

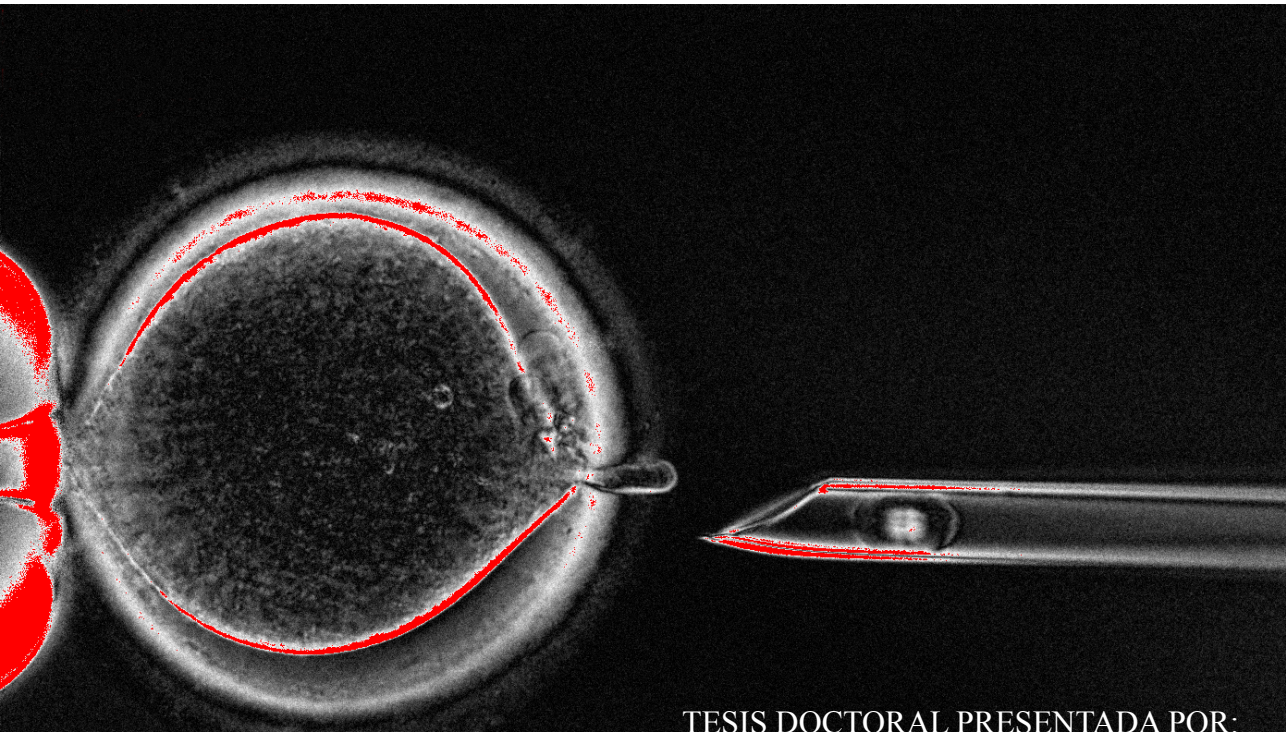


VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO  
030E BIOQUÍMICA CLÍNICO-MÉDICA E INMUNOLOGÍA

# TERAPIAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA GERMINAL Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:  
**NURIA MARTÍ GUTIÉRREZ**

DIRECTORA:  
DRA. M. ROSA PERIS SANCHIS

VALENCIA, OCTUBRE 2015





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

PROGRAMA DE DOCTORADO  
030E BIOQUÍMICA CLÍNICO-MÉDICA E INMUNOLOGÍA

**TERAPIAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL  
EN LA LÍNEA GERMINAL Y SUS  
APLICACIONES CLÍNICAS**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

**NURIA MARTÍ GUTIÉRREZ**

DIRECTORA:

**DRA. M. ROSA PERIS SANCHIS**

TUTOR:

**CATEDRÁTICO JUAN VIÑA RIBES**

**VALENCIA, OCTUBRE DE 2015**



# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Dra. M. Rosa Peris Sanchis, Profesora Titular de Anatomía y Embriología de la Universidad de Valencia.

INFORMA:

Que el presente trabajo, realizado por la Licenciada en Ciencias Biológicas Nuria Martí Gutiérrez y titulado “**Terapia de reemplazo mitocondrial en la línea germinal y sus aplicaciones clínicas**” ha sido realizado bajo su dirección en la Universidad de Ciencias de la Salud de Oregón.

Que expresa su conformidad para la presentación y evaluación del mismo, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia.

Y para que conste a todos los efectos, firma el presente certificado en:

Valencia a 29 de Octubre de 2015.



## **Agradecimientos:**

Quiero agradecer en primer lugar a mis compañeros del laboratorio en Portland, creo que formamos un gran equipo y sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo. Especialmente a Shoukhrat y a Eunju por todas las horas que me han dedicado y los buenos consejos.

Estoy muy agradecida a la Profesora Peris por haber confiado en mí y por el apoyo que me ha prestado en todo momento.

Una mención especial a María, gracias por todos los días que has pasado separada de tu familia para ayudarme durante la escritura de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a mis "loquitas", que han estado ahí siempre para apoyar, ayudar y sobretodo hacerme reír cuando no se veía el fin. ¡Parecía imposible pero lo hemos logrado!

A mis amigos del "Cito", con los que me inicié en investigación y lo pasé tan bien aquellos primeros años. Gracias por enseñarme tantas cosas e insistir en que terminara este trabajo.

No puedo olvidarme de mis amigas y sus constantes mensajes de ánimo que, estando tan lejos, hacen que cada día las sienta muy cerca. ¡Simplemente gracias!

Finalmente me gustaría dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres, Vicente y Patro, por entender todas mis decisiones y apoyarme incondicionalmente. A Félix muchísimas gracias por acompañarme en este viaje y hacer que todo parezca tan fácil. A Emma, mi bichito, gracias por recibirme siempre con una sonrisa. Y a su futura hermanita, que tantas ganas tengo de tener entre nosotros. Muchísimas gracias, nada de esto habría sido posible sin vosotros.





*A mi padre*



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	13
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1. LA MITOCONDRIA.....	19
1.1. ESTRUCTURA DE LA MITOCONDRIA.....	19
1.2. EL ADN MITOCONDRIAL.....	21
1.3. EL SISTEMA OXPHOS.....	24
1.4. MUTACIONES DEL ADN <sub>mt</sub> .....	25
2. OVOGÉNESIS, FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTACIONAL.....	33
2.1. OVOGÉNESIS.....	33
2.2. FECUNDACIÓN.....	35
2.3. DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTACIONAL.....	36
3. TERAPIA DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL.....	38
3.1. TÉCNICAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL.....	39
3.2. SEGURIDAD Y EFECTIVIDAD EN LAS TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL.....	46
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	51
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	55
1. ESTUDIO 1. REEMPLAZAMIENTO DEL ADN <sub>mt</sub> DE OVOCITOS HUMANOS.....	57
2. ESTUDIO 2. INCOMPATIBILIDAD ENTRE EL ADN <sub>mt</sub> Y ADN <sub>n</sub> COMO BARRERA DE AISLAMIENTO POST-ZIGÓTICA EN RATONES.....	68
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	77
1. ESTUDIO 1. REEMPLAZAMIENTO DEL ADN <sub>mt</sub> EN OVOCITOS HUMANOS.....	79
1.1. REEMPLAZAMIENTO DEL ADN EN OVOCITOS HUMANOS ENTRE DONANTES SANAS.....	79

1.2. REEMPLAZAMIENTO DEL ADN <sub>mt</sub> ESTUDIANDO EL EFECTO DE HAPLOTIPOS DISTINTOS, LA PRESENCIA DE ADN <sub>mt</sub> MUTADO Y LA VITRIFICACIÓN Y POSTERIOR DESCONGELACIÓN DE LOS OVOCITOS .....	98
2. ESTUDIO 2. INCOMPATIBILIDAD ENTRE EL ADN <sub>mt</sub> Y ADN <sub>n</sub> COMO BARRERA DE AISLAMIENTO POST-ZIGÓTICA EN RATONES.....	119
2.2. PRODUCCIÓN DE RATONES CÍBRIDOS MEDIANTE REEMPLAZAMIENTO MITOCONDRIAL Y EL ESTUDIO DE SU FERTILIDAD .....	121
2.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HETEROPLASMA Y SEGREGACIÓN EN LA LÍNEA GERMINAL .....	130
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	137
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	141
<b>ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	155
<b>ANEXOS</b> .....	163

## ABREVIATURAS

<b>ADNmt</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
<b>ADNn</b>	Ácido desoxirribonucleico nuclear.
<b>ARMSs-qPCR</b>	PCR cuantitativa de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones.
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal.
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico de transferencia.
<b>B6</b>	Cepa C57Bl/6 de la subespecie <i>Mus m. domesticus</i> .
<b>CB</b>	Citocalasina B.
<b>CNV</b>	Variación en el número de copias.
<b>COCs</b>	Complejos Cúmulo-ovocito.
<b>CP</b>	Corpúsculo polar.
<b>CP1</b>	Primer corpúsculo polar.
<b>CP2</b>	Segundo corpúsculo polar.
<b>D</b>	Ensayo discriminativo.
<b>DGP</b>	Diagnóstico genético preimplantacional.
<b>ESC</b>	Células madre embrionarias.
<b>F1, F2 y F3</b>	Generaciones primera, segunda y tercera.
<b>FADH</b>	Flavin adenin dinucleótido.
<b>GnRH</b>	Hormonas liberadoras de gonadotropinas.
<b>GV</b>	Vesícula germinal.

<b>hCG</b>	Hormona gonadotropina coriónica humana.
<b>hESC</b>	Células madre embrionarias humanas.
<b>hMG</b>	Hormona gonadotropina menopáusica humana.
<b>HSP</b>	Promotor para la transcripción de la cadena pesada.
<b>HSV-1</b>	Segmento hipervariable 1.
<b>ICM</b>	Masa celular interna.
<b>ICR</b>	Cepa de ratón de la subespecie <i>Mus m. domesticus</i> .
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide.
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal.
<b>IRB</b>	Junta de Evaluación Institucional.
<b>ISCNT</b>	Transferencia nuclear de célula somática interespecie.
<b>LHON</b>	Neuropatía óptica hereditaria de Leber.
<b>Líneas HESO</b>	Líneas de células madre embrionarias humanas de Oregón.
<b>Líneas HESO-ST</b>	Líneas de célula madre embrionarias humanas- Transferencia de la placa metafásica.
<b>Líneas HESO-STP</b>	Líneas de células madre embrionarias humanas de Oregón. Transferencia de placa metafásica en pacientes
<b>LSP</b>	Promotor para la transcripción de la cadena ligera.
<b>mEF</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón.
<b>MELAS</b>	Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular.
<b>MERRF</b>	Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas.
<b>MI</b>	Metafase I.

<b>MII</b>	Metafase II.
<b>MPF</b>	Factor promotor de la maduración.
<b>MR1 y MR2</b>	Reemplazamiento mitocondrial 1 y 2 (generación de híbridos).
<b>MR3 y MR4</b>	Reemplazamiento mitocondrial 3 y 4 (generación de híbridos).
<b>MRT</b>	Terapia de reemplazamiento mitocondrial.
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido.
<b>NARP</b>	Neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria.
<b>ND</b>	Ensayo no discriminativo.
<b>OH</b>	origen para la duplicación de la cadena pesada.
<b>OHSU</b>	Universidad de Ciencias y Salud de Oregón.
<b>OL</b>	replicación de la cadena ligera.
<b>OXPHOS</b>	Sistemas o vías de fosforilización oxidativa.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PI</b>	Profase de la primera división meiótica.
<b>PM</b>	Placa metafásica.
<b>PMSG</b>	Gonadotropina de suero de yegua gestante.
<b>PN</b>	Pronúcleos.
<b>PWD</b>	Cepa de ratón de la subespecie <i>Mus m. musculus</i> .
<b>RFLP</b>	Polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción.
<b>rFSH</b>	Hormona estimulante del folículo recombinante.
<b>ROS</b>	Especies reactivas de Oxígeno.

<b>SCID</b>	Ratones inmunodeprimidos.
<b>SeV</b>	Extracto de virus Sendai.
<b>Síndrome de LEIGH</b>	Encefalopatía necrotizante infantil subaguda.
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido.
<b>SPS</b>	Sustrato de suero proteico.
<b>ST</b>	Transferencia del complejo cromosomas-huso acromático, también llamado placa metafásica (Spindle Transfer).
<b>STR</b>	Polimorfismo de repeticiones cortas en tándem.
<b>TCP</b>	Transferencia del corpúsculo polar.
<b>TCP1</b>	Transferencia del primer corpúsculo polar.
<b>TCP2</b>	Transferencia del segundo corpúsculo polar.
<b>TPN</b>	Transferencia de pronúcleos.



## ***I. INTRODUCCIÓN***

---

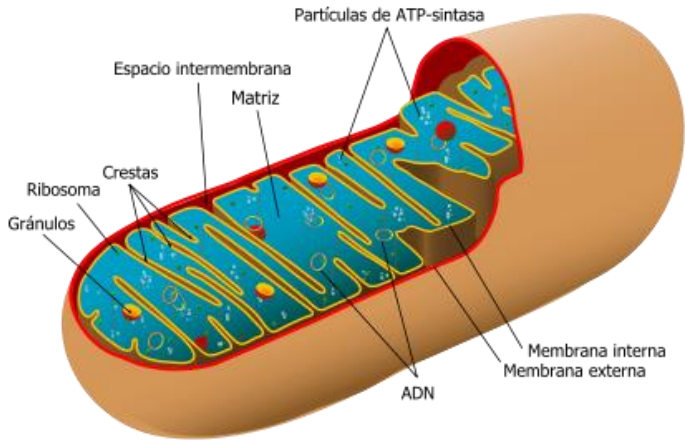


## **1. LA MITOCONDRIA**

### **1.1. ESTRUCTURA DE LA MITOCONDRIA**

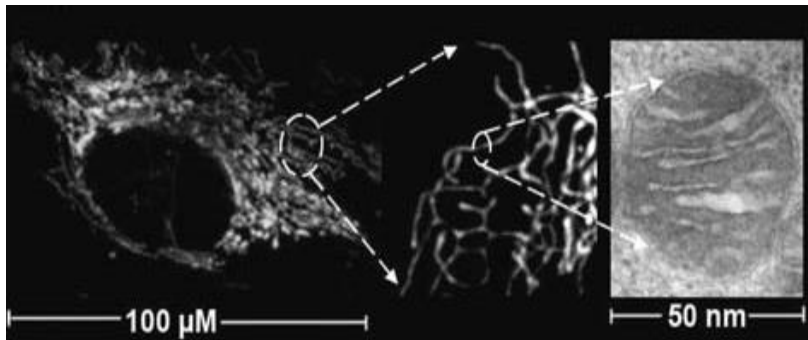
Las mitocondrias son unos orgánulos semiautónomos que contienen su propio genoma. Su papel principal es proveer a las células de energía metabólica en forma de ATP generado a través de la oxidación fosforilativa (OXPHOS) <sup>1</sup>. Las mitocondrias también juegan un papel importante en otros procesos celulares como son la termogénesis adaptativa <sup>2</sup>, la homeostasis de iones, especialmente calcio<sup>3</sup>, la respuesta inmune innata <sup>4</sup>, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) <sup>5</sup> y la muerte celular programada, llamada apoptosis<sup>6</sup>.

En las células eucarióticas las mitocondrias fueron identificadas hace 120 años. Fueron descritas como un conjunto de vesículas, con más de 100 copias por célula, que permanecen libres en el citosol<sup>7</sup>. En la década de 1950 mediante técnicas de microscopía electrónica se describió la estructura de las mismas, éstas están formadas por la membrana externa que es lisa, por la membrana interna que está altamente plegada y cada pliegue recibe el nombre de cresta, donde se encuentra el sistema de OXPHOS, también por el espacio contenido dentro de la membrana interna que recibe el nombre de matriz mitocondrial y por último, por el espacio intermembrana<sup>8</sup>. (Figura 1).



**Figura 1. Estructura de la mitocondria.**

En la década de 1980 mediante el uso de técnicas microscópicas, se pudo observar en células vivas, lo cual llevó a la conclusión de que las mitocondrias no son los orgánulos solitarios que se pensaba que eran, sino que son orgánulos dinámicos que pueden formar redes interconectadas<sup>9</sup>. (Figura 2).



**Figura 2. De la mitocondria a la red mitocondrial.** A la izquierda una imagen de la red mitocondrial por microscopía de fluorescencia (bi-photonica) usando GFP. La imagen central muestra una ampliación de la red mitocondrial. A la derecha se observa la sección de un túbulo mostrando la visión clásica de la mitocondria. Benard, G. & Rossignol, R. *Antioxid. Redox Signal.* 2008.

Las mitocondrias se mueven a lo largo del citoesqueleto de la célula sufriendo procesos de fusión y fisión<sup>1</sup>. Los procesos de fusión favorecen la generación de mitocondrias interconectadas siendo esto especialmente beneficioso para las células metabólicamente activas<sup>10</sup>, por el contrario los procesos de fisión favorecen la generación de numerosos fragmentos mitocondriales presentes con frecuencia en células quiescentes<sup>11</sup>.

## 1.2. EL ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una doble cadena circular de aproximadamente 16.6Kb en humanos (16.3Kb en ratón). Está formado por una cadena pesada o H, (Heavy) y por una cadena ligera o L (Light) que codifican para 37 genes, de los cuales 13 codifican para proteínas que forman parte del sistema OXPHOS. Éstas incluyen 7 de las 45 proteínas del complejo I (ND1-3, ND4L, ND4-6), 1 de las 11 proteínas del complejo III (Cytb), 3 de las 13 proteínas del complejo IV (COI-COIII) y 2 de las 15 proteínas del complejo V (ATP6 y 8). Además 22ARN de transferencia (ARNt) y 2 ARN ribosomales (ARNr)<sup>12</sup>. El resto de proteínas que forman parte del sistema OXPHOS, las proteínas necesarias para los procesos de duplicación, transcripción y traducción y los enzimas necesarios para el metabolismo mitocondrial están codificadas en los genes del ADN nuclear (ADNn)<sup>13</sup>.

Solo existen 2 regiones no codificantes en el ADNmt. Una de ellas es la región de control principal llamada D-loop de aproximadamente 1100 pb que contiene la región del promotor para la transcripción de la cadena pesada (HSP) y de la cadena ligera (LSP) y también la región de origen para la duplicación de la cadena pesada (OH). La otra región no codificante consiste en una zona de sólo 30 pb situada entre los genes ND2 y COXI y contiene la región de origen para la

replicación de la cadena ligera (OL)<sup>14</sup>. Excepto estas regiones no codificantes el ADNmt no tiene separación entre genes ni intrones, es más algunas de las regiones codificantes se sobreponen entre ellas<sup>15</sup>. (Figura 3).

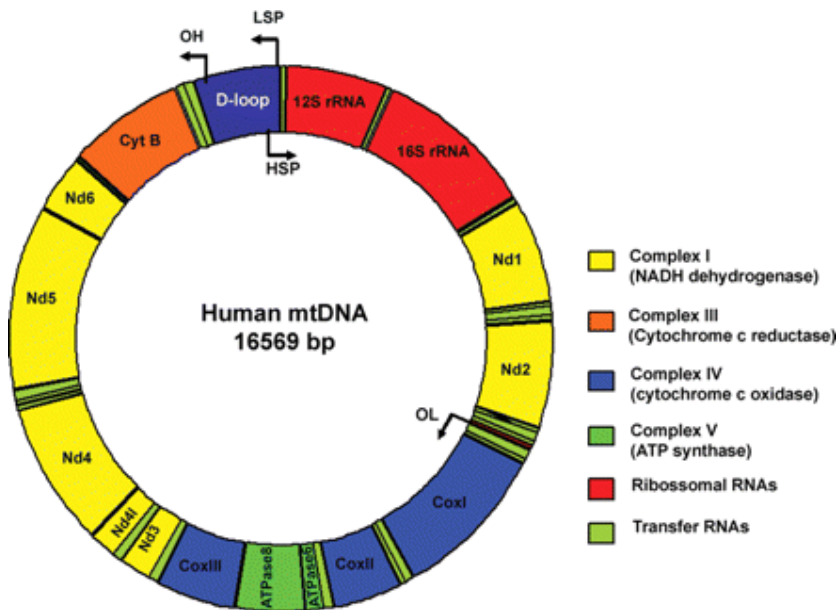


Figura 3. El ADNmt humano. St. John et al., Hum Reprod Update. 2010.

El ADNmt se hereda por vía materna. Esto se logra en parte por la dilución del ADNmt del espermatozoide con el ADNmt del ovocito, ya que el ovocito contiene por encima de las 200.000 copias mientras que el espermatozoide tiene sólo cientos<sup>16</sup>. Posteriormente el ADNmt paterno es eliminado selectivamente. Los espermatozoides de mamíferos tienen la proteína prohibitina situada en la membrana externa mitocondrial ubiquinada, lo que permite que las mitocondrias de los espermatozoides sean reconocidas por el ovocito como extrañas y degradadas<sup>17</sup> antes de que se produzca la activación génica embrionaria<sup>18</sup>.

El ADNmt tiene una elevada tasa de mutación<sup>19</sup>, lo cual es debido en parte a la generación de ROS en las mitocondrias<sup>14</sup> y a la ausencia de histonas que le protejan<sup>20</sup>. Como consecuencia de la alta tasa de mutación, el ADNmt es altamente polimórfico en la población, sin embargo cada individuo suele ser homoplásmico, es decir que sólo es portador de una sola variante de ADNmt<sup>21</sup>, aunque es posible la presencia de dos o más variantes de ADNmt en un sólo individuo, lo que se llama heteroplasmia. Se ha observado que los genotipos heteroplásmicos de ADNmt tienden a volver a la homoplasmia en pocas generaciones.

Durante décadas se pensó que la segregación mitocondrial se debía al azar pero la evidencia de una rápida pérdida de las mutaciones más severas en pocas generaciones ha cambiado este punto de vista<sup>22,23</sup>. La hipótesis más extendida para explicarla es la existencia de un cuello de botella mitocondrial, aunque la naturaleza de éste se encuentra ante un intenso debate. Diversos estudios proponen diferentes mecanismos que no necesariamente se excluyen entre ellos.

Estos mecanismos incluyen: uno, la masiva reducción del ADNmt durante el desarrollo embrionario temprano<sup>24</sup>; dos, la rápida segregación del ADNmt en embriones pre-implantacionales. Tras la fecundación del ovocito el número de copias del ADNmt permanece constante durante el desarrollo pre-implantacional<sup>25</sup>, lo que implica que las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto tengan un número reducido de copias del ADNmt<sup>26,27</sup> debido a la segregación de las mitocondrias durante las divisiones celulares, ya que el número total de mitocondrias del óvulo se divide entre todas las células del blastocisto. Esta reducción de las copias de ADNmt en las células de la ICM que van a dar lugar al feto asegura que muy pocas copias estén disponibles para su amplificación en los distintos tejidos del mismo; tres, la agregación de variantes

idénticas del ADNmt sin que tenga lugar una reducción del número de copias del ADNmt<sup>28</sup> y cuatro la amplificación preferencial por una variante del ADNmt específica en las células germinales, lo que implica una selección activa<sup>29</sup>.

Todas estas teorías aseguran que las mutaciones son eliminadas o fijadas en función de su severidad en pocas generaciones, de forma que mutaciones beneficiosas pueden ser fijadas y mutaciones letales no permiten que los ovocitos lleguen a madurar y sean transmitidas<sup>30,31</sup>.

### 1.3. EL SISTEMA OXPHOS

Para entender las implicaciones clínicas de las mutaciones en el ADNmt es esencial entender el papel que la oxidación fosforilativa juega en la biología de la célula, ya que la mitocondria oxida las calorías de nuestra dieta con el oxígeno que respiramos para generar aproximadamente el 95% de la energía de la célula<sup>32</sup>.

El proceso se inicia con la oxidación de NADH por el complejo I (NADH dehidrogenasa) o por la oxidación de FADH por el complejo II (succinato dehidrogenasa). Los electrones son transferidos secuencialmente al Coencima Q, complejo III (citocromo c oxidoreductasa), citocromo c, complejo IV (citocromo c oxidasa) y finalmente al oxígeno produciendo agua. A medida que los electrones atraviesan los complejos I, III y IV la energía liberada se usa para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, lo cual crea un gradiente electroquímico transmembrana de -0.2 voltios que es utilizado por el complejo V (ATP sintasa) para generar ATP a partir de ADP y fosfato, de esta forma se une la oxidación de la cadena transportadora de electrones con la fosforilación de la ATP sintasa<sup>33</sup>.



## 1.4. MUTACIONES DEL ADNmt

Los genes del ADNmt tienen una altísima tasa de evolución, de unas 10 a 20 veces superior a los genes del ADNn<sup>34</sup>, lo cual se debe a la elevada tasa de mutación del ADNmt y a su tasa de fijación de mutaciones.

Clínicamente existen tres clases relevantes de variantes del ADNmt: unas son las mutaciones adaptativas que dan origen a los haplogrupos, otras, las mutaciones deletéreas que causan las enfermedades mitocondriales y por último, las mutaciones somáticas<sup>33</sup>.

### 1.4.1. HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

Hay una gran diversidad en la secuencia del ADNmt (polimorfismos) entre individuos y también entre poblaciones. Diferentes polimorfismos se han ido acumulando a lo largo de la historia mientras los humanos salían de África y colonizaban el planeta. Si una nueva mutación beneficiaba de algún modo a los individuos en un determinado medioambiente, entonces esa variante se veía favorecida en esa localización geográfica. De esta forma cada continente y área geográfica está asociada con unas secuencias de ADNmt determinadas que llamamos haplotipos<sup>33</sup>.

