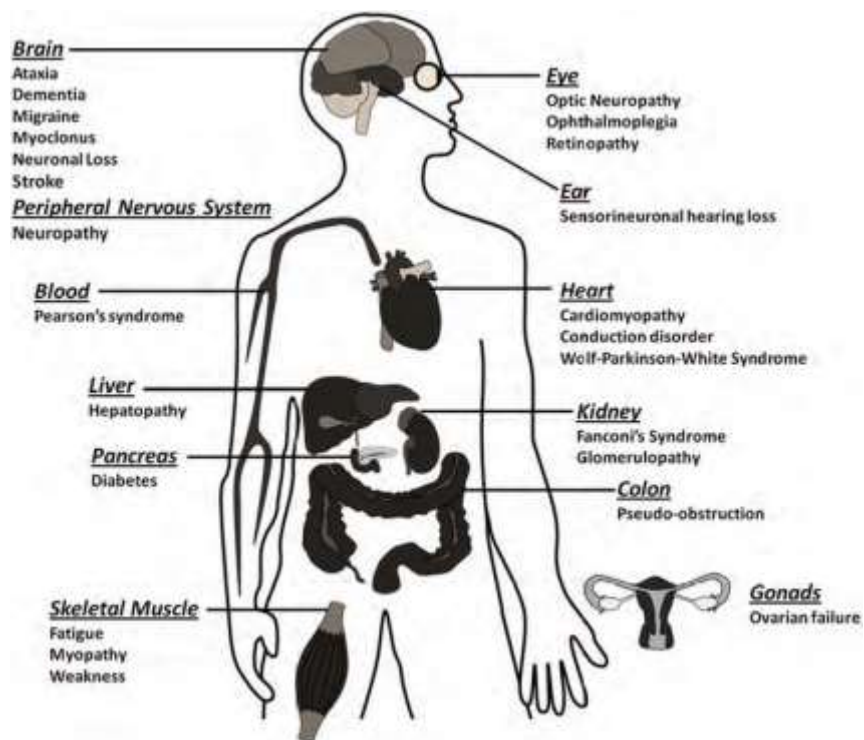


Figura 4. Espectro clínico de la enfermedad mitocondrial (12).

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)

Esta enfermedad, que es de las más comunes de entre las asociadas a mutaciones del ADNmt, resulta normalmente de una mutación homoplásmica en uno de tres genes de los que codifican subunidades del complejo I (m.11778G→A NADH deshidrogenasa 4 (ND4), m.3460G→A en NDI y m.14484T→C en ND6) (46). Estas alteraciones provocan una pérdida subaguda de la visión central en jóvenes, afectando selectivamente a las células ganglionares de la retina. Esta enfermedad afecta

fundamentalmente a hombres debido a la relativa abundancia de receptores de estrógeno (47), lo cual afecta epigenéticamente a la manifestación de los síntomas.

Leigh's syndrome

Aunque hay una gran variedad de etiologías, este síndrome presenta algunas características clínicas comunes, como retraso del desarrollo, alteraciones respiratorias, vómitos recurrentes, ataxia, distonía o muerte temprana (5).

Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS)

Este desorden afecta predominantemente al cerebro, los músculos y el sistema endocrino, y suele ser fatal en la infancia o la juventud (48). La mutación causante más común es m.3243A→G in tRNA^{Leu}(UUR) (49), aunque puede ser debido a otras doce mutaciones diferentes que afectan tanto a los genes que codifican para proteína como a los que codifican ARNt. Los pacientes presentan dolores de cabeza frecuentes, anorexia con vómitos recurrentes, sordera post-lingual y episodios transitorios tipo ictus (50), (51), (52). Los infartos en los lóbulos temporal y occipital están asociados con hemiplejía y ceguera cortical. MELAS es también una angiopatía, por lo que este síndrome es prácticamente único entre las enfermedades mitocondriales (53).

Myoclonus epilepsy and ragged red fibers (MERRF)

Este síndrome se debe casi exclusivamente a mutaciones en el ARNt^{Lys}, en concreto m.8344A→G. Sus síntomas incluyen debilidad muscular, ataxia cerebelosa y demencia, mioclonías y epilepsia, aunque los síntomas neurológicos pueden desarrollarse con la edad (54).

Neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa, and maternally inherited Leigh's syndrome (NARP y MILS, respectivamente)

Estos síndromes se deben a dos posibles mutaciones: m.8993T→G o m.8993T→C. Como su nombre indica, los síntomas de este síndrome pueden ser neuropatías, ataxia, retinitis pigmentosa o síntomas propios del síndrome de Leigh, como retraso en el desarrollo o atrofia cerebelosa y del tronco cerebral (5).

Deficiencia reversible de la cadena respiratoria

Este síndrome es muy inusual. Se debe a una mutación homoplásmica que afecta al ARNt^{Glu} (m.14674T→C). Los bebés que padecen esta enfermedad están gravemente enfermos, pero si se les proporcionan los cuidados adecuados durante el periodo perinatal, recuperan espontáneamente la función mitocondrial en 2 años (55).

1.3.1 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de las enfermedades mitocondriales puede ser difícil cuando no se trata de los síndromes más comunes, los cuales pueden detectarse mediante secuenciación de Sanger (12). El proceso de diagnóstico consiste en la realización de diferentes pasos consecutivos (figura 5) (56).

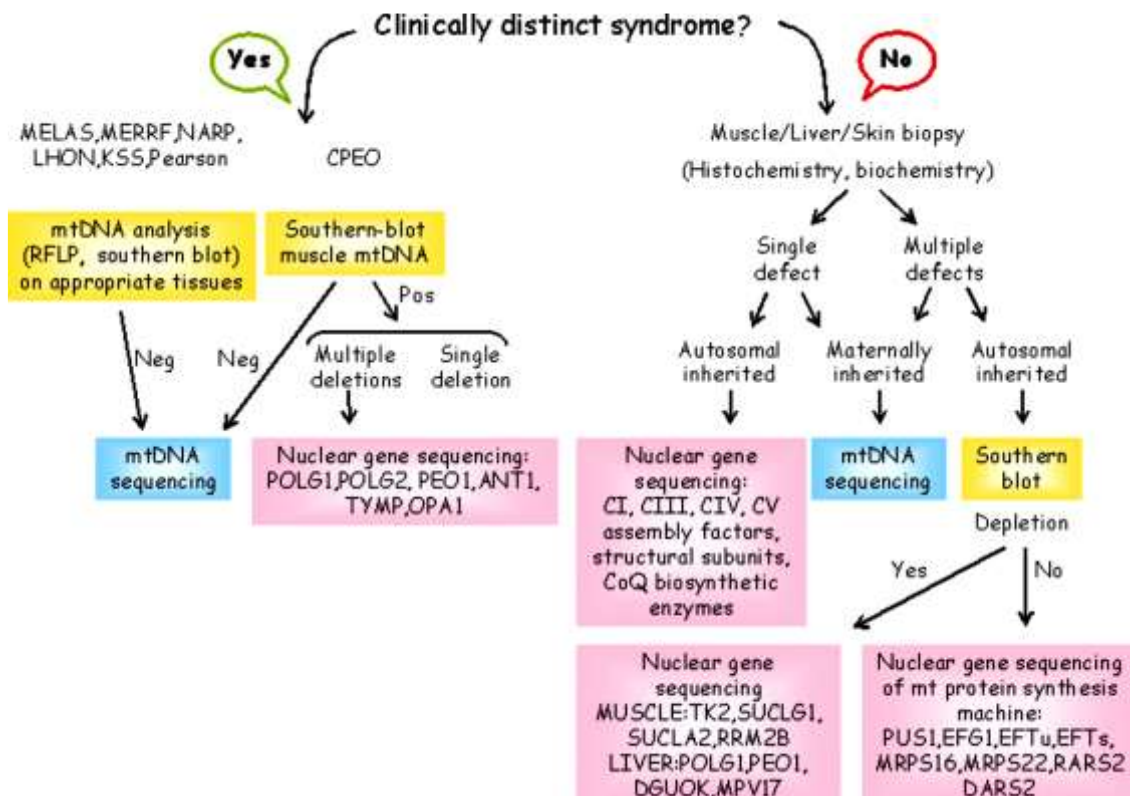


Figura 5. Algoritmo para el análisis genético de las enfermedades mitocondriales (56).

El primer paso es disponer de una historia familiar detallada. Dado que el ADNmt es heredado exclusivamente vía materna, una clara herencia materna indica una enfermedad mitocondrial primaria. En cambio, la herencia autosómica indica que el origen de la enfermedad está en el ADNn (12). Además, deben realizarse investigaciones clínicas a cargo de especialistas en neurología, oftalmología, otología,

endocrinología, cardiología, gastroenterología, nefrología, hematología o dermatología (56).

En un segundo paso, los médicos deben decidir si el fenotipo particular se ajusta a alguno de los síndromes conocidos o si, por el contrario, se trata de una enfermedad mitocondrial no sindrómica. Tras esto se realizan las pruebas genéticas pertinentes para determinar la raíz del fenotipo clínico. En muchos casos pueden detectarse evidencias histológicas e histoquímicas de enfermedad mitocondrial mediante neuroimagen (57), (58), evaluación cardíaca, biopsia muscular o a través de la concentración de lactato en la sangre y /o el líquido cefalorraquídeo (59). No obstante, es preferible el diagnóstico genético molecular, que puede llevarse a cabo sobre ADN extraído de sangre o del tejido afectado (12). Las reorganizaciones genéticas pueden detectarse mediante *southern blot* (12).

Así, si el fenotipo sugiere un síndrome debido a mutaciones puntuales del ADNmt (MELAS, MERRF, NARP, LHON), pueden utilizarse microarrays de ADN para la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo, PCR en tiempo real, o la secuenciación de un determinado gen. Si el síndrome se debe a deleciones en el ADNmt (KSS, síndrome de Pearson), el análisis comienza con RFLP o *Southern blot* de los tejidos apropiados. Si no se encuentran deleciones, debe llevarse a cabo la secuenciación del ADNmt. Por otra parte, si se encuentran deleciones múltiples, deben secuenciarse los genes POLG1 (cuya probabilidad de estar mutado es mayor), POLG2, PEO1, ANT1, TYMP o OPA1 (56).

Si el fenotipo no corresponde a ningún síndrome, deben realizarse investigaciones bioquímicas de los tejidos más afectados (músculo, hígado, cerebro, piel) para aclarar si uno o varios componentes de la cadena respiratoria son defectuosos. Si el componente o los componentes defectuosos han sido heredados por vía materna, deben secuenciarse los correspondientes genes del ADNmt. Si solo es defectuoso un componente y este ha sido heredado por herencia autosómica, deben secuenciarse las subunidades estructurales apropiadas o los factores de ensamblaje de los complejos I, III, IV o V de la cadena respiratoria. Si hay sospecha de deficiencia del CoQ, deben secuenciarse los genes implicados en su biosíntesis (con mayor frecuencia ETFDH). Si por herencia autosómica se han heredado múltiples componentes de la cadena respiratoria defectuosos, debe comprobarse por *Southern blot* o PCR cuantitativa si se ha producido o no una reducción del ADNmt. En caso afirmativo, se recomienda la

secuenciación de diferentes genes según qué órganos sean los más afectados. Así, si el músculo esquelético es el órgano predominantemente afectado se secuenciarán los genes TK2 o RRM2B, si los músculos y el cerebro son los órganos más afectados se secuenciarán los genes SUCLA2 SUCLG1, y si se trata del hígado se secuenciarán POLG1, PEO1, DGUOK o Mpv17. Si por el contrario no se detecta ninguna reducción del ADNmt, deben secuenciarse los genes implicados en la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales (PUS1, EFT, EFG1, EFTs, MRPS16, MRPS22, RARS2, DARS2).

1.4 Prevención de la transmisión de desórdenes del ADNmt

Como se explica anteriormente, hoy en día no existe cura para las enfermedades mitocondriales. En casos aislados se han utilizado como tratamiento suplementos vitamínicos, fármacos y ejercicios físicos en ensayos clínicos pequeños. Sin embargo, una revisión Cochrane realizada en 2003 y actualizada sucesivamente en 2006 y 2012 concluye que actualmente no existe evidencia alguna sobre la utilidad de estas intervenciones en los trastornos mitocondriales (60). Por ello, la práctica clínica se mueve más en la línea de prevenir o minimizar la transmisión madre-hijo de las enfermedades mitocondriales (18).

Para evitar el riesgo de concebir un hijo afectado, las mujeres pueden recurrir a la donación de óvulos, o a la adopción (18). El uso de óvulos de donante sin ninguna alteración en el ADNmt asegura que el niño resultante no será portador de la enfermedad. No obstante, aunque la mujer que lo geste será reconocida legalmente como su madre, el niño solo estará genéticamente ligado al padre. Una dificultad que presenta esta técnica es la escasez de óvulos de donante, que limita su aplicación (61). En cuanto a la adopción, también es una posibilidad totalmente segura para tener hijos no afectados. No obstante, en este caso los hijos no estarán genéticamente relacionados con ningún de sus padres y la madre no podrá gestarlo.

Las mujeres afectadas que quieren usar sus propios óvulos pueden recurrir al diagnóstico genético preimplantacional (PGD) o al diagnóstico prenatal (PND). Sin embargo, estas opciones solo pueden ser usadas por mujeres heteroplásmicas, ya que el hijo de una mujer homoplásmica será inevitablemente homoplásmico. Técnicas como la transferencia citoplasmática (CT), la transferencia nuclear (NT) o la transferencia de vesícula germinal (GVT) han sido propuestas como posibles métodos para prevenir la

transmisión del ADNmt mutado a los hijos. En los últimos años se han desarrollado específicamente para este fin dos nuevas técnicas, la *Maternal Spindle Transfer* (MST) y la *Pronuclear transfer* (PNT). Estas técnicas parecen tener un mayor potencial de aplicación, tanto que pronto podrían ser legalizadas en Inglaterra (18). Además, un equipo de investigación japonés ha propuesto recientemente un nuevo método, la transferencia de cromosomas agregados (ACT) (62).

1.4.1 Diagnóstico prenatal (PND)

La OMS define el PND como aquellas “acciones prenatales que tengan por objeto la detección y/o diagnóstico de un defecto congénito, entendiendo por tal toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular, presente al nacer (aunque puede manifestarse más tarde) externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no, única o múltiple. Las técnicas de PND pueden ser no invasivas (análisis bioquímicos u observaciones ecográficas), que no suponen un riesgo para el feto, o invasivas (como la amniocentesis o la biopsia de la vellosidad coriónica), que suponen un riesgo de aborto de aproximadamente el 1%.

Estas técnicas pueden aplicarse en el caso de las enfermedades mitocondriales para conocer el estado mitocondrial del feto (tabla 1). Antes de aplicar la técnica se debe determinar a cuál de estos tres grupos pertenece la paciente (28).

- Pacientes con una mutación conocida en un gen del ADNn.

Este grupo supone un pequeño porcentaje del total de pacientes con enfermedades mitocondriales, aproximadamente un 10%. Es el caso en el que el asesoramiento genético resulta más sencillo, ya que se puede hacer un diagnóstico prenatal fidedigno mediante análisis de la mutación en células obtenidas por biopsia de la vellosidad coriónica (28) y/o amniocentesis (63).

- Pacientes con una deficiencia enzimática en la cadena respiratoria de origen genético desconocido.

Si la deficiencia enzimática puede detectarse en los fibroblastos, puede realizarse un análisis bioquímico de los amniocitos o de las células coriónicas (obtenidas por amniocentesis o por biopsia de la vellosidad coriónica, respectivamente) (63), ya que tienen el mismo origen embrionario que los fibroblastos (64). Los tests basados en enzimas son más limitados, ya que, además de requerir que la deficiencia enzimática sea

detectable en los fibroblastos, pueden darse falsos negativos y es probable que algunos defectos no se estén expresando o tengan una actividad residual relativamente alta en las células coriónicas o los amniocitos (28).

Tabla 1. PND de diferentes enfermedades mitocondriales. Modificado de (63).

ENFERMEDAD	MUTACIÓN	MÉTODO	RESULTADO	REFERENCIA
NARP	m.8993T>G	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	Los dos embarazos revelaron altos niveles de heteroplasmia (>80%) y se abortó	Harding <i>et al.</i> (1992) (66)
NARP	m.8993T>G	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	Los niveles de mutación oscilaron entre el 64% y el 68%. El embarazo llegó a término y nació un niño sano	Bartley <i>et al.</i> (1996) (67)
Leigh syndrome	m.8993T>G	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	El nivel de mutación rozaba la homoplasmia, por lo que se abortó	Ferlin <i>et al.</i> (1997) (68)
Deficiencia de la piruvato carboxilasa (PC)	Desconocida	Medida directa de la actividad de la PC en las células de la vellosidad coriónica	Nació un bebé sano y se produjo un aborto voluntario	Van Coster <i>et al.</i> (1998) (69)
Leigh syndrome debido a una deficiencia en la citocromo c oxidasa	Desconocida	Análisis de la actividad y composición de los complejos del sistema OXPHOS mediante PAGE bidimensional y medida de la producción de ATP estimulada por sustrato	Se descartó el defecto enzimático y nacieron dos gemelos sanos	Housteck <i>et al.</i> (1999) (70)
NARP y Leigh syndrome	m.8993T>G	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	Se descartó la mutación mitocondrial y nacieron dos bebés sanos	White <i>et al.</i> (1999) (71)
PEO	Delección de 5kb del ADNmt (nt 9986-nt 15042)	Análisis por <i>southern blot</i> del ADNmt completo	No se detectó la delección en las células de la vellosidad coriónica y nació un bebé sano	Graff <i>et al.</i> (2000) (72)
KSS	Delección en el ADNmt	Análisis por <i>southern blot</i> del ADNmt completo	No se detectó la delección en las células de la vellosidad coriónica y nació un bebé sano	Thorburn y Dahl (2001) (28)
Deficiencia en la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)	Desconocida	Ensayos bioquímicos del complejo I en tejidos fetales (células de la vellosidad coriónica nativas y cultivadas)	De 23 embarazos analizados, nacieron 15 bebés sanos y 3 afectados y se produjeron 5 abortos	Niers <i>et al.</i> (2001) (73)

Deficiencia del complejo I	Gen NDUFV1 E214K/IVS8+ 4A>C , Gen NDUFV1 A432P/ΔTC (989-990), gen SDH- <i>Fp</i> A524V/MIL, gen SCO1 P174L/ΔGA (363-364), gen SURF1 G180E/IVS6-1G>C	Secuenciación	Se continuó la gestación de 2 fetos heterocigotos y de un homocigoto normal y se produjo el aborto provocado de un feto afectado y el aborto espontáneo de un feto homocigoto onormal	Amiel <i>et al.</i> (2001) (74)
Deficiencia de la carmitina palmitoyltransferasa 2 (CPT2)	983A>G (D328G)	Medida de la actividad de la CPT2 en células de la vellosidad corial y análisis molecular de la mutación	Se produjo 1 aborto y nació un bebé afectado	Vakemans <i>et al.</i> (2003) (75)
<i>Leigh syndrome</i>	m.8993T>C	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	Nació un bebé sano	Leshinsky-Silver <i>et al.</i> (2003) (76)
MELAS	m.3243A>G	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	Aunque la amniocentesis reveló un alto porcentaje de mutación, a la edad de 4 años no se observaban síntomas de MELAS	Chou <i>et al.</i> (2004) (77)
<i>Leigh syndrome</i>	m.9176T>C	Análisis directo de la mutación mediante digestión por enzimas de restricción	La biopsia de la vellosidad coriónica y la amniocentesis revelaron un porcentaje de mutación de riesgo, pero nació un niño aparentemente sano	Jacobs <i>et al.</i> (2005) (78)

- *Pacientes con una mutación conocida en un gen del ADNmt.*

El PND de mutaciones puntuales del ADNmt es difícil debido a sus complejas características (heteroplasmia, diferentes umbrales clínicos, etc). En el año 2000 se propusieron tres criterios para determinar aquellas mutaciones del ADNmt para las cuales es posible ofrecer un PND de confianza (65): (i) que exista una estrecha relación entre el nivel de carga mutante y la gravedad de la enfermedad; (ii) que haya una distribución uniforme del ADNmt mutado en todos los tejidos; (iii) que la carga mutante no cambie con el tiempo. Sin embargo, lo cierto es que muy pocas mutaciones cumplen todos estos criterios, por lo que el PND no puede considerarse una opción eficaz para prevenir la transmisión de las enfermedades asociadas al ADNmt. Entre las mutaciones

que sí cumplen los tres criterios anteriores destacan m.8993T>G y m.8993T>C, responsables de los síndromes NARP y Leigh. Las técnicas de PND fueron utilizadas por primera vez para la detección de mutaciones en el ADNmt en 1992 (66).

1.4.2 Diagnóstico genético preimplantacional (PGD)

El PGD normalmente consiste en el análisis de una o dos células obtenidas del embrión de 8 células. Esta técnica se utiliza en los tratamientos de FIVET tras la fecundación *in vitro* para detectar posibles defectos genéticos, de manera que solo se transfieran a la madre embriones sanos. No obstante, la biopsia y posterior análisis también pueden realizarse sobre el primer o el segundo corpúsculo polar del ovocito, antes de que este sea fertilizado.

El PGD puede emplearse para el diagnóstico de enfermedades asociadas al ADNmt, aplicación que ya ha sido llevada a cabo en humanos (79), (80) (81), (82), (83). Lo más habitual es realizar la biopsia de uno o dos blastómeros del embrión de 8 células (día 3) (84). Obviamente, esta opción solo es aplicable en caso de que exista heteroplasmia, ya que los ovocitos de una mujer homoplásmica tendrán todos un nivel de mutación del ADNmt del 100%, el cual se transmitirá irremediamente a la descendencia (84). El PGD de mutaciones en el ADNmt depende de los mismos criterios que el PND para ser de confianza (65). Una vez realizado el PGD se transfieren al útero los embriones cuyo nivel de mutación pueda dar lugar a un fenotipo sano. Pueden ser necesarios varios ciclos de IVF-PGD, bien porque no se encuentre ningún embrión adecuado o porque, debido a diversos motivos, no se establezca el embarazo (63). En este contexto también es aplicable la biopsia del corpúsculo polar del ovocito (63), aunque el diagnóstico de blastómeros parece ser más fiable (85), (86). Así, el nivel de mutación determinado en los corpúsculos polares es distinto del nivel de mutación en el embrión (81), el cual, sin embargo, coincide suficientemente con el nivel de mutación de los blastómeros individuales (figura 6) (61). No obstante, hay que tener en cuenta que en ocasiones un solo blastómero puede diferir del resto en su nivel de ADNmt mutado, por lo que se recomienda realizar el PGD siempre sobre dos blastómeros y, en caso de que no coincidan las cifras, tomar el valor más alto como referencia para las consideraciones posteriores (83). Aunque realizar la biopsia de dos blastómeros es más fiable, puede perjudicar la viabilidad del embrión (87), (88), (89).

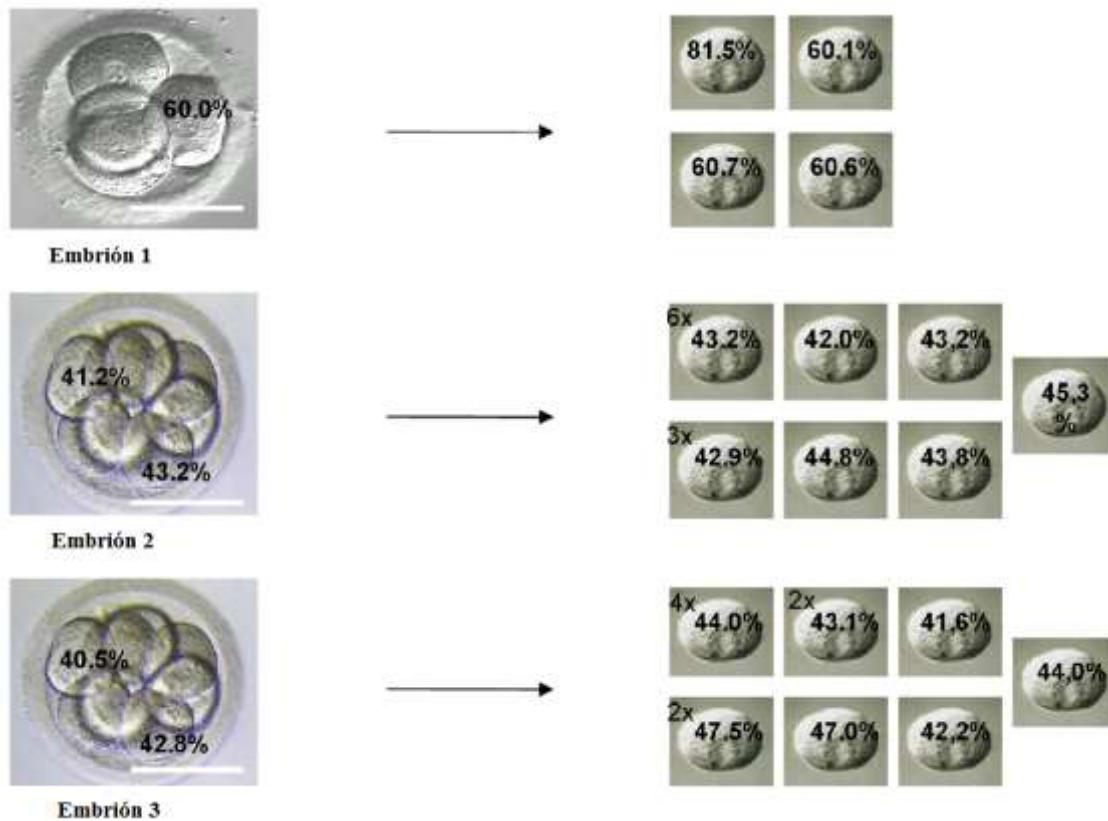


Figura 6. Nivel de mutación del ADNmt en las distintas células de tres embriones descartados de un ciclo de PGD-IVFET. Las células individuales reflejan el estado general del embrión, aunque alguna es dispar. *Modificado de (61).*

Un factor clave en la aplicación del PGD al diagnóstico de enfermedades asociadas al ADNmt es el umbral de manifestación de la enfermedad, el cual puede ser calculado para las mutaciones comunes a partir de los datos disponibles (84), pero no para el resto de mutaciones.

Dada esta imposibilidad de determinar los umbrales clínicos para muchas de las mutaciones del ADNmt, se realizó un estudio para averiguar si existía un nivel de mutación por debajo del cual no se manifestase la enfermedad en ningún caso, para ninguna mutación del ADNmt (90), lo que haría del PGD una herramienta muy útil para prevenir la transmisión de mutaciones del ADNmt. El estudio consistió en una revisión sistemática del nivel de mutación detectado en células musculares para 159 mutaciones puntuales diferentes derivadas de 327 pedigrís distintos. Tres mutaciones comunes (m.3243A>G, m.8344A>G y m.8993T>C/G) fueron consideradas individualmente para evitar que desviaran la tendencia de los datos y porque en su caso es más conveniente basarse en correlaciones genotipo-fenotipo específicas, que permiten definir un umbral clínico propio de la mutación concreta. Se trabajó con células musculares asumiendo

que el nivel de mutación en estas células no varía de forma significativa a lo largo de la vida del individuo y que es representativo de los niveles existentes en los blastómeros. No obstante, los autores reconocen que hay pocos estudios disponibles sobre la variación del nivel de mutación en el tejido muscular (91), (92), por lo que su premisa puede no ser acertada.

El umbral clínico para las mutaciones m.8993T>G y m.8993T>C se definió en el año 1999 en el 60-70% y el 80-90%, respectivamente (20). No obstante, estas cifras consideraban los estados clínicos 'leves' y 'graves', en lugar de 'afectado' y 'no afectado', por lo que probablemente el umbral clínico real está por debajo de estos valores. Aunque considerar los estados 'afectado' y 'no afectado' es más seguro, puede llevar a descartar embriones sanos (90).

Para la mutación m.8344A>G no hay datos suficientes como para determinar una relación genotipo-fenotipo acertada (90), aunque sí se ha descrito la relación entre el nivel de mutación en las células musculares y la presencia de determinados síntomas, viéndose que los síntomas más comunes asociados a la mutación no aparecen por debajo de un nivel de mutación del 70% (19). Además, también se ha visto que la manifestación de la mutación aparece a partir de niveles mayores al 50% (19), (93), (94), (95), (96).

Los datos sobre la manifestación clínica de la mutación m.3243A>G reflejan un patrón variable, observándose fenotipos clínicos incluso para niveles de mutación muy bajos (figura 7) (90). No obstante, estos datos están desviados en tres sentidos, por lo que el análisis de esta mutación puede considerarse menos fiable y menos útil a la hora de predecir el umbral clínico. Como se puede apreciar en la figura 7, el gráfico derivado de los datos disponibles muestra que incluso para niveles de mutación del 0% existe la posibilidad de verse afectado. (90).

En primer lugar, dada la elevada frecuencia de la mutación en la población general, algunas enfermedades que han sido asociadas a la mutación podrían no estarlo realmente, presentándose por otro motivo en el portador de la alteración. Por ejemplo, pacientes con diabetes, sordera o problemas oftalmológicos y bajos niveles de la mutación, estos trastornos pueden deberse a otras causas. En segundo lugar, ya se han publicado numerosos pedigrís con la mutación m.3243A>G, lo que crea una desviación hacia aquellos pacientes con manifestaciones clínicas y/o niveles de mutación inusuales.

Y en tercer lugar, para la detección de la mutación no se analiza todo el ADNmt, sino que se recurre a un ensayo de preselección muy sensible. Así, una vez se detecta la mutación, normalmente no se realiza un análisis posterior del resto de ADNmt, lo que impide la identificación de otras posibles mutaciones causales (90).

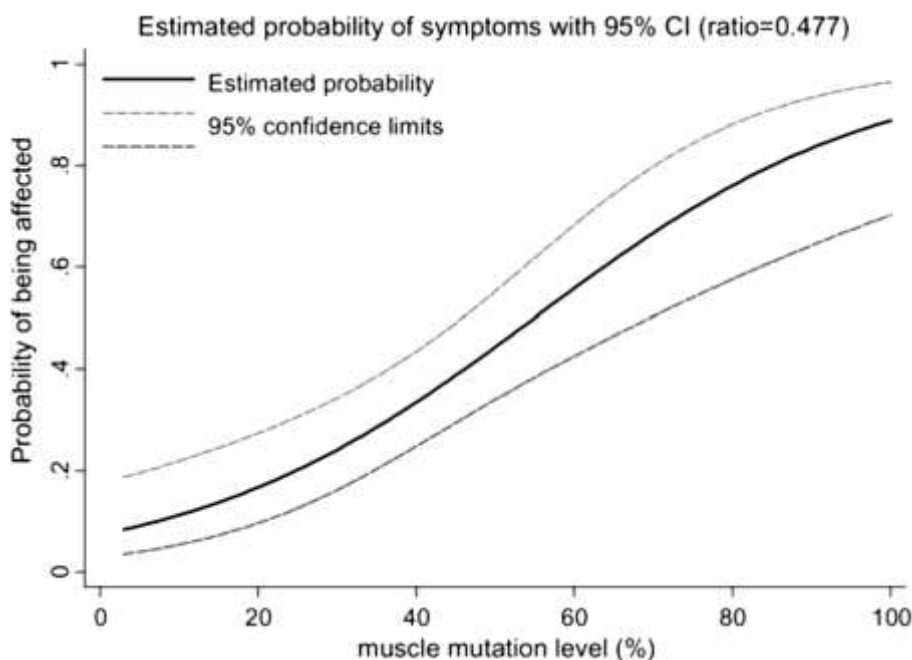


Figura 7. Probabilidad estimada estar afectado para un determinado nivel de mutación m.3243A>G en músculo (modelo de regresión logística), asumiendo una probabilidad general de estar afectado de 0.477. Modificado de (90).

Dada la actual imposibilidad de determinar un umbral clínico certero para esta mutación, en la práctica del PGD se utilizan distintos niveles límite, que pueden ir desde el 15% hasta el 30% (90), (97), (84), (82). Es necesario, por tanto, realizar una evaluación de la mutación m.3243A>G que no esté desviada (90).