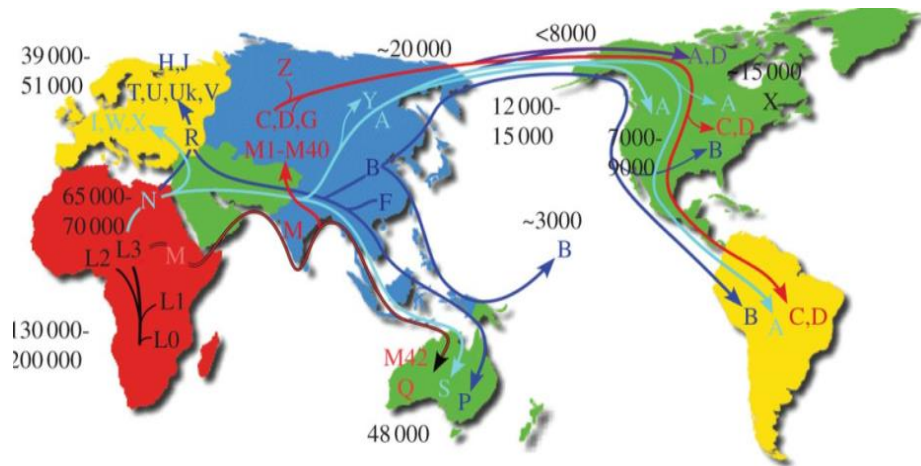
Todas las variantes del ADNmt del continente africano están relacionadas y forman el macrohaplogrupo L que surgió hace 130.000-200.000 años. Hace unos 65.000 años el haplogrupo L3 dio lugar a 2 variaciones llamadas M y N, siendo estas variantes las que salieron de África y colonizaron el resto del mundo, dando lugar a los macrohaplogrupos M y N.

Hace unos 48.000 años el macrohaplogrupo M salió de África y se movió a través de la India y a lo largo de la costa sureste de Asia hasta llegar a Australia

generando los haplogrupos Q y M42. Desde la costa sureste se movió hacia el norte para dar lugar a los linajes de ADNmt de Asia Central que incluyen los haplogrupos C, D, G y M1-M40. En el noreste de Asia el haplogrupo C dio lugar al haplogrupo Z.

El macrohaplogrupo N tuvo dos movimientos. Uno al igual que el M hacia el sureste asiático y de allí a Australia generando el haplogrupo S. En Asia el macrohaplogrupo M se movió hacia el norte generando el haplogrupo de Asia central A y el haplogrupo de Siberia Y. El segundo movimiento fue desde el oeste de Eurasia hacia el norte dando lugar a los haplogrupos europeos I, W y X. En Eurasia surgió el submacrohaplogrupo R que se movió, por una parte, hacia el oeste dando lugar al resto de haplogrupos europeos H, J, Uk, T, U y V y, por otra parte, hacia el este dando lugar al haplogrupo australiano P y a los haplogrupos del este asiático B y F.

Hace unos 20.000 años los haplogrupos C y D provenientes de M y el haplogrupo A proveniente de N aumentaron su presencia en el noreste de Siberia y fueron los que migraron a través del estrecho de Bering a América, expandiéndose por Norte América, América Central y Sudamérica. El haplogrupo X con gran presencia en Europa y también en Mongolia, sin embargo no en Siberia, llegó a Norte América donde ha permanecido desde hace unos 15.000 años. Por último el haplogrupo B con gran presencia en la costa este asiática, aunque no en Siberia, llegó a América hace unos 12.000-15.000 años expandiéndose como C, D y A por Norte América, América Central y Sudamérica. (Figura 4).



**Figura 4. Historia de la migración de los haplogrupos del ADNmt humano.** Wallace, D.C & Chalkia D., Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013.

Más recientemente, hace unos 3.000 años el haplogrupo B migró hacia el sur a lo largo de la costa asiática y colonizó las islas del Pacífico<sup>35</sup>.

Los haplogrupos nombrados anteriormente se dividen en subramas que dan lugar a miles de haplogrupos distintos. El árbol filogenético global de las variaciones de ADNmt en humanos se puede encontrar en la página *web phylotree.org* que se actualiza regularmente para incorporar la información sobre nuevas secuencias.

Los cambios en las secuencias del ADNmt se deben a polimorfismos de un solo nucleótidos (SNPs). Se ha observado que la distancia entre haplotipos sigue una distribución bimodal con un pico a los 45 SNPs (entre haplotipos más próximos) y un segundo pico a los 100 SNPs (entre haplotipos más alejados), con un rango de 0 a 130 SNPs<sup>36</sup>.

### 1.4.2. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las manifestaciones clínicas de las enfermedades mitocondriales son muy variadas. Se puede encontrar pérdida del control motor, retraso en el desarrollo, accidentes cerebrovasculares, problemas gastrointestinales, cardiomiopatías, disfunciones hepáticas y pancreáticas, diabetes, ceguera, sordera etc. En general suelen afectar a órganos y tejidos con una gran demanda energética como son el cerebro, corazón, músculo, páncreas y riñón<sup>37</sup>.

Las enfermedades mitocondriales se dividen en dos grupos. Por una parte las causadas por alteraciones en el ADNn y, por otra parte, las causadas por mutaciones en el ADNmt. Estas últimas se subdividen en mutaciones en genes codificantes de proteínas y mutaciones en genes que codifican para ARNr o ARNt, dependiendo la severidad de los síntomas no solo de la mutación en sí, sino también del nivel de heteroplasmia<sup>37</sup>. Es conocida la mutación T8993C/G en el gen ATP6 que produce neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria (NARP) con niveles de heteroplasmia entre 70-90%, mientras que si los niveles son mayores pueden producir el Síndrome de Leigh, con una sintomatología mucho más grave que NARP. El nivel umbral de heteroplasmia a partir del cual se expresa la enfermedad en la mayoría de las enfermedades mitocondriales varía dependiendo de la mutación y del tejido, pero suele encontrarse del 50% al 100% de heteroplasmia del ADNmt mutado. Sin embargo, existen algunas mutaciones del ADNmt que tienen su umbral en niveles de heteroplasmia del 10%<sup>38,39</sup>.

La primera vez que se publicó que una mutación en el ADNmt podía causar una enfermedad fue en 1988. Se trataba de dos pacientes, uno de ellos con una delección en el ADNmt que le provocó una miopatía mitocondrial<sup>40</sup> y otro con una mutación homoplásmica en el gen ND4 que le causaba una neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)<sup>41</sup>. Dada la alta tasa de mutación del ADN mitocondrial, nuevas mutaciones patogénicas se introdujeron en la población.

Actualmente, en la página *web mitomap 2015* hay recogidas 301 mutaciones deletéreas que afectan a las regiones control y a los genes codificantes de proteínas y 304 mutaciones deletéreas que afectan a los genes que codifican para ARNr y ARNt. Algunas de las enfermedades más comunes causadas por mutaciones en el ADNmt son el síndrome de Leigh, la neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria (NARP), la encefalopatía con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares (MELAS), la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) o la epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF).

Diversos estudios epidemiológicos estiman que la incidencia de las enfermedades mitocondriales es de alrededor de 1 cada 5.000 individuos<sup>42</sup>, pero todavía es más sorprendente que el análisis de cordones umbilicales de recién nacidos revelaran que 1 de cada 200 era portador de una mutación patogénica<sup>43</sup>, aunque no todos estos niños desarrollaran la enfermedad debido a que el nivel de heteroplasmia de estas mutaciones era bajo.

A continuación se prestará una especial atención a diversas enfermedades mitocondriales, ya que, aunque no son objeto del presente estudio, si son relevantes para el mismo, como son el Síndrome de Leigh, NARP y MELAS.

#### 1.4.2.1. SÍNDROME DE LEIGH

El síndrome de Leigh también llamado encefalomiopatía necrotizante infantil subaguda, es un desorden neurodegenerativo progresivo que produce retraso motor e intelectual, además puede ir acompañado de complicaciones cardíacas, respiratorias, renales y pérdida de visión. Aparece generalmente en el primer año de vida, siendo la causa de lesiones necróticas multifocales en el sistema nervioso central debido a desmielinización, gliosis y/o proliferación vascular.

Este síndrome se caracteriza por estar causado tanto por genes mitocondriales, como por genes nucleares. Los genes mitocondriales afectados pertenecen al complejo I, IV y V, siendo la mutación más común T8993G/C en el gen ATP6 que afecta al complejo V<sup>44</sup>.

### 1.4.2.2. NARP

La neuropatía con ataxia y retinitis pigmentaria conocida como NARP es un síndrome caracterizado por presentar retinitis pigmentaria, retraso intelectual, convulsiones, debilidad muscular y neurogénica, ataxia, neuropatía sensitiva y/o cardiomiopatía.

Esta enfermedad está causada por la mutación T8993G/C en el gen ATP6, que como se ha mencionado anteriormente es la mutación más común en el síndrome de Leigh, pero cuando se encuentra en niveles de heteroplasmia menores, (alrededor de 70-90%) produce NARP. Es importante destacar que es posible encontrar en una misma familia individuos que presentan NARP y otros que presentan el Síndrome de Leigh<sup>14</sup>.

### 1.4.2.3. MELAS

La encefalopatía con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares comúnmente conocida como MELAS, consiste en un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la presencia de una encefalomiopatía, acompañada de acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares. Además también son frecuentes otros síntomas como convulsiones, demencia, sordera y cefaleas.

Se han observado al menos 17 mutaciones que causan MELAS, siendo la más común y la causante aproximadamente del 80% de los casos la mutación

A3243G localizada en el gen ARNt<sup>Leu</sup>. Esta misma mutación también está asociada a otras enfermedades mitocondriales<sup>45</sup>.

#### 1.4.2.4. MECANISMOS ACTUALES DE PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Actualmente no hay ningún tratamiento para las enfermedades mitocondriales, los únicos disponibles sólo alivian los síntomas e intentan retrasar la progresión de la enfermedad, por lo tanto, todos los esfuerzos están centrados en la prevención de la transmisión de madres a hijos de dichas enfermedades, aunque hay que decir que el éxito de los métodos de prevención, sin renunciar a los genes nucleares maternos, es limitado hasta el momento.

El primer método es la donación de ovocitos. Es el método más simple para asegurar la completa eliminación de la transmisión de la mutación del ADNmt. La desventaja es que se pierde cualquier herencia genética de la madre, no solo la del ADNmt<sup>46</sup>.

Si no se quiere renunciar a los genes maternos, uno de estos métodos es el diagnóstico prenatal, el cual es muy efectivo en el diagnóstico de mutaciones génicas en el ADNn, pero que desafortunadamente no resulta muy útil en el diagnóstico de enfermedades del ADNmt. El problema radica en la heteroplasmia y la segregación del ADNmt mutado, pudiéndose determinar el nivel de heteroplasmia en muestras de vellosidades coriónicas o amniocentesis, pero existe un problema el cual reside en que, debido a la segregación, no es seguro que ese nivel de heteroplasmia se corresponda al del cerebro, corazón, músculo o riñón. Además, para la mayoría de las enfermedades mitocondriales es incierto cual es el nivel seguro de heteroplasmia. En la literatura existen autores que postulan que niveles superiores al 60% de heteroplasmia, medidos durante el

desarrollo prenatal para la mutación A3243G, causan MELAS en el individuo, mientras que niveles inferiores al 30% lo más probable es que den lugar a individuos sanos. Pero el problema es qué ocurrirá en los individuos provenientes de fetos con heteroplasmia entre el 30% y el 60%<sup>47</sup>. A este problema hay que añadir la posibilidad de que las mujeres conciban repetidas veces y los resultados de las muestras de vellosidades coriónicas y/o amniocentesis den siempre niveles altos de heteroplasmia para el ADNmt mutado, lo que lleva a múltiples abortos<sup>48</sup>.

Otra de las formas de actuación preventiva es el diagnóstico genético pre-implantacional (DGP), en el que una de las posibilidades es el estudio del primer corpúsculo polar. Distintos trabajos realizados en ratón sobre el estudio del primer corpúsculo polar parecían prometedores, ya que se habían observado niveles de heteroplasmia similares en él a los del resto del embrión<sup>49</sup>. Desafortunadamente, estudios en humanos han demostrado que el corpúsculo polar puede tener niveles de heteroplasmia muy distintos a los del resto del embrión<sup>50</sup>.

La otra posibilidad es el estudio de blastómeras o células del trofoectodermo en embriones pre-implantacionales. Algunos estudios en humanos han tenido resultados prometedores determinando el nivel de heteroplasmia de las mutaciones T8993G (NARP/Leigh) y A3242G (MELAS) mediante DGP<sup>47,51</sup>, aun así tiene grandes limitaciones. Sobre todo no es útil en mujeres homoplásmicas o incapaces de producir ovocitos con una baja carga de ADNmt mutado. Además, aunque los niveles de heteroplasmia se hayan visto consistentes entre el embrión y el feto ya que las distintas blastómeras han dado niveles de heteroplasmia similares y a su vez similares al feto, los niveles de heteroplasmia entre los distintos tejidos pueden ser muy diferentes al obtenido tras DGP debido a la segregación.



### 1.4.3. MUTACIONES SOMÁTICAS DEL ADN<sub>mt</sub>

Estas mutaciones aparecen *de novo* en los diversos tejidos a lo largo del tiempo y progresivamente van deteriorando la función mitocondrial generando el llamado reloj biológico<sup>13</sup>.

Estas mutaciones pueden aparecer en cualquier momento, desde el desarrollo embrionario hasta la vejez del individuo. Así pues, cuanto antes aparecen en el desarrollo más ampliamente se distribuyen en el individuo.

## **2. OVOGÉNESIS, FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTACIONAL**

### 2.1. OVOGÉNESIS

Durante el desarrollo fetal, las ovogonias (células precursoras de los ovocitos) inician la primera división meiótica dando lugar a los ovocitos primarios. Cuando el ovocito alcanza el estadio de profase de la primera división meiótica (PI), se produce la primera detención meiótica, coincidiendo con el momento del nacimiento. Este estadio se caracteriza por un núcleo prominente llamado vesícula germinal (GV). En su interior se encuentran los cromosomas condensados, cada uno formado por 2 cromátidas, es decir un número diploide de cromosomas con 4 copias del ADNn. Durante esta fase los cromosomas homólogos se recombinan asegurándose la diversidad genética. Mientras, el ovocito detenido se rodea de células somáticas, constituyendo así el folículo primordial<sup>52</sup>.

Una vez llegada la pubertad, periódicamente algunos folículos primordiales inician una fase de crecimiento. Las células somáticas que rodean al

ovocito se dividen, adquieren receptores para las gonadotropinas que van a regular su maduración posterior y establecen uniones gap con el ovocito que le proveen de macromoléculas. Mientras tanto el ovocito, que sigue detenido en PI, va aumentando de tamaño y acumulando todo el material necesario que permitirá el desarrollo temprano del embrión<sup>52</sup>. Durante este periodo se produce un aumento en el número de mitocondrias del ovocito que quedan distribuidas por todo el citoplasma estando ausentes de la parte cortical<sup>53</sup>.

Una vez por ciclo menstrual las gonadotropinas inducen la maduración ovocitaria de los ovocitos que se encuentran en los folículos que habían iniciado la fase de crecimiento. Todavía en el interior del folículo tiene lugar la rotura de la membrana del núcleo y se forma el huso acromático donde se sitúan los cromosomas dando lugar a la placa metafásica. La placa migra hacia la superficie del ovocito y extruye el primer corpúsculo polar (CP1) que contiene la mitad de los cromosomas homólogos dándose por terminada la primera fase de la división meiótica.

Un nuevo huso acromático se forma y en él se sitúan la otra mitad de los cromosomas que aún permanecen en el ovocito, dando lugar a una nueva placa metafásica. Este estadio se llama metafase II (MII), se caracteriza por tener un número haploide de cromosomas, aunque cada cromosomas aún conserva dos cromátidas por lo que tiene dos copias del ADNn. El ovocito queda detenido en este estadio a la espera de ser fecundado para reanudar la meiosis. Mientras el ovocito madura, que en humanos dura unas 24 horas, las células somáticas que rodean al ovocito se expanden, produciéndose una rotura del folículo y el ovocito detenido en MII es liberado a la Trompa de Falopio<sup>52</sup>.

## 2.2. FECUNDACIÓN

El espermatozoide fecunda al ovocito en el oviducto, de tal manera que cuando el espermatozoide penetra en el ovocito desencadena una serie de oscilaciones en el nivel intracelular de calcio que provoca la reducción de los niveles del factor promotor de la maduración (MPF)<sup>54</sup>, molécula básica para la detención del ovocito en MII, formada por dos subunidades, una proteína llamada  $p34^{cdc2}$  con función kinasa dependiente de ciclina, cuyos niveles se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular y una ciclina B, con función reguladora, ya que para que tenga lugar la inactivación del MPF es necesaria su proteólisis<sup>55</sup>. Como consecuencia de la disminución de MPF activo, el ovocito sale del arresto meiótico, extruye el segundo corpúsculo polar (CP2) con una cromátida de cada uno de los cromosomas que permanecían en el ovocito MII y se forman los pronúcleos (PN) femenino y masculino, cada uno de ellos con una dotación haploide del ADN<sup>n</sup><sup>52</sup>. (Figura 5).

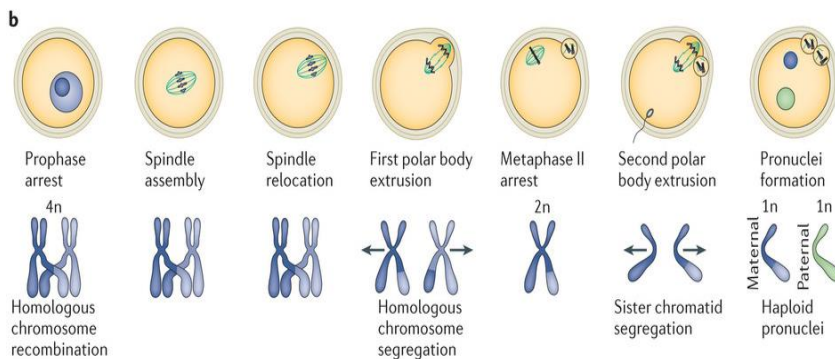


Figura 5. Maduración ovocitaria y su correspondiente configuración cromosómica. Clift D & Schuh M., Nature Rev. 2013.

La fecundación del ovocito por el espermatozoide da lugar al cigoto. En el cigoto los PNs femenino y masculino migran el uno hacia el otro, se rompen las membranas nucleares, se forma el primer huso mitótico y los cromosomas

provenientes de ambos PNs se sitúan en él dando lugar a una célula con una dotación cromosómica diploide.

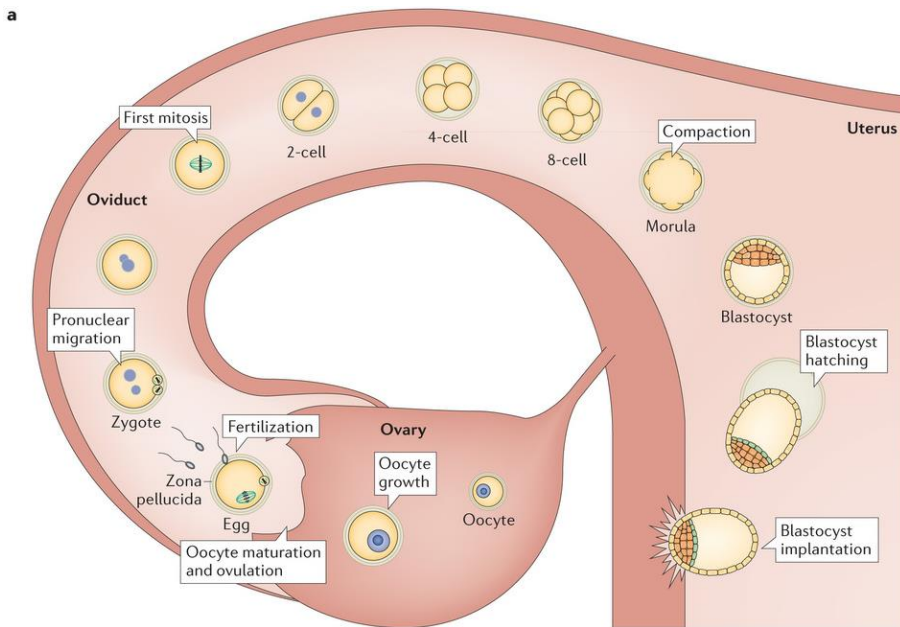
### 2.3. DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTACIONAL

A partir de ahora tiene lugar la fase de segmentación, la cual consiste en una serie de divisiones mitóticas rápidas que dan lugar a células más pequeñas pero todas con un tamaño uniforme, llamadas blastómeras. Las blastómeras empiezan a adherirse unas con otras en el estadio de 8 células y posteriormente con 16 células experimentan la compactación para formar una bola de células compacta llamada mórula, donde las blastómeras se aprietan entre sí por medio de uniones gap.

Desde este momento las siguientes divisiones celulares van a generar dos tipos distintos de células. Las que se encuentran en la parte exterior del embrión, que sufren un proceso de división más rápido y las que se encuentran en la parte interior del embrión con un proceso de división más lento. Al cuarto día, la mórula formada por unas 32 células comienza el proceso por el cual se empieza a formar una cavidad rellena de líquido en el interior del embrión y el embrión pasa a llamarse blastocisto.

En el blastocisto mientras las células se siguen dividiendo la cavidad, llamada blastocele, se va expandiendo de forma que las células de la zona interna se ven desplazadas hacia uno de los lados y dan lugar a la masa celular interna (ICM) de donde derivan las hojas blastodérmicas que darán lugar al individuo propiamente dicho. A esta zona se le denomina polo embrionario. Mientras tanto las células de la pared externa del embrión han dado lugar al trofoectodermo que forma la capa periférica del blastocisto de donde derivan las estructuras extraembrionarias necesarias para mantener el desarrollo embrionario en el útero.

En este momento el blastocisto ha llegado al útero, escapa de la zona pelúcida que le rodea y se implanta en la pared de dicho útero donde el embrión continúa su desarrollo<sup>52</sup>. Al desarrollo embrionario de cigoto a blastocisto se le conoce como desarrollo embrionario pre-implantacional y es posible llevarlo a cabo *in vitro*. Este desarrollo pre-implantacional se puede observar en la Figura 6.



**Figura 6. Desarrollo pre-implantacional.** Clift D & Schuh M., Nature Rev. 2013.

A partir de las células de la ICM se obtienen las células madre embrionarias (ESC). Estas células se caracterizan por su habilidad de mantenerse indefinidamente *in vitro* y por su capacidad pluripotente, es decir, son capaces de diferenciarse hacia todos los tipos celulares del individuo<sup>56</sup>. Las células madre embrionarias se aislaron por primera vez de la ICM de blastocistos de ratón en 1981<sup>57,58</sup>. Desde entonces se han obtenido ESC en multitud de especies incluidos

monos<sup>59</sup> y humanos<sup>60</sup>. El objetivo principal de las células madre embrionarias es diferenciar los cultivos de células indiferenciadas en tejidos y órganos para terapias de reemplazo celular.

### **3. TERAPIA DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL**

La terapia génica de la línea germinal se ha propuesto para prevenir la transmisión de anomalías génicas a las sucesivas generaciones, corrigiendo esas anomalías en las células germinales masculinas (espermatozoides) o femeninas (ovocitos). Cuando esas alteraciones génicas se encuentran en el ADNn nuevas tecnologías de edición del genoma están surgiendo capaces de corregir concretamente la zona afectada por la mutación<sup>61</sup>. Cuando las alteraciones génicas se encuentran en el ADNmt las técnicas de reemplazo mitocondrial (MRT) pueden utilizarse para evitar transmitir el ADNmt mutado a las siguientes generaciones<sup>62,63</sup>.

Estas técnicas se basan en la transferencia del ADNn de ovocitos o cigotos portadores de ADNmt mutado a otro ovocito o cigoto previamente enucleado portador de ADNmt sano procedente, a su vez, de una donante sana. Las MRT incluyen transferencia de pronúcleos (TPN), transferencia de la placa metafásica (PM) de la segunda división meiótica, llamada spindle transfer (ST) y transferencia del corpúsculo polar (TCP), bien del primer corpúsculo polar (TCP1) o bien del segundo corpúsculo polar (TCP2).

### 3.1. TÉCNICAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL

#### 3.1.1. TRASFERENCIA DE PRONÚCLEOS (PNT)

En el estadio de cigoto, el ADNn se encuentra en los pronúcleos (PN). Hay 2 PN, uno proviene del espermatozoide y otro del ovocito y cada uno de ellos contiene una dotación haploide (n) del ADNn que permitirá al embrión contener una dotación diploide (2n) cuando se unan los 2 PNs.

La PNT consiste en la transferencia de los PN rodeados por la membrana y una pequeña cantidad de citoplasma (carioplasto) a otro cigoto previamente enucleado como se puede ver en la Figura 7.

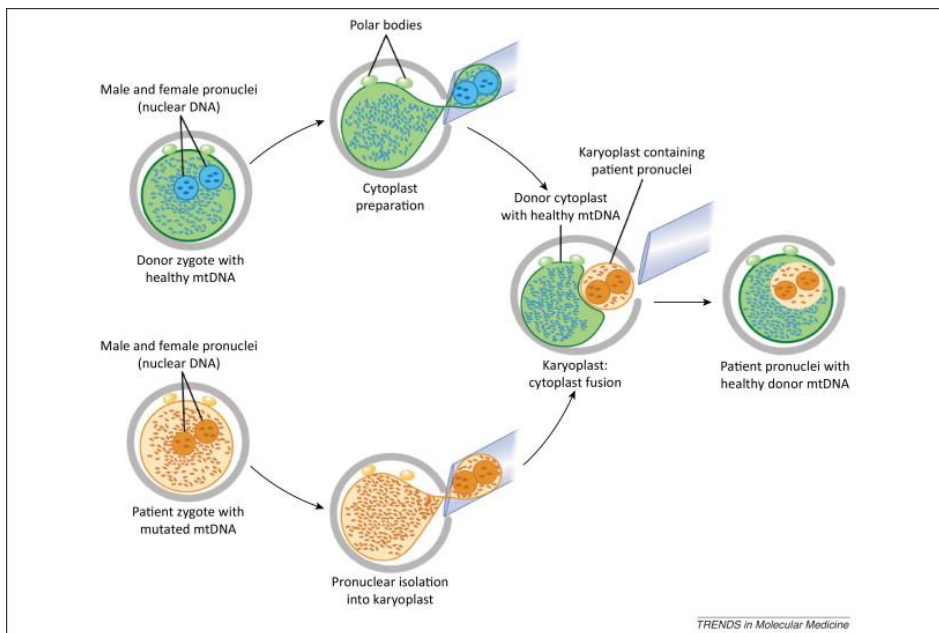


Figura 7. Transferencia de pronúcleos (PNT). Wolf et al., Trends Mol Med. 2015.