En cuanto al nivel de mutación por debajo del cual no se manifiesta la enfermedad en ningún caso, los investigadores elaboraron un gráfico para determinar la probabilidad de estar afectado en base al nivel de mutación del ADNmt en las células musculares (figura 8), y determinaron que para un nivel de mutación de hasta el 18% la probabilidad de no padecer la enfermedad es del 95% (con un límite de confianza del 95%) (90).

En base a la experiencia actual en PGD de mutaciones en el ADNmt, si bien esta es limitada, parece que las mujeres portadoras heteroplásmicas generalmente son capaces de producir ovocitos con un nivel de mutación menor al 18% (98), (99), (82),

(81), (83), (79), (80), por lo que el PGD parece ser una opción factible para que las parejas en las que la mujer tenga alguna mutación en su ADNmt puedan tener hijos propios sanos (90). Normalmente, la posibilidad de producir ovocitos con un nivel de mutación por debajo de este umbral mínimo depende del nivel de mutación de la madre, de la naturaleza de la mutación y de la distribución del nivel de mutación entre los distintos ovocitos. Un elevado nivel de mutación en la madre no será un problema cuando la mutación muestre una distribución aleatoria o asimétrica en los ovocitos, mientras que una distribución estrecha supone una contraindicación para el PGD (61).

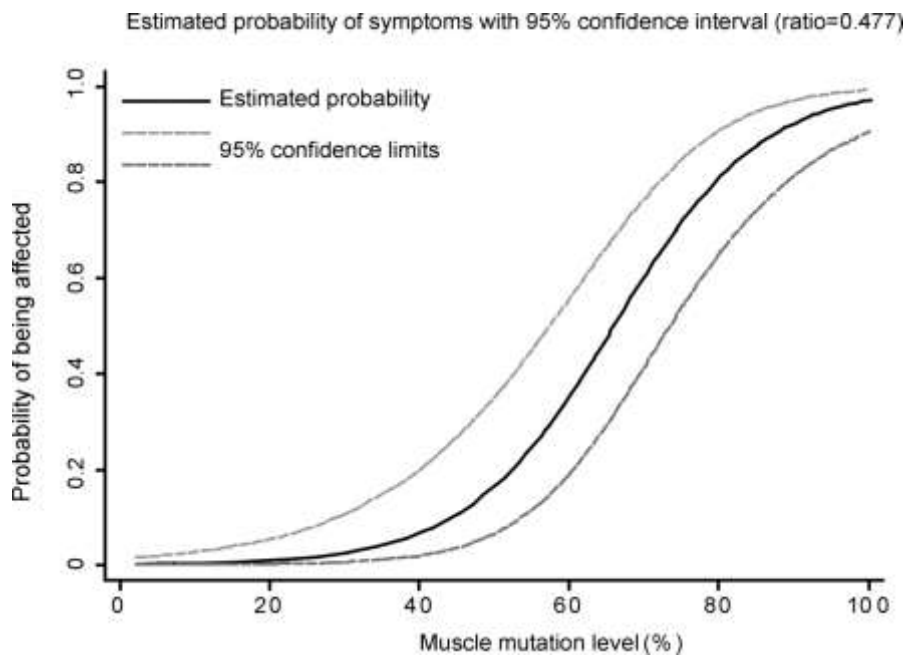


Figura 8. Probabilidad estimada de padecer la enfermedad para un determinado nivel de mutación del ADNmt en músculo (modelo de regresión logística), asumiendo una probabilidad general de estar afectado de 0.477. Modificado de (90).

Aunque el umbral del 18% generalmente evitará la manifestación de la enfermedad, es muy probable que no se erradique la mutación en la descendencia, por lo que las mujeres de la generación posterior se enfrentarán a los mismos problemas que su madre a la hora de tener hijos sanos. Para evitar este hecho se ha propuesto incluir el análisis de sexo como parte del procedimiento de PGD para seleccionar solo los embriones masculinos, lo que impediría la transmisión de la mutación a futuras generaciones (100).

El umbral del 18% puede ser aplicado a priori para todas las mutaciones del ADNmt. Sin embargo, para cada pareja, el umbral específico debe determinarse durante el asesoramiento, ya que depende de otros factores, como la manifestación de la

enfermedad y la percepción del riesgo y de la gravedad clínica en la familia, la disponibilidad de embriones por debajo del umbral y cuestiones generales de fertilidad relacionadas con la fecundación in vitro (90). Estas cuestiones deben esclarecerse en el asesoramiento previo para poder obtener un adecuado consentimiento informado de los futuros padres (101).

Por ejemplo, debe informarse a la pareja de la posibilidad de realizar un análisis los ovocitos para determinar si es factible utilizarlos en un ciclo de FIV-PGD, así como de las ventajas e inconvenientes de este procedimiento. Los ovocitos analizados no pueden ser fertilizados, de manera que se pierden y la mujer para la cual el PGD parece factible, es decir, aquella en la que se han podido detectar ovocitos con un nivel de mutación nulo o bajo (102), tiene que someterse a un segundo ciclo de superovulación para proceder al FIV-PGD. Este inconveniente podría evitarse omitiendo el paso del análisis de ovocitos y realizando directamente la fertilización y posterior PGD. No obstante, este procedimiento presenta importantes ventajas en el caso en el que la mujer no disponga de ovocitos adecuados, ya que si se comprueba que la posibilidad de conseguir ovocitos con un nivel de mutación suficientemente bajo es despreciable, puede evitarse una vana creación y destrucción de embriones y un gasto innecesario (101).

Otros factores que deben definirse previamente al FIV-PGD son la representatividad, para cada caso concreto debe determinarse si el blastómero biopsiado es representativo del embrión, para lo cual es conveniente biopsiar dos blastómeros; y la posibilidad de llevar a cabo sucesivos ciclos que, que dependerá de la mutación específica, de los deseos de la pareja, de sus probabilidades individuales de éxito y del número de ciclos permitidos y reembolsados en el país (101).

Además, también debe informarse a la pareja de las posibles alternativas, como el PND, la donación de ovocitos o la adopción; de los riesgos del procedimiento; y de las posibilidades de contribuir a la investigación científica mediante la donación de los embriones descartados o el posterior PND o análisis post-natal, etc (101).

1.4.3 Transferencia citoplasmática (CT)

Esta técnica consiste en añadir citoplasma de donante a los ovocitos de una mujer con problemas de fertilidad. Para ello se obtienen ovocitos de una mujer infértil y de una mujer joven y sana, la donante. Se extrae el citoplasma del ovocito de la donante

y se inyecta en el ovocito de la paciente, de manera que el ovocito resultante contiene el ADNn y las mitocondrias de la futura madre juntamente con mitocondrias de la mujer donante (figura 9). Este ovocito es fertilizado con el espermatozoides del padre o de un donante y el embrión se transfiere a la madre.

Esta técnica se desarrolló para posibilitar que las que se da un desarrollo deficiente del embrión y un fracaso recurrente de la implantación del mismo, posiblemente debido a unos pobres niveles de ATP en los ovocitos (103), (104), pudieran tener hijos (18). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual la CT favorece el correcto desarrollo del embarazo, parece que actúa ´rejuveneciendo` los ovocitos de las mujeres infértiles, ya que se aportan factores citoplasmáticos de mejor calidad, tales como ADNmt, ARNm, proteínas y otras moléculas (105).

En 1997 nació el primer bebé fruto de esta técnica (106), y en 2001 ya habían nacido unos 30 niños gracias a la CT. Sin embargo, esta técnica ha sido considerablemente desacreditada en la comunidad científica debido a que no parece ser muy segura (18). Dos gemelos concebidos tras la aplicación de la técnica fueron abortados por estar afectados del síndrome de Turner y a un niño nacido se le diagnosticó *Pervasive developmental disorder* (PDD) a los 18 meses (107), (108). Estos trastornos podrían deberse a la desestructuración del citoesqueleto durante la introducción del ooplasma (63).

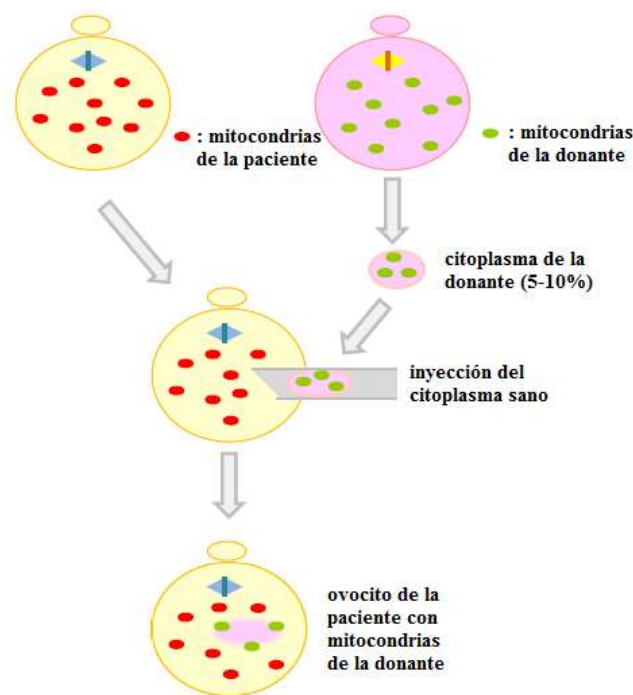


Figura 9. Diagrama de la técnica de Transferencia Citoplasmática (CT). Modificado de (105).

Tras la publicación de estos casos en el año 2001, la *Food and Drug Administration* (FDA) de US prohibió la práctica de esta técnica e indicó que era necesaria una investigación más profunda de la misma. Sin embargo, en otros países la CT sí está legalizada, como es el caso de India, la República Turca del Norte de Chipre, Ucrania, Armenia, Georgia, Israel, Turquía, Tailandia, Singapur, Alemania y Austria (18). Por lo tanto, aquellas mujeres que quieran someterse a la técnica pueden viajar a alguno de estos países y solicitarla si en su país no está legalizada (109).

Aunque la CT fue desarrollada para su aplicación en casos de infertilidad femenina, también ha sido propuesto su uso en la prevención de la transmisión de enfermedades mitocondriales hereditarias. No obstante, dados los problemas que plantea esta técnica, no parece probable que la comunidad científica investigue su aplicación en este contexto (29). Además, la proporción de ADNmt de donante que se transfiere con esta técnica oscila entre el 5 y el 15% (105), por lo que es muy posible que el porcentaje de ADNmt mutado en el ovocito tras la técnica sea todavía suficientemente alto como para que se manifieste la enfermedad y, sobre todo, se transmita a posteriores generaciones. Para prevenir la transmisión, un volumen mucho mayor, más del 50%, del citoplasma de la donante debe ser transferido (28), lo cual se desconoce si es técnicamente posible (63). Una posibilidad podría ser la reducción parcial, previa a la inyección, del ooplasma del ovocito recipiente o del cigoto una vez constituido (110), (111). Estas limitaciones técnicas, además de las indicadas para el tratamiento de la infertilidad, hacen que la CT no parezca un método apropiado para prevenir la transmisión de estas enfermedades (63).

1.4.4 Transferencia nuclear (NT)

Aunque algunos investigadores engloban bajo el término NT a todas las técnicas que implican la transferencia del núcleo de una célula donante a una célula receptora, lo que incluye a la NT propiamente dicha y también a la GVT, a la MST (63), (112), (113) y a la PNT (113), preferimos considerar estas técnicas por separado, ya que presentan unas diferencias técnicas que van a ser de gran relevancia para su valoración ética.

Así, utilizamos el término NT para referirnos a la transferencia del núcleo de un blastómero a un oocito enucleado (18). Para ello se crea un embrión por FIV, del cual se escinden cinco días después varios blastómeros para obtener los núcleos. Por otro lado, se extraen los núcleos de varios oocitos de donante. Los núcleos procedentes de los

blastómeros se introducen en los oocitos enucleados y se deja seguir el desarrollo *in vitro* hasta el momento de transferir al cuerpo de la madre (figura 10).

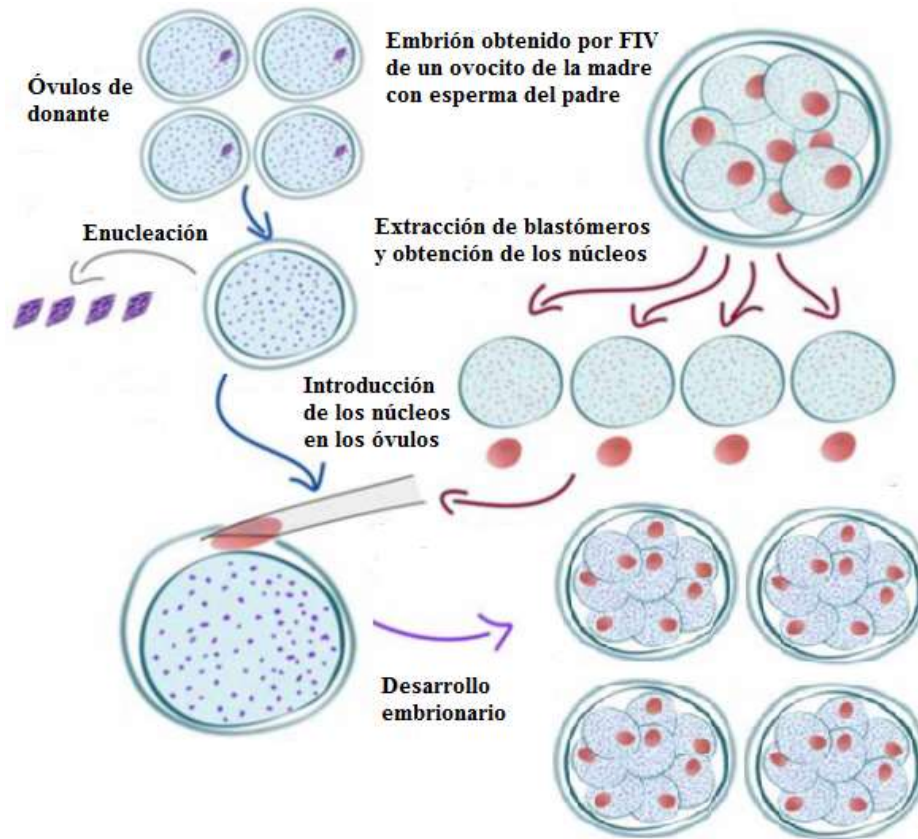


Figura 10. Diagrama de la Transferencia Nuclear (NT). Modificado de (18).

La NT podría ser aplicada a la prevención de las enfermedades mitocondriales hereditarias, transfiriendo los núcleos de los blastómeros a óvulos de donante sanos (18). No obstante, esta técnica no parece muy prometedora en este ámbito, ya que es menos segura y eficiente que la MST o la PNT. Además, es la que presenta mayores dificultades éticas, pues implica la clonación de seres humanos. Por estas razones, la comunidad científica ha evitado la investigación con esta técnica en favor de la MST y la PNT, más prometedoras (113).

1.4.5 Germinal Vesicle Transfer (GVT)

Los oocitos inmaduros, detenidos en la profase I, son diploides ($2n$) y presentan los cromosomas en el interior de una membrana nuclear intacta llamada vesícula germinal. El pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) reactiva la meiosis, de manera que se provoca la primera división meiótica con la extrusión del primer corpúsculo polar. El proceso se paraliza de nuevo en la metafase de la segunda división

meiótica, pocas horas antes de la ovulación, y no se reanuda hasta que no se produzca la fecundación. Este proceso es muy importante, y de que ocurra correctamente depende la posibilidad de una posterior fertilización del óvulo. Está regulado por factores citoplasmáticos, por lo que si estos son disfuncionales (presentes en ovocitos de mujeres de avanzada edad) incrementan la frecuencia de anomalías en la formación del huso mitótico y en la segregación cromosómica (114) y, por lo tanto, disminuye la fertilidad. Estas anomalías podrían evitarse cambiando el citoplasma comprometido por otro sano antes de la segregación cromosómica, es decir, en el estado de vesícula germinal (105).

La técnica consiste en la extracción de la vesícula germinal de un ovocito de la paciente y su transferencia a un ovocito enucleado de donante. El óvulo resultante debe ser madurado *in vitro*, para lo cual actualmente no existen métodos eficientes, lo que limita en gran medida la aplicabilidad de esta técnica (113). Así, aunque la GVT podría utilizarse también para reemplazar las mitocondrias con un ADNmt mutado por mitocondrias sanas (figura 11) (105), la necesidad de la maduración *in vitro* de los ovocitos hace de ella una posibilidad poco prometedora actualmente (113).

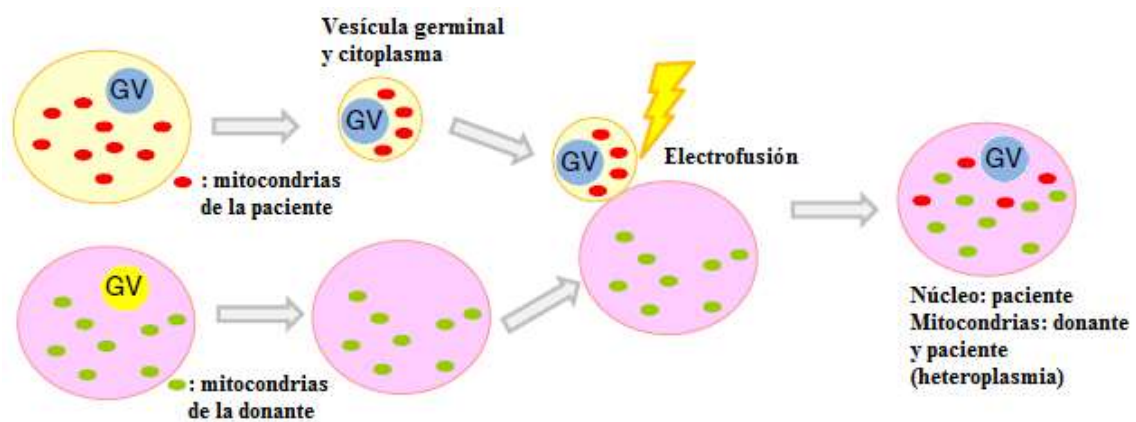


Figura 11. Diagrama de la Transferencia de la Vesícula Germinal (GVT). Modificado de (105).

Otro inconveniente de esta técnica es que, junto con la vesícula germinal, se transfiere una pequeña cantidad del ooplasma de la paciente, que contiene mitocondrias comprometidas, al ovocito de la donante, de manera que, incluso tras la aplicación de la técnica, podría superarse el umbral clínico de heteroplasmia.

Sin embargo, un grupo de investigadores ha propuesto recientemente un método para evitar la transferencia de este ooplasma y conseguir la homoplasmia en el ovocito híbrido, la *Germinal Vesicle Injection* (GVI) (figura 12). Se trata de cambiar la forma

tradicional de fusión del núcleo con el ovocito (electro fusión o fusión mediante el virus Sendai (HVJ) inactivado) por un sistema que utiliza pulsos Piezo para inyectar la vesícula germinal en el ovocito [datos no publicados, presentados en *The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine*] (105).

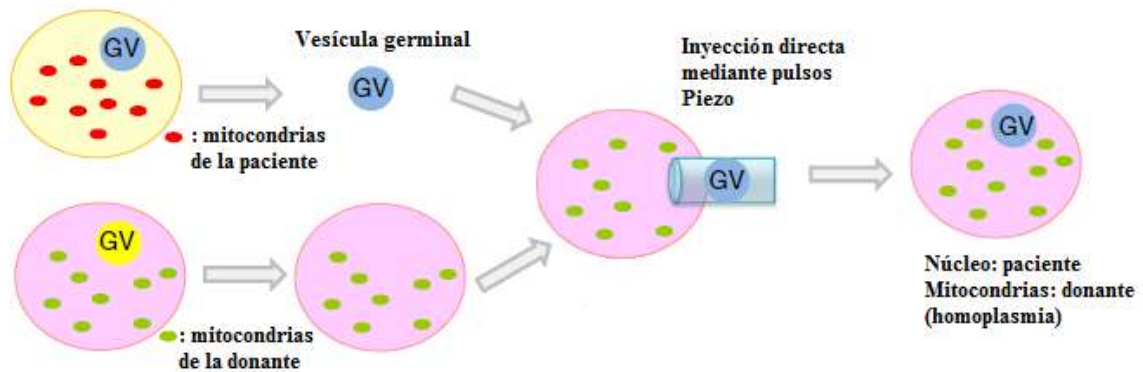


Figura 12. Diagrama de la Inyección de la Vesícula Germinal (GVI). Modificado de (105).

1.4.6 Pronuclear Transfer (PNT)

Esta técnica consiste en la realización de una fecundación *in vitro* utilizando los óvulos de la futura madre, cuyas mitocondrias contienen ADNmt mutado, y los espermatozoides del futuro padre, y la posterior extracción, tras un día de desarrollo, de los pronúcleos, dejando atrás la mayoría de las mitocondrias mutadas. Estos pronúcleos se transfieren a un cigoto enucleado, formado por la unión de un óvulo sano de donante y un espermatozoide del futuro padre o de donante. Es necesario que los pronúcleos se transfieran a un cigoto enucleado, y no a un ovocito, porque el estado de desarrollo debe ser el mismo. A continuación, el cigoto híbrido se desarrolla *in vitro* hasta alcanzar un estado adecuado para ser transferido al útero materno (18) (figura 13).

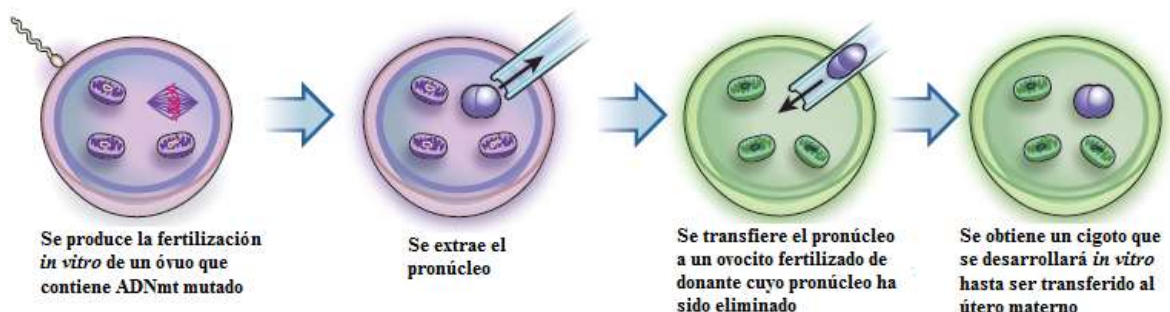


Figura 13. Diagrama de la Pronuclear Transfer (PNT). Modificado de (115).

La manipulación de cigotos presenta, frente a la manipulación de oocitos no fertilizados, una mayor resistencia al daño físico producido por la micromanipulación,

lo cual supone una ventaja técnica. No obstante, también plantea serias complicaciones éticas (116).

La PNT se aplicó por primera vez con éxito en ratones, el año 1983 (117) y posteriormente se han realizado algunos experimentos en cigotos humanos, aunque ninguno ha llegado a término (18). La aplicación clínica de la PNT solo se ha registrado una vez, en China. Se consiguió un embarazo de trillizos, pero ninguno llegó a término (118). Destacan las experiencias realizadas por un grupo de investigadores de la Universidad de Newcastle, Reino Unido, los cuales obtuvieron en 2005 una licencia de la HFEA (*Human Fertilisation and Embryology Authority*) (119) que les permitía aplicar la técnica en embriones con un número anormal de pronúcleos, donados por no poder ser utilizados en los tratamientos de fertilidad. Mediante la aplicación de esta técnica en cigotos humanos, este grupo consiguió eliminar más de 98% de las mitocondrias maternas (36), lo cual en principio sería suficiente para evitar la manifestación clínica de la enfermedad (90) y su transmisión a generaciones posteriores (33). No obstante, los investigadores advierten que es necesario realizar experiencias adicionales en otras situaciones: por ejemplo, utilizando embriones fertilizados normalmente o utilizando oocitos de mujeres con un elevado nivel de mutación del ADNmt (36).

1.4.7 Maternal Spindle Transfer (MST)

En el momento de la metafase II, última fase de la maduración ovocítica previa a la fertilización, los cromosomas se encuentran agrupados (*spindle complex*) en un lado del ovocito. La MST consiste en extraer del ovocito materno, cuyo ADNmt presenta alguna mutación, los cromosomas en este estadio, para a continuación transferirlos a un ovocito sano de donante, cuyo *spindle complex* ha sido eliminado. El ovocito híbrido es fertilizado *in vitro* y posteriormente se transfiere al útero de la madre (18) (figura 14).

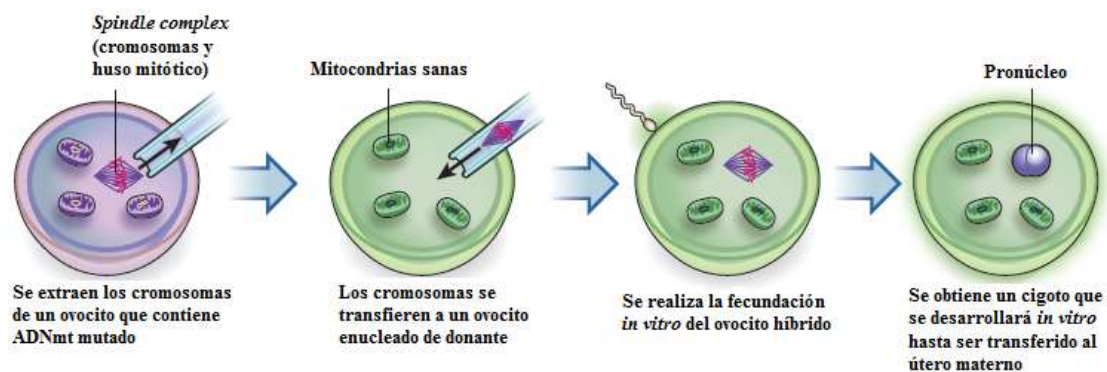


Figura 14. Diagrama de la *Maternal Spindle Transfer* (MST). Modificado de (115).

Esta técnica presenta la ventaja ética de que se manipulan ovocitos no fertilizados, por lo que no se crean embriones con el único fin de utilizarlos en el tratamiento.

La MST se realizó en primates (*Macaca mulatta*) en 2009, consiguiéndose el nacimiento de cuatro monos sanos, en los cuales no se detectó la presencia de mitocondrias maternas con una sensibilidad del 3% (34). Estos son los primeros animales nacidos tras un procedimiento de MST. Posteriormente, se probó la técnica en ovocitos humanos (35). En este caso, aunque un 52% de los cigotos fueron fertilizados anormalmente, el resto fueron capaces de desarrollarse a blastocistos y producir células madre de manera semejante a los controles. Al parecer, la fertilización anormal se debe a una activación prematura de los ovocitos, previa a la fecundación. Los investigadores sugieren que realizar las manipulaciones en un medio con Ca^{2+} o suplementado con MG132 podría ser una solución a este problema. Por tanto, investigaciones adicionales son necesarias para la aplicación clínica de esta técnica.

1.4.8 Aggregated Chromosomes Transfer (ACT)

En el año 2007 se descubrió una fase durante la meiosis en la que los cromosomas se ensamblan en una única agregación (120). Esta fase es visible desde la rotura de la vesícula germinal hasta la formación del huso en la metafase I y desde la extrusión del primer o el segundo corpúsculo polar hasta la formación del huso en la metafase II (120). Recientemente, se ha realizado con éxito la transferencia de los cromosomas agregados (CA) desde un óvulo a otro, con la intención de explorar esta vía para su aplicación a la prevención de enfermedades asociadas al ADNmt (figura 15) (62).

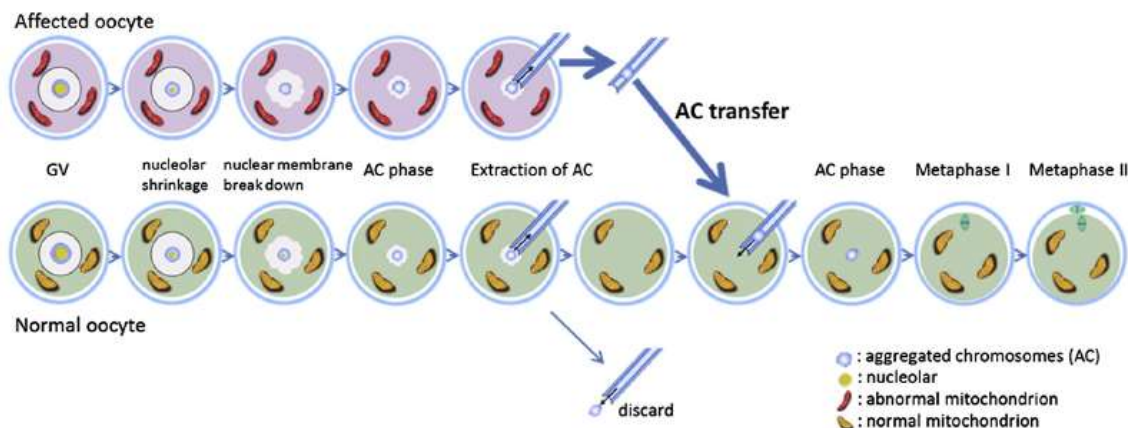


Figura 15. Diagrama de la *Aggregated Chromosomes Transfer* (ACT). Modificado de (62).

Esta técnica permite la transferencia cromosómica con un traspaso mínimo de ooplasma. Además, gracias a la utilización de pipetas de inyección de ICSI, no es necesario realizar una fusión eléctrica o mediada por virus Sendai, y el ooplasma del ovocito receptor sufre daños mínimos (62). No obstante, esta técnica necesita ser mejorada y posteriores estudios son necesarios.

1.5 Marco jurídico y normativo de la PNT y la MST

En febrero de 2008 se discutió en la Cámara de los Lores una enmienda especial de la ley para permitir la PNT como método de prevención las enfermedades asociadas al ADNmt (121). Esta propuesta se realizó a raíz de una conferencia en la que el profesor Salvatore DiMauro, experto en enfermedades mitocondriales, relató los primeros experimentos llevados a cabo por el equipo de Newcastle, todavía no publicados. Ese mismo año se modificó la Ley HFE (Human Fertilisation and Embryology) 1990, según la cual no se podía transferir al cuerpo de una mujer ningún espermatozoide, óvulo o embrión cuyo ADN nuclear o mitocondrial hubiera sido modificado (122). La nueva Ley HFE (modificada) otorga poderes al Secretario de Estado de Salud para proponer regulaciones que permitan la alteración de óvulos o embriones solo como parte de un tratamiento para la prevención de la herencia de trastornos mitocondriales (123). Esta modificación de la ley sentaba las bases para una posible legalización de la PNT y la MST (e incluso de otros métodos nuevos) en caso de demostrarse su seguridad y efectividad.

Así, en febrero del 2011, el Secretario de Estado de Salud pidió a la HFEA que coordinara un examen científico de los métodos existentes para evitar las enfermedades mitocondriales (124). Los resultados de la revisión se presentaron al gobierno inglés en abril de 2011. El trabajo concluía que, si bien la PNT y la MST podrían tener el potencial de evitar la transmisión de mutaciones del ADNmt a la descendencia, era necesario llevar a cabo ciertos experimentos para constatar su seguridad previamente a su aplicación clínica (125).

Los ministros respondieron al informe pidiendo a la HFEA que llevara a cabo un programa de diálogo público sobre el impacto social y ético de poner estas técnicas a disposición de los pacientes. La HFEA tenía también la tarea de considerar las implicaciones prácticas de conceder un lugar a estas técnicas dentro de las regulaciones. Los hallazgos fueron considerados por la Autoridad y su consejo se informó al gobierno

en marzo del 2013 (126). En líneas generales, concluía es que en Reino Unido existía un apoyo general a las técnicas de sustitución mitocondrial, siempre y cuando fueran lo suficientemente seguras como para ofrecerlo como tratamiento y se hiciera dentro de un marco regulatorio, y que la opinión pública veía las cuestiones éticas compensadas por los argumentos a favor de las técnicas (127).