La primera vez que se realizó la transferencia de PN de un cigoto a otro fue en 1983, demostrando que los cigotos de ratón manipulados pueden dar lugar

a individuos vivos<sup>64</sup>. En el año 2005 se utilizó por primera vez la técnica de PNT en ratón como modelo experimental para las terapias de transferencia mitocondrial<sup>65</sup> observándose que la recuperación de las mitocondrias provenientes del ovocito donante de PN (ADNn) en los ratones producidos a partir de PNT era bastante alta. En una de las publicaciones más recientes la recuperación era del 24% en la primera generación y del 22% en la segunda generación<sup>66</sup>.

Actualmente se piensa que la recuperación del genotipo mitocondrial original se debe al gran tamaño de los PN, que implica un gran tamaño del carioplasto que se transfiere, y también a la distribución desigual de las mitocondrias en el cigoto que se sitúan preferencialmente alrededor de los PN<sup>67</sup>. Así pues, aunque se consiguiera reducir el tamaño del carioplasto, debido a la distribución de las mitocondrias es posible que la cantidad de mitocondrias que se transfieren sea inaceptable.

En un estudio publicado en 2010 se emplearon embriones humanos de fecundación anómala con un PN o más de dos PNs para producir embriones de 2PNs. Los resultados fueron que de un total de 36 embriones reconstruidos sólo 3 de ellos se desarrollaron hasta blastocisto con un porcentaje de heteroplasma menor al 2%<sup>63</sup>. Así pues la cantidad de mitocondrias transferidas en humanos es mucho menor que en ratón y por lo tanto PNT podría ser contemplada como técnica de reemplazamiento mitocondrial. El bajo porcentaje de blastocistos, solo un 50% de la tasa normal de desarrollo a blastocisto de los embriones de fecundación anómala, se debe seguramente al origen parental desconocido de los PNs.

El PN paterno y materno en cigotos humanos es indistinguible, por lo que es probable que en los cigotos de fecundación anómala con 1PN o 3PN, al restaurar el número de PNs a la dotación normal de 2 PNs, algunos cigotos



reconstruidos presenten 2 PNs paternos y otros presenten 2 PNs maternos y esto contribuya a la reducida tasa de desarrollo que presentan los embriones tras PNT<sup>63</sup>.

Debida a la baja tasa de desarrollo obtenida en humanos no es posible evaluar la seguridad y eficacia de esta técnica en cigotos normales, por lo que se recomienda realizar más estudios en primates y humanos antes de confirmar la viabilidad de PNT como técnica de reemplazamiento mitocondrial.

### 3.1.2. TRASFERENCIA DE LA PLACA METAFÁSICA DE LA SEGUNDA DIVISIÓN MEIÓTICA (ST)

Los ovocitos maduros se encuentran detenidos en el estadio de MII hasta que tenga lugar la fecundación y se reanude la meiosis. El ADNn se encuentra condensado en cromosomas en el huso acromático formando la placa metafásica de la segunda división meiótica. En este estadio ya ha tenido lugar la primera división meiótica y solo la mitad de los cromosomas, formados por 2 cromátidas cada uno, se encuentran en el huso acromático.

La ST consiste en la transferencia de la placa metafásica de la segunda división meiótica, rodeada por la membrana y una pequeña cantidad de citoplasma (carioplasto) a otro ovocito MII previamente enucleado como se puede observar en la Figura 8. Tras la fusión del carioplasto con el citoplasma se lleva a cabo la fecundación del ovocito reconstruido.

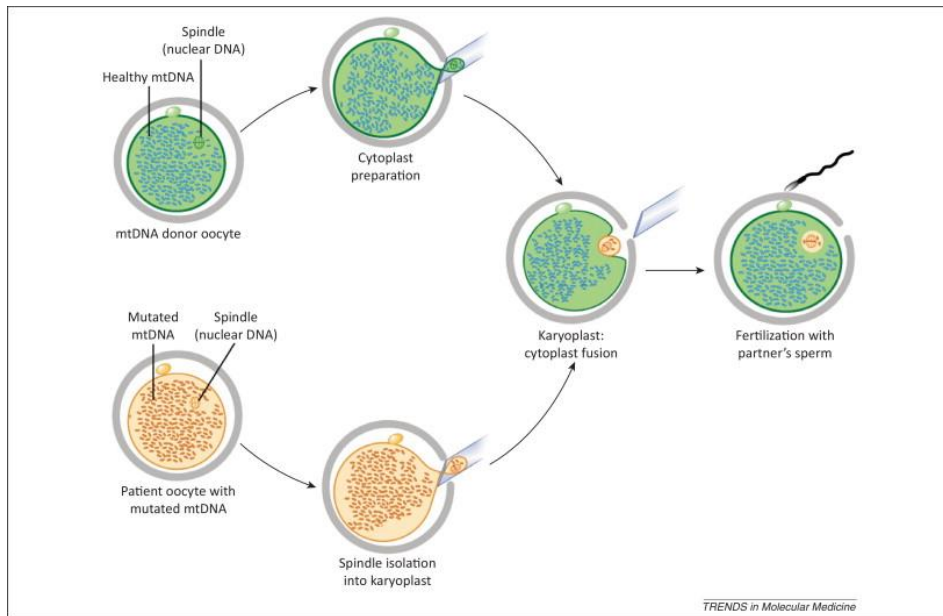


Figura 8. Spindle Transfer. Wolf et al., Trends Mol Med. 2015.

En 2009 se utilizó por primera vez ST en mono Rhesus, su eficacia y seguridad se demostró con el nacimiento de 4 individuos sanos y niveles de recuperación del ADNmt proveniente del ovocito donante de ADNn inferiores al 3%<sup>62</sup>. En 2012 varios autores publicaron la ST en ovocitos humanos obteniéndose niveles de recuperación inferiores al 2%<sup>68</sup>. Por lo tanto el futuro de ST como MRT parece prometedor.

### 3.1.3. TRASFERENCIA DEL CORPÚSCULO POLAR (TCP)

Cuando los ovocitos se encuentran en MII ya se ha producido la primera división meiótica y por lo tanto ya han extruido el primer corpúsculo polar (CP1) que contiene la mitad de los cromosomas formados por dos cromátidas cada uno. Una vez tiene lugar la fecundación se reanuda la meiosis y tiene lugar la segunda

división meiótica donde se extruye el segundo corpúsculo polar (CP2) que contiene la mitad de los cromosomas, pero esta vez están formados por una única cromátida.

Se pueden realizar 2 tipos de TCP, la transferencia del primer corpúsculo polar (TCP1) y la transferencia del segundo corpúsculo polar (TCP2).

**La transferencia del primer corpúsculo polar (TCP1)** consiste en la transferencia del CP1 de un ovocito MII a otro ovocito MII previamente enucleado. Una vez tiene lugar la fusión del CP1 con el citoplasma del ovocito enucleado se procede a la fecundación del ovocito reconstruido, como se puede observar en la Figura 9.

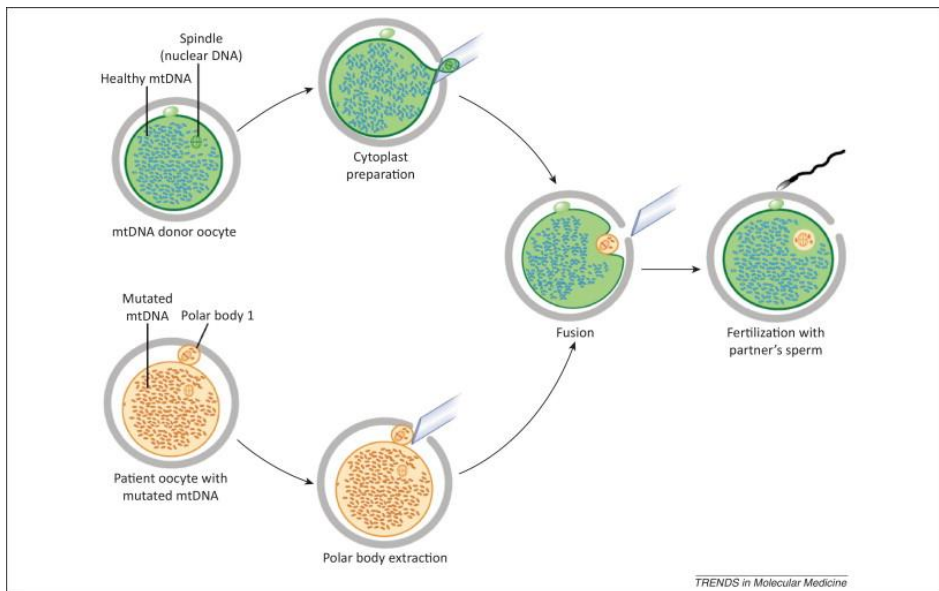


Figura 9. Transferencia del primer corpúsculo polar. Wolf et al., Trends Mol Med. 2015.

**La transferencia del segundo corpúsculo polar (TCP2)** consiste en transferir el CP2 de un cigoto a otro cigoto donde previamente se ha extraído el PN femenino (Figura 10).

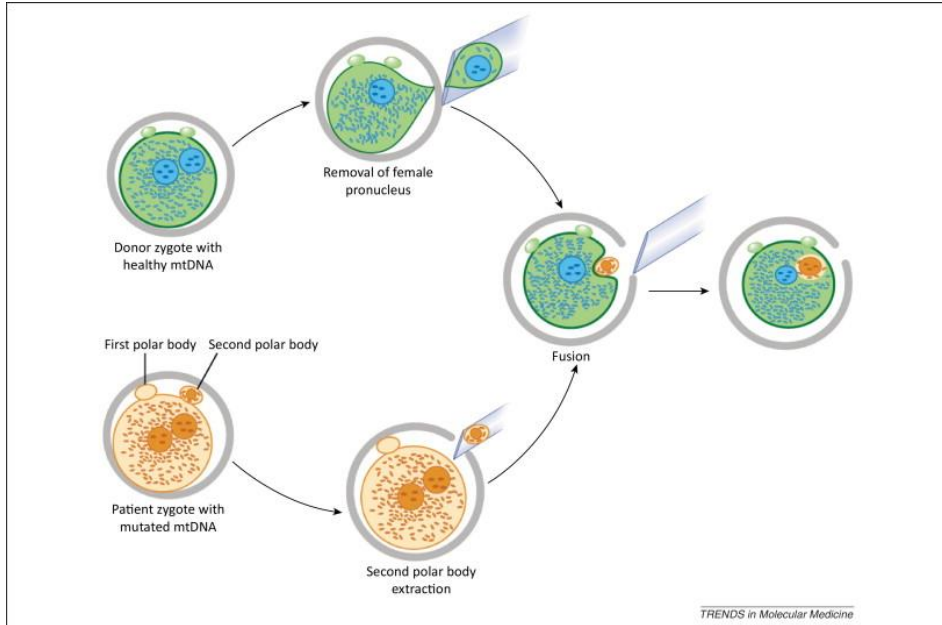


Figura 10. Transferencia del segundo corpúsculo polar. Wolf et al., Trends Mol Med. 2015.

En 1997 y 1998 se llevó a cabo en ratón la TCP2 y la TCP1 respectivamente observándose que tanto la transferencia del CP1 en el citoplasma de un ovocito como la del CP2 en el citoplasma de un cigoto permite completar la meiosis normalmente y dar lugar a individuos vivos<sup>69,70</sup>. La ventaja del uso de CP es que el número de mitocondrias presentes en ellos es muy reducido<sup>71</sup>, así pues se esperan bajos niveles de recuperación de ADNmt. Nuevos estudios usando TCP han indicado que los niveles de recuperación del ADNmt en ratones procedentes de TCP1 y TCP2 han sido muy bajos, indetectables tras la TCP1 y menores al 2% tras la TCP2<sup>66</sup>.

Hasta el momento no se ha tenido éxito usando TCP con ningún otro mamífero, posiblemente se deba a que en la mayoría de las especies el tiempo de vida del CP es muy breve<sup>72</sup>, a causa de un proceso apoptótico que lleva a la fragmentación y degradación del ADN<sup>73</sup>. En ratón se ha observado que la mitad de los CP degeneran en un par de horas tras la ovulación aunque tras 14 horas aún quedan un 5-10% vivos<sup>70</sup>.

Además de su utilización como terapia de reemplazo mitocondrial, la importancia de la transferencia del CP1 es que ofrece la posibilidad a cualquier paciente que se someta a un tratamiento de fertilidad de duplicar su número de ovocitos. Teóricamente el uso de la transferencia del CP2 cuadruplicaría el número de ovocitos pero la transferencia del CP2 es complicada debido a la necesidad de identificar el PN femenino, lo que es relativamente fácil en ratón pero muy complicado en humanos<sup>72</sup>.

El éxito de un tratamiento de infertilidad es altamente dependiente de la adecuada respuesta de las pacientes a la estimulación ovárica ya que determina el número y también la calidad ovocitaria. Desafortunadamente del 9 al 25% de los ciclos no responden adecuadamente a la estimulación debido a una baja respuesta ovárica a la estimulación hormonal<sup>74</sup>. Esto da lugar a un número reducido de ovocitos maduros que está relacionado con un bajo porcentaje de éxito tras el tratamiento de infertilidad.

Un estudio reciente determina que los individuos nacidos por transferencia embrionaria varían desde el 9.2% cuando solo se recupera un ovocito al 31.3% cuando se recuperan más de 16 ovocitos<sup>75</sup>. Así pues la posibilidad de aumentar el número de ovocitos disponibles para las mujeres con baja respuesta ovárica marca una gran diferencia en sus probabilidades de éxito.

### 3.2. SEGURIDAD Y EFECTIVIDAD EN LAS TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL

Además de la recuperación del ADNmt del ovocito donante de ADNn en los embriones producidos, tema del que ya se ha hablado durante las técnicas de transferencia mitocondrial, hay otros factores a tener en cuenta para la seguridad y eficacia de estas técnicas.

#### 3.2.1. INHIBIDORES DEL CITOESQUELETO

Tanto la ST como la TPN durante el proceso de micromanipulación necesitan la presencia de un inhibidor de los microfilamentos de actina del citoesqueleto, este inhibidor es la **citocalasina B**. Además la TPN necesita también la exposición de los cigotos al inhibidor de microtúbulos de tubulina del citoesqueleto, que en este caso es el **nocodazol**. Ambos inhibidores facilitan la separación de la placa metafásica o los PN, reduciendo la lisis<sup>72</sup>. Dichos reactivos debido a su gran toxicidad se tienen que utilizar en bajas concentraciones, en cortos periodos de tiempo y los ovocitos o cigotos deben ser lavados intensamente. Teniendo en cuenta estos factores no parece que haya ningún efecto negativo en su uso según los últimos experimentos realizados en ratón<sup>66</sup> o mono<sup>62</sup>.

#### 3.2.2. GENERACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS

Durante los procesos de micromanipulación se puede alterar el número de cromosomas que se transfieren al ovocito donante de ADNmt.

En el cigoto, una vez formados los PNs, para que tenga lugar la correcta segregación de los cromosomas durante la primera división mitótica es necesario la correcta formación de un huso mitótico bipolar y para ello es necesario que el cigoto tenga 2 centriolos que en humanos provienen del espermatozoide y se encuentran pegados a la membrana pronuclear<sup>53</sup>. Al intentar reducir la cantidad de citoplasma que se transfiere con los PNs, es importante asegurarse que hay suficiente citoplasma que pueda incluir los centriolos y no se esté transfiriendo un número incorrecto de centriolos, lo cual dará lugar en el embrión a aneuploidías<sup>76</sup>.

A diferencia de lo que ocurre en los PNs, los cromosomas situados en la placa metafásica no se encuentran envueltos por ninguna membrana nuclear que prevenga la pérdida de algún cromosoma durante el proceso de extracción de la placa metafásica. Normalmente los cromosomas se sitúan correctamente alineados en el ecuador de la placa metafásica, pero algunos estudios han observado que es posible que se dé la dispersión de algún cromosoma como respuesta a la exposición de determinadas condiciones ambientales como la bajada de temperatura<sup>77</sup>. Por lo tanto es importante realizar las micromanipulaciones en un ambiente altamente controlado para minimizar el riesgo de aneuploidías.

### 3.2.3. INCOMPATIBILIDAD ENTRE EL ADN NUCLEAR (ADN<sub>n</sub>) Y MITOCONDRIAL (ADN<sub>mt</sub>)

Como se ha comentado anteriormente, 13 proteínas del sistema OXPHOS están codificadas en el ADN<sub>mt</sub>, pero el resto de proteínas que forman parte del sistema OXPHOS, las cuales son necesarias para los procesos de duplicación, transcripción y traducción, además de los enzimas necesarios para

el metabolismo mitocondrial, están codificadas en el ADNn<sup>13</sup>. Así pues las proteínas codificadas por ambos genomas deben ser altamente compatibles para mantener la estructura y las propiedades bioquímicas requeridas para el correcto funcionamiento, por lo cual y debido a esta interacción el ADNmt y el nuclear se han visto sometidos a una adaptación co-evolutiva<sup>78</sup>.

Incompatibilidades genéticas entre poblaciones generan aislamiento reproductivo post-zigótico que dan lugar a procesos de especiación<sup>79</sup>. Originalmente estas incompatibilidades se asociaban a la interacción entre genes nucleares, pero recientes estudios han observado incompatibilidades entre los genomas nuclear y mitocondrial en levadura<sup>80</sup> y *Drosophila*<sup>81</sup>. En mamíferos el escaso éxito conseguido tras la transferencia nuclear de célula somática interespecie (ISCNT) se asocia, sin haber podido ser demostrado, a la incompatibilidad entre el ADNn y mitocondrial entre las distintas especies<sup>82</sup>.

Se han llevado a cabo estudios en ratones generados mediante el cruce entre distintas especies o entre distintas cepas dentro de la misma especie, observándose problemas cognitivos en ratones de distinta especie que se asocian a incompatibilidades entre el ADNmt y ADNn<sup>83</sup>, mientras que entre cepas de la misma especie no se ha observado ningún problema<sup>84</sup>. Aun observándose problemas cognitivos asociados a la incompatibilidad ADNn-ADNmt, estos ratones híbridos tienen limitaciones para el estudio de la incompatibilidad como barrera post-zigótica, ya que mientras el ADNmt proviene exclusivamente de una especie, al ADNn contribuyen las dos especies, por lo que la presencia de los alelos relacionados con el donante de ADNmt permitirá una correcta interacción entre el ADNn y el ADNmt que da lugar a la supervivencia de los ratones híbridos generados, de forma que se enmascara la posible incompatibilidad.



### 3.2.4. SINCRONIZACIÓN DE LOS CICLOS OVÁRICOS DE LA DONANTE Y LA PACIENTE

Para la realización de estas técnicas es necesario obtener ovocitos maduros MII de dos mujeres distintas, la paciente y la donante del citoplasma, esto debe realizarse el mismo día y con el menor periodo de tiempo posible entre las 2 recuperaciones ovocitarias; pero debido a variaciones biológicas de las distintas mujeres en su respuesta a la estimulación ovárica, no es posible garantizarlo.

Una solución a este problema sería el uso de ovocitos congelados, ya que, la vitrificación de ovocitos es una práctica rutinaria en las clínicas de reproducción asistida con unos buenos resultados. Entorno a un 85% de supervivencia tras la criopreservación, las tasas de fecundación son del 75%, mientras que las tasas de desarrollo son del 48%<sup>85</sup>.

En monos se ha publicado la formación de blastocistos y el nacimiento de una hembra tras el uso de ovocitos vitrificados como donantes de placa metafásica en la ST<sup>86</sup>. Estos resultados unidos a los buenos resultados obtenidos en las clínicas tras el uso de ovocitos vitrificados<sup>87</sup> sugieren que el uso de ovocitos vitrificados podría ser una solución al problema de la sincronización de los ciclos ováricos.



## ***II. OBJETIVOS***

---



Para la realización de este trabajo se planteó un Objetivo General y cuatro Objetivos Parciales:

**OBJETIVO GENERAL:**

- Estudiar el completo reemplazamiento del citoplasma en la línea germinal femenina para su aplicación clínica en mujeres portadoras de ADN mitocondrial mutado.

**OBJETIVOS PARCIALES:**

- Estudiar la eficacia y seguridad del reemplazo del ADN mitocondrial en ovocitos humanos mediante el desarrollo *in vitro* de blastocistos y de las células madre embrionarias derivadas a partir de ellos.
- Observar la eficacia del reemplazo del ADN mitocondrial mediante la utilización de ovocitos congelados.
- Estudiar el efecto del reemplazo mitocondrial entre mujeres con distintos haplotipos mitocondriales.
- Observar la incompatibilidad entre el ADN nuclear y el ADN mitocondrial como barrera post-zigótica utilizando modelos experimentales de animales.



### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***

---





Para la realización de este trabajo se elaboraron 2 estudios.

El primero de ellos consistió en estudiar el reemplazamiento del ADNmt en ovocitos humanos. Para su elaboración se utilizaron muestras humanas. Los protocolos del estudio que nos permitió el uso de material humano fueron aprobados por el Comité de Supervisión de Investigación con Células Madre Embrionarias de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón (OHSU) y por la Junta de Evaluación Institucional (IRB) (Anexo I, pág. 165).

El segundo de ellos fue el estudio de la incompatibilidad entre el ADNmt y el ADNn como barrera de aislamiento post-zigótica en ratones. Para su realización se utilizaron ratones vivos. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón. (Anexo II, pág. 167).

## **ESTUDIO 1: REEMPLAZAMIENTO DEL ADNmt DE OVOCITOS HUMANOS**

### **1.1. DONANTES DE GAMETOS**

La información para reclutar a las donantes de ovocitos fue mediante anuncios impresos y en la página web de la Unidad de Investigación de Salud de Mujeres de OHSU, [www.ohsuhealth.com/women](http://www.ohsuhealth.com/women). Los donantes de esperma fueron reclutados en la clínica de reproducción asistida de OHSU.

Las mujeres que se interesaron por el estudio fueron seleccionadas teniendo en cuenta su salud reproductiva, médica y psicosocial. Las mujeres sanas, no obesas [Índice de masa corporal (IMC) < 28 kg/m<sup>2</sup>] y con edades comprendidas entre 21 y 34 años que pasaron las evaluaciones médicas y psicológicas iniciales, fueron seleccionadas como donantes de ovocitos para la investigación. Las mujeres portadoras de mutaciones mitocondriales pasaron las mismas pruebas de salud reproductiva, médica y psicosocial, pero no se tuvo en cuenta su IMC y se amplió el rango de edad de 34 a 36 años. Participaron un total de diecinueve donantes de ovocitos sanas, cuatro donantes de ovocitos portadoras de mutaciones mitocondriales y tres donantes de esperma sanos con edades comprendidas entre 21 y 60 años. Todas las personas fueron informadas con todo tipo de detalles sobre el procedimiento a seguir y por supuesto anónima y voluntariamente firmaron el consentimiento informado. (Anexo III, pág. 169, consentimiento de donante de óvulos y Anexo IV, pág. 187, consentimiento de donante de esperma).

Todos los donantes fueron compensados económicamente por su tiempo, esfuerzo, y sobre todo por las molestias derivadas del proceso de donación.

### 1.2. OBTENCIÓN DE OVOCITOS

Los protocolos de estimulación de la ovulación siguieron las directrices clínicas de los tratamientos de reproducción asistida ya establecidas y consistieron en una combinación de hormona recombinante folículo estimulante (rFSH), gonadotropina menopáusicas humana (hMG) y agonistas o antagonistas de las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH). Cuando dos o más folículos alcanzaron 18 mm de diámetro se les inyectó gonadotropina coriónica humana (hCG) que provocó la ovulación. Treinta y seis horas después de la

inyección de la hCG tiene lugar la punción ovárica mediante la aspiración folicular vía transvaginal.

Se recolectaron los Complejos Cúmulo-Ovocito (COCs) y se colocaron en medio HTF con HEPES (*Lifeglobal*®, IVFonline, LLC) complementados con 10% de sustituto de suero proteico (SPS) (*Quinns Advantage Serum*®, CooperSurgical, INC) y cubiertos con aceite de cultivo (*Sage IVF*®, Cooper Surgical, Inc) y mantenidos a 37°C. Los COCs se trataron con hialuronidasa (Sigma) a una concentración final de 1mg/ml en medio HTF con HEPES para eliminar las células del cúmulo. Una vez eliminadas las células, los ovocitos se clasificaron en función de su estado de maduración como vesícula germinal (GV), metafase I (MI) y ovocitos maduros metafase II (MII) y se colocaron en medio Global (*Lifeglobal*®, IVFonline, LLC) suplementado con 10% de SPS en el incubador (Nu-Airea, Modelo UN-S425-600) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.3. REEMPLAZAMIENTO MITOCONDRIAL MEDIANTE TRANSFERENCIA DE LA PLACA METAFÁSICA (ST) EN OVOCITOS MII

Se colocaron los ovocitos MII de dos donantes no emparentadas en gotas de 10µl de medio HTF con HEPES que contienen 5 µg/µl de citocalasina B (Sigma) en una placa con base de cristal (World Precision Instrument FD5040-100). Las gotas se cubrieron con aceite de cultivo y se mantuvieron los ovocitos a 37°C durante 10-15 minutos antes del aislamiento de la placa metafásica. Se colocó la placa en la platina de un microscopio invertido (Olympus IX71) equipado con calentador de platina ([www.tokaihit.com](http://www.tokaihit.com)), micromanipuladores (Narishige), Sistema de imagen Oosight™ ([www.cri-inc.com](http://www.cri-inc.com)) y objetivo 20x con láser ([www.hamiltonthorne.com](http://www.hamiltonthorne.com)).