En ese momento, el Secretario de Estado de Salud también pidió a la HFEA que actualizará su revisión científica de 2011. Esta actualización se centró en los nuevos avances con respecto a la seguridad y la eficacia de la PNT y la MST, incluyendo cualquier hallazgo publicado recientemente y el grado en que se habían abordado las recomendaciones del informe de 2011. Este nuevo informe fue presentado junto con el informe del diálogo (128).

En junio de 2013, el Gobierno anunció que, en base en los resultados del diálogo público llevado a cabo por la HFEA, procedería a la elaboración de un proyecto de ley en la línea de la legalización de la PNT y la MST para su consulta pública. El documento se publicó el 27 de febrero de 2014 (129) y la consulta se extendió hasta el 21 de mayo de 2014. A esta consulta pública respondimos con una sugerencia legislativa basada en los resultados de este estudio (anexo 1).

Al mismo tiempo, el gobierno pidió a la HFEA otra revisión de las últimas pruebas de seguridad y eficacia para las dos técnicas de donación mitocondrial. Por ello, la HFEA hizo un llamamiento público para recopilar nuevas pruebas, desde la actualización de 2013, sobre la seguridad o la eficacia de la PNT y la MST en la prevención de las enfermedades mitocondriales (130). Este llamamiento se cerró el 21 de marzo y los datos fueron revisados por un grupo de expertos, tras lo cual, el 3 de Junio, se publicó un informe en la web de la HFEA (131). El Secretario de Estado tendrá en cuenta esta actualización junto con los resultados de la consulta pública sobre el proyecto de ley para definir las regulaciones que se presentarán al Parlamento.

2. OBJETIVOS

Para las mujeres afectadas de enfermedades asociadas al ADN mitocondrial, las técnicas de donación de mitocondrias, en caso de resultar seguras, supondrían la posibilidad de concebir hijos sanos que compartieran su ADN nuclear. Sin embargo, según nuestro conocimiento previo de estos métodos, requieren de la manipulación y destrucción de numerosos embriones y separan la procreación de la sexualidad. Una alternativa para aquellos que perciben estas dificultades éticas como insalvables sería la reintroducción del óvulo manipulado, con las mitocondrias donadas, en el cuerpo de la madre, de manera que la fecundación tendría lugar de forma natural y no se destruirían embriones.

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de las técnicas disponibles en el campo de la prevención de la transmisión de enfermedades asociadas al ADNmt, en base a la cual desarrollar una valoración ética e identificar aquellas opciones que sean moralmente aceptables o, en su defecto, proponer una alternativa lícita, que respete la vida y la dignidad del embrión humano y salvaguarde la unión sexualidad-procreación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la búsqueda bibliográfica se introdujeron diversos perfiles de búsqueda en *Pubmed*. Por un lado se recopiló información sobre las características de las mitocondrias y del ADNmt y por otro lado se realizaron búsquedas sobre las enfermedades asociadas a este ADN y sobre las opciones terapéuticas actuales, así como sobre los aspectos éticos de las mismas. Además, se revisó la bibliografía disponible sobre la transferencia intratubárica de gametos (GIFT). Para la elaboración de la bibliografía se siguieron las normas de Vancouver.

A continuación se detallan las búsquedas realizadas y los resultados obtenidos de las mismas. En el caso de las búsquedas que resultaron ser poco específicas, se aplicaron determinados límites con la finalidad de reducir el número de documentos y así facilitar la detección de información útil para nuestros objetivos.

Aspectos éticos de la donación de mitocondrias

- **mitochondria AND ethics** (11 de Noviembre de 2013)
Se obtuvieron 15 resultados, de los cuales, tras revisar los títulos y los resúmenes, se seleccionaron 7 (los números **1, 3, 5, 6, 8, 9 y 13**, de los cuales solo se consiguió acceso al texto completo de aquellos marcados en negrita).
- **(mitochondrial transfer) AND ethics** (20 de Noviembre de 2013)
Se obtuvieron 29 resultados, de los cuales, tras revisar los títulos y los resúmenes, se seleccionaron 24 (los números **1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28 y 29**, de los cuales solo se consiguió acceso al texto completo de aquellos marcados en negrita).
- **(mitochondrial donation) AND ethics** (20 de Noviembre de 2013)
Se obtuvieron 9 resultados, de los cuales la mayoría se habían encontrado en las búsquedas anteriores y el resto no eran útiles.

Enfermedades mitocondriales.

- **(mtDNA mutation) AND disease** (21 de Noviembre de 2013)
Se obtuvieron 3593 resultados. Al aplicar los límites *Text availability: Free full text available* y *Publication dates: From 2013/01/01 to 2013/12/31*, se

obtuvieron 36 resultados, los cuales se revisaron para encontrar algún trabajo que sirviera como punto de partida para elaborar el apartado de “Enfermedades mitocondriales” de la introducción. Se seleccionó el artículo *Mitochondrial genetics, 2013* (12) como base para el desarrollo de este punto.

- **mitochondria AND inheritance AND disease** (8 de Enero de 2014)
Se obtuvieron 207 resultados. Al aplicar el límite *Publication dates: 10 years*, se obtuvieron 85 resultados, de los cuales se seleccionaron 3 (los números 4, 26 y **40**, de los cuales solo se consiguió acceso al texto completo de aquellos marcados en negrita).
- **mitochondria AND inheritance AND heteroplasmy** (8 de Enero de 2014)
Se obtuvieron 48 resultados, de los cuales se seleccionaron 2 (los números 1 y 23, de los cuales no se consiguió acceso al texto completo).

Técnicas de prevención de la transmisión del ADNmt afectado

- **(mitochondrial disease) AND ((preimplantation genetic diagnosis) OR (prenatal diagnosis))** (20 de Enero de 2014)
Se obtuvieron 278 resultados. Al aplicar el límite *Publication dates: From 2007/01/01 to 2014/12/31* se obtuvieron 77 resultados, de los cuales se seleccionaron 15 (los números 1, **3**, 11, 16, **22**, **34**, **36**, **40**, **45**, **47**, **49**, 58, **59**, **61** y **66**, de los cuales solo se consiguió acceso al texto completo de aquellos marcados en negrita). Otros artículos habían sido encontrados en búsquedas anteriores.
- **(mitochondria AND ((pronuclear transfer) OR (maternal spindle transfer))** (20 de Enero de 2014)
Se obtuvieron 11 resultados, de los cuales se seleccionaron 4 (los números 1, 3, 4 y 5). Otros artículos habían sido encontrados en búsquedas anteriores.

GIFT (transferencia intratubárica de gametos o Gamete Intra- Fallopian Transfert).

- **gamete intra fallopian transfer** (25 de Noviembre de 2013)
Se obtuvieron 220 resultados, de los cuales se seleccionaron 19 (los números **2**, **6**, **9**, **10**, **12**, **14**, **15**, **16**, **17**, **20**, **21**, **26**, **28**, **31**, **39**, **43**, 53, 149 y 158, de los

cuales solo se consiguió acceso al texto completo de aquellos marcados en negrita).

Low tubal oocyte transfer (LTOT)

- **(low tubal oocyte transfer)** (23/03/2014)

Se obtuvieron 39 resultados, de los cuales, tras revisar los títulos y los resúmenes, se seleccionó 1 (el número 39), cuyo texto completo no se encuentra disponible.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Consideraciones previas al análisis ético

Antes de entrar en la valoración ética de cada una de las técnicas explicadas, se exponen determinadas consideraciones que servirán para su posterior análisis ético.

4.1.1 El estatuto biológico del embrión humano.

A este respecto partimos de la certeza basada en criterios estrictamente científicos de que el cigoto producto de la unión de los gametos de un hombre y una mujer es un ser vivo de la especie humana.

Desde el momento de la fecundación, el embrión cuenta con el patrimonio genético propio de la especie humana. Se genera un nuevo genoma, único, en el que está contenida toda la información necesaria para que el embrión se desarrolle, y que se mantendrá íntegro durante toda su vida (prenatal y postnatal), con la excepción de que se produzca alguna mutación puntual. Nótese aquí que las modificaciones epigenéticas que se producirán sobre el genoma no afectarán a su secuencia nucleotídica, sino solo a la expresión génica.

El desarrollo del embrión está dirigido por miles de genes que se van expresando de manera coordinada bajo el control de determinadas señales moleculares producidas por las interacciones intercelulares y del embrión con su ambiente. Así, es el genoma del propio embrión el que dirige su desarrollo. Por tanto, si bien es cierto que el embrión tiene una dependencia extrínseca de la madre, no cabe duda de que cuenta con su propia individualidad. Este desarrollo es continuo y gradual, puesto que es siempre el mismo individuo el que va adquiriendo fenotipos sucesivos cada vez más complejos, requisito necesario para que se dé la existencia de cualquier organismo pluricelular (132).

Además, numerosos fenómenos biológicos constatados empíricamente apoyan la definición del embrión humano como un ser biológico organizado, en contraposición con la idea del embrión como un cúmulo de células desorganizadas. Así, por ejemplo, en el embrión de solo dos células, cada una de ellas es diferente y tienen un destino distinto; de una de ellas se derivarán los precursores del embrión, mientras que de la otra se derivarán los precursores del tejido extraembrionario (133).

Por lo tanto, dado que el embrión fruto de la fecundación de un óvulo de mujer por un espermatozoide de hombre constituye un individuo de la especie humana,

apelando al artículo 3 de la Declaración Universal de los Derechos Humanos (“*Todo individuo tiene derecho a la vida, a la libertad y a la seguridad de su persona*”) (134), la vida del embrión debe ser respetada y protegida en todo contexto. Su derecho a la misma no puede ser concedido o denegado por la sociedad o por los progenitores, sino que le debe ser reconocido.

4.1.2 Ética de la procreación humana

Entender la naturaleza de la procreación humana es fundamental para resolver las cuestiones bioéticas planteadas por las distintas técnicas de reproducción asistida (TRA). Partiendo de una concepción tridimensional del hombre según la cual el hombre es cuerpo, psique y espíritu (135), puede entenderse la sexualidad como componente integral de la persona, y la procreación como fin fundamental de la diferenciación sexual.

Efectivamente, la corporeidad está sexualmente diferenciada como masculina o femenina por factores cromosómicos, endocrino-neurológicos, genitales y por distintos caracteres secundarios, de manera que esta diferenciación marca en profundidad toda la corporeidad, “[...] *la corporeidad no existe si no está sexualmente diferenciada como corporeidad masculina y corporeidad femenina [...]*” (132).

De estas dos premisas, la unión integral cuerpo-psyque-espíritu y la existencia de la corporeidad como sexualmente diferenciada, se deduce que la sexualidad marca a toda la personalidad, de manera que no es algo que se tiene, sino algo que se es, “*Por eso la persona no solo tiene un sexo determinado, sino que es hombre o mujer*” (132). Así, la sexualidad condiciona también las relaciones interpersonales, ya que el ser-varón se relaciona con los otros como varón y el ser-mujer como mujer. Esto implica tanto a las relaciones sexuadas, en las que no interviene la genitalidad, como a las relaciones sexual-genitales.

La diferenciación sexual tiene un carácter complementario, de manera que el varón y la mujer están orientados el uno al otro (132). Por ello, en cuanto a las relaciones sexual-genitales, para que el acto sea humanamente completo, y por tanto digno, la unión debe ser heterosexual y debe implicar a toda la persona, no solo a una de sus partes. Así, debe darse la unión física, psíquica y espiritual, esto es, la conyugalidad, “*si falta una de estas tres dimensiones, se trata entonces de una unión humanamente incompleta y objetivamente falsa, porque el cuerpo no tiene sentido sino como*

expresión de la totalidad de la persona” (132). Además, puesto que la persona no se descompone tampoco en sentido cronológico, sino que es siempre la misma, la unión debe ser perenne, la conyugalidad perdura en el tiempo lo que dura la persona que se vincula.

La conyugalidad tiene diversas consecuencias vinculadas al acto sexual: la dimensión unitiva y la dimensión procreativa. Para ser plenamente humano, en el acto físico de unión sexual deben darse de modo simultáneo la capacidad de representar y operar los dos sexos y la apertura a la procreación, al menos en su objetividad e intencionalidad. *“Excluír la fecundidad de una unión que está orientada precisamente a la fecundidad supone contradecir la finalidad del acto conyugal”* (132).

En cuanto a las llamadas técnicas de reproducción asistida (TRA), pueden tener un carácter genuinamente asistencial o un carácter sustitutivo, es decir, pueden ayudar a los procesos necesarios para que se dé la fecundación o pueden exceder el ámbito médico y sustituir el momento procreativo, de manera que este queda dissociado del momento unitivo, lo que equivale a romper la unión entre amor y vida en el acto conyugal. Ciertamente, el fin no justifica los medios, y no todas las técnicas disponibles para lograr la concepción de un hijo deseado pueden considerarse lícitas (132).

4.1.3 Valoración ética de la fecundación in vitro con transferencia de embriones (FIVET)

La FIVET, a pesar de haberse impuesto como TRA y de gozar de una amplia aceptación social, no se presenta, en base a nuestras premisas, como una técnica moralmente aceptable, ya que conlleva una importante pérdida de embriones humanos y una disociación de las dimensiones unitiva y procreativa del acto sexual (132).

La fecundación *in vitro* implica que el momento clave de unión de los gametos se produce fuera del seno materno, de manera que el embrión queda irremediamente sujeto a una manipulación posterior, lo cual, además de atentar contra su dignidad, supone un riesgo considerable para su vida. De hecho, la eficiencia de la FIVET es muy baja y, con el objetivo de conseguir un resultado positivo, esto es, el nacimiento de un hijo, se fertilizan varios ovocitos, de manera que se obtienen varios embriones. Una vez conseguido el objetivo buscado, los embriones sobrantes pueden ser desechados, utilizados en experimentación o congelados. Así, razonablemente puede afirmarse que

esta técnica atenta contra el derecho que el embrión, como individuo humano, tiene “*a la vida, a la libertad y a la seguridad de su persona*” (133).

En la FIVET se da una verdadera *producción* del embrión, el cual pasa de ser un fruto de la expresión del amor de sus padres a ser un producto de la técnica. Los momentos procreativo y unitivo se separan, rompiéndose la causalidad paterno-filial del acto conyugal, dado que la fecundación es llevada a cabo extracorpóreamente por un sujeto ajeno a la pareja, de manera que se introduce una causalidad parental adicional extraconyugal. Así, la procreación ya no es un acto personal de la pareja, por lo que compromete no solo la responsabilidad de los cónyuges, sino también de los operadores que intervienen en el proceso de fecundación.

4.1.4 Aspectos éticos de la donación de mitocondrias

Las técnicas que involucran la donación de mitocondrias (CT, NT, GVT, MST, PNT y ACT) plantean una serie de cuestiones bioéticas comunes. En primer lugar, sería necesario un incremento importante en el número de donantes de ovocitos para llevar a cabo la investigación necesaria y para su aplicación clínica. A este respecto, sería necesario implantar una regulación que garantizase el bienestar de la donante, mediante un reclutamiento y apoyo adecuados y una limitación del número de donaciones por donante que la preserve de los efectos negativos de una repetida hiperestimulación ovárica (18). No obstante, los aspectos éticos más relevantes son el hecho de que estas técnicas suponen una modificación genética de la línea germinal y que los niños nacidos tras su aplicación tendrían un vínculo genético con tres personas, sus padres y la donante.

4.1.4.1 Manipulación genética de la línea germinal

La modificación genética de la línea germinal consiste en la introducción en los gametos o en el embrión temprano de un ADN extraño, que pasará a los hijos y a las generaciones futuras. Mientras que la terapia génica somática es generalmente aceptada, puesto que al no alterar la globalidad del genoma y no ser transmisible a la descendencia es comparable con una intervención quirúrgica (136), la terapia génica germinal es más controvertida. En este caso, los riesgos de la modificación genética son muy difíciles de predecir, lo cual se ve agravado por el hecho de que la modificación se transmitirá a la descendencia. Otro inconveniente es la imposibilidad de que las personas nacidas tras la aplicación de estas técnicas den su consentimiento informado (18).

Además, la manipulación genética de la línea germinal podría ser utilizada con fines eugenésicos en vez de terapéuticos.