Se sujetó un ovocito con una pipeta de sujeción (Origio, Humangen) de manera que la placa metafásica se situaba aproximadamente a las 3 en punto. Se perforó con el láser la zona pelúcida a la altura de la placa metafásica y se introdujo una pipeta de enucleación (Biomedical Instruments) a través de la abertura. Se aspiró la placa metafásica en el interior de la pipeta con la mínima cantidad de citoplasma posible y membrana citoplasmática. El carioplasto fue entonces expuesto al extracto de Sendai Virus (SeV) (GenomONE-CF-EX Sendai Virus (HJV) Envelope Cell fusión Kit, COSMO Bio USA) y colocado dentro del espacio perivitelino en la posición opuesta al primer corpúsculo polar de otro ovocito previamente enucleado.

Los ovocitos fueron enjuagados en HTF con HEPES suplementado con 10% de SPS y posteriormente transferidos a una placa con medio Global suplementado con 10% de SPS e incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos hasta que se produjo la fusión del carioplasto con el citoplasma del ovocito.

### 1.4. FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

Los ovocitos fueron fertilizados mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizando esperma congelado y descongelado, después de 30 minutos a 2 horas tras la transferencia de la placa metafásica. Posteriormente se cultivaron en medio Global suplementado con 10% de SPS y se incubaron a 37°C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 89% N<sub>2</sub>.

Se confirmó la fecundación 16 horas después de ICSI observándose la formación pronuclear y extrusión del 2° corpúsculo polar. Los embriones se dejaron en cultivo durante 6 días hasta que se desarrollaron a blastocistos.

### 1.5. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS ESC

Después de eliminar la zona pelúcida de los blastocistos con proteasa al 0,5% (Sigma), los blastocistos se colocaron sobre capas de alimentación de fibroblastos embrionarios de ratón, (mEF) y se cultivaron durante 5-7 días a 37°C, 3% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, y 92% N<sub>2</sub> en medio de cultivo de ESC [DMEM/F12 (Invitrogen) con 0,1 mM aminoácidos no esenciales (Gibco), 1 mM L-Glutamina (Gibco), 0,1 mM β-mercaptoetanol (Sigma), 5 ng/ml factor básico de crecimiento de fibroblastos (Sigma), 10 μM inhibidor Rock (Sigma), 10% suero fetal bovino (Thermo Scientific) y 10% suero de reemplazo knockout (Invitrogen)]. En los casos donde se observó crecimiento de la masa celular interna (ICM) se troceó en pequeñas partes con un micro escalpelo y se sembraron de nuevo en placas mEF frescas. Las colonias con morfología similar a ESC se seleccionaron para una posterior propagación, caracterización y análisis citogenéticos.

### 1.6. FORMACIÓN DE TERATOMAS

Se inyectaron aproximadamente de 3 a 5 millones de ESC no diferenciadas en el músculo de la pata trasera de ratones macho inmunodeprimidos (SCID) de 4 semanas, usando una aguja de calibre 18G. De seis a siete semanas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados y los tumores se diseccionaron, y clasificaron histológicamente según la presencia de tejidos representativos de las tres capas germinales en el Servicio de Histología del Centro Nacional de Investigación con Primates de Oregón.

## 1.7. ANÁLISIS GENÉTICO Y CITOGENÉTICO

Se extrajo el ADN de las ESC, esperma, muestras de sangre y fibroblastos de las donantes utilizando el kit de purificación de DNA Purogen (Qiagen), siguiendo las instrucciones del laboratorio.

Para el genotipado y análisis de parentesco se realizó un análisis de polimorfismo de repeticiones cortas en tándem (STR) donde se usaron 19 marcadores que representan 18 loci autosómicos (D1S548, D2S1333, D3S1768, D4S2365, D4S413, D5S1457, D6S501, D7S513, D10S1412, D11S2002, D11S925, D12S364, D12S67, D13S765, D16S403, D17S1300, D18S537 y MFGT22) y 1 locus del cromosoma sexual X (DXS2506). Las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio veterinario de Genética de la Universidad de California, Davis.

Para el análisis de mutaciones genéticas se realizó un análisis de variación en el número de copias (CNV). Para ello las muestras de ADN fueron enviadas al Hospital de niños de Cincinnati.

Para el cariotipado, en primer lugar se preparan las células. Se añade 0.2µg/ml de colcemida (Gibco) a las células para provocar su arresto meiótico en metafase. Se disocian las células con tripsina (Invitrogen) y se tratan con 0.75M solución hipotónica KCl para expandir el tamaño de las células. Finalmente se fijan con solución 3:1 de metanol/ácido acético. Las ESC preparadas fueron enviadas al Laboratorio de genética humana de la Universidad de Nebraska y al laboratorio de investigación citogenético de OHSU donde se realizó el análisis de cariotipo por bandeado GWT en 20 células metafase de cada línea ESC.

## 1.8. ANÁLISIS DEL ADNmt

### 1.8.1. GENOTIPADO DEL ADNmt

Se realiza el genotipado del ADNmt en 6 de las donantes y en las líneas celulares ST que se obtienen a partir de ellas, mediante la amplificación del segmento hipervariable 1 (HSV-1) de la región de control del ADNmt D-Loop. Para la amplificación se usaron el juego de primers:

- Forward (5'-TTAAACTATTCTCTGTTCTTTCAT-3')
- Reverse (5'-TCCGGCTCCAGCGTCTCGCA-3').

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50µL que contenía muestras de ADN, polimerasa Pfx50 (Invitrogen) y los primers a una concentración 0.5µM. Se secuenciaron los productos de la PCR y se identificaron las localizaciones de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) usando el programa Sequencher v. 4.7 (GeneCodes).

### 1.8.2. NIVELES DE HETEROPLASMIA

Para medir los niveles de heteroplasmia de embriones ST y/o ESC ST se realizó el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la PCR cuantitativa de amplificación refractaria de sistemas de mutaciones (ARMS-qPCR), el método de secuenciación Sanger y el Sistema Illumina MiSeq.

• **RFLP:** se identificaron lugares de digestión únicos en 4 de las donantes y en las líneas celulares ST que se obtuvieron a partir de ellas. Se ajustó la cantidad de los productos de la PCR anterior a 250 µg y fueron digeridos por los

enzimas (EcoRV y EarI) durante una noche. Las muestras se analizaron usando un gel de agarosa 3%.

• **ARMS-qPCR:** se midió el nivel de heteroplasmia en embriones ST y ESC ST provenientes de 2 pacientes. Para el ensayo discriminativo (D) se diseñaron primers y sonda Taqman (FAM) para detectar SNPs únicos entre los dos haplotipos del ADNmt de las donantes de ovocitos que contribuyen a la formación de estos cigotos y ESC. Para una paciente:

- Forward 5'-AGGGTGGGTAGGTTTGTAGA-3'
- Reverse 5'-AGCAAGTACAGCAATCAATCC-3'

Y para la otra paciente:

- Forward 5'-GGGTGGGTAGGTTTGTAGG-3'
- Reverse 5'-AAGCAAGTACAGCAATCAAAC-3'.

La sonda Taqman (FAM) fue la misma para ambas FAM-ATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCC. Para el ensayo no discriminativo (ND), se diseñaron primers y sonda TaqMan (FAM) para detectar una región común entre los dos ADNmt:

- Forward 5'-CTATGTAAGGTTAAGGGTGGGTA-3'
- Reverse 5'-GCTTACAAGCAAGTACAGCAA-3'

Se usó la misma sonda TaqMan que en el ensayo discriminativo. El volumen total de la reacción es de 15 µl y contiene muestra de ADN, 250nM de cada conjunto de primers, 150 nM de cada sonda TaqMan y 1x de Master Mix Rotor-Gene Multiplex (Qiagen). Todas las reacciones se realizaron por duplicado con dos cantidades diferentes de ADN: 8 ng y 1 ng. Las intensidades de señal fluorescente se registraron y analizaron durante la PCR en un sistema de PCR rápido en tiempo real ABI 7900HT (Applied Biosystems) utilizando el programa



SDS (versión 2.4). El porcentaje de ADNmt donante, en relación con el ADNmt total se calculó según la ecuación: heteroplasma = 100 x (cantidad D/cantidad ND).

• **Secuenciación Sanger:** Para la amplificación se usaron los juegos de primers:

- Forward 5' - CGCTAAGCTCGCACTGATTT-3'
- Reverse 5' - AGCTCGGCTCGAATAAGGAG-3'
- Forward 5' - GGCTCATTCATTTCTCTAACAGC-3'
- Reverse 5' - TCCGAGGAGGTTAGTTGT-3'

El volumen total de la reacción es de 20  $\mu$ l y contiene, muestra de ADN, 10nM de cada uno de los primers, forward y reverse correspondiente y de Master Mix Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen). Posteriormente el producto PCR se purificó. En un volumen total de 9 $\mu$ l se añadieron 3.5 $\mu$ l del producto purificado y el primer correspondiente a una concentración 10nM y se mandó a secuenciar al Instituto Vollum de OHSU.

• **Sistema Illumina MiSeq**

Para determinar el haplotipo de las donantes y el nivel de heteroplasma de todas las líneas ESC ST producidas, se secuenció el genoma mitocondrial completo mediante el Sistema Illumina MiSeq. En primer lugar se amplificó el ADNmt completo usando los primers:

- Forward 5' - GGACACTAGGAAAAACCTTGTAGAGAGAG-3'
- Reverse 5' - AAAGAGCTGTTCTCTTTGGACTAACA-3'

La amplificación se realizó mediante el uso de TAKARA LA Taq polimerasa (Takara Biotechnology). La concentración de los productos de la PCR se midió mediante el fluorímetro Qubit 2.0. Las muestras se prepararon siguiendo las instrucciones del kit Nextera XT Sample preparation. La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el sistema Illumina MiSeq y los datos se analizaron mediante el programa Nextgene (Softgenetics).

### **1.9. INMUNOCITOQUÍMICA**

Para el marcaje de los microtúbulos en los ovocitos, en primer lugar se fijan los ovocitos con la solución de fijación [20% MTBS (500mM Pipes, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 12.5mM EGTA), 1mM DTT, 50% Oxido de deuterio, 0.0001mM Paclitaxel, 0.1% Triton X100, 2% Formaldehído, 0.01% Aprotinina] durante 1 hora a 38°C. Después se lavaron varias veces en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% en solución de lavado (PBS, 2% BSA, 2% serum de cabra, 0.2% leche en polvo, 0.1% Triton X-100) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con la solución de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después los ovocitos se incubaron con el anticuerpo primario ( $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina acetilada) (Sigma) preparados a una concentración 1:100 durante 1h a 38°C, seguidamente se lavaron varias veces con la solución de lavado y se incubaron con el anticuerpo secundario (cabra  $\alpha$  ratón IgG) (Santa Cruz Biotech) preparado a una concentración 1:150 durante 1h a 38°C y oscuridad. Se volvieron a lavar con solución de lavado varias veces y finalmente los ovocitos se colocaron sobre un portaobjetos de cristal, se añadió una gota de medio de montaje con DAPI para teñir los núcleos y se montó el cubre sobre el portaobjetos.

Las ESC se cultivaron en portaobjetos para inmunocitoquímica tratados con gelatina. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS las células se

permeabilizaron con una solución de PBS, Triton X-100 al 0.2% y Tween-20 al 0.1% durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron varias veces con PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de PBS, serum normal al 2% y Tween-20 al 0.05% durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente las células se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (OCT4, SOX2, TRA1-60, TRA1-81 y SSEA-4) (Applied StemCell) preparados a una concentración 1:100 durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces 5 min cada lavado con una solución de PBS y Tween-20 al 0.05% y se incubaron con los anticuerpos secundarios necesarios (cabra  $\alpha$  ratón IgG, Burro  $\alpha$  cabra IgG y Burro  $\alpha$  ratón IgM) (Santa Cruz Biotech) preparados a una concentración 1:150 durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Se lavaron varias veces en una solución de PBS con Tween-20 al 0.05% y finalmente se añade medio de montaje con DAPI para teñir los núcleos al cubre y se montó sobre el portaobjetos. También se realizaron controles omitiendo el anticuerpo primario.

La intensidad de fluorescencia se mide con el microscopio de fluorescencia EVOS.

#### 1.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados obtenidos se analizaron con métodos estadísticos utilizando ANOVA de una vía para comparaciones de varios grupos y un Test t para comparaciones entre 2 grupos.

En todos los análisis, se consideró significativo un P valor menor a 0.05. Para el análisis estadístico se usó el programa SPSS 18 (IBM Company).

### 1.11. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este estudio se realiza el reemplazamiento del ADNmt mediante la técnica ST. El estudio se divide en 2 apartados:

- **Apartado 1:** Por primera vez se estudia en ovocitos humanos la eficacia del reemplazamiento mitocondrial mediante ST. Para ello se utilizan los ovocitos obtenidos de 7 donantes sanas. Se realiza ST, se fecundan y se cultivan hasta blastocisto. A partir de los blastocistos se derivan ESC para realizar estudios genéticos que nos den información sobre la seguridad de la técnica.
- **Apartado 2:** Se estudia la eficacia del reemplazamiento mitocondrial en tres grupos distintos. En donantes sanas con haplotipos próximos y alejados, en donantes portadoras de ADNmt mutado y en ovocitos congelados de donantes sanas. Para ello se utilizan ovocitos obtenidos de 12 donantes sanas y 4 donantes portadoras de ADNmt. Al igual que en el apartado anterior una vez obtenidos los blastocistos se derivan ESC para realizar estudios genéticos que nos den información sobre la seguridad de la técnica.

## **ESTUDIO 2: INCOMPATIBILIDAD ENTRE EL ADNmt Y EL ADNn COMO BARRERA DE AISLAMIENTO POST-ZIGÓTICA EN RATONES**

### 2.1. ANIMALES

En el segundo bloque de este capítulo de material y métodos se utilizaron ratones de la subespecie *Mus m. domesticus* de la cepa C57Bl/6NCrI (B6) y de la cepa conplástica C57Bl/6J-mt<sup>PWD/PhJ</sup> (PWD) que conserva el 0.13% del ADNn de

la subespecie *Mus m. musculus* PWD y ratones híbridos creados mediante el cruce de hembras B6 o PWD con machos de la subespecie *Mus m. domesticus* de la cepa DBA/2 generando ratones B6-DBA cuyo ADN nuclear proviene de subespecies *Mus m. domesticus* o ratones PWD-DBA cuyo ADNn proviene de ratones de las dos subespecies (*Mus m. musculus* y *Mus m. domesticus*). Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de iluminación (12h de luz/12h de oscuridad) y condiciones específicas libres de patógenos en la Unidad de Animales Pequeños del Centro Nacional de Investigación con Primates de Oregón.

## 2.2. OBTENCIÓN DE OVOCITOS O ZIGOTOS

Los ratones hembras fueron superovuladas con 5 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG). 14 horas después de la inyección de hCG se recolectaron ovocitos MII a partir de los oviductos extirpados de las hembras. Para la recolección de cigotos tras la inyección de hCG las hembras se cruzan con ratones macho y tras 20h se recolectaron los cigotos.

## 2.3. REEMPLAZAMIENTO MITOCONDRIAL MEDIANTE ST O TRANSFERENCIA DE PRONÚCLEOS (PNT)

El reemplazamiento mitocondrial, se realizó mediante ST en ovocitos metafase II que se colocaron en gotas de medio FHM (95mM NaCl, 2.5mM KCl, 0.35mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mM NA Lactato, 0.2mM Na Piruvato, 0.2mM glucosa, 1mM glutamina, 0.01mM EDTA, 4mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.71mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20mM HEPES, 4g/L BSA) que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  de

citocalasina B (Sigma) y mediante PNT en zigotos que se colocaron en gotas de medio FHM que contenía además de citocalasina B, 10 µg/ml de nocodazol (Sigma) y se cubrieron con aceite de cultivo. Todas las manipulaciones fueron realizadas con un microscopio invertido (Olympus IX71) equipado con calentador de platina ([www.tokaihit.com](http://www.tokaihit.com)), micromanipuladores (Narishige), Sistema de imagen Oosight™ ([www.cri-inc.com](http://www.cri-inc.com)) y objetivo 20x con láser ([www.hamiltonthorne.com](http://www.hamiltonthorne.com)). Los ovocitos MII o zigotos se sujetaron con una pipeta de sujeción, la zona pelúcida se perforó con pulsos láser antes de insertar una pipeta de enucleación por la abertura. La placa metafásica o pronúcleos fueron aspirados con una cantidad mínima de citoplasma y membrana plasmática adyacente. El carioplasto resultante que contenía la placa metafásica o pronúcleos fue brevemente expuesto a SeV y transferido al espacio perivitelino de los ovocitos MII o zigotos enucleados previamente, asegurándonos que la membrana del carioplasto está en contacto con la membrana del ovocito o zigoto. Los ovocitos o zigotos reconstruidos se incubaron en medio KSOM (Millipore) hasta que tuvo lugar la fusión.

Tras la fusión, los ovocitos reconstruidos fueron fecundados *in vitro*. Finalmente los embriones producidos mediante ST o PNT se colocaron en gotas de medio KSOM cubiertos con aceite de cultivo celular y cultivados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> hasta el estadio de blastocisto.

### **2.4. GENERACIÓN DE DESCENDENCIA F1, F2 y F3**

Los blastocistos se transfirieron a úteros de hembras de la cepa ICR pseudo preñadas (recipientes) y el embarazo fue monitorizado en función del peso de la hembra recipiente una semana después de la transferencia de los embriones. Se asumió el embarazo si las recipientes ganaban dos o más gramos

de peso. Las recipientes gestantes se mantuvieron solas en jaulas. Toda la descendencia nació de manera natural y se destetó a los 21 días o bien si alcanzaban 10 gramos de peso. El nacimiento a término se definió como el día del nacimiento. Se consideraron nacidos muertos cuando las crías nacían muertas o eran canibalizadas por la madre el día del nacimiento.

Al alcanzar la madurez sexual, la descendencia F1 de los grupos experimentales, se cruzaron con ratones macho de las correspondientes subespecies, para generar animales de la generación F2.

Hembras seleccionadas de la generación F2 se cruzaron con ratones macho para generar animales de la generación F3.

## 2.5. EXTRACCIÓN DE ADN DE ZIGOTOS Y TEJIDOS

Los cigotos reconstruidos se transfirieron individualmente a tubos PCR de 0,2 ml y se extrajo el ADN utilizando el kit de extracción de Arcturus Pico Pure (Applied Biosystems).

Para las muestras de tejido, tras el destete, se obtuvieron muestras de las colas de las crías. También se obtuvieron tejidos de los animales sacrificados (cerebro, corazón, riñón, hígado, piel, bazo y cola) utilizando el kit de purificación de DNA Purogen (Qiagen), siguiendo las instrucciones del laboratorio.

Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies) para medir la concentración del ADN.

## 2.6. CUANTIFICACIÓN DE HETEROPLASMA POR AMPLIFICACIÓN REFRACTARIA DE SISTEMAS DE MUTACIONES (ARMS-qPCR)

Se realizaron análisis ARMs-qPCR para medir los niveles de heteroplasmia del ADNmt en zigotos y tejidos de las crías generadas. Para el ensayo discriminativo (D), se diseñaron los primers y la sonda TaqMan (FAM) que detectaron una región del ADNmt en el gen ND5 única para el ADNmt de ratones B6:

- Forward 5'-CCTACTAATTACACTAATCGCCACT-3'
- Reverse 5'- GAGGTCTGGGTCAATTTTCGTTA-3',
- FAM-AACCGCGTTTTCCCCCCTAA

Y una región del ADNmt en el gen ND2 única para ADNmt de ratones PWD:

- Forward 5'- ACTGCACATAGGACTTATTCTTGTC-3'
- Reverse 5'- TTGAGTAGCGGGTAGATTAGG-3'
- FAM-TGACAAAAAATCGCCCCCTATCAA

Para el ensayo no discriminativo (ND), se diseñaron los primers y la sonda TaqMan (TET) para detectar la región común a ambos ADNmt del gen COX3:

- Forward 5'- TCTAGCCTCGTACCAACACATGAT-3',
- Reverse 5'- TGAAACACCTGATGCTAGAAGTACTGA-3',
- TET- TCCTGTTGGAGGTCAGCAGCCTCCT.

Se siguió el mismo protocolo que se ha explicado previamente en el Estudio 1.



## 2.7. ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

Se probaron las actividades de los complejos I y IV de la cadena respiratoria en homogeneizados de músculo esquelético por métodos espectrofotométricos, como se describió anteriormente<sup>88</sup>. Para las mediciones de actividad, se utilizó un sistema lector de microplacas (Molecular Devices) en combinación con el programa SoftMax Pro. Las actividades enzimáticas se expresaron como porcentaje relativo a la citrato sintasa.

## 2.8. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE ESPERMATOZOIDES Y SU MOVILIDAD

Se recolectaron muestras de espermatozoides de epidídimos extirpados aplicando una ligera presión sobre el epidídimo y se incubaron las suspensiones de espermatozoides en 200 ml de medio HTF (Millipore) durante 45 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El número de espermatozoides, presentado en millones/mL, se basó en tres recuentos usando cámaras Neubauer, mientras que la motilidad se calculó a partir de los espermatozoides que nadaban progresivamente en una población de 50 espermatozoides.

## 2.9. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

Los ratones fueron sacrificados con CO<sub>2</sub>, seguido de una dislocación cervical. Se extrajeron los tejidos y se fijaron en un tampón neutro de formalina 10% durante la noche. Se incrustaron en parafina y fueron procesadas por la Unidad del Servicio de Patología del Centro Nacional de Investigación con Primates de Oregón.

## 2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para expresar los resultados los datos se presentaron como media  $\pm$ SEM en las tablas 21, 22, 23 y 27. Para la comparación de varios grupos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis en combinación con una prueba de U Mann-Whitney y un Test T para las comparaciones de dos grupos.

También se presentaron los resultados como media  $\pm$ SEM en los ensayos de la actividad de los complejos I y IV. Para su comparación se usó la ANOVA de una vía.

Se usaron tablas de contingencia para la comparación de porcentajes de crías vivas y crías nacidas muertas en las hembras de la generación F1.

En todos los análisis, se consideró significativo un P valor menor a 0.05. Para el análisis estadístico se usó el programa SPSS 18 (IBM Company).

## 2.11. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para estudiar la incompatibilidad entre el ADNn y el mitocondrial como barrera de aislamiento post-zigótico se crearon ratones híbridos, es decir ratones donde el ADNn proviene únicamente de una cepa y el ADNmt proviene de otra cepa diferente. Los ratones híbridos se crearon mediante PNT generando los grupos experimentales que se pueden ver en la Figura 11.

**Apartado 1:** Se estudia la supervivencia de los ratones híbridos producidos y su fertilidad.

**Apartado 2:** Se estudia los niveles de heteroplasma de los ratones híbridos producidos y la segregación del ADNmt en la línea germinal.

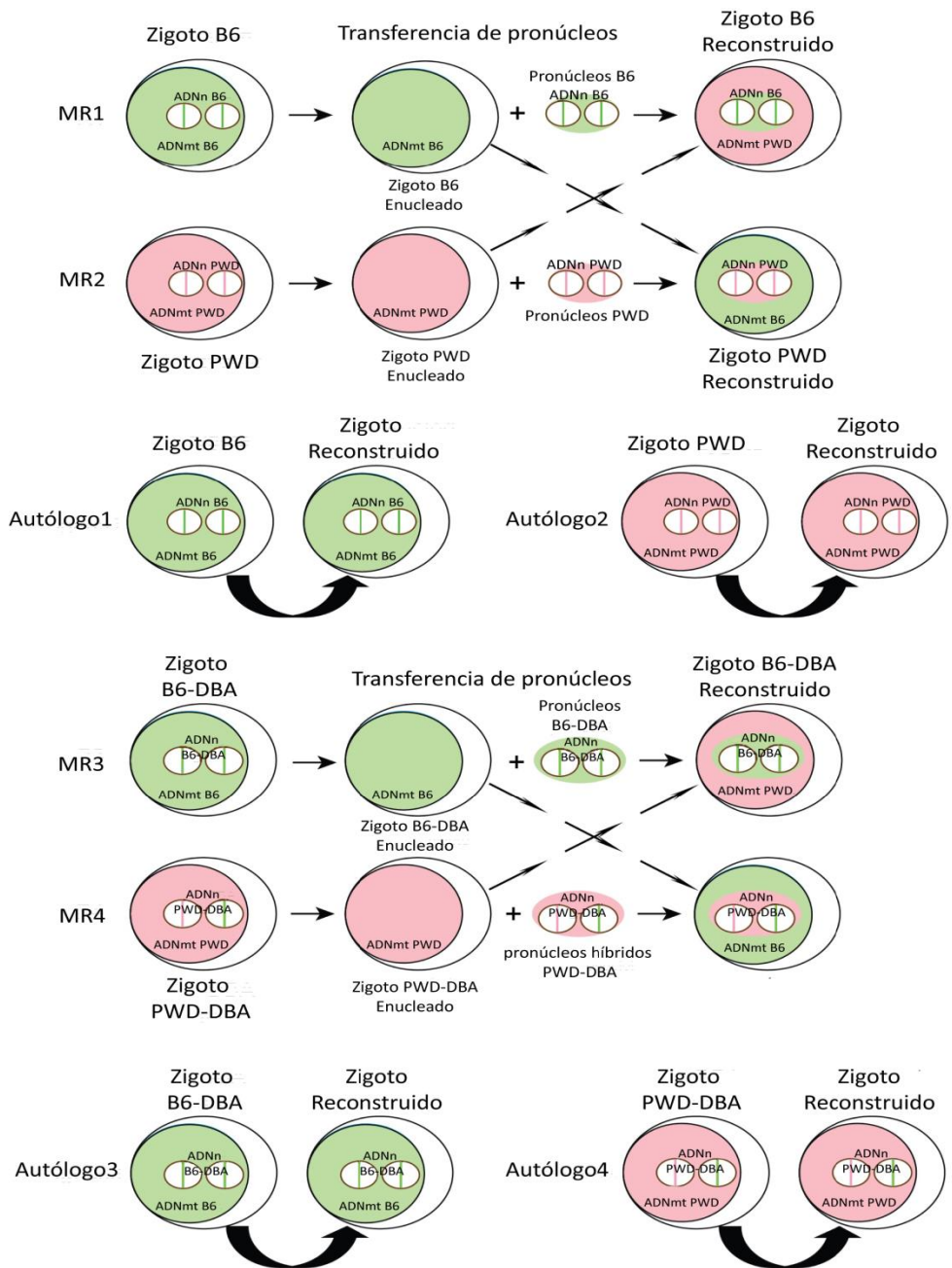


Figura 11. Generación de los zigotos reconstruidos en los grupos experimentales y sus controles autólogos



## ***IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

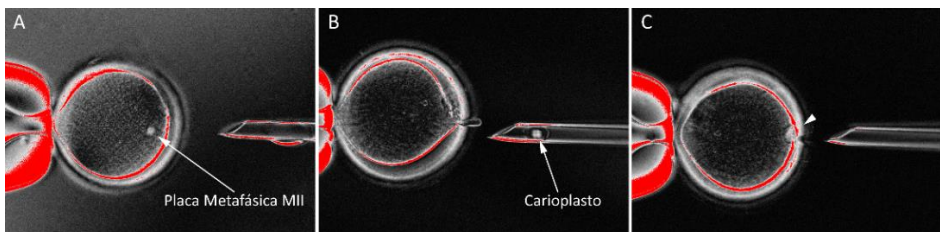


Para comprender mejor los resultados que se han obtenido en este trabajo se analizará en primer lugar el **Remplazamiento del ADNmt** en ovocitos humanos (Estudio 1) y posteriormente la **Incompatibilidad entre el ADNmt y el ADNn** como barrera de aislamiento post-zigótica en ratones (Estudio 2).

## **ESTUDIO 1. REEMPLAZAMIENTO DEL ADNmt EN OVOCITOS HUMANOS**

### **1.1. REEMPLAZAMIENTO DEL ADN EN OVOCITOS HUMANOS ENTRE DONANTES SANAS.**

Se realizó por primera vez en la Historia el reemplazamiento del ADNmt en ovocitos humanos. Para el grupo experimental ST (transferencia de placa metafásica) fueron seleccionados un total de 65 ovocitos MII. La transferencia de la placa metafásica rodeada por una membrana y una pequeña cantidad de citoplasma (carioplasto) fue un éxito entre 64 de los 65 ovocitos MII (Figura.12).



**Figura 12. Transferencia de la placa metafásica.** A, Ovocito maduro MII con la placa metafásica. B, Carioplasto aislado en la pipeta de enucleación. C, Carioplasto con la placa metafásica intacta introducido en un ovocito donante de citoplasma previamente enucleado.

## Resultados y Discusión

Al proceso de fecundación mediante inyección intracitoplásmica del espermatozoide (ICSI) sobrevivieron 60 ovocitos, de los cuales 44 fueron fecundados observándose los pronúcleos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el grupo Control donde de los 33 ovocitos MII seleccionados, 32 ovocitos sobrevivieron a la fecundación mediante ICSI y 24 de ellos formaron pronúcleos visibles.

Mediante estudios microscópicos se pudo observar que casi la mitad de los cigotos producidos mediante ST (21/44) reanudaron correctamente la meiosis observándose los 2 pronúcleos (PN) y los 2 corpúsculos polares (CP) propios de una correcta fecundación (2PN/2CP). Sin embargo los restantes cigotos ST presentaban un número irregular de PN y/o CP, observándose también una fecundación anómala en el grupo Control pero con una menor incidencia, apareciendo ésta en sólo 3 de los 24 cigotos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fecundación normal y anómala en los grupos Control y ST.

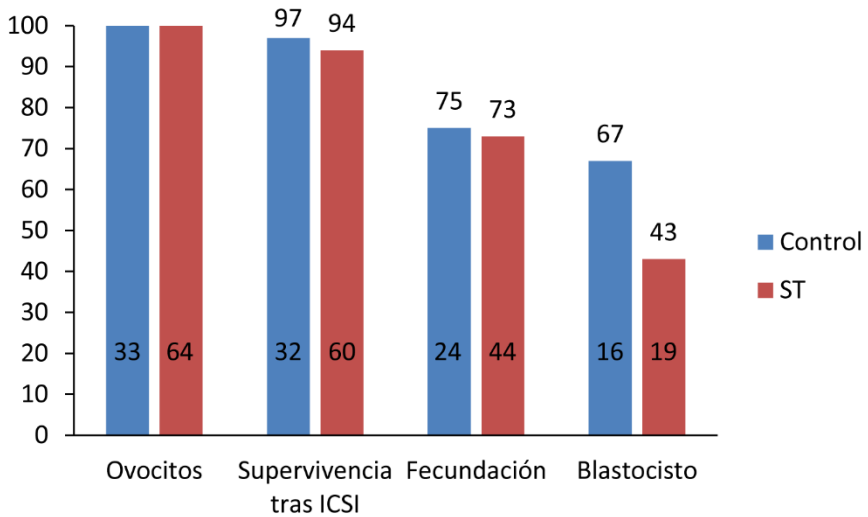
Grupo	Fec.	Normal (%) 2PN/2CP	Anómala (%)	Anómala			
				1PN (%)	3PN/1CP (%)	3PN/2CP (%)	2 Cél. (%)
Control	24	21 (88%)	3 (13%)	3 (13%)	0	0	0
ST	44	21 (48%)	23 (52%)	3 (6.8%)	11 (25%)	3 (6.8%)	3 (6.8%)

Fec: Fecundados y Cél: Células.

La formación de blastocitos en el grupo ST fertilizado normalmente (13/21) fue estadísticamente igual al grupo Control (16/21). Todos los cigotos de fecundación anómala del grupo Control se detuvieron antes de llegar al estadio de blastocisto, lo que también ocurrió en la mayoría del grupo ST, donde sólo 6 de 23 llegaron a blastocisto, siendo el desarrollo de los cigotos 3PN/1CP



considerablemente mayor (4/11) que en el resto de los grupos de fecundación anómala (Figura 13 y Tabla 2).



**Figura 13. Desarrollo embrionario tras ST en ovocitos humanos.**

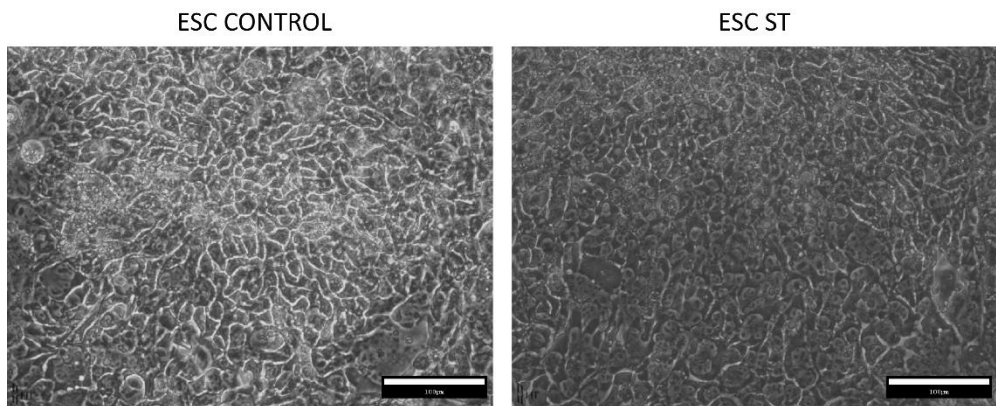
**Tabla 2.** Desarrollo embrionario de los embriones de fecundación normal en los grupos Control y ST.

Grupo	Nº. Ovocitos	Fecundación (%)	Normal 2PN/2CP (%)	Blastocisto (%)
<b>Control</b>	32	24 (75%)	21 (88%)	16 (76%)
<b>ST</b>	60	44 (73%)	21 (48%)	13 (62%)

A continuación se derivaron células madre de los blastocitos obtenidos para obtener suficiente material con el que realizar análisis moleculares y citogenéticos que ofrecieran un mayor conocimiento de la capacidad de desarrollo de los embriones producidos por ST. Se derivaron un total de 15 líneas de ESC:

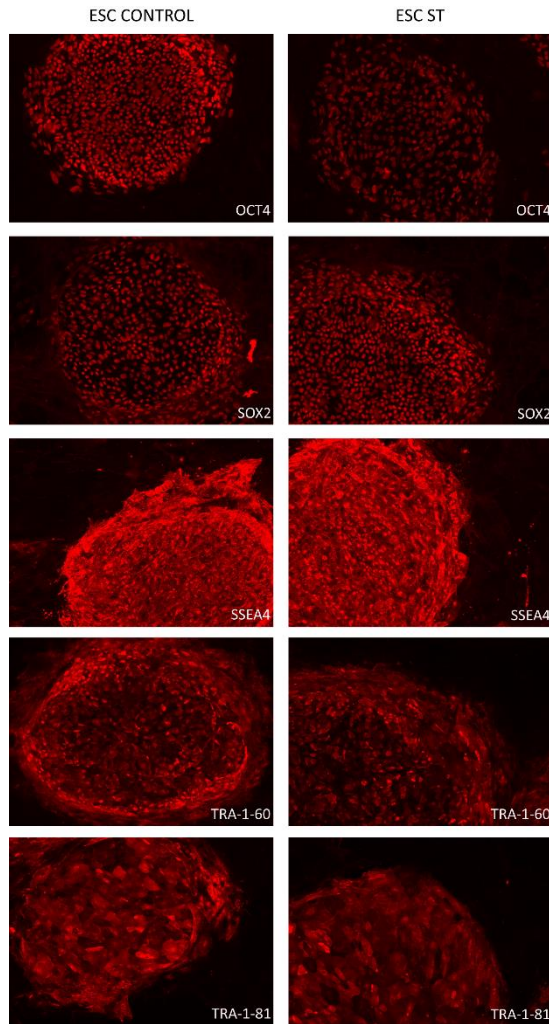
- 9 líneas celulares a partir de los 16 blastocitos Control que se llamaron líneas HESO (human embryonic stem cell from Oregon).
- 5 líneas celulares obtenidas de los 13 blastocitos ST desarrollados a partir de los cigotos de fecundación normal 2PN/2CP, que se llamaron líneas HESO-ST.
- 1 línea celular a partir de 4 blastocitos ST provenientes de cigotos de fecundación anómala 3PN/1CP, que se llamó también HESO-ST.

En primer lugar se estudió la morfología de las ESC derivadas de embriones ST comparándolas con las ESC derivadas de embriones Control teniendo una morfología normal indistinguible las primeras de las segundas como se puede ver en la Figura 14.



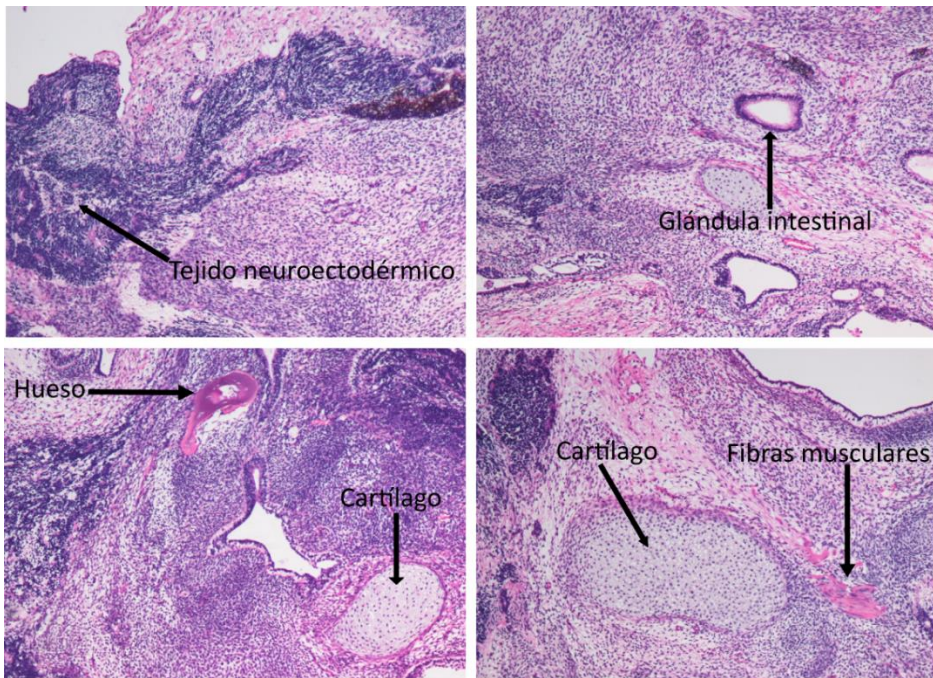
**Figura 14. Morfología de las ESC derivadas de embriones Control y ST.** Morfología típica de las ESC en ESC Control y ST (Contraste de fase. 20X).

A continuación se observó la expresión de marcadores estándar de pluripotencia incluyendo OCT-4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81 y TRA-1-60 tanto en las ESC derivadas de embriones ST como en las ESC Control, sin observarse ninguna diferencia entre ellos como se puede ver en la Figura 15.



**Figura 15. Análisis de pluripotencia en ESC derivadas de embriones control y ST.** Expresión similar de los marcadores de pluripotencia en las líneas ESC Control y ST.

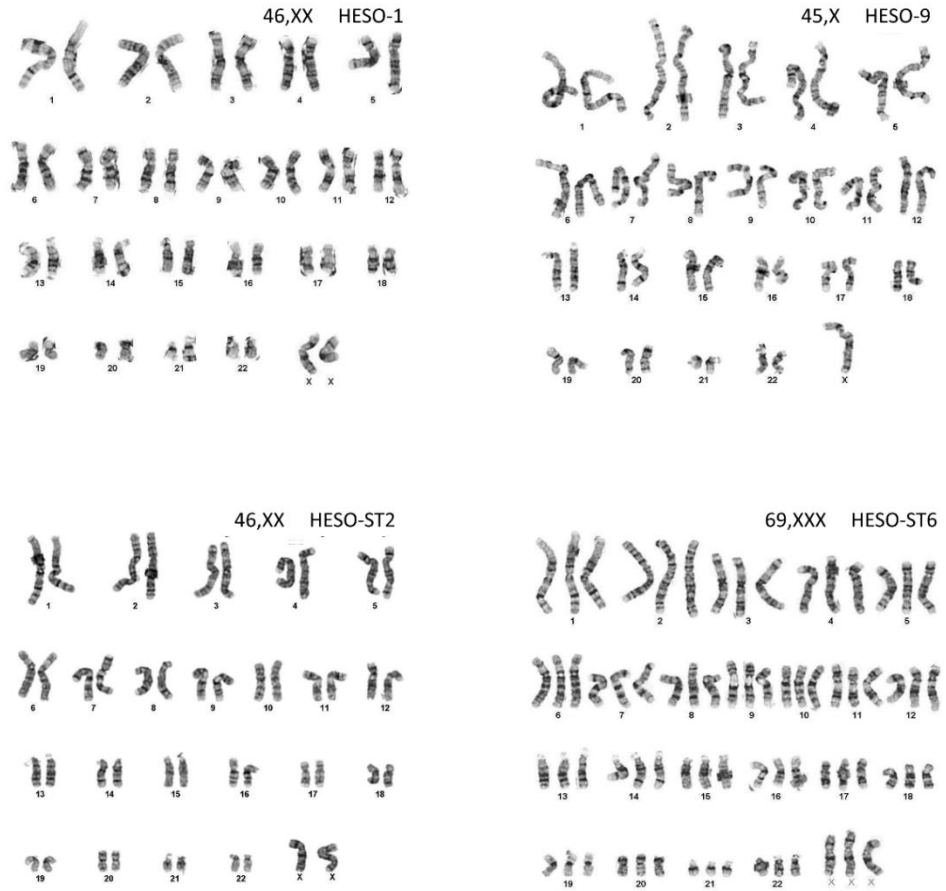
Las ESC producidas se inyectaron en ratones inmunodeprimidos formando, como era esperado, teratomas que presentaban células y tejidos propios de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, como se puede ver en la Figura 16.



**Figura 16. Análisis histológico del teratoma inducido por la inyección de la línea HESO-ST5 en ratones SCID.** Las flechas muestran rosetas neuroectodérmicas (ectodermo), glándulas intestinales (endodermo) y hueso, cartilago y fibras musculares (mesodermo).

Los análisis citogenéticos indicaron que todas las líneas celulares HESO-ST provenientes de fecundación normal (2PN/2CP) tenían un cariotipo diploide femenino o masculino, sin evidencias de ninguna anomalía cromosómica numérica o estructural. La línea celular obtenida a partir del blastocito de fecundación anómala (3PN/1CP) contenía un cariotipo anómalo triploide femenino. De las nueve líneas celulares derivadas de los blastocitos Control, dos de ellas tenían anomalías numéricas (Figura 17). La línea HESO-6 es 47XYY y la línea HESO-9

es 45XO. Como ambas aneuploidías son debidas a cromosomas sexuales, se puede pensar que la anomalía fue inducida por el espermatozoides que contenía dos cromosomas Y en un caso y ninguno en el otro.



**Figura 17. Cariotipos de líneas HESO y HESO-ST.** En la parte superior izquierda el cariotipo normal de la línea HESO-1 y en la derecha el cariotipo anómalo de la línea HESO-9 derivadas de embriones control no manipulados. En la parte inferior izquierda el cariotipo normal de la línea HESO-ST2 derivada de un embrión ST de fecundación normal y en la parte derecha el cariotipo triploide de la línea HESO-ST6 derivada de un embrión ST de fecundación anómala (3PN71CP).

## Resultados y Discusión

Hasta el momento los resultados obtenidos demuestran que el proceso de ST se puede realizar en ovocitos humanos con una alta eficacia, ya que tan sólo el 1.5% (1/65) de los ovocitos sometidos a ST no superaron con éxito el proceso. Los ovocitos ST también son capaces de ser fecundados en tasas similares a los Controles (73% en el grupo ST y 75% en el grupo Control) y las líneas ESC derivadas de embriones ST de fecundación normal (2PN/2CP) son similares a las líneas Control tanto morfológicamente como en la expresión de marcadores de pluripotencia y además son cariotípicamente normales.

Sin embargo se observó que aproximadamente la mitad de los embriones (52%) presentaban una fecundación anómala, sobre todo debido a un exceso en el número de PNs (39%). Este hallazgo fue algo inesperado ya que no había sido observado previamente en primates<sup>62</sup>.

Para confirmar que todas las líneas ESC derivadas de embriones ST habían heredado los cromosomas del ovocito donante de placa metafásica se hizo un genotipado del ADNn mediante STR que confirmó que el ADNn de todas las líneas HESO-ST provienen del ovocito donante de placa metafásica como se puede ver en las Tablas 3, 4 y 5.

**Tabla 3.** Análisis STR para determinar el origen de las líneas HESO-ST2, HESO-ST3 y HESO-ST4.

Muestra	Esperma	#14	#15	HESO-ST2	HESO-ST3	HESO-ST4
Cariotipo	NT	NT	NT	46XX	46XX	46XY
Donante PM				#14	#14	#14
Donante Cito				#15	#15	#15
D1S548	152/168	152/168	152/172	152/168	152/168	152/168
D2S1333	285/301	285/297	293/293	285/301	285/297	285/285
D3S1768	192/192	192/196	180/184	192/192	192/192	192/192

D4S2365	296/300	196/196	296/300	296/300	296/300	296/300
D4S413	123/125	125/135	123/159	123/135	123/135	123/135
D5S1457	119/119	119/119	119/119	119/119	119/119	119/119
D6S501	172/176	172/176	172/172	172/176	172/176	176/176
D7S513	191/193	191/199	187/201	193/199	191/193	193/199
<u>D10S1412</u>	156/156	162/165	162/162	156/165	156/165	156/165
D11S2002	254/254	254/254	254/254	254/254	254/254	254/254
<u>D11S925</u>	301/307	299/299	282/303	299/307	299/307	299/301
<u>D12S364</u>	276/278	270/274	266/288	270/276	274/278	270/276
<u>D12S67</u>	248/260	256/264	252/264	256/260	248/256	248/256
D13S765	200/200	196/204	192/200	200/204	200/204	200/204
D16S403	137/143	143/145	137/137	143/145	143/145	143/145
D17S1300	257/257	257/265	265/265	257/265	257/265	257/257
D18S537	196/196	200/204	200/204	196/204	196/200	196/200
D18S72	305/305	305/309	301/301	305/309	305/305	305/305
DXS2506	278	278/282	278/286	278/282	278/278	278/282
MFGT22	104/106	108/108	104/108	104/108	104/108	106/108

#: Número de identificación de la donante. **NT**: No testado. **PM**: Placa metafásica y **Cito**: Citoplasma.

Los marcadores para los loci D10S1412, D11S925, D12S364 y D12S67 muestran que el ADNn en estas 3 líneas celulares proviene de la donante #14 (donante de placa metafásica).

**Tabla 4.** Análisis STR para determinar el origen de las líneas HESO-ST5 y HESO-ST6.

Muestra	Esperma	#12	#11	HESO-ST5	HESO-ST6
Cariotipo	NT	NT	NT	46XX	69XXX
Donante PM				#11	#12
Donante Cito				#12	#11
D1S548	152/168	172/172	172/172	168/172	168/172
D2S1333	285/301	297/305	301/305	285/305	297/301/305
D3S1768	192/192	184/192	192/192	192/192	192/192
D4S2365	296/300	296/296	296/296	296/296	296/296
<u>D4S413</u>	123/125	133/153	155/159	123/159	123/133/153
D5S1457	119/119	123/123	119/119	119/119	119/123
D6S501	172/176	164/172	172/172	172/172	164/172
D7S513	191/193	179/193	189/199	189/193	179/193
D10S1412	156/156	162/165	156/162	156/162	156/162/165
D11S2002	254/254	254/254	254/254	254/254	254/254
<u>D11S925</u>	301/307	297/303	282/282	282/301	297/301/303
D12S364	276/278	266/272	274/276	276/276	266/272/276
D12S67	248/260	252/264	252/260	252/260	252/260/264
D13S765	200/200	192/200	188/204	200/204	192/200
D16S403	137/143	137/139	139/145	137/139	137/139



D17S1300	257/257	257/269	253/267	257/267	257/269
D18S537	196/196	196/204	196/200	196/196	196/204
D18S72	305/305	305/305	305/305	305/305	305/305
DXS2506	278	278/278	274/282	274/278	278/278
MFGT22	104/106	104/108	104/108	106/108	104/106/108

#: Número de identificación de la donante. **NT**: No testado. **PM**: Placa metafásica. y **Cito**: Citoplasma.

Los marcadores para los loci D4S413 y D11S925 muestran que el ADNn de la línea HESO-ST5 proviene de la donante #11 (donante de placa metafásica) y que la línea HESO-ST6 proviene de la donante#12 (donante de placa metafásica).

**Tabla 5.** Análisis STR para determinar el origen de la línea HESO-ST7.

Muestra	Esperma	#16	#17	HESO-ST7
Cariotipo	NT	NT	NT	46XY
# PM				#16
#Citoplasma				#17
D1S548	152/168	168/172	152/172	152/172
D2S1333	285/301	285/285	285/301	285/285
D3S1768	192/192	192/196	188/192	192/192
D4S2365	296/300	296/296	284/300	296/300
D4S413	123/125	123/125	133/135	123/125
D5S1457	119/119	119/123	101/119	119/119
D6S501	172/176	172/172	168/176	172/176
D7S513	191/193	193/195	175/183	193/195

## Resultados y Discusión

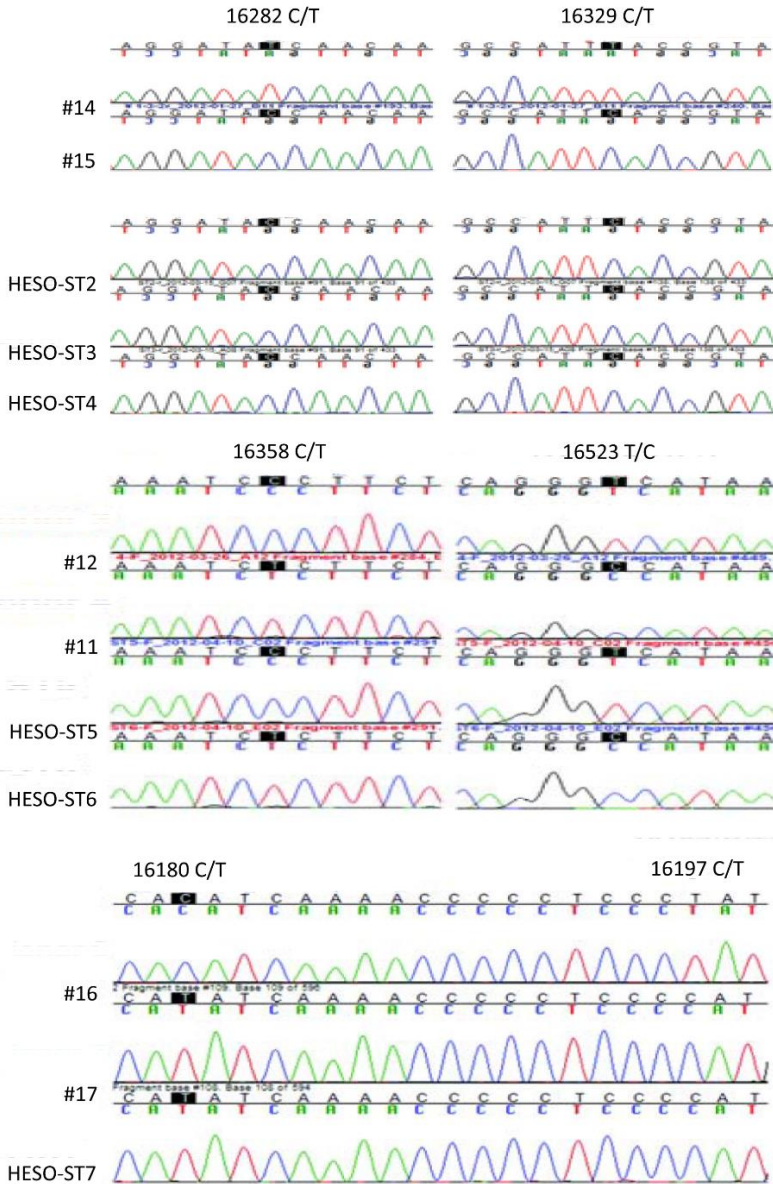
---

D10S1412	156/156	156/162	156/162	156/162
D11S2002	254/254	254/254	254/254	254/254
<u>D11S925</u>	301/307	282/299	282/282	299/307
D12S364	276/278	264/264	264/270	264/276
D12S67	248/260	256/264	248/256	256/260
D13S765	200/200	188/200	188/200	200/200
<u>D16S403</u>	137/143	145/147	141/143	137/145
D17S1300	257/257	257/257	261/265	257/257
D18S537	196/196	196/212	196/204	196/196
D18S72	305/305	305/305	305/305	305/305
DXS2506	278	278/278	278/278	278/278
MFGT22	104/106	104/104	104/108	104/106

#: Número de identificación de la donante. **NT**: No testado y **PM**: Placa metafásica.