Todas las técnicas propuestas para prevenir la transmisión de enfermedades asociadas al ADNmt, exceptuando el PND y el PGD, suponen una modificación genética de la línea germinal, motivo que ha sido utilizado en contra de la investigación y aplicación de estas técnicas (18). No obstante, no existe un consenso general entre los investigadores en cuanto a incluir estas técnicas en el campo de la terapia génica germinal, ya que no actúan sobre el núcleo (18).

Ciertamente, es importante considerar la diferencia entre el ADNn y el ADNmt. A día de hoy parece que el ADNmt se encarga solamente de la producción de energía celular y que no tiene ninguna influencia sobre el fenotipo, por lo que su modificación no plantearía los mismos inconvenientes éticos que la modificación del ADNn, que sí podría alterar características esenciales y, por tanto, la identidad y la personalidad del individuo (137). Las técnicas basadas en la modificación de la línea germinal para prevenir la transmisión de las enfermedades mitocondriales mantienen el núcleo intacto, y es el ADNmt de una donante el que, en distintas proporciones según la técnica, aparecerá en el individuo y en las generaciones posteriores. Por ello, en principio no se aplicarían las restricciones éticas existentes para la modificación del ADNn. Sin embargo, algunos investigadores argumentan en contra de estas técnicas que, en el caso de ser aceptadas, esto podría llevar a aceptar la terapia génica de la línea germinal también en otros casos, con consecuencias imprevisibles (18). Pero la obvia diferencia entre el ADNmt y el ADNn hace pensar que la legalización de estas técnicas no tiene por qué llevar a la legalización de la modificación del ADNn en la línea germinal (18).

No obstante, existe una objeción al establecimiento de una dicotomía estricta entre el ADNn y el ADNmt, ya que todavía hay un gran desconocimiento sobre sus interacciones. Modificar el ADNmt puede influenciar la expresión del ADNn (137). Así, un estudio sugiere la implicación del ADNmt en el funcionamiento cognitivo en ratones (138) y en otra investigación se detectaron asociaciones entre la variación del ADNmt y la susceptibilidad al alcoholismo (139). Por lo tanto, no se puede afirmar con rotundidad la neutralidad ética de la modificación del ADNmt (137). Es necesario realizar estudios sobre la interacción del ADNmt y el ADNn para determinar si el ADNmt tiene alguna influencia sobre nuestra identidad y personalidad y, si esto es así, hasta qué punto.

Frente a esta posibilidad hay que considerar el principio moral de la acción de doble efecto, que establece que es lícito llevar a cabo u omitir deliberadamente una acción incluso cuando ello implique un efecto negativo siempre y cuando se den las siguientes condiciones: 1) que la finalidad buscada sea positiva; 2) que el efecto directo de la acción sea positivo; 3) que el efecto positivo sea proporcionalmente superior o equivalente al efecto negativo; 4) que no haya otra posibilidad de conseguir la finalidad positiva exenta de efectos negativos (132). Este principio deberá considerarse en cada caso concreto, sopesando las posibles consecuencias positivas y negativas de la omisión del tratamiento, esto es, la preservación de determinadas características frente a la manifestación de cierta enfermedad, y las consecuencias positivas y negativas de la aplicación de la técnica, es decir, la eliminación de cierta enfermedad en la descendencia frente a la alteración de determinadas características. Será fundamental, por lo tanto, tener la máxima información posible sobre la sintomatología de la enfermedad y sobre las interacción entre el ADNmt y el ADNn.

4.1.4.2 Relación receptor-donante

Las experiencias de los donantes y receptores en cuanto a las relaciones establecidas tras la donación, o en cuanto al deseo de establecerlas, varían dependiendo de la naturaleza de la donación (140).

Al tener las mitocondrias su propio ADN, su donación tiene una implicación que no tiene la donación de órganos o tejidos, pues los niños concebidos tendrán un vínculo genético con tres personas; sus padres y la donante. A día de hoy son pocos los nacidos tras un tratamiento de CT, la única técnica que supone donación de mitocondrias que ha sido llevada a cabo en humanos, y no existe ninguna evidencia de que estas personas hayan intentado establecer ningún tipo de relación con sus donantes ni viceversa (18). Sin embargo, dado el reducido número de casos, estos datos no tienen una gran relevancia.

Así, solo se pueden hacer suposiciones acerca de las consecuencias que tendrá para el niño el estar relacionado genéticamente con 3 personas. No obstante, teniendo en cuenta la mínima proporción de ADN que aportan las mitocondrias, un 0,1% (137), no parece razonable considerar a la donante como un tercer progenitor (o una segunda madre). Es innegable que no puede considerarse al mismo nivel de causalidad que los padres propiamente dichos, y tampoco resulta lógico definir a la donante como una

madre menos madre. Por tanto, este término no parece acertado para referirse a la donante. Además, llamar “madre” a la donante podría ser perjudicial para el niño, pues podría afectar al desarrollo de su identidad personal y a su percepción de la unidad matrimonial de sus padres.

En cuanto al posible interés del niño por contactar con la donante o viceversa, es algo que podría ocurrir, como ocurre en otros casos de donación de órganos, tejidos o gametos. En el caso de que se aprueben las técnicas de donación de mitocondrias, la legislación debe anticiparse a esta posibilidad, de manera que queden reguladas de antemano las cuestiones de confidencialidad y de posible contacto con la donante.

4.2 Donación de óvulos y adopción

La donación de óvulos de una donante sana, en cuyas mitocondrias no se encuentra la mutación que, en cambio, padece la madre, no es una alternativa moralmente aceptable. Esta opción entra dentro de las TRA heterólogas, ya que en la concepción interviene un gameto de un donante ajeno a la pareja, en este caso el óvulo. Esta modalidad de reproducción asistida no solamente vulnera la unión sexualidad-procreación, sino que vulnera la propia unidad del matrimonio, ya que uno solo de los esposos se convierte en padre o madre a través de otra persona distinta de su cónyuge, mientras que el otro cónyuge queda excluido de la causalidad parental. Además, la modalidad heteróloga es contraria al derecho de los hijos “*a ser concebidos y traídos al mundo en el matrimonio y por el matrimonio*”, privándoles de la relación filial con sus orígenes paternos, lo que puede dificultar la maduración de su identidad personal (141).

La alternativa de la adopción no vulnera ningún valor moral y, por tanto, es perfectamente lícita. No obstante, no se presenta como una solución óptima al problema que nos ocupa, ya que no puede satisfacer a aquellas parejas que deseen tener hijos propios.

4.3 Diagnóstico prenatal (PND)

El PND por sí solo puede considerarse éticamente neutro o incluso bueno. No obstante, en la práctica médica ha estado considerablemente asociado al aborto selectivo de embriones con distintos problemas congénitos, por lo que su uso ha resultado polémico. Sin embargo, el PND puede ser usado para, tratando al feto como a un ser humano más, diagnosticar diferentes complicaciones, con el objetivo de poder efectuar

un tratamiento temprano o, si esto no es posible, informar a los progenitores sobre el estado de su hijo, de manera que puedan preparar su acogida de la mejor manera posible (142). Es importante tener en cuenta que, en el caso de las técnicas invasivas, que suponen un riesgo para el feto, la licitud de la técnica dependerá del ratio riesgo/posibles beneficios. Así, solo será ético realizar una amniocentesis o una biopsia de la vellosidad corial cuando del diagnóstico se espere obtener una información necesaria para el desarrollo de una acción médica adecuada, esto es, curativa o de custodia (141). Como ejemplo, en un caso en el que por alguna razón fuera conveniente adelantar el parto, es lícito realizar una amniocentesis para estudiar la madurez fetal.

En el caso de las enfermedades mitocondriales, del PND no podría seguirse un tratamiento, puesto que como se ha explicado antes, no existe cura para ellas. Por ello, serían lícitas solo aquellas técnicas que no entrañen un riesgo para la vida del feto. Por otra parte, debe informarse correctamente a los padres sobre las limitaciones del PND de enfermedades mitocondriales, puesto que el riesgo de diagnósticos erróneos es elevado.

4.4 Diagnóstico genético preimplantacional (PGD)

El PGD se utilizó por primera vez en Londres en el año 1989. A. Handyside y su equipo aplicaron esta técnica para excluir a los embriones masculinos descendientes de madres portadoras de alguna enfermedad que solo podía afectar a varones (hemofilia, Duchenne) (143). Así, con el PGD, la FIV, que en principio nace como respuesta al deseo de tener hijos de parejas estériles, comienza a mostrar una finalidad eugenésica (144).

Efectivamente, el PGD no tiene una finalidad terapéutica sino eugenésica, puesto que no se pretende curar o mejorar las condiciones de vida del enfermo, sino eliminarlo (144). Esto aplica igualmente al caso del PGD de enfermedades asociadas al ADNmt, ya que se busca el embrión con un menor porcentaje de mutación para transferirlo y el resto se desecha e incluso, si no se encuentra ninguno suficientemente sano, se desechan todos y se repite el ciclo FIV-PGD.

Para aquellos que defienden el PGD con una finalidad eugenésica, este supone una importante ventaja frente al PND, puesto que se evita el embarazo y la interrupción del mismo y, por tanto, el gasto y las consecuencias físicas y psicológicas para la mujer. Sin embargo, ninguna de estas dos posibilidades es moralmente aceptable, puesto que

atentan contra el derecho a la vida que el embrión, como individuo de la especie humana, posee.

A pesar de esta finalidad eugenésica, no puede decirse que el PGD sea eugenésico en sí, puesto que, de la misma manera que el PND, podría usarse para informar a los padres del estado de su hijo. No obstante, esta sería su única aplicación en principio lícita posible, puesto que una aplicación terapéutica de un diagnóstico tan precoz no es una posibilidad a día de hoy. Por lo tanto, hasta aquí no habría ningún motivo de peso para preferir en PGD al PND.

Sin embargo, aunque la finalidad de informar a los padres es en principio lícita, hay un hecho insalvable que descarta el PGD como opción moralmente aceptable. Esta es su inherente vinculación a la fecundación *in vitro*. Para llevar a cabo el PGD es necesario que el embrión se encuentre fuera del cuerpo de la madre, lo cual, como se explica anteriormente, supone un riesgo innecesario e injustificable para su vida y atenta contra la unión intrínseca entre sexualidad y procreación.

4.5 Transferencia citoplasmática (CT)

La CT, al contrario que el PGD, puede considerarse independientemente del procedimiento de FIVET, puesto que, aunque en la práctica se realiza la fecundación *in vitro* tras la transferencia del ooplasma, esto no tiene que ser así necesariamente. Como se verá posteriormente, existen otras posibilidades que salvaguardan la unión entre sexualidad y procreación.

No obstante, la CT plantea otros problemas éticos. Esta técnica supone una forma de modificación genética de la línea germinal, ya que se introduce el ADNmt de la donante en los gametos femeninos y este ADN pasará al niño. En el caso de la CT no está muy claro que este ADN se mantenga en posteriores generaciones, ya que en los estudios realizados se ha podido demostrar la presencia del ADNmt de la donante solo en el 50% de los embriones obtenidos y en la sangre de solo 2 de 15 niños de 1 año analizados (108), (145). Como se explica anteriormente, la terapia génica germinal puede ser lícita en el caso de que el ADN modificado sea el mitocondrial y no el nuclear y siempre y cuando se salvable el principio moral de la acción de doble efecto. Sin embargo, la CT solo cumple completamente la primera condición de este principio, que la finalidad buscada sea positiva, y parcialmente la segunda condición, que el efecto directo de la acción sea positivo, ya que, como se ha visto antes, la CT tiene unas

limitaciones técnicas que hacen que no sea un método muy eficaz en la prevención de las enfermedades mitocondriales. Este método no cumple las otras dos condiciones del principio de la acción de doble efecto. El relativamente elevado número de defectos registrado en los nacidos tras la aplicación de la técnica hace que no se pueda afirmar que el efecto positivo sea proporcionalmente superior o equivalente al efecto negativo. Además, existen otras técnicas capaces de conseguir la misma finalidad de un modo más eficaz y seguro.

Así, en el estado de desarrollo de la CT a día de hoy, no resulta una opción lícita para prevenir la transmisión de las enfermedades asociadas al ADNmt.

4.6 Transferencia nuclear (NT)

El principal problema ético planteado por la NT es que implica la clonación de seres humanos. Algunos autores defienden la eticidad de la NT en base a la diferencia con la *somatic cell nuclear transfer* (SCNT), la técnica de clonación por excelencia, en la que los núcleos proceden de células somáticas de un individuo adulto en lugar de proceder de blastómeros (113), (18). No obstante, dado que el embrión fruto de la fecundación de un óvulo de mujer por un espermatozoide de hombre constituye un individuo de la especie humana, es sujeto de los mismos derechos que el ser humano adulto y no puede afirmarse ninguna diferencia moral, ni cualitativa ni cuantitativa, entre las dos técnicas.

La clonación humana presenta numerosas e importantes dificultades éticas, entre las que destaca la agresión a la individualidad del ser humano, al concepto mismo de persona como sujeto individual irreplicable (146). Además, vulnera la dignidad del individuo clon, cuya venida a la vida responde a objetivos ajenos a su propio bien, de manera que es tratado como un mero medio y no como un fin en sí mismo, y cuya seguridad se ve gravemente comprometida. Además la NT o clonación embrionaria requiere la obtención del embrión por FIV, de manera que se rompe la unión sexualidad-procreación.

La ilicitud de esta técnica la descarta como opción adecuada para el tratamiento preventivo de las enfermedades mitocondriales hereditarias.

4.7 Germinal vesicle transfer (GVT)

Esta técnica también supone una forma de manipulación de la línea germinal. Actualmente parece que la MST o la PNT podrían conseguir un grado de heteroplasma seguro, esto es, menor al umbral clínico mínimo, cosa que no puede afirmarse de la GVT. No obstante, la variante GVI podría superar este inconveniente.

Por otra parte, también hay que considerar que, en el estado actual de desarrollo de las técnicas de maduración de ovocitos, la eficacia de esta técnica se ve muy comprometida, por lo que constituye una opción menos deseable, en términos de factibilidad, que otras posibilidades.

Así, en el estado actual de desarrollo de las técnicas involucradas en la GVT, no se trata de una opción que pueda competir contra la MST o la PNT. No obstante, si se superaran las dificultades técnicas, sí podría ser un método a considerar. En tal caso habría que esclarecer la posibilidad de aplicar tras la GVT/GVI una técnica de reproducción asistida éticamente lícita, distinta de la FIVET.

4.8 Pronuclear transfer (PNT)

La PNT plantea serios impedimentos morales para su aplicación. El más importante es que requiere la destrucción de un embrión por cada embrión producido, ya que los pronúcleos deben transferirse a un “recipiente” en el mismo estado de desarrollo, esto es, un cigoto enucleado. Por tanto, esta técnica, que atenta necesariamente contra la vida del embrión, resulta éticamente inaceptable. Por otra parte, su realización precisa de la producción de embriones *in vitro*, ya que el cambio mitocondrial se lleva a cabo tras la fecundación, por lo que es necesario tener acceso al embrión. Así, la PNT atenta también contra la unidad entre la dimensión unitiva y procreativa del acto sexual y contra la causalidad paterno-filial, lo que tampoco es éticamente aceptable. Además, esta técnica incumple tres de los cuatro requisitos del principio de la acción de doble efecto, ya que: el efecto directo de la acción es positivo para un individuo y negativo (mortal) para otro (en contra del requisito 2); el efecto positivo sobre un individuo es proporcionalmente inferior al efecto negativo sobre el otro individuo (en contra del requisito 3); hay otras posibilidades de conseguir la finalidad positiva exentas o con un menor grado de efectos negativos, la GVT, GVI o MST (en contra del requisito 4).

4.9 Maternal spindle transfer (MST)

En la MST la transferencia cromosómica se produce previamente a la fertilización, de manera que lo que se manipula son los ovocitos, en vez de los cigotos. Así, esta técnica cumple todos los requisitos del principio de la acción del doble efecto, por lo que puede considerarse una forma lícita de manipulación de la línea germinal. No obstante, como en el caso de la GVI, hay que esclarecer la posibilidad de aplicar tras su realización una técnica de reproducción asistida éticamente lícita, distinta de la FIVET.