Los marcadores para los loci D11S925 y D16S403 muestran que el ADNn de esta línea celular proviene de la donante #16 (donante de placa metafásica).

Posteriormente realizamos el genotipado del ADNmt mediante la secuenciación de la zona D-loop para determinar mediante la diferencia SNPs de donde provenía el ADNmt, observándose en todas las líneas HESO-ST que el ADNmt provenía del ovocito donante de citoplasma, como se puede observar en la Figura 18.



**Figura 18. Genotipado del ADNmt mediante la secuenciación de la región control D-Loop.** El ADNmt en las líneas HESO-ST2, ST3 y ST4 proviene de la paciente #15, en la línea HESO-ST5 proviene de la paciente #12, en la línea HESO-ST6 proviene de la paciente #11 y en la línea HESO-ST7 proviene de la paciente #17.

Como ya se observó previamente en primates<sup>62</sup> una pequeña cantidad de ADNmt del ovocito donante de placa metafásica se transfiere con el carioplasto durante el proceso de ST lo que produce un pequeño porcentaje de heteroplasmia en el ovocito reconstruido. Si se hablara de un caso clínico, una pequeña cantidad de ADNmt mutado se estaría transmitiendo al nuevo ovocito y, por lo tanto al individuo que naciera a partir de él. En el caso del estudio en primates que ya fue citado anteriormente se analizaron los niveles de heteroplasmia de los individuos nacidos a través de esta técnica y de las líneas ESC establecidas a partir de blastocitos ST y todos ellos fueron prácticamente homoplásmicos, con niveles de heteroplasmia inferiores al 2%. Así pues se planteó analizar los niveles de heteroplasmia en embriones y en las líneas HESO-ST, para ver si los niveles eran prácticamente inexistentes durante el desarrollo embrionario y si estos niveles se mantenían en las líneas celulares producidas y no se observaba una recuperación del ADNmt proveniente del ovocito donante de la placa metafásica.

Para las líneas HESO-ST se utilizó el análisis RFLP capaz de medir niveles de heteroplasmia de hasta el 3%. Los resultados confirmaron que el ADNmt de todas las líneas ST provenía de los ovocitos donantes de citoplasma y que el nivel de recuperación del ADNmt del ovocito donante de placa metafásica era indetectable. Seguidamente utilizamos una técnica más sensible, la ARMs-qPCR capaz de medir niveles de heteroplasmia inferiores al 1%, en los embriones y también en 3 de las 6 líneas HESO-ST (Tabla 6).

**Tabla 6.** Nivel de heteroplasmia del ADNmt proveniente de la donante de placa metafásica.

<b>Muestras</b>	<b>% de Heteroplasmia± SD</b>
ST Embrión 1	0.5±0.1
ST Embrión 2	0.9±0.2
ST Embrión 3	0.6±0.9
ST Embrión 4	0
<b>Media</b>	<b>0.5±0.4</b>
HESO-ST2	0.2±0
HESO-ST3	0
HESO-ST4	1.7±0.3
<b>Media</b>	<b>0.6±0.9</b>

Un resumen de los análisis genéticos estudiados se puede ver en la tabla 7.

**Tabla 7.** Análisis genético de las ESC obtenidas a partir de embriones ST.

<b>Línea Celular</b>	<b>ST2</b>	<b>ST3</b>	<b>ST4</b>	<b>ST5</b>	<b>ST6</b>	<b>ST7</b>
ADNn	#14	#14	#14	#11	#12	#16
ADNmt	#15	#15	#15	#12	#11	#17
Fecundación	2PN/2CP	2PN/2CP	2PN/2CP	2PN/2CP	3PN/1CP	2PN/2CP
Cariotipo	46XX	46XX	46XY	46XX	69XXX	46XY
Origen ADNn (STR)	#14	#14	#14	#11	#12	#16
Origen ADNmt	#15	#15	#15	#12	#11	#17
Heteroplasmia (RFLP)	ND	ND	ND	ND	ND	NT
Heteroplasmia (ARMS-qPCR)	0.2%	0.01%	1.7%	NT	NT	NT

#: Número identificación de la donante. **ND**: No detectado y **NT**: No testado.

En base a estos resultados se puede decir que el proceso de ST es eficaz ya que en todas las líneas celulares el ADNn proviene del ovocito donante de la placa metafásica.

La seguridad del proceso de ST depende de la cantidad de ADNmt mutado que se transfiera junto a la placa metafásica. Se ha observado en distintas especies como en ratón y primates que las mitocondrias no aumentan durante el desarrollo pre-implantacional<sup>25</sup>. Así pues, los niveles inferiores al 1% observados en embriones indican que la cantidad de ADNmt que se transfirió con el carioplasto fue mínimo como ya se esperaba para que esta técnica fuera segura. Además las líneas celulares derivadas de embriones ST mostraron niveles indetectables o inferiores al 2% de recuperación del ADNmt propio del ovocito donante de placa metafásica. En la mayoría de enfermedades mitocondriales el umbral a partir del cual aparecen los efectos de la enfermedad se sitúa en un 60% de heteroplasma<sup>12</sup>, por lo que es bastante improbable que los niveles de recuperación indetectables o inferiores al 2% observados en las ESC producidas de lugar a un niño enfermo.

Los análisis genéticos de la línea HESO-ST6 proveniente de un embrión de fecundación anómala (3PN/1CP) indicaban que el embrión había retenido un juego extra de cromosomas que normalmente se extruyen con el segundo corpúsculo polar. Esto seguramente se deba a alguna condición subóptima durante el proceso de ST que alteraría la integridad de la placa metafásica. Realizamos una serie de experimentos adicionales para encontrar el factor que alteró la placa metafásica y dio lugar al alto porcentaje de embriones de fecundación anómala.

En primer lugar se creyó que se debía a la citocalasina B (CB), un inhibidor de microfilamentos, que se sabe que inhibe la citoquinesis y bloquea la extrusión del segundo corpúsculo polar en ovocitos y que se usa en el proceso de ST para evitar la lisis del ovocito durante la micromanipulación. Tras la micromanipulación

el ovocito se lava repetidamente antes de fecundarlo, pero era posible que residuos de CB estuvieran interfiriendo en la extrusión del segundo corpúsculo polar.

Para evitar este inconveniente se amplió el tiempo de incubación entre ST e ICSI a 2 horas como se puede apreciar en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Formación de PNs en ovocitos fecundados a varios intervalos de tiempo tras ST.

<b>Intervalo</b>	<b>Ovocitos</b>	<b>Fecundación (%)</b>	<b>Normal 2PN/2CP (%)</b>	<b>Anómala (%)</b>
<b>30 min</b>	18	18 (100%)	10 (56%)	8 (44%)
<b>2 horas</b>	9	7 (78%)	4 (57%)	3 (43%)

O bien se redujo la concentración de CB a 2.5µg/ml o 0 µg/ml. Sin embargo la presencia de fecundación anómala persistió incluso en ausencia de CB (Tabla 9).

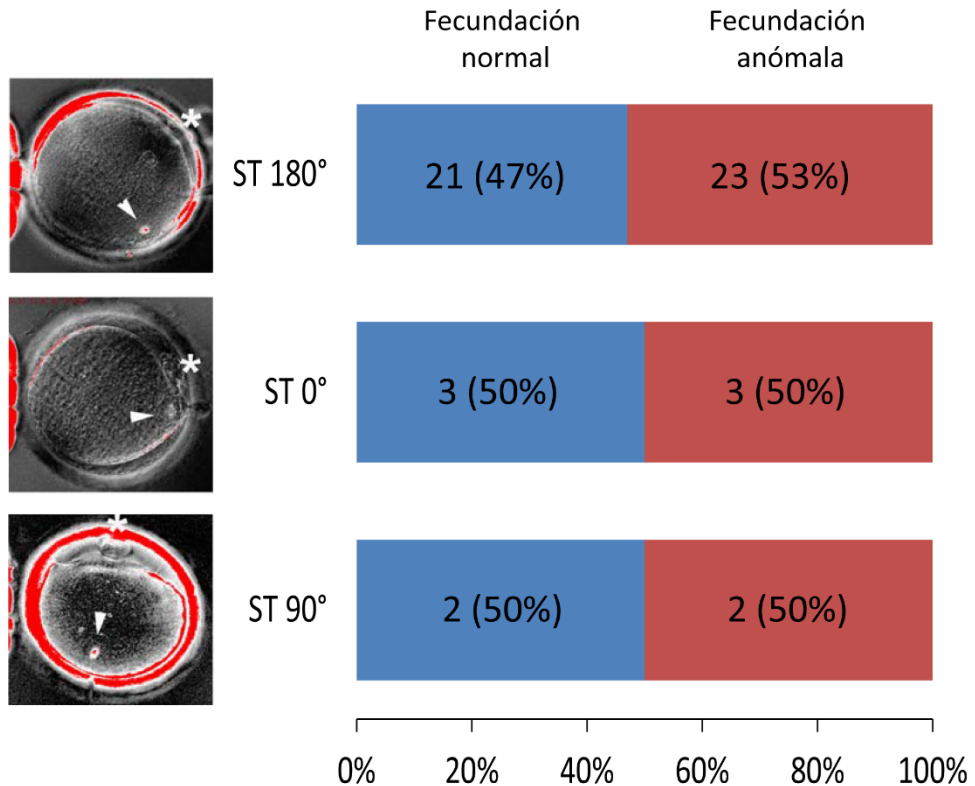
**Tabla 9.** Formación de PNs en ovocitos expuestos a diferentes concentraciones de citocalasina B (CB) durante el proceso de ST.

<b>Concentración CB (ug/ml)</b>	<b>Ovocitos</b>	<b>Fecundación (%)</b>	<b>Normal 2PN/2CP (%)</b>	<b>Anómala (%)</b>
<b>5</b>	60	44 (73%)	21 (47%)	23 (53%)
<b>2.5</b>	5	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)
<b>0</b>	1	1 (100%)	0	1 (100%)

Posteriormente se pensó que la polaridad al introducir la placa metafásica en el proceso de ST podría dar lugar a una meiosis anómala. Normalmente la placa metafásica en ovocitos MII está adyacente al primer corpúsculo polar<sup>89</sup> sin embargo durante el proceso de ST el carioplasto se introdujo en el lado opuesto (lo

## Resultados y Discusión

que se llama a 180 grados)<sup>90,62</sup>. Así pues se probó a introducir los siguientes carioplastos en las otras 2 posiciones posibles, unos próximos (0 grados) y otros a 90 grados del primer corpúsculo polar, sin embargo los cigotos ST siguieron mostrando la misma proporción de fecundación anómala. Los resultados se observan en la Figura 19.

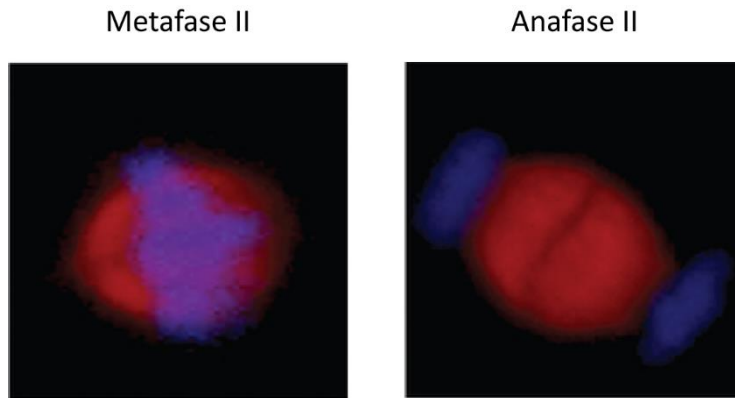


**Figura 19. Resultados tras introducir el carioplasto en diferentes posiciones en el ovocito durante ST.**

Finalmente se razonó que los ovocitos podían experimentar una activación prematura durante la micromanipulación durante el proceso de ST que daba lugar a una reanudación incompleta de la meiosis tras la fecundación. La morfología de



la placa metafásica fue analizada en ovocitos ST y ovocitos intactos, marcándolos con  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina. Los resultados demostraron que en algunos ovocitos ST la placa metafásica había progresado a anafase II, mientras todos los ovocitos Control se mantenían en MII. (Figura 20).



**Figura 20. Integridad de la placa metafásica en ovocitos tras ST.** En la imagen de la izquierda se observa la metafase II normal y en la imagen de la derecha se observa la progresión prematura a anafase II.

La estructura huso acromático-cromosomas (placa metafásica) en ovocitos MII es una estructura muy sensible fácilmente alterable por manipulaciones físicas o químicas. Parece ser que los ovocitos MII de humanos son más sensibles a estas manipulaciones que los ovocitos de primates<sup>62</sup>. El mantenimiento del complejo huso acromático-cromosomas en MII depende del factor promotor de la maduración<sup>55</sup> (MPF). Bajo condiciones normales, durante la fecundación, el espermatozoide dispara la disminución del MPF, que permite la salida del arresto meiótico y por lo tanto la segregación de los cromosomas, mediante oscilaciones en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ <sup>54</sup>. Sin embargo un aumento de calcio inducido de forma mecánica o química durante la manipulación en el proceso de ST puede inducir a la activación partenogenética del ovocito y a la reanudación de

la meiosis de forma prematura<sup>91,92</sup>. Así pues hay que optimizar el proceso de ST en un medio con una menor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Es importante evaluar la fecundación para detectar la formación de PNs y CPs anómala, lo que permitirá separar los embriones ST normales de los anómalos.

A pesar del riesgo de fecundación anómala tras ST, el desarrollo embrionario de los cigotos de fecundación normal es comparable al del grupo Control y las ESC derivadas de ellos muestran cariotipos normales. Según los resultados que se han obtenido, se puede estimar una media de 12 ovocitos MII por ciclo, 35% con fecundación normal y de estos un 60% se desarrolla hasta blastocisto, por lo que al menos 2 blastocistos ST pueden ser generados por ciclo y por paciente.

### 1.2. REEMPLAZAMIENTO DEL ADNmt ESTUDIANDO EL EFECTO DE HAPLOTIPOS DISTINTOS, LA PRESENCIA DE ADNmt MUTADO Y LA VITRIFICACIÓN Y POSTERIOR DESCONGELACIÓN DE LOS OVOCITOS.

Una vez analizado el estudio de reemplazamiento en ovocitos humanos entre donantes sanas se procedió al estudio de factores clave en la aplicación clínica de las terapias de reemplazamiento mitocondrial. Para ello se realizaron tres grupos:

- 1<sup>er</sup> grupo. Se estudia la posible incompatibilidad generada por la mezcla de haplotipos distintos durante el reemplazamiento mitocondrial. Para ello se utilizaron ovocitos de mujeres sanas con haplotipos próximos y distantes. (Grupo **HAPLOTIPOS**).

• 2º grupo. Se estudia la eficacia del reemplazamiento mitocondrial de ADNmt mutado. Para ello se utilizaron ovocitos de mujeres portadoras de ADNmt mutado y ovocitos de donantes sanas (Grupo **PACIENTES**).

• 3º grupo. Se estudia el efecto de la vitrificación de los ovocitos sobre el citoplasma y la placa metafásica. Para ello se utilizaron ovocitos vitrificados de donantes sanas (Grupo **VITRIFICADOS**).

En el grupo HAPLOTIPOS intervinieron 6 donantes. Se dividió en 3 subgrupos: un subgrupo con donantes de haplotipos próximos que difieren en 6 SNPs, otro con donantes de haplotipos más alejados que difieren en 60 SNPs y un subgrupo con donantes de haplotipos intermedios que difieren en 33 SNPs.

En la tabla 10 se pueden ver las combinaciones entre donantes que se realizaron durante la ST, el haplotipo de cada una de ellas y las diferencias de SNPs que presentan sus haplotipos.

**Tabla 10.** Haplotipos de donantes sanas y diferentes polimorfismo de un sólo nucleótido.

#	Haplotipo	SNPs
#11 - #12	H2a – H56	6
#8 - #9	U5a – V3	33
#8 - #10	U5a – H1b	33
#9 - #10	V3 – H1b	33
#11 - #13	H2a – L2c	60

#: Número de identificación de la donante.

Se seleccionaron 36 ovocitos MII para el grupo experimental. La transferencia del carioplasto se realizó con éxito en 35 ovocitos de los 36 (97%).

## Resultados y Discusión

En el segundo grupo PACIENTES, se reclutaron 4 mujeres portadoras de ADNmt mutado. Tres mujeres eran portadoras de Síndrome de Leigh, estando una de ellas (#1) afectada por NARP y la cuarta era portadora de MELAS. Las mutaciones de las que son portadoras y el nivel de heteroplasmia que presentaban en los tejidos que fueron analizados se puede observar en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Mutación y nivel de heteroplasmia en las donantes portadoras de ADNmt mutado.

#	Enfermedad	Mutación	%Hetero. Fibroblasto	%Hetero. Sangre	%Hetero. Orina
#1	S. de Leigh	8993T>G	100%	70%	NT
#2	S. de Leigh	8993T>G	16%	13%	NT
#3	S. de Leigh	13513G>A	98%	3%	39%
#4	MELAS	3243A>G	47%	8%	33%

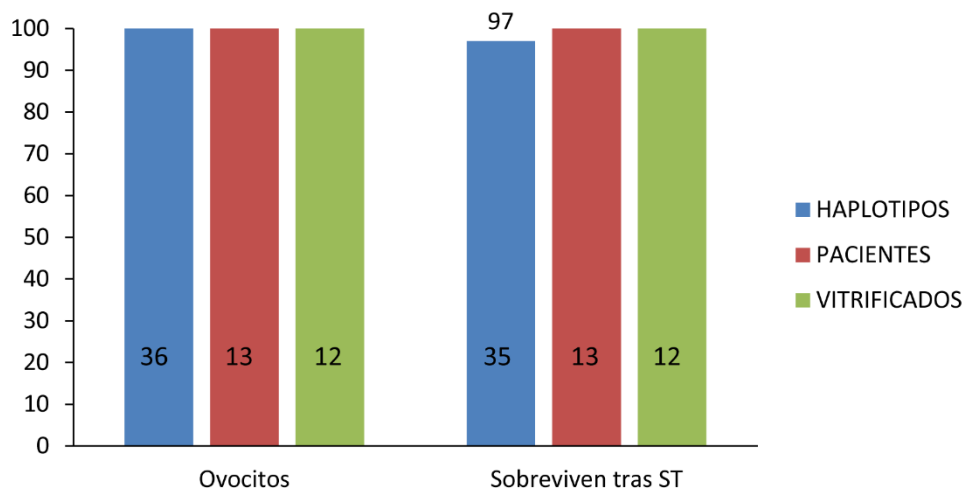
#: Número de identificación de la donante. **Hetero:** heteroplasmia y **NT:** no testado.

Se seleccionaron un total de 26 ovocitos MII para el grupo experimental ST. 13 provenían de 3 de las donantes portadoras de ADNmt mutado y 13 de las donantes sanas. Se realizó con éxito la transferencia del carioplasto de los 13 ovocitos portadores de ADNmt mutado a los otros 13 ovocitos sanos previamente enucleados (100%).

Los protocolos de ST necesitan sincronizar la recuperación ovocitaria de la paciente y la donante sana el mismo día. La sincronización es difícil debido a la diferencia de los ciclos ováricos y a las distintas respuestas que tienen a las gonadotropinas. Por lo tanto la congelación, almacenaje y descongelación de los ovocitos es muy importante para las aplicaciones clínicas de ST.

En el tercer grupo (VITRIFICADOS) se seleccionaron 6 ovocitos criopreservados mediante vitrificación y 6 ovocitos frescos, todos ellos de donantes sanas. Se realizó con éxito la transferencia del carioplasto de los 12 ovocitos

(100%). Los resultados de la supervivencia de los ovocitos tras ST se puede observar en la Figura 21.



**Figura 21. Supervivencia de los ovocitos tras ST en los grupos HAPLOTIPOS, PACIENTES y VITRIFICADOS.**

Sólo 1 ovocito (1.6%) en el grupo de haplotipos se lisó durante el proceso de ST, así pues se puede concluir que ninguna de las características estudiadas en este apartado, como son las diferencias de haplotipos, la presencia de ADNmt mutado o la vitrificación de los ovocitos afecta al proceso de micromanipulación durante la ST.

Para el grupo CONTROL no micromanipulado se seleccionaron 21 ovocitos. 20 de ellos pertenecientes a las donantes sanas y 1 de una portadora de ADNmt mutado.

En el grupo HAPLOTIPOS todos los ovocitos sometidos a ST sobrevivieron al proceso de fecundación mediante ICSI y 32 de ellos fueron fecundados con una tasa de fecundación del 89%. De los 32 ovocitos fecundados, 30 de ellos presentaban una fecundación normal presentando 2PN/2CP (94%).

Si se estudia cada subgrupo por separado tuvimos 9 ovocitos que se utilizaron en el subgrupo con 6 SNPs diferentes, 23 ovocitos en el de 33 SNPs diferentes y por último 4 ovocitos en el 60 SNPs diferentes. La única lisis tras ST tuvo lugar en el grupo de 33 SNPs diferentes. Los ovocitos fecundados fueron 8 (en el subgrupo de 6 SNPs), 20 (en el subgrupo de 33 SNPs) y 4 (en el subgrupo de 60 SNPs), con tasas de fecundación del 89% (subgrupo de 6 SNPs), 87% (Subgrupo de 33 SNPs) y 100% (subgrupo de 60 SNPs) y tasas de fecundación normal del 88% (subgrupo de 6 SNPs), 95% (subgrupo de 33 SNPs) y 100% (subgrupo de 60 SNPs). Estos datos se pueden observar en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo HAPLOTIPOS.

Tratamiento	Fec.	Normal	Anómala	Anómala	
		2PN/2CP (%)	(%)	1PN (%)	3PN (%)
<b>Haplotipos</b>	32	30 (94%)	2 (6%)	1 (3%)	1 (3%)
<b>ST 6 SNPs</b>	8	7 (88%)	1 (12%)	1 (12%)	0
<b>ST 33 SNPs</b>	20	19 (95%)	1 (5%)	0	1 (5%)
<b>ST 60 SNPs</b>	4	4 (100%)	0	0	0

En el grupo PACIENTES todos los ovocitos sometidos a ST sobrevivieron al proceso de fecundación mediante ICSI y 12 de ellos fueron fecundados observándose pronúcleos. Mediante estudios microscópicos se observó que 8 de los 12 embriones producidos mediante ST reanudaron correctamente la meiosis observándose los 2PN/2CP. Los 4 restantes presentaban una fecundación anómala, siendo 2 de ellos portadores de 3PN/1CP.

En el grupo VITRIFICADOS todos los ovocitos sometidos a ST sobrevivieron al proceso de fecundación mediante ICSI y 9 de ellos fueron

fecundados observándose pronúcleos. Se observó que 6 de los 9 (67%) embriones producidos mediante ST presentaban una fecundación normal, observándose los 2PN/2CP. Los 3 restantes presentaban una fecundación anómala, siendo 2 de ellos portadores de 3PN/1CP.

Si se estudia independientemente los 2 subgrupos, uno formado por placa metafásica (PM) vitrificada y citoplasma fresco y el otro grupo formado por PM fresca y citoplasma vitrificado, se observa la misma tasa de fecundación normal, el 67% en ambos grupos. Tabla 13.

**Tabla 13.** Fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo VITRIFICADOS.

Tratamiento	Fec.	Normal	Anómala	Anómala	
		2PN/2CP (%)	(%)	1PN (%)	3PN (%)
<b>Vitrificados</b>	9	6 (67%)	3 (33%)	1 (11%)	2 (22%)
<b>Cito vitri/ PM fresca</b>	6	4 (67%)	2 (33%)	1 (16.5%)	1 (16.5%)
<b>Cito fresco/ PM vitri</b>	3	2 (67%)	1 (33%)	0	1 (33%)

Fec: fecundados. PN: pronúcleos. CP: corpúsculo polar. Cito: citoplasma. PM: placa metafásica.

En el grupo CONTROL 20 ovocitos sobrevivieron a la fecundación mediante ICSI y 17 de ellos formaron pronúcleos visibles, con una tasa de fecundación del 85%. Sólo un ovocito presentó fecundación anómala, siendo la tasa de fecundación normal del 94%. (Tabla 14).

## Resultados y Discusión

**Tabla 14.** Fecundación normal y anómala en los grupos ST y Control.

Tratamiento	Fec	Normal	Anómala	Anómala		
		2PN/2CP (%)	(%)	1PN (%)	3PN (%)	2 cél (%)
<b>Haplotipos</b>	32	30 (94%)	2 (6%)	1(3%)	1(3%)	0
<b>Pacientes</b>	12	8 (67%)	4 (33%)	1 (8%)	2 (17%)	1 (8%)
<b>Vitrificados</b>	9	6 (67%)	3 (33%)	1(11%)	2 (22%)	0
<b>Control</b>	17	16 (94%)	1 (6%)	1 (6%)	0	0

Fec: fecundados. PN: pronúcleos. CP: corpúsculo polar y cél: células.

Una vez fecundados los ovocitos, los cigotos de todos los grupos continúan el desarrollo embrionario a blastocistos.

En el grupo HAPLOTIPOS de los 30 embriones de fecundación normal, 20 (67%) de ellos se desarrollaron a blastocisto. De los 2 embriones de fecundación anómala el que contenía 3PN/1CP se desarrolló a blastocisto (50%). (Tabla 15).

**Tabla 15:** Fecundación y desarrollo embrionario de los embriones de fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo HAPLOTIPOS.

Tratamiento	Fec. Normal	Blastocistos Fec. Normal (%)	Fec. Anómala	Blastocistos Fec. Anómala (%)
<b>Haplotipos</b>	30	20 (67%)	2	1 (50%)
<b>ST 6 SNPs</b>	7	4 (57%)	1	0
<b>ST 33 SNPs</b>	19	12 (63%)	1	1 (100%)
<b>ST 60 SNPs</b>	4	4 (100%)	0	0

Fec: fecundación. ST: transferencia metafásica. SNPs: polimorfismos de un sólo nucleótido.



En el grupo PACIENTES se obtuvieron 6 blastocitos de los 8 (75%) ovocitos fertilizados normalmente. Todos los cigotos de fecundación anómala se detuvieron antes de llegar al estadio de blastocisto.

En el grupo VITRIFICADOS se obtuvieron 2 blastocistos de los 6 (33%) embriones de fecundación normal, los cuales provenían de cada uno de los dos grupos, siendo la tasa de blastocisto para el grupo con citoplasma vitrificado/PM fresca del 25% y en el grupo de citoplasma fresco/PM vitrificada del 50%. De los 3 embriones provenientes de fecundación anómala se desarrollaron a blastocisto los 2 embriones de 3PN/1CP, que provenían como en el caso de la fecundación normal uno del grupo de PM vitrificada y citoplasma fresco y el otro del grupo de PM fresca y citoplasma vitrificado. (Tabla 16).

**Tabla 16.** Fecundación y desarrollo embrionario de los embriones de fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo VITRIFICADOS.

<b>Tratamiento</b>	<b>Fec. Normal</b>	<b>Blastocistos Fec. Normal (%)</b>	<b>Fec. Anómala</b>	<b>Blastocistos Fec. Anómala (%)</b>
<b>Vitrificados</b>	6	2 (33%)	3	2 (67%)
<b>Cito vitri/ PM fresca</b>	4	1 (25%)	2	1 (50%)
<b>Cito fresco/ PM vitri</b>	2	1 (50%)	1	1 (100%)

**Fec:** fecundación. **Cito:** Citoplasma. **PM:** placa metafásica.

No se observaron diferencias significativas en las tasas de fecundación (89% -Grupo Haplotipos-, 92% -Grupo Pacientes-, 75% -Grupo Vitrificados- y 85% -Grupo Control-), fecundación normal (94% -Haplotipos-, 67% -Pacientes-, 67% -Vitrificados- y 94% -Control-) y blastocistos (67%, -Haplotipos-, 75% -Pacientes-, 33% -Vitrificados- y 75% -Control-) entre los distintos grupos ST y el

grupo Control, así pues la diferencia de haplotipos, el ADNmt mutado o la vitrificación de ovocitos no afecta al desarrollo pre-implantacional tras el reemplazo mitocondrial. (Tabla 17)

**Tabla 17.** Fecundación y desarrollo embrionario en los grupos ST y Control.

<b>Tratamiento</b>	<b>Nº. Ovocitos</b>	<b>Fecundación (%)</b>	<b>Normal 2PN/2CP (%)</b>	<b>Blastocisto (%)</b>
<b>Haplotipos</b>	35	32 (89%)	30 (94%)	20 (67%)
<b>Pacientes</b>	13	12 (92%)	8 (67%)	6 (75%)
<b>Vitrificados</b>	12	9 (75%)	6 (67%)	2 (33%)
<b>Control</b>	20	17 (85%)	16 (94%)	12 (75%)

Es interesante prestar atención al grupo vitrificado. Los resultados obtenidos son distintos a los observados previamente en primates donde solamente se obtuvieron blastocistos a partir de embriones formados por citoplasmas frescos y no a partir de aquellos formados por citoplasma vitrificado<sup>86</sup>.

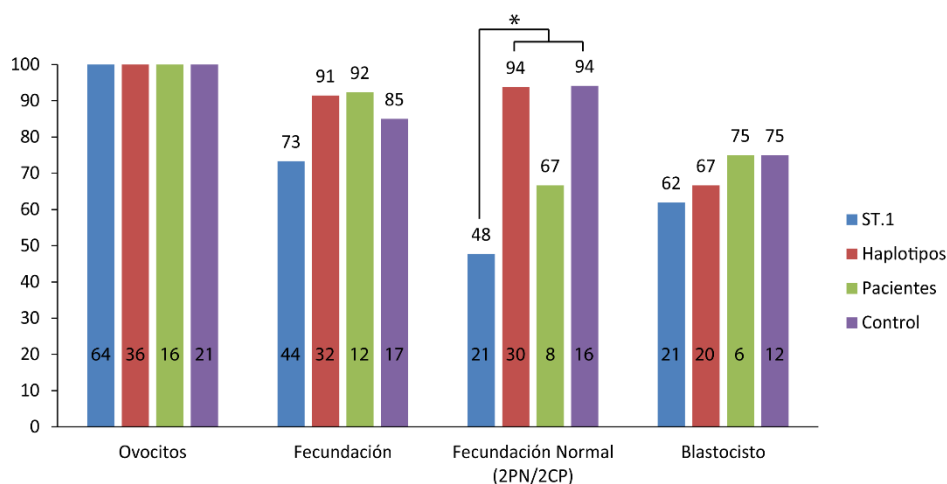
Si se compara la tasa de blastocisto a partir de ovocitos vitrificados de sólo fecundados mediante ICSI en primates (6%) y en humanos (48%)<sup>85</sup>, se puede observar que los resultados son mucho mejores en humanos que en primates, así pues se puede concluir que las técnicas de vitrificación están mejor optimizadas en ovocitos humanos que en ovocitos de primates, por lo que la diferencia en el desarrollo a blastocisto observada entre primates y humanos se debe a la reducción de calidad ovocitaria que tiene lugar tras la descongelación ovocitaria en primates.

Así pues ofrecemos la evidencia de que usando buenos protocolos de vitrificación es posible obtener blastocistos mediante reemplazamiento

mitocondrial a partir de ovocitos vitrificados, independientemente de que sean usados como donantes de placa metafásica o de citoplasma.

Una vez analizados los resultados del desarrollo pre-implantacional en cada uno de los grupos (Haplotipos, Pacientes, Vitrificados), se comparan con los resultados que se habían obtenido en el apartado 1 al utilizar ovocitos de donantes sanas, pues se modificó el protocolo de ST de un experimento a otro, reduciendo la concentración de SeV, que se utiliza como técnica de fusión del carioplasto con el ovocito previamente enucleado, un tercio, ya que su uso puede incrementar la entrada de  $Ca^{2+}$  en el ovocito<sup>93</sup> y provocar la activación ovocitaria prematura que sufrieron los ovocitos en el primer apartado y que ocasionó la alta tasa de fecundación anómala de aproximadamente el 50%.

Se comparan la tasa de fecundación, fecundación normal y blastocisto, entre el grupo ST del primer apartado (ST.1), el grupo HAPLOTIPOS, el grupo PACIENTES y el grupo CONTROL (Figura 22).



**Figura 22. Desarrollo embrionario tras ST de los ovocitos correspondientes a los grupos ST1, HAPLOTIPOS, PACIENTES y CONTROL.**

No se observan diferencias entre los distintos grupos en la tasa de fecundación y en la de blastocisto, sin embargo como se esperaba la tasa de fecundación normal es significativamente mayor en el grupo HAPLOTIPOS que en el grupo ST.1. Así pues podemos concluir que el SeV fue el causante de la alta tasa de fecundación anómala y que diluyéndolo podemos obtener tasa similares de fecundación normal a las observadas en el grupo Control.

Analizamos embriones en diferentes estadios del desarrollo pre-implantacional producidos tras el reemplazo mitocondrial para comprobar la cantidad de ADNmt del ovocito donante de placa metafásica que se transfirió con el carioplasto. Medimos los niveles de heteroplasmia mediante secuenciación Sanger en 19 embriones ST provenientes de donantes sanas y en 7 embriones de pacientes siendo los niveles de heteroplasmia indetectables en todos los casos.

En base a estos resultados se puede concluir que el reemplazamiento mitocondrial fue realizado correcta y eficazmente, transfiriendo una cantidad mínima del ADNmt proveniente del ovocito donante de placa metafásica, que se mantiene a lo largo del desarrollo pre-implantacional. Estos resultados son similares a los que se observaron en el primer apartado de este estudio y a los que obtuvieron otros autores en primates<sup>25</sup> y en humano<sup>68</sup>.

A partir de los blastocistos obtenidos tras el reemplazamiento mitocondrial en los distintos grupos (HAPLOTIPOS, PACIENTES, VITRIFICADOS) y grupo Control, se derivaron células madres embrionarias, en este caso para obtener suficiente material con el que realizar análisis genéticos que ofrecieran un mayor conocimiento de la integridad del genoma nuclear y de la segregación y amplificación del ADNmt en embriones producidos tras el reemplazamiento mitocondrial.

Se obtuvieron 11 líneas ESC provenientes de blastocistos ST de fecundación normal, 2 líneas ESC provenientes de blastocistos ST de fecundación anómala y 5 líneas ESC provenientes de blastocistos del grupo Control llamado HESO.

Las líneas ESC provenientes de embriones ST de fecundación normal fueron:

- 7 líneas provenientes del grupo HAPLOTIPOS que se llamaron HESO-ST.
- 3 líneas provenientes del grupo PACIENTES que se llamaron HESO-STP.
- 1 línea proveniente del grupo VITRIFICADOS que se llamó HESO-STV.

Las líneas ESC provenientes de embriones ST de fecundación anómala 3PN/1CP fueron:

- Una línea proveniente del grupo HAPLOTIPO (HESO-ST).
- Una línea proveniente del grupo VITRIFICADO (HESO-STV).

Para confirmar que todas las ESC provenientes de embriones ST habían heredado sus cromosomas del ovocito donante de placa metafásica se realizó un genotipado del ADNn mediante STR que confirmó que el ADNn de todas las líneas ESC-ST provenían del ovocito donante de placa metafásica.

Ya se ha estudiado previamente que los embriones de fecundación normal son cariotípicamente normales. Ahora se analizará si las líneas celulares cariotípicamente normales presentan mutaciones en el genoma relacionadas con el proceso de ST. Para ello se realiza el análisis de variación en el número de copias (CNV) en 6 de las líneas ST obtenidas (Tabla 18).

## Resultados y Discusión

**Tabla 18.** Determinación del origen de mutaciones mediante CNV.

Muestra	# donante de PM	Cariotipo	Cromosoma de la mutación	Localización de la mutación	Origen de la mutación
Esperma	NA	46XY			
<b>Fibro. #10</b>	NA	46XX			
<b>HESO-12</b>	#10	46XX	15	15q11.2	Esperma
			10	10p15.3-q26.3	Esperma
<b>HESO-ST8</b>	#10	46XX	15	15q11.2	Esperma
			X	Xp22.33-q28	ND
<b>HESO-ST13</b>	#10	46XX			
<b>Fibro. #8</b>	NA	46XX			
<b>HESO-13</b>	#8	46XX	15	15q11.2	Esperma
			X	Xp22.33-q28	ND
<b>HESO-ST10</b>	#8	46XY			
<b>HESO-ST15</b>	#8	46XY			
			2	2q24.1-q31.1	
<b>Fibro. #4</b>	NA	46XX	2	2q32.3-q33.1	
			X	Xp21.2-p21.1	
			X	Xq13.1-q21.1	
<b>HESO-STP2</b>	#4	46XX	X	Xp21.2-p21.1	Ovocito
<b>HESO-STP3</b>	#4	46XY	15	15q11.2	Esperma
			X	Xp21.2-p21.1	Ovocito

CNV: Variación en el número de copias. #: Número identificación de la donante. **PM**: Placa metafásica. **NA**: No aplicable. **Fibro**: Fibroblasto y **ND**: No detectable.

Tres de las líneas ST no presentaban ninguna mutación. El laboratorio resolvió que las mutaciones localizadas en la posición 15q11.2 presentes en dos líneas ST y la mutación Xp21.2-p21.1 presente en otras dos líneas ST provenían del espermatozoide y del ovocito respectivamente y por lo tanto no habían sido causadas por el proceso de ST. Sólo una de las mutaciones localizada en la posición Xp22.33-q28 que estaba presente en una de las líneas ST no fueron capaces de determinar su origen. Sin embargo como esta mutación está presente en 2 líneas celulares proveniente de distintas mujeres, se puede asumir que el origen de la mutación proviene del espermatozoide que es común en todas las líneas celulares, así que en función de los resultados se puede decir que el proceso de ST no produce alteraciones genéticas.

Posteriormente se estudiaron los niveles de heteroplasmia en las líneas celulares obtenidas en pases del 1 al 3 mediante MiSeq. De las 13 líneas producidas, 10 de ellas mostraron niveles indetectables de heteroplasmia, sin embargo 3 líneas, perteneciendo una de ellas al grupo ST con pacientes, mostraron recuperación del ADNmt propio de la placa metafásica, mostrando niveles de heteroplasmia de (92%, 78% y 27%). Así pues a pesar de un nivel de heteroplasmia indetectable en embriones pre-implantacionales, es posible que la recuperación del genotipo mitocondrial original debida a la segregación y posterior amplificación del ADNmt, tenga lugar en el cultivo de células madre después de sucesivos pases.

Estos resultados son completamente diferentes a los observados por otros autores donde ninguna de sus líneas ESC derivadas de embriones ST presentaban recuperación del ADNmt<sup>68</sup>, al igual que en nuestro resultado previo donde ninguna de las 7 líneas HESO-ST presentaban recuperación del ADNmt.

A raíz de estos resultados nos preguntamos si la diferencia de SNPs entre los distintos haplotipos mitocondriales podría causar una amplificación

preferencial por el ADNmt relacionado con el ADNn. Mucho se ha debatido en torno a la necesidad de emparejar haplotipos próximos basándose en la diferencia de SNPs para evitar problemas de incompatibilidad entre el ADNn y el ADNmt ya que la producción de energía en las células es dependiente de una buena interacción entre proteínas codificadas tanto por genes nucleares como mitocondriales<sup>94</sup>.

Se compararon el número de SNPs y los haplogrupos con los niveles de heteroplasmia de todas las líneas HESO-ST, incluidas las 7 que se obtuvieron en el primer experimento (Tabla 19).

**Tabla 129.** Nivel de heteroplasmia en las líneas HESO-ST.

Tratamiento	# hESC	Haplotipo Citoplasto	Haplotipo Carioplasto	SNPs	Heteroplasmia %
	ST6	H2a	H56	6	ND
	ST5	H56	H2a	6	ND
	ST17	H56	H2a	6	ND
	ST7	H13a	H44a	26	ND
	ST16	U5a	V3	33	ND
	ST12	Ua5	V3	33	ND
<b>ST Donantes Sanas</b>	ST15	V3	Ua5	33	ND
	ST14	H1b	Ua5	33	92%
	ST10	H1b	Ua5	33	78%
	ST13	Ua5	H1b	33	ND
	ST8	Ua5	H1b	33	ND
	ST4	D1f	H1e	44	ND
	ST3	D1f	H1e	44	ND



---

	ST2	D1f	H1e	44	ND
	STV1	A2g	D4a	49	ND
	STV2	D4a	A2g	49	ND
	STP1	T2	T2b	27	ND
<b>ST Pacientes</b>	STP2	B2k	H49	32	27%
	STP3	B2K	H49	32	ND

---

#: Número identificación de la donante y **ND**: No detectado.

Según vemos en la tabla 19 la recuperación del genotipo mitocondrial original no está relacionada con la diferencia de SNPs, ya que haplotipos más distantes no muestran este proceso de recuperación. Otros estudios ya habían observado previamente que ESC humanas obtenidas tras el reemplazamiento mitocondrial entre haplotipos más distantes no presentan anomalías<sup>95</sup>.

Algunos autores proponen una amplificación preferencial de un determinado haplotipo sobre otro, lo que provocaría que aun partiendo de una pequeña cantidad de ADNmt, si tiene una ventaja proliferativa sobre el otro, acabara convirtiéndose en el ADNmt mayoritario<sup>46</sup>. La línea STP2 comparte los mismos haplotipos que otra línea celular, STP3, que sin embargo no presenta recuperación del ADNmt del ovocito donante de placa metafásica. Durante el desarrollo embrionario tiene lugar un proceso de segregación del ADNmt que se refleja en un número reducido de copias del ADNmt en la ICM<sup>27</sup>. Durante el proceso de derivación de las células madre embrionarias una selección al azar de las células de la ICM da lugar a la línea celular. Es posible que debido a este proceso de segregación y selección al azar el ADNmt del genotipo original haya sido eliminado de la línea ESC.

Sin embargo, las líneas celulares ST14 y ST10 cuyo genotipo mitocondrial original es Ua5 y están combinadas con un ADNmt donante con haplotipo H1b, presentan recuperación del genotipo mitocondrial original, que podría estar relacionada con una amplificación preferencial del haplotipo Ua5 sobre el haplotipo H1b.

Los estudios donde se observa la amplificación preferencial de un haplotipo sobre otro están basados en la producción de animales heteroplásmicos, donde los niveles de heteroplasma son superiores al 2% que se ha observado como mucho tras esta técnica<sup>96,97</sup>.

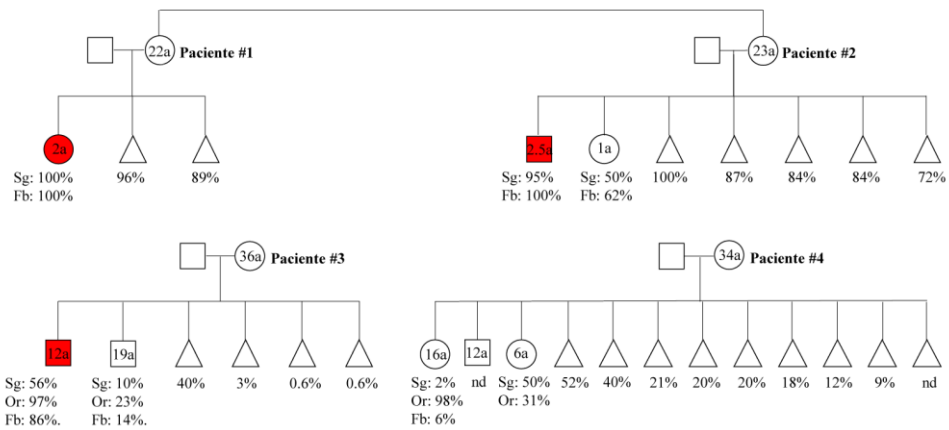
La recuperación del genotipo mitocondrial original no se ha observado en animales producidos con esta tecnología. Se analizó el nivel de recuperación del ADNmt original en fetos de primates de 135 días producidos mediante ST sin observar segregación detectable del ADNmt en los distintos tejidos<sup>25</sup>. Además 4 monos nacieron a partir de embriones generados mediante ST y presentaron al nacer niveles de recuperación del ADNmt original inferiores al 2%<sup>62</sup> manteniéndose en estos niveles 4 años después de su nacimiento. También se han generado ratones que presentan niveles indetectables de recuperación tanto en la generación F1 como en la F2<sup>66</sup> Además se ha desarrollado un modelo de la herencia del ADNmt tras el estudio de 87 mujeres, donde se afirma que para mutaciones del ADNmt cuyo nivel umbral de heteroplasma es >60%, niveles de heteroplasma tras MRT inferiores al 3% son muy improbables que produzcan descendientes enfermos, sin embargo niveles de heteroplasma >5% están asociados con una gran probabilidad de transmitir altos niveles de ADNmt mutado a las siguientes generaciones<sup>98</sup>.

En base a estos trabajos se puede pensar que la recuperación del ADNmt original observado en las células madre es un proceso asociado a la derivación de células madre tras sucesivos pases y su expansión clonal, que no es equiparable al

desarrollo de un individuo a partir de un blastocisto, por lo que al igual que se concluyó en la primera parte de este estudio no parece probable que procesos de recuperación, segregación y acumulación de ADNmt mutado tengan lugar en niños provenientes de ST. A pesar de que las evidencias dicen que no es necesario<sup>99</sup>, parece lógico para evitar preocupaciones, recomendar el uso de donantes con el mismo haplotipo de la paciente para evitar procesos de amplificación preferencial de un haplotipo sobre otro, o llevar a cabo más estudios que identifique las combinaciones en las que tiene lugar la amplificación de un haplotipo sobre otro para aplicarlo en la selección de donantes sanas más adecuada al haplotipo de la paciente.

Continuaremos con el estudio de la segregación del ADNmt a través de la línea germinal en humanos, que ha sido estudiada en muy pocos trabajos, tanto en polimorfismos neutros<sup>100</sup>, como en mutaciones patogénicas del ADNmt<sup>101,102,103,22</sup>.

Se analizó el nivel de heteroplasmia de los ovocitos de nuestras cuatro pacientes y de sus descendientes en distintos tejidos. En total se analizó el citoplasma de los 13 ovocitos enucleados, 5 ovocitos intactos de la paciente #2, cuya calidad ovocitaria estaba comprometida debido a la ovulación prematura el día anterior a su recuperación ovocitaria, por lo que no se usaron para ST y 2 ovocitos de la paciente #4 que tampoco se usaron para ST (Figura 23).



**Sg:** Sangre. **Or:** Orina. **Fb:** Fibroblastos. **nd:** mutación no detectada. **a:** años

**Figura 23. Transmisión de la mutación en la línea germinal de las pacientes.** En rojo se muestran los descendientes afectados por la enfermedad mitocondrial. Los triángulos indican los ovocitos obtenidos.

Las paciente #1 y #2 son hermanas portadoras de la mutación 8993T>G en el gen ATP6 que genera Síndrome de Leigh cuando los niveles de heteroplasmia superan el 95% y NARP cuando los niveles se encuentran entre el 70 y 90%<sup>22</sup>.

La paciente #1 con niveles de heteroplasmia en fibroblasto de 100% y en sangre de 70%, que padece NARP, tiene una hija afectada por Síndrome de Leigh homoplásmica en ambos tejidos. Se recuperaron 2 ovocitos que tenían un rango de heteroplasmia entre 89% y 96%, una heteroplasmia media de 92.5% y una mediana de 92.5%.

La paciente #2 con niveles de heteroplasmia en fibroblasto de 16% y en sangre de 13%. Tiene un hijo afectado por Síndrome de Leigh prácticamente homoplásmico y una hija portadora con niveles de heteroplasmia en fibroblasto del 62% y en sangre del 50%. Los 5 ovocitos recuperados tienen un rango de heteroplasmia entre 72% y 100%, una heteroplasmia media de 85% y una mediana de 84%.

La paciente #3 es portadora de la mutación 13513G>A en el gen ND5 que produce Síndrome de Leigh. Sus niveles de heteroplasmia para esta mutación son de 98% en fibroblasto, 39% en orina y 3% en sangre. Tiene un hijo afectado por Síndrome de Leigh con niveles de heteroplasmia superiores al 85% en fibroblasto y orina y del 56% en sangre y también un hijo portador con niveles de heteroplasmia inferiores al 25% en los 3 tejidos analizados. Se recuperaron 4 ovocitos con un rango de heteroplasmia de 0.6% a 40%, una heteroplasmia media de 11% y una mediana de 2%.

La paciente #4 es portadora de la mutación 3243A>G en el gen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> que produce MELAS. Sus niveles de heteroplasmia son 47% en fibroblastos, 33% en orina y 8% en sangre. Tiene 2 hijos portadores de la mutación. Uno de ellos tiene niveles inferiores al 10% en fibroblasto y sangre y 98% en orina y el otro 31% en orina y 50% en sangre. También tiene un hijo donde no se ha detectado la mutación en los tejidos analizados. Se recuperaron 9 ovocitos con un rango de heteroplasmia de 0% a 52%, una heteroplasmia media de 21% y una mediana de 20%. Estos resultados se pueden ver en la Figura 23

La línea germinal de las pacientes #1 y #2 presentaban en su línea germinal niveles de heteroplasmia sesgados hacia niveles altos de heteroplasmia tendiendo a la homoplasmia, a diferencia de lo que se puede observar en las pacientes #3 y #4, que muestran un amplio rango de heteroplasmia con niveles de heteroplasmia intermedios.

Los resultados observados en las paciente #1 y #2 son similares a los observados por otros autores, donde una mujer portadora de esta misma mutación 8993T>G en el gen ATP6 con nivel de heteroplasmia del 50% en sangre, tuvo 3 descendientes con niveles de heteroplasmia en los diferentes tejidos analizados superiores al 85%. También fueron analizados 7 ovocitos de los cuales 6 de ellos

tuvieron niveles de heteroplasmia superiores al 95% y uno de ellos con niveles no detectables de la mutación<sup>22</sup>. Mientras, los resultados de las pacientes #3 y #4 son similares a los obtenidos por otros autores, que tras estudiar 82 ovocitos primarios de una mujer portadora de la mutación 3243A>G en el gen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> con nivel de heteroplasmia del 7% en sangre, observaron que los ovocitos presentaban un rango de heteroplasmia de 0 a 45% con una heteroplasmia media de 12.6% y una mediana de 8.18%<sup>103</sup>. Así pues nuestros resultados apoyan la teoría de que diferentes patrones de segregación ocurren dependiendo de la mutación patológica del ADNmt.