4.10 Aggregated chromosomes transfer (ACT)

Al igual que en la MST y la GVT, la manipulación se realiza antes de la fertilización. Así, si de ella pudiera seguirse una técnica de reproducción asistida moralmente aceptable, no presentaría, en principio, inconvenientes éticos para su aplicación en la prevención de enfermedades asociadas al ADNmt. Sin embargo, dado que la fase de cromosomas agregados solo se ha observado en ovocitos humanos, a día de hoy un modelo animal sobre el que poder realizar estudios previos. Por ello, a no ser que se encuentre un modelo animal adecuado, esta técnica no supone una opción en la actualidad, pues no puede investigarse por medios éticamente lícitos.

4.11 Transferencia intratubárica de gametos (GIFT)

Una alternativa moralmente aceptable a la FIVET es la GIFT (147), (132), técnica mediante la cual se transfieren los gametos masculino y femenino simultáneamente, pero separados mediante una burbuja de aire, donde se producirá la fecundación, en caso de que se produzca. Se trata por tanto de una TRA intracorpórea, ya que la fecundación tiene lugar en el cuerpo de la madre. La ventaja ética de estas técnicas es que la manipulación técnica es previa a la constitución del cigoto, ya que se realiza sobre los gametos, por lo que la GIFT puede considerarse una TRA asistencial, y no sustitutiva, del acto conyugal.

No obstante, para asegurar que la GIFT actúe de manera meramente asistencial debe salvaguardarse la unidad entre el momento unitivo y procreativo. Así, el momento unitivo debe producirse, y los gametos masculinos deben obtenerse inmediatamente después de la realización del acto conyugal, mediante recuperación del semen por lavado vaginal. Además, hay que asegurarse de que el momento procreativo ocurre en el cuerpo de la madre y no durante la aplicación de la técnica.

Los resultados de la GIFT efectuada por vía vaginal transuterina parecen prometedores, aunque los datos disponibles divergen demasiado como para poder hablar de cifras concretas. En comparación con la FIVET no se encuentran diferencias significativas en cuanto a la eficacia. Si bien es cierto que la FIVET tiene un mayor rango de aplicación para conseguir embarazos en parejas infértiles, puesto que no es necesario que la mujer cuente con unas trompas de Falopio funcionales, esto no tiene ninguna relevancia en el campo que nos ocupa, ya que las mujeres a las que se aplicaría la GIFT no tendrían, en principio, ningún problema de infertilidad.

4.12 Low tubal oocyte transfer (LTOT)

Otra técnica que podría ser aplicada en el contexto de la prevención de la transmisión de enfermedades asociadas al ADNmt y que no presenta dificultades éticas es la LTOT (132). En esta técnica son únicamente los óvulos los que se transfieren a la trompa de Falopio o al útero, por vía abdominal o transcervical respectivamente, y a continuación tiene lugar una relación sexual normal. Sin embargo, el porcentaje de éxito es muy bajo (15% aprox.) y la bibliografía existente sobre esta técnica es escasa, encontrándose solo un documento en *Pubmed*, del año 1980 (148). No obstante, probablemente podría incrementarse la eficacia si se invirtieran recursos en el desarrollo de la técnica. Además, en el caso de la prevención de enfermedades mitocondriales, las mujeres a las que se les aplicaría y sus parejas no tendrían problemas de fertilidad, por lo que también es probable que la eficacia fuera mayor.

Dada la imposibilidad actual de curar los trastornos asociados al ADNmt una vez están presentes en el individuo, prevenir su transmisión se presenta como una posibilidad prometedora para las familias afectadas por este tipo de enfermedades. No obstante, las técnicas disponibles para su realización plantean serias dificultades éticas, en algunos casos insalvables.

Tras el estudio teórico de las distintas técnicas disponibles para prevenir la transmisión de enfermedades asociadas al ADNmt y la evaluación ética de cada una de ellas, se identificaron aquellas técnicas que podrían suponer una posibilidad éticamente aceptable en este campo.

Así, el PGD, la NT y la PNT son opciones éticamente inadmisibles, pues entrañan de forma inherente prácticas tales como la FIV, la clonación o la destrucción de embriones. La CT y la ACT, en cambio, no presentan dificultades éticas en sí mismas. Sin embargo, las dificultades técnicas y la ausencia de modelos adecuados para su estudio, respectivamente, hacen que, a día de hoy, la aplicación de estas técnicas no sea éticamente aceptable. Por su parte, la aplicabilidad del PND en este ámbito es muy limitada, y no sería ética su utilización en los casos que implicaran un riesgo para el feto. Finalmente, la GVT/I y la MST no presentan dificultades éticas en sí mismas ni tampoco importantes problemas técnicos, aunque la GVT/I debe ser perfeccionada. Sin embargo, para que su aplicación clínica pueda considerarse éticamente aceptable, es necesario sustituir la subsiguiente FIV por una técnica de reproducción asistida que salvaguarde la vida y la dignidad del embrión humano, así como la unión entre sexualidad y procreación. Las técnicas de reproducción asistida propuestas son la GIFT y la LTOT, y su aplicación tras un procedimiento de GVT/I o, preferiblemente, MST, debe ser legislativamente fomentada e investigada por los equipos científicos que trabajan en el campo de la donación mitocondrial.

5. CONCLUSIONES

A día de hoy existen ocho técnicas diferentes para prevenir la transmisión de enfermedades asociadas al ADN mitocondrial, cada una de las cuales plantea determinadas cuestiones éticas. Tras realizar un estudio teórico de cada una de las técnicas se procedió a su valoración ética y se derivaron las siguientes conclusiones:

1- En diagnóstico prenatal (PND), solo sería ético realizar aquellas prácticas que no supongan un riesgo para la vida del feto, ya que no puede seguirse un tratamiento y el único beneficio que podría derivarse es el de informar a los padres sobre la salud de su hijo.

2- Dada su inherente vinculación a la fecundación *in vitro*, el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) no es una técnica moralmente aceptable.

3- Debido a los problemas de seguridad que plantea la transferencia citoplasmática (CT), esta técnica no constituye una opción a considerar a día de hoy.

4- La transferencia nuclear (NT) implica la clonación de seres humanos y la obtención del embrión por fecundación *in vitro*, por lo que es moralmente inadmisibile.

5- La *germinal vesicle transfer* o *injection* (GVT/I) presenta unas dificultades técnicas que, en la actualidad, hacen de ellas una opción menos factible que la *pronuclear transfer* (PNT) o la *maternal spindle transfer* (MST). No obstante, si estas dificultades se superaran y se pudiera seguir la transferencia intratubárica de gametos GIFT o la *low tubal oocyte transfer* (LTOT), sería una posibilidad éticamente aceptable.

6- La PNT, además de estar ligada necesariamente a la fecundación *in vitro*, precisa de la destrucción de un embrión sano por cada embrión que se quiere tratar, lo que supone un impedimento moral insalvable.

7- La MST, por sí sola, es éticamente aceptable. No obstante, para que su aplicación práctica también lo sea, debe seguirse una GIFT o LTOT, no una fecundación *in vitro*.

8- La *aggregated chromosomes transfer* (ACT) no es inmoral en sí misma. Sin embargo, a día de hoy no existe un modelo animal adecuado para su investigación, por lo que, a menos que se encuentre uno, no podrá ser investigada por medios moralmente aceptables ni, por tanto, ser aplicada a la clínica.

9- Es necesario investigar en la aplicación de la GIFT o la LTOT como paso subsiguiente a la MST o a la GVT/I.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Van der Giezen M, Tovar J. Degenerate mitochondria. *EMBO Rep* 2005;6:525-30.
2. Nass S, Nass, MMK. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol* 1963;19:613-29.
3. St John J, Lovell-Badge R. Human–animal cytoplasmic hybrid embryos, mitochondria, and an energetic debate. *Nat Cell Biol* 2007;9(9):988-92.
4. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999;23(2):147.
5. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012;13(12):878-90.
6. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 1996;144(4):1835-50.
7. Pello R, Martín MA, Carelli V, Nijtmans LG, Achilli A, Pala M et al. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 2008;17(24):4001–11.
8. Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W, Lambert C, Keers SM, Allcock LM et al. Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol* 2005;57(4):564-7.
9. Santoro A, Balbi V, Balducci E, Pirazzini C, Rosini F, Tavano F et al. Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer’s disease. *PLoS One* 2010;5(8):e12037.
10. Ridge PG, Maxwell TJ, Corcoran CD, Norton MC, Tschanz JT, O'Brien E et al. Mitochondrial genomic analysis of late onset Alzheimer’s disease reveals protective haplogroups H6A1A/H6A1B: the Cache County Study on Memory in Aging. *PLoS One* 2012;7(9):e45134.
11. Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S et al. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2966–74.
12. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 2013;106:135-59.

13. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 2012;337(6098):1062–5.
14. Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012;379(9828):1825-34.
15. McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowlers RN et al. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 2002;30(2):145-6.
16. Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 2002;347(8):576-80.
17. Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech* 2003;61(1):88–102.
18. Nuffield Council on Bioethics. Novel techniques for the prevention of mitochondrial DNA disorders: an ethical review. London; 2012.
19. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 1997;120 (Pt 10):1713-21.
20. White SL, Collins VR, Wolfe R, Cleary MA, Shanske S, DiMauro S et al. Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *Am J Hum Genet* 1999;65(2):474–82.
21. Freyer C, Cree LM, Mourier A, Stewart JB, Koolmeister C, Milenkovic D et al. Variation in germ line mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. *Nat Genet* 2012;44(11):1282–5.
22. Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K et al. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 2007;39(3):386–90.
23. Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR et al. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 2008;40(2):249–54.

24. Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 2008;40(12):1484–8.
25. Wonnapijit P, Chinnery PF, Samuels DC. Previous estimates of mitochondrial DNA mutation level variance did not account for sampling error: comparing the mtDNA genetic bottleneck in mice and humans. *Am J Hum Genet* 2010;86(4):540–50.
26. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM et al. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 2000;16(11):500–5.
27. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. Genetic counseling and prenatal diagnosis for mtDNA disease. *Am. J. Hum. Genet* 1998;63(6):1908–11.
28. Thorburn DR, Dahl HH. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 2001;106(1):102–14.
29. Brown DT, Herbert M, Lamb VK, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowlers RN et al. Transmission of mitochondrial DNA disorders: Possibilities for the future. *Lancet* 2006;368(9529):87–9.
30. Wonnapijit P, Chinnery PF, Samuels DC. The distribution of mitochondrial DNA heteroplasmy due to random genetic drift. *Am J Hum Genet* 2008;83(5):582–93.
31. Wright S. Statistical genetics and evolution. *Bull Am Math Soc* 1942;48:223-46.
32. Kimura M. Solution of a process of random genetic drift with a continuous model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955;41(3):144–50.
33. Samuels DC, Wonnapijit P, Chinnery PF. Preventing the transmission of pathogenic mitochondrial DNA mutations: can we achieve long-term benefits from germ-line gene transfer? *Hum Reprod* 2013;28(3):554-9.
34. Tachibana M, Sparman M, Sritanaudomchai H, Ma H, Clepper L, Woodward J et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 2009;461(7262):367–72.
35. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Woodward J, Sanchis DM, Ma H et al. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 2013;493(7434):627-31.

36. Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM et al. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 2010;465(7294):82-5.
37. Skladal D, Halliday J, Thorburn, DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003;126(Pt 8):1905-12.
38. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* 1998;63(2):447-54.
39. Chinnery PF1, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000;48(2):188-93.
40. Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001;49(3):377-83.
41. Uusimaa J, Moilanen JS, Vainionpää L, Tapanainen P, Lindholm P, Nuutinen M et al. Prevalence, segregation and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. *Ann Neurol* 2007;62(3):278-87.
42. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 2008;63(1):35-9.
43. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet* 2008;83(2):254-60.
44. MITOMAP. A human mitochondrial genome database. MITOMAP: Reported Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: rRNA/tRNA mutations. 2014 Abr 16 [citado 2014 May 29]. Disponible en: URL: <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsRNA>.
45. MITOMAP. A human mitochondrial genome database. MITOMAP: Reported Mitochondrial DNA Base Substitution Diseases: Coding and Control Region Point

Mutations. 2014 Abr 16 [citado 2014 May 29]. Disponible en: URL: <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsCodingControl>.

46. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242(4884):1427–30.

47. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2011;134(Pt 1):220–34.

48. Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Kulikova R, Oskoui M, Sproule DM et al. Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. *Neurology* 2011;77(22):1965–71.

49. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348(6302):651–3.

50. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984;16(4):481–8.

51. Hirano M, Ricci E, Koenigsberger MR, Defendini R, Pavlakis SG, DeVivo DC et al. Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul Disord* 1992;2(2):125–35.

52. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rohtchina E, Howard C, Mitchell P et al. Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion* 2007;7(3):230–3.

53. Tay SH, Nordli DR Jr, Bonilla E, Null E, Monaco S, Hirano M et al. Aortic rupture in mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Arch Neurol* 2006;63(2):281–3.

54. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990;61(6):931–7.

55. Horvath R, Kemp JP, Tuppen HA, Hudson G, Oldfors A, Marie SK et al. Molecular basis of infantile reversible cytochrome c oxidase deficiency myopathy. *Brain* 2009;132(Pt 11):3165–74.
56. Finsterer J, Harbo HF, Baets J, Van Broeckhoven C, Di Donato S, Fontaine B et al. EFNS guidelines on the molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Eur J Neurol* 2009;16(12):1255–64.
57. Barkovich AJ, Good WV, Koch TK, Berg BO. Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993;14(5):1119–37.
58. Lin DD, Crawford TO, Barker PB. Proton MR spectroscopy in the diagnostic evaluation of suspected mitochondrial disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24(1):33–41.
59. Magner M, Szentiványi K, Svandová I, Ješina P, Tesařová M, Honzík T et al. Elevated CSF-lactate is a reliable marker of mitochondrial disorders in children even after brief seizures. *Eur J Paediatr Neurol* 2011;15(2):101–8.
60. Pfeffer G, Majamaa K, Turnbull DM, Thorburn D, Chinnery PF. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Abr 18.
61. Smeets HJ. Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders: Selecting the good guys or kicking out the bad guys. *Reprod Biomed Online* 2013;27(6):599-610.
62. Otsuki J, Nagai Y, Sankai T. Aggregated chromosomes transfer in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2014;28(3):401-4.
63. Jacobs LJ, de Wert G, Geraedts JP, de Coo IF, Smeets HJ. The transmission of OXPHOS disease and methods to prevent this. *Hum Reprod Update* 2006;12(2):119-36.
64. Graff C, Bui TH, Larsson NG. Mitochondrial diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(5):715-28.
65. Poulton J, Turnbull DM. 74th ENMC international workshop: mitochondrial diseases 19-20 November 1999. *Neuromuscul Disord* 2000;10(6):460-2.
66. Harding AE, Holt IJ, Sweeney MG, Brockington M, Davis MB. Prenatal diagnosis of mitochondrial DNA 8993 T---G disease. *Am J Hum Genet* 1992;50(3):629-33.

67. Bartley J, Senadheera D, Park P, Brar H, Abad D, Wong LJ. Prenatal diagnosis of T8993G mitochondrial DNA point mutation in amniocytes by heteroplasmy detection. *Am J Hum Genet* 1996;59 Supl 4:A316
68. Ferlin T, Landrieu P, Rambaud C, Fernandez H, Dumoulin R, Rustin P et al. Segregation of the G8993 mutant mitochondrial DNA through generations and embryonic tissues in a family at risk of Leigh syndrome. *J Pediatr* 1997;131(3):447–9.
69. Van Coster RN, Janssens S, Misson JP, Verloes A, Leroy JG. Prenatal diagnosis of pyruvate carboxylase deficiency by direct measurement. *Prenat Diagn* 1998;18(10):1041–4.
70. Houstek J, Klement P, Hermanská J, Antonická H, Houstková H, Stratilová L et al. Complex approach to prenatal diagnosis of cytochrome c oxidase deficiencies. *Prenat Diagn* 1999;19(6):552–8.
71. White SL, Shanske S, Biros I, Warwick L, Dahl HM, Thorburn DR et al. Two cases of prenatal analysis for the pathogenic T to G substitution at nucleotide 8993 in mitochondrial DNA. *Prenat Diagn* 1999;19(12):1165–8.
72. Graff C, Wredenberg A, Silva JP, Bui TH, Borg K, Larsson NG. Complex genetic counselling and prenatal analysis in a woman with external ophthalmoplegia and deleted mtDNA. *Prenat Diagn* 2000;20(5):426–31.
73. Niers LE, Smeitink JA, Trijbels JM, Sengers RC, Janssen AJ, van den Heuvel LP. Prenatal diagnosis of NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Prenat Diagn* 2001;21(10):871–80.
74. Amiel J, Gigarel N, Benacki A, Benit P, Valnot I, Parfait B et al. Prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency by direct mutation screening. *Prenat Diagn* 2001;21(7):602–4.
75. Vekemans BC, Bonnefont JP, Aupetit J, Royer G, Droin V, Attié-Bitach T et al. Prenatal diagnosis of carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency in chorionic villi: a novel approach. *Prenat Diagn* 2003;23(11):884–7.
76. Leshinsky-Silver E, Perach M, Basilevsky E, Hershkovitz E, Yanoov-Sharav M, Lerman-Sagie T et al. Prenatal exclusion of Leigh syndrome due to T8993C mutation in the mitochondrial DNA. *Prenat Diagn* 2003;23(1):31–3.

77. Chou YJ, Ou CY, Hsu TY, Liou CW, Lee CF, Tso DJ et al. Prenatal diagnosis of a fetus harboring an intermediate load of the A3243G mtDNA mutation in a maternal carrier diagnosed with MELAS syndrome. *Prenat Diagn* 2004;24(5):367–70.
78. Jacobs LJ, de Coo IF, Nijland JG, Galjaard RJ, Los FJ, Schoonderwoerd K et al. Transmission and prenatal diagnosis of the T9176C mitochondrial DNA mutation. *Mol Hum Reprod* 2005;11(3):223–8.
79. Steffann J, Frydman N, Gigarel N, Burlet P, Ray PF, Fanchin R et al. Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet* 2006;43(3):244–7.
80. Thorburn DR, Wilton L, Stock-Myer S. Healthy baby girl born following preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA m.8993T>G mutation. *Mol Genet Metab* 2009;98:5–6.
81. Gigarel N, Hesters L, Samuels DC, Monnot S, Burlet P, Kerbrat V et al. Poor correlations in the levels of pathogenic mitochondrial DNA mutations in polar bodies versus oocytes and blastomeres in humans. *Am J Hum Genet* 2011;88(4):494–8.
82. Monnot S, Gigarel N, Samuels DC, Burlet P, Hesters L, Frydman N et al. Segregation of mtDNA throughout human embryofetal development: m.3243A>G as a model system. *Hum Mutat* 2011 Jan;32(1):116–25.
83. Sallevelt SC, Dreesen JC, Drüsedau M, Spierts S, Coonen E, van Tienen FH et al. Preimplantation genetic diagnosis in mitochondrial DNA disorders: challenge and success. *J Med Genet* 2013;50(2):125–32.
84. Poulton J, Bredenoord AL. 174th ENMC international workshop: applying preimplantation genetic diagnosis to mtDNA diseases: implications of scientific advances 19–21 March 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2010;20(8):559–63.
85. Briggs DA, Power NJ, Lamb V, Rutherford AJ, Gosden RG. Amplification of DNA sequences in polar bodies from human oocytes for diagnosis of mitochondrial disease. *Lancet* 2000;335(9214):1520–1.

86. Dean NL, Battersby BJ, Ao A, Gosden RG, Tan SL, Shoubridge EA et al. Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases. *Mol Hum Reprod* 2003;9(10):631–8.
87. Cohen J, Wells D, Munné S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 2007;87(3):496–503.
88. Combelles CM. What are the trade-offs between one-cell and two-cell biopsies of preimplantation embryos? *Hum Reprod* 2008;23(3):493– 8.
89. Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2008;23(3):481-92.
90. Hellebrekers DM, Wolfe R, Hendrickx AT, de Coo IF, de Die CE, Geraedts JP et al. PGD and heteroplasmic mitochondrial DNA point mutations: a systematic review estimating the chance of healthy offspring. *Hum Reprod Update* 2012;18(4):341–9.
91. Weber K, Wilson JN, Taylor L, Brierley E, Johnson MA, Turnbull DM et al. A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997;60(2):373–80.
92. Frederiksen AL, Andersen PH, Kyvik KO, Jeppesen TD, Vissing J, Schwartz M. Tissue specific distribution of the 3243A->G mtDNA mutation. *J Med Genet* 2006;43(8):671–7.
93. Antonická H, Floryk D, Klement P, Stratilová L, Hermanská J, Houstková H et al. Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt. *Biochem J* 1999;342(Pt 3):537–44.
94. van de Glind G, de Vries M, Rodenburg R, Hol F, Smeitink J, Morava E. Resting muscle pain as the first clinical symptom in children carrying the MTTK A8344G mutation. *Eur J Paediatr Neurol* 2007;11(4):243–6.

95. Choi BO, Hwang JH, Cho EM, Jeong EH, Hyun YS, Jeon HJ et al. Mutational analysis of whole mitochondrial DNA in patients with MELAS and MERRF diseases. *Exp Mol Med* 2010;42(6):446–55.
96. Wahbi K, Larue S, Jardel C, Meune C, Stojkovic T, Ziegler F et al. Cardiac involvement is frequent in patients with the m.8344A.G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology* 2010;74(8):674–7.
97. de Die-Smulders C, Smeets HJ. The challenge of prenatal and preimplantation genetic diagnosis of mitochondrial disorders. In: European Society of Human Genetics Annual Meeting, Vienna, Austria, 23–26 May 2009.
98. Blok RB, Gook DA, Thorburn DR, Dahl HH. Skewed segregation of the mtDNA nt 8993 (T→G) mutation in human oocytes. *Am J Hum Genet* 1997;60(6):1495–501.
99. Brown DT, Samuels DC, Michael EM, Turnbull DM, Chinnery PF. Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am J Hum Genet* 2001;68(2):533–6.
100. Bredenoord AL, Dondorp W, Pennings G, De Wert G. Avoiding transgenerational risks of mitochondrial DNA disorders: a morally acceptable reason for sex selection? *Hum Reprod* 2010;25(6):1354–60.
101. Bredenoord A, Dondorp W, Pennings G, de Die-Smulders C, Smeets B, de Wert G. Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA disorders: ethical guidance for clinical practice. *Eur J Hum Genet* 2009;17(12):1550 – 9.
102. Poulton J, Marchington DR. Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. *Reproduction* 2002;123(6):751– 5.
103. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995;10(2):415–24.
104. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod* 2001;16(4):719–29.

105. Yabuuchi A, Beyhan Z, Kagawa N, Mori C, Ezoe K, Kato K et al. Prevention of mitochondrial disease inheritance by assisted reproductive technologies: Prospects and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(5):637-42.
106. Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997;350(9072):186-7.
107. Barritt JA, Brenner CA, Willadsen S, Cohen J. Spontaneous and artificial changes in human ooplasmic mitochondria. *Hum Reprod* 2000;15(Suppl 2):207-17.
108. Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, Cohen J. Rebuttal: interooplasmic transfers in humans. *Reprod Biomed Online* 2001;3(1):47-8.
109. Firfer H. How far will couples go to conceive? CNN.com. 2004 Jun 17 [citado 2014 Febr 20]. Disponible en: <http://edition.cnn.com/2004/HEALTH/03/12/infertility.treatment/index.html>.
110. Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE et al. Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biol Reprod* 2010;82(1):76-85.
111. Ferreira CR, Burgstaller JP, Perecin F, Garcia JM, Chiaratti MR, Méo SC et al. Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. *Biol Reprod* 2010;82:563-71.
112. Chiaratti MR, Meirelles FV, Wells D, Poulton J. Therapeutic treatments of mtDNA diseases at the earliest stages of human development. *Mitochondrion* 2011;11(5):820-8.
113. Bredenoord AL, Dondorp W, Pennings G, De Wert G. Nuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disorders: revisiting the debate on reproductive cloning. *Reprod Biomed Online* 2011;22(2):200-7.
114. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996;11(10):2217-22.
115. Callaway E. UK sets sights on gene therapy in eggs. *Nature* 2012;481(7382):419.
116. Klitzman R. The use of eggs and embryos in stem cell research. *Semin Reprod Med* 2010;28(4):336-44.

117. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983;220(4603):1300–2.
118. Zhang J, Zhuang G, Zeng Y, Acosta C, Shu Y, Grifo J. Pregnancy derived from human nuclear transfer. *Fertil Steril* 2003;80(Suppl 3):56.
119. Human Fertilisation and Embryology Authority. HFEA grants licence to Newcastle Centre at LIFE for Mitochondrial Research. 2005 Sept 8 [citado 2014 Mar 12]. Disponible en: <http://www.hfea.gov.uk/671.html>.
120. Otsuki J, Nagai Y. A phase of chromosome aggregation during meiosis in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;15(2):191-7.
121. House of Lords Hansard c846-848. 2008 Febr 4 [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: <http://www.publications.parliament.uk/pa/ld200708/ldhansrd/text/80204-0002.htm>.
122. Human Fertilisation and Embryology Act 1990 (section 3), as amended [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: <http://www.legislation.gov.uk/ukpga/2008/22/section/3>.
123. Human Fertilisation and Embryology Act 2008. c.22 – explanatory notes: commentary on sections – part 1 (section 3) [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: <http://www.legislation.gov.uk/ukpga/2008/22/notes/division/6/1/3>.
124. Human Fertilisation and Embryology Authority. Review of scientific methods to avoid mitochondrial disease 2011 2011 Abr 18 [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: <http://www.hfea.gov.uk/6372.html>.
125. Human Fertilisation and Embryology Authority. Scientific review of the safety and efficacy of methods to avoid mitochondrial disease through assisted conception 2011 Abril [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: http://www.hfea.gov.uk/docs/2011-04-18_Mitochondria_review_-_final_report.PDF.
126. Mitochondria public consultation 2012. 2013 Mar [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: <http://www.hfea.gov.uk/6896.html>.
127. Mitochondria replacement consultation: Advice to Government. Human Fertilisation and Embryology Authority. 2013 Mar [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: http://www.hfea.gov.uk/docs/Mitochondria_replacement_consultation_-_advice_for_Government.pdf.

128. Human Fertilisation and Embryology Authority. Annex VIII: Scientific review of the safety and efficacy of methods to avoid mitochondrial disease through assisted conception: update. 2013 Mar [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: http://www.hfea.gov.uk/docs/Mito-Annex_VIII-science_review_update.pdf.
129. Open consultation. Serious mitochondrial disease: new techniques to prevent transmission. Gov.uk. 2014 Febr 27 [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/consultations/serious-mitochondrial-disease-new-techniques-to-prevent-transmission>.
130. Human Fertilisation and Embryology Authority. Call for evidence: Update to scientific review of the methods to avoid mitochondrial disease. 2014 Febr [citado 2014 Mar 13]. Disponible en: http://www.hfea.gov.uk/docs/mitochondria_scientific_review_update_-_call_for_evidence_2014.pdf.
131. Human Fertilisation and Embryology Authority. Third scientific review of the safety and efficacy of methods to avoid mitochondrial disease through assisted conception: 2014 update. 2014 Jun 3 [citado 2014 Jun 11]. Disponible en: http://www.hfea.gov.uk/docs/Third_Mitochondrial_replacement_scientific_review.pdf.
132. Sgreccia, E. Manual de bioética. I, fundamentos y ética biomédica. 2ª ed. Madrid: Biblioteca de Autores Cristianos; 2009.
133. Piotrowska K, Wianny F, Pedersen RA, Zernicka-Goetz M. Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development* 2001;128(19):3739–48.
134. Declaración Universal de los Derechos Humanos. [citado 2014 Febr 25]. Disponible en: <http://www.un.org/es/documents/udhr/>.
135. Burgos JM. ¿Qué es la bioética personalista? Un análisis de su especificidad y de sus fundamentos teóricos. *Cuad Bioet* 2013;24(80):17-30.
136. Miralles, A Aparisi. El Proyecto Genoma y la ingeniería genética desde la perspectiva de los derechos humanos. Universidad de Navarra. Centro de Documentación de Bioética. 1999 [citado 2014 Febr 25]. Disponible en: <https://www.unav.es/cdb/uncib2a.html>.

137. Bredenoord AL, Pennings G, de Wert G. Ooplasmic and nuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disorders: conceptual and normative issues. *Hum Reprod Update* 2008;14(6):669–78.
138. Roubertoux PL, Sluyter F, Carlier M, Marcet B, Maarouf-Veray F, Chérif C et al. Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat Genet* 2003;35(1):65–9.
139. Lease LR, Winnier DA, Williams JT, Dyer TD, Almasy L, Mahaney MC. Mitochondrial genetic effects on latent class variables associated with susceptibility to alcoholism. *BMC Genet* 2005;6(Suppl 1):S158.
140. Nuffield Council on Bioethics. Human bodies: donation for medicine and research. 2011 Oct. [citado 2014 Febr 27]. Disponible en: http://www.nuffieldbioethics.org/sites/default/files/Donation_full_report.pdf.
141. Benedicto XVI. Instrucción Donum Vitae sobre el respeto de la vida humana naciente y la dignidad de la procreación. Congregación para la doctrina de la fe. 1987 Febr 22 [citado 2014 Febr 27]. Disponible en: http://www.vatican.va/roman_curia/congregations/cfaith/documents/rc_con_cfaith_doc_19870222_respect-for-human-life_sp.html.
142. Juan Pablo II. Evangelium Vitae. 1995 Mar 25 [citado 2014 Ene 29]. Disponible en: http://www.vatican.va/holy_father/john_paul_ii/encyclicals/documents/hf_jp-ii_enc_25031995_evangelium-vitae_sp.html.
143. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989;1(8634):347-9.
144. Velasco, M^aC Díaz de Terán. Diagnóstico preimplantatorio. Selección de sexo y eugenesia prenatal. En: *Bioética personalista: ciencia y controversias*. EIUNSA, Ediciones Internacionales Universitarias S.A;2007, págs. 223-241.
145. Brenner CA, Barritt JA, Willadsen S, Cohen J. Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril* 2000;74(3):573–8.
146. Burgos JM. El giro personalista: del qué al quién. Salamanca: Fundación Emmanuel Mounier, Colección Persona 37; 2011.

147. Solís LS. Técnicas de reproducción asistida. Aspectos éticos. Cuad Bioet 2000:37-47.
148. Kreitmann O, Hodgen GD. Low tubal ovum transfer; an alternative to in vitro fertilization. Fertil Steril 1980;34(4):375-8.

7. ANEXO 1

Mitochondrial Donation

A consultation on draft regulations to permit the use of new treatment techniques to prevent the transmission of a serious mitochondrial disease from mother to child.

Response Form

Name: Justo Aznar Lucea

Organisation represented (if appropriate): Instituto de Ciencias de la vida

Address: C/ Guillem de Castro, 94, 46003 Valencia, Spain

Question 9: Do you have comments on any other aspect of the draft regulations?

Your Comments:

Dear Sir or Madam,

We are writing in response to the open consultation launched on 27 February.

In terms of efficiency and safety, there is no evidence to recommend one technique over the other, and it is foreseeable that, in any case, it will be the resources invested in their development which will make the difference.

However, we argue that there are important ethical considerations that rise MST above PNT. Indeed, while PNT involves the destruction of one healthy embryo for each embryo to be treated, MST consists in handling gametes (oocytes). Furthermore, while PNT is inherently associated to *in vitro* fecundation (IVF), MST could be followed by gamete intrafallopian transfer (GIFT) or low tubal ovum transfer (LTOT), which do not rise the ethical concerns associated with IVF and could be preferable for the couple.

Given these ethical considerations, we strongly believe that research on this area should be focused on MST and research in PNT should be discontinued. Moreover, GIFT and/or LTOT should be explored as MST subsequent assisted reproduction

techniques. Additionally, we want to mention the alternative of Germinal Vesicle Transfer/Injection (GVT/I), which is another (nowadays less effective) option ethically less controversial than PNT.

In conclusion, we urge UK government to legislate in favor of MST / GVT/I + GIFT / LTOT, in order to ethically conduct research and clinical practice within the promising field of mitochondrial replacement.

Yours faithfully,

Justo Aznar Lucea
José Miguel Hernández Andreu
Lucía Gómez Tatay