La mayoría de las mutaciones patológicas puntuales del ADNmt tiene un patrón de transmisión en la línea germinal al azar como hemos observado nosotros por primera vez en la mutación 13513G>A de la paciente #3 o en la mutación 3243A>G de la paciente #4, también observado previamente por otros autores<sup>103</sup>, mientras que la mutación 8993T>G tiene una segregación sesgada hacia la homoplasmia como se puede apreciar en las pacientes #1 y #2, este hallazgo ha sido observado también por otros autores<sup>22</sup>, lo que se refleja en que el tamaño de pedigrí de estas familias normalmente es pequeño debido a la segregación tan rápida de esta mutación en una o dos generaciones<sup>104</sup>.

## ESTUDIO 2. INCOMPATIBILIDAD ENTRE EL ADN<sub>mt</sub> Y EL ADN<sub>n</sub> COMO BARRERA DE AISLAMIENTO POST-ZIGÓTICA EN RATONES

En primer lugar se analizó la distancia genética entre las 2 subespecies de ratones, cepa B6 (*Mus m. domesticus*) y cepa PWD (*Mus m. musculus*) seleccionadas para este experimento en base a la diferencia total de SNPs entre los distintos ADN mitocondriales y el número de SNPs que provocan un cambio de aminoácido en los genes que codifican las proteínas mitocondriales, llamadas sustituciones no sinónimas. Se observa que la secuencia del ADN<sub>mt</sub> de estas dos especies difieren en 393 SNPs, lo que corresponde al 2.4% del genoma. Estas incluyen 27 SNPs en los genes que codifican para los ARN<sub>r</sub>, 18 SNPs en los genes que codifican para los ARN<sub>t</sub>, 34 SNPs en las regiones no codificantes y 314 SNPs que incluyen 33 sustituciones no sinónimas en los genes que codifican para las proteínas mitocondriales. Estos resultados se pueden ver en la tabla 20.

**Tabla 20.** Número de SNPs diferentes entre ratones B6 y PWD.

Gen	Posición en B6	Posición en PWD	Nº. de SNPs B6-PWD	Nº. de aa cambiados
tRNA-Phe	1-68	1-68	1	
12s rRNA	70-1024	70-1024	5	
tRNA-Val	1025-1093	1025-1093	1	
16s rRNA	1094-2675	1094-2676	22	
ND1	2751-3705	2752-3708	34	2
tRNA-Ile	3706-3774	3707-3775	1	
tRNA-Gln	3772-3842	3773-3843	1	
ND2	3914-4949	3915-4952	39	5
tRNA-Cys	5192-5257	5193-5259	1	
tRNA-Tyr	5260-5326	5262-5328	1	
COX I	5328-6872	5330-6874	33	1

## Resultados y Discusión

---

<b>COX II</b>	7013-7696	7015-7698	14	1
<b>tRNA-Lys</b>	7700-7764	7702-7766	1	
<b>ATP 8</b>	7766-7969	7768-7971	2	1
<b>ATP 6</b>	7927-8607	7929-8609	15	1
<b>COX III</b>	8607-9390	8609-9392	14	
<b>tRNA-Gly</b>	9391-9458	9393-9460	1	
<b>ND3</b>	9459-9806	9461-9808	13	1
<b>tRNA-Arg</b>	9808-9876	9810-9878	1	
<b>ND4L</b>	9878-10174	9880-10176	11	1
<b>ND4</b>	10168-11545	10170-11547	26	6
<b>tRNA-His</b>	11547-11613	11548-11615	1	
<b>ND5</b>	11743-13566	11745-13568	70	10
<b>ND6</b>	13553-14071	13555-14073	15	2
<b>tRNA-Glu</b>	14072-14140	14074-14142	2	
<b>CYTB</b>	14146-15289	14148-15291	28	2
<b>tRNA-Thr</b>	15290-15356	15292-15358	4	
<b>tRNA-Pro</b>	15357-15423	15359-15425	2	
<b>D-loop</b>	15424-16300	15426-16300	34	
<b>Total</b>			393	33

---

aa: Aminoácidos.

El 2.4% del genoma es un porcentaje muy alto si se compara con el 0.6% del genoma (90 SNPs) observado cuando se comparó el ADNmt de B6 con NZB, otra cepa endogámica de su misma subespecie<sup>97</sup>. Esta mayor diferencia se debe a que B6 y PWD divergieron de un ancestro común hace medio millón de años, lo que corresponde en número de generaciones y divergencia molecular a la diferencia existente entre chimpancés y humanos<sup>105</sup>.



## 2.1. PRODUCCIÓN DE RATONES CÍBRIDOS MEDIANTE REEMPLAZAMIENTO MITOCONDRIAL Y EL ESTUDIO DE SU FERTILIDAD.

A continuación se realizó el reemplazo mitocondrial recíproco entre cigotos B6 y PWD mediante transferencia de pronúcleos (PNT). Los embriones cíbridos obtenidos al transferir el ADNn B6 en los cigotos enucleados con ADNmt PWD se llamaron MR1 y a los embriones cíbridos obtenidos en el caso recíproco donde el ADNn es PWD y el ADNmt es B6 se llamaron MR2. Se produjeron dos tipos de grupos Control:

- Los grupos donde se realizó PNT entre cigotos de la misma cepa, que se llamaron Autólogo 1 cuando se usaron cigotos B6 y Autólogo 2 cuando se usaron cigotos PWD.
- Los grupos donde no se realizó ninguna micromanipulación que se llamaron Intacto 1 para B6 e Intacto 2 para PWD.

Al proceso de PNT sobrevivieron en MR1 el 91% de los cigotos y en MR2 el 93%. Estos resultados son comparables a los obtenidos en el grupo Control Autólogo (97% en Autólogo 1 y 95% en Autólogo 2).

Se estudiaron un total de 495 cigotos en MR1 y 490 en MR2. Las tasas de división y desarrollo a 8 células fueron similares a las de los grupos Control.

Sin embargo la tasa de blastocisto fue similar a la observada en el grupo Control Autólogo, pero fue inferior a la del grupo Control intacto. Esto sugiere que el proceso de micromanipulación es el que afecta al desarrollo embrionario, ya que son los 2 grupos micromanipulados los presentan una menor tasa de blastocistos y no se debe a problemas de incompatibilidad. Los resultados se pueden ver en la Tabla 21.

## Resultados y Discusión

**Tabla 21.** Desarrollo embrionario pre-implantacional en cigotos híbridos B6 y PWD y grupos Control.

Grupos	ADNn	ADNmt	Zigoto (Rep)	Divididos	8-células	Blastocistos
MR1	B6 (d)	PWD (m)	495 (30)	421 (85%±3)	309 (73%±4)	288 (68%±4 <sup>a</sup> )
Autólogo1	B6 (d)	B6 (d)	48 (5)	47 (98%±1)	43 (91%±6)	42 (89%±8 <sup>a</sup> )
Intacto1	B6 (d)	B6 (d)	160 (9)	153 (96%±1)	139 (91%±2)	137 (90%±3 <sup>b</sup> )
MR2	PWD (m)	B6 (d)	490 (31)	416 (85%±4)	297 (71%±4)	281 (68%±4 <sup>c</sup> )
Autólogo2	PWD (m)	PWD (m)	67 (4)	59 (88%±1)	51 (86%±1)	50 (85%±2 <sup>c</sup> )
Intacto2	PWD (m)	PWD (m)	279 (11)	259 (93%±2)	218 (84%±2)	215 (83%±2 <sup>d</sup> )

**Rep:** Repeticiones.

Ya que el fallo de fecundación debido a la incompatibilidad entre gametos está reconocido como un mecanismo de aislamiento pre-zigótico<sup>106</sup>, se puede preguntar si el reemplazamiento mitocondrial interespecies afectaría a la fecundación. Para ello realizamos ST recíproca entre ovocitos MII de estas 2 subespecies.

El grupo ST1 se produjo introduciendo la placa metafásica de ovocitos B6 en ovocitos PWD previamente enucleado y el grupo ST2 introduciendo la placa metafásica de ovocitos PWD en ovocitos enucleados B6. La tasa de supervivencia tras el proceso ST fue alta y comparable entre los 2 grupos (91% y 93%). Los ovocitos reconstruidos se fecundaron con espermatozoides recuperados de cada una de las cepas mediante fecundación *in vitro* (FIV). Como grupo Control se usaron ovocitos MII intactos fecundados también mediante FIV. Las tasas de fecundación fueron similares en ambos grupos ST (73% en ST1 y 69% en ST2) y en los Controles (72% en FIV1 y 78% en FIV2). Estos resultados indican que el reemplazo

mitocondrial interespecies no afecta a la fecundación y por lo tanto no actúa como mecanismo pre-zigótico (Figura 24).

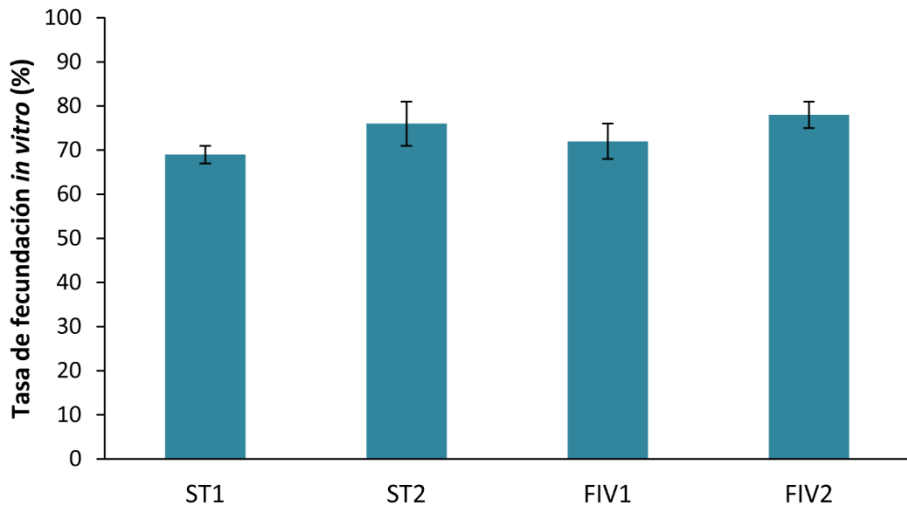


Figura 24. Tasa de fecundación *in vitro* en el grupo ST y Control.

A continuación para determinar si el reemplazo mitocondrial afecta al desarrollo post-implantacional, los embriones producidos fueron transferidos. Así pues 341 embriones del grupo MR1 se transfirieron a 37 hembras receptoras sincronizadas, 11 hembras quedaron gestantes (30%) y nacieron un total de 14 crías vivas (5 machos y 9 hembras) lo que se corresponde al 4%. Esta tasa de crías nacidas vivas fue comparable a la obtenida en ambos grupos Control, lo que sugiere que el desarrollo post-implantacional de ratones B6 portadores de ADNmt PWD no está afectado por el reemplazo mitocondrial. Sin embargo en el grupo MR2, aunque la tasa de gestación fue similar a la obtenida en ambos grupos Control (32% en MR2 y 33% y 31% en los grupos Control), sólo nacieron 6 crías que se corresponde al 1.7%, una tasa inferior al 6% obtenido en ambos grupos Control. Es más, sólo 1 cría nació viva, lo que se corresponde al 0.3%, una tasa significativamente menor a la obtenida en el grupo Control autólogo<sup>2</sup>. El bajo

desarrollo post-implantacional en MR2, puede deberse a la incompatibilidad entre el genoma nuclear y mitocondrial.

Así pues, se puede especular que si existe esta incompatibilidad entre el ADNn y el ADNmt, se debería revertir si se utilizan embriones híbridos que contienen ADNn de las 2 especies.

Para crear los híbridos usamos machos de la cepa DBA/2 (*Mus. m. domesticus*), ya que sus mitocondrias sólo difieren con B6 en 1 SNP y produce camadas más grandes que otras cepas. Estos machos se cruzan con hembras PWD generando los híbridos PWD-DBA con ADNn proveniente de 2 subespecies distintas PWD y DBA (*Mus. m. musculus-Mus m. domesticus*) y ADNmt PWD. Cruzando machos DBA con hembras B6 se generaron los cigotos B6-DBA con ADNn DBA y B6 (Ambos *Mus. m. domesticus*) y ADNmt B6. Se realizó el reemplazamiento mitocondrial mediante PNT entre B6-DBA y PWD-DBA. Los embriones resultantes se llamaron MR3 cuando contenían ADNn B6-DBA y ADNmt PWD y MR4 cuando contenían ADNn PWD-DBA y ADNmt B6. Se produjeron los mismos grupos Control que se llevaron a cabo para los grupos MR1 y MR2, pero en este caso se llamaron Autólogo3 y Autólogo4 e Intacto3 e Intacto4.

Se estudió el desarrollo post-implantacional en ambos grupos. Como se podía esperar, la letalidad embrionaria observada en el grupo MR2 fue revertida en el grupo de ratones híbridos MR4. Se transfirieron 274 blastocistos MR4 en 23 hembras receptoras y se obtuvieron 33 crías vivas (17machos y 16 hembras) que se corresponde con el 11%. Esta tasa es comparable a la obtenida en los grupos Control (Tabla 22).

**Tabla 22.** Desarrollo a término de los embriones cíbridos PWD y los híbridos PWD-DBA

Grupo	ADNn	ADNmt	TE	Hembra Recip.	Gestación	Crías Nacidas	Crías Vivas
<b>MR2</b>	PWD (m)	B6	359	31	10 (32%)	6 (1.7%±1)	1 (0.3%±0.3 <sup>a</sup> )
<b>Autólogo2</b>	PWD (m)	PWD	87	12	3 (33%)	5 (6%±4)	5 (6%±4 <sup>b</sup> )
<b>Intacto2</b>	PWD (m)	PWD	227	11	4 (31%)	15 (6%±3)	9 (4%±2 <sup>a</sup> )
<b>MR4</b>	PWD-DBA (m-d)	B6	276	23	15 (65%)	41 (15%±3)	33 (11%±3 <sup>b</sup> )
<b>Autólogo4</b>	PWD-DBA (m-d)	PWD	51	3	2 (67%)	5 (10%±4)	5 (10%±4 <sup>b</sup> )
<b>Intacto4</b>	PWD-DBA (m-d)	PWD	103	7	3 (43%)	16 (16%±8)	16 (16%±8 <sup>b</sup> )

TE: Transferencia embrionaria y **Recip:** Recipiente.

El grupo MR3 no mostró ninguna diferencia con el grupo MR1 como también se esperaba (Tabla 23).

**Tabla 2313.** Desarrollo a término de los embriones cíbridos B6 y B6-DBA

Grupo	ADNn	ADNmt	TE	Hembra Recip.	Gestación	Crías Nacidas	Crías Vivas
<b>MR1</b>	B6 (d)	PWD	341	37	11 (30%)	20 (6%±2)	14 (4%±2)
<b>Autólogo1</b>	B6 (d)	B6	80	9	3 (25%)	3 (4%±2)	3 (4%±2)
<b>Intacto1</b>	B6 (d)	B6	158	13	4 (36%)	6 (4%±3)	5 (3%±3)
<b>MR3</b>	B6-DBA (d-d)	PWD	260	21	14 (67%)	27 (10%±3)	14 (5%±3)
<b>Autólogo3</b>	B6-DBA (d-d)	B6	47	4	2 (50%)	4 (9%±5)	4 (9%±5)
<b>Intacto3</b>	B6-DBA (d-d)	B6	71	9	4 (44%)	9 (13%±6)	9 (13%±6)

**Recip:** Recipiente

Todas las crías de la primera generación (F1) crecieron hasta la edad adulta sin ningún tipo de anomalía obvia. Cuando llegaron a la madurez sexual se investigó si el reemplazamiento mitocondrial intersubespecie afecta a su habilidad reproductora. Así pues se cruzaron todas las crías F1 del grupo MR1 (excepto un macho sacrificado para analizar los niveles de heteroplasmia) y del grupo MR2 con machos con su mismo fondo nuclear. También incluimos 2 hembras del grupo MR3 y 3 hembras del grupo MR4 como Controles.

En el grupo MR1 dos de los machos F1 tuvieron una o dos camadas de tamaño normal, mientras que los otros 2 machos en el mismo tiempo y cruzados al menos con 2 hembras diferentes no produjeron ninguna camada, lo que indicó que eran estériles. Para averiguar las causas de la infertilidad de estos machos se examinó el peso del cuerpo, el peso de los testículos, recuento de esperma y motilidad del esperma. Todos los machos presentaron valores similares para los parámetros estudiados (Tabla 24).

**Tabla 2414.** Parámetros reproductivos de los machos del grupo MR1.

<b>Macho</b>	<b>Fert</b>	<b>Peso Cuerpo (gramos)</b>	<b>Peso Testículos (miligramos)</b>	<b>Recuento esperma (millones / mL)</b>	<b>Motilidad esperma (%)</b>
1	+	32	96	$4.5 \times 10^6$	56
2	+	40	157	N/T	N/T
3	-	40	147	$0.3 \times 10^6$	80
4	-	37	111	$2.4 \times 10^6$	68

**Fert:** Fértiles.

Además se llevaron a cabo análisis histológicos que no revelaron ningún problema significativo en los testículos o en otros órganos que pudieran explicar la esterilidad.

Las 9 hembras F1 del grupo MR1 quedaron gestantes. Tres de ellas produjeron una o dos camadas de tamaño normal, mientras que las otras 6

mostraron baja tasa de supervivencia de las crías producidas, con tasas de muerte al nacer que variaban del 60 al 100% durante los 6 meses que estuvieron cruzadas, reflejando una disminución de su fertilidad.

Se puede pensar que la función respiratoria mitocondrial puede estar comprometida debido a una interacción subóptima entre el ADNn y el mitocondrial y que esto podría afectar a la capacidad reproductora de los ratones del grupo MR1. Como se ha observado antes, entre estos 2 tipos mitocondriales hay un total de 33 substituciones no sinónimas, de las cuales 27 (82%), se encuentran en los genes que codifican para proteínas del complejo I de OXPHOS. Así pues se realizó un ensayo de actividad enzimática para el complejo I en muestras del músculo recuperado tanto en las hembras como en los machos del grupo MR1 y en las dos hembras del grupo MR3. Entre los machos infértiles se observan niveles similares de actividad del complejo I que en los machos fértiles. Entre las hembras sólo una de ellas con reducida fertilidad muestra niveles de actividad enzimática del complejo I significativamente inferiores al resto de las hembras, incluidas las del grupo MR3. Así pues la reducción de la fertilidad observada en algunos individuos F1 del grupo MR1 no se correlaciona con una disminución de la actividad de OXPHOS (Tabla 25).

**Tabla 25.** Resumen de la aptitud reproductiva de las crías F1 de los grupos MR1 y MR3.

Grupo	Animales	Fertil	Crías F2/ No. Gestaciones	Crías F2 vivas		Crías F2 nacidas muertas		Actividad Complejo I (%)
MR1	Macho 1	+	13/2	8	62%	5	38%	91±4.7 <sup>a</sup>
	Macho 2	+	9/1	7	78%	2	22%	90±2.8 <sup>a</sup>
	Macho 3	-	-	-	-	-	-	91±1.9 <sup>a</sup>
	Macho 4	-	-	-	-	-	-	88±5.4 <sup>a</sup>
	Hembra 1	+	10/1	10	100%	0	0% <sup>a</sup>	91±0.3 <sup>a</sup>
	Hembra 2	+	11/2	11	100%	0	0% <sup>a</sup>	91±0.3 <sup>a</sup>
	Hembra 3	+	16/2	15	94%	1	6% <sup>a</sup>	88±3.8 <sup>a</sup>
	Hembra 4	+	5/1	2	40%	3	60% <sup>a</sup>	91±0.9 <sup>a</sup>
	Hembra 5	+	7/1	2	29%	5	71% <sup>a</sup>	84±1.4 <sup>a</sup>
	Hembra 6	+	9/1	0	0%	9	100% <sup>a</sup>	65±3.6 <sup>b</sup>
	Hembra 7	+	5/1	0	0%	5	100% <sup>a</sup>	89±2.2 <sup>a</sup>
	Hembra 8	+	3/1	0	0%	3	100% <sup>a</sup>	87±1.8 <sup>a</sup>
	Hembra 9	+	1/1	0	0%	1	100% <sup>a</sup> <sub>b</sub>	90±2.2 <sup>a</sup>
MR3	Hembra 1	+	7/1	7	100%	0	0% <sup>a</sup>	90±0.6 <sup>a</sup>
	Hembra 2	+	6/2	5	83%	1	17% <sup>a</sup>	86±2.2 <sup>a</sup>

A diferencia de lo observado en el grupo MR1, la única hembra viva del grupo MR2 no quedó gestante tras 5 meses cruzada con al menos 2 machos distintos, lo que sugiere infertilidad. El análisis histológico de los ovarios y otros órganos no revelaron ningún problema significativo que pudiera explicar la esterilidad. Durante el mismo periodo de tiempo que esta hembra estuvo cruzada, tres hembras F1 del grupo Control MR4 tuvieron cada una de ellas 2 camadas y todas las crías F2 nacieron vivas (100%). Se analizó la actividad del complejo I del sistema OXPHOS en la hembra F1 del grupo MR2 y en las tres hembras F1 del grupo MR4, observando que los niveles de actividad de la hembra del grupo MR2 eran significativamente más bajos que la media de los niveles de actividad en las hembras del grupo MR4 (65±1.4% de media en MR2 y 80±2.6% en MR4).



También se midió la actividad del complejo IV, sabiendo que sólo 2 substituciones no sinónimas afectaban a los genes que codifican para las proteínas mitocondriales de este complejo. Como se esperaba los niveles de actividad del complejo IV en la hembra del grupo MR2 eran indistinguibles de la media de los niveles de actividad en las hembras del grupo MR4 ( $81 \pm 3.1\%$  de media en MR2 y  $81 \pm 6.5\%$  en MR4) (Tabla 26).

**Tabla 2615.** Fertilidad y actividad mitocondrial en hembras F1 de los grupos MR2 y MR4.

Grupo	Hembra	ADNn	ADNmt	Fértil	Crías F2 / No. Gestaciones	Crías F2 vivas	Actividad Complejo I (%)	Actividad Complejo IV (%)
MR2	H1	PWD	B6	-	-	-	$65 \pm 1.4^a$	$81 \pm 3.1$
	H1	PWD-DBA	B6	+	13/2	13 (100%)	$72 \pm 2.2^b$	$78 \pm 9.0$
MR4	H2	PWD-DBA	B6	+	24/2	24 (100%)	$79 \pm 5.1^b$	$82 \pm 5.9$
	H3	PWD-DBA	B6	+	20/2	20 (100%)	$90 \pm 0.4^b$	$84 \pm 4.5$
Media							$80 \pm 2.6$	$81 \pm 6.5$

Estos resultados sugieren que la infertilidad observada en la hembra del grupo MR2 está asociada con un mal funcionamiento de OXPHOS sobretudo en el complejo I, debido a una incompatibilidad entre el ADNn y el ADNmt. Algunos autores atribuyen la infertilidad o una alta tasa de aborto a una reducción de la función respiratoria mitocondrial ya que altos niveles de ATP se necesitan para disparar las oscilaciones de calcio en la fecundación, y para que tenga lugar un correcto desarrollo embrionario y fetal<sup>107</sup>.

Así pues en este estudio se muestra por primera vez en mamíferos a nivel de organismo que la incorrecta interacción entre ADNn y ADNmt, debido a la divergencia de las secuencias del ADNmt entre subespecies, juega un papel importante en el aislamiento reproductivo. Se piensa pues que el ADNn PWD tras

haber estado separado del genoma de B6 durante más de 0.5 millones de años<sup>105</sup> ha perdido su capacidad de interactuar con el ADNmt B6.

## 2.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE HETEROPLASMA Y SEGREGACIÓN EN LA LÍNEA GERMINAL.

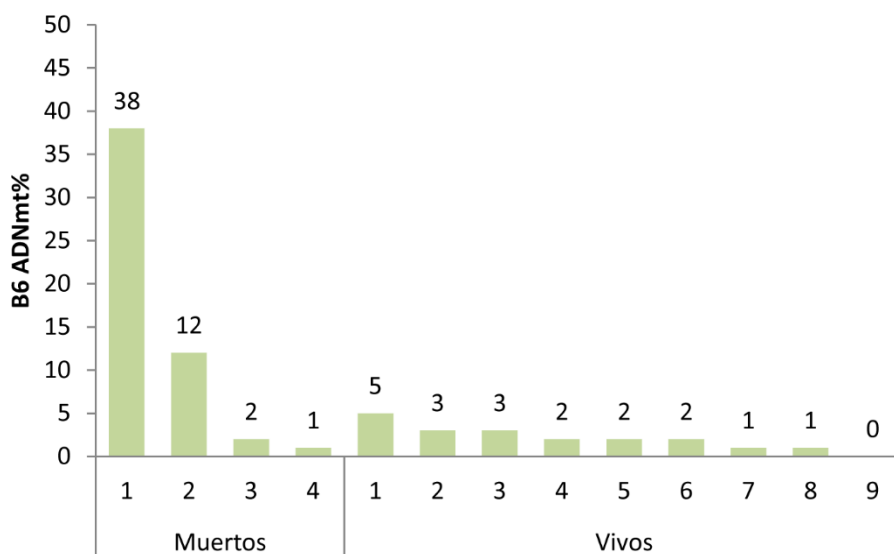
En primer lugar, como ya se sabe, al transferir los PN, una pequeña porción del citoplasma es transferida también. Así pues se miden los niveles de heteroplasma en los cigotos reconstruidos de ambos grupos mediante ARMS-qPCR. Los niveles de heteroplasma en el grupo MR1 fueron de 16% y en el grupo MR2 de 10%. (Tabla 27). Estos resultados son similares a los observados por otros autores tras realizar PNT en ratón<sup>66</sup>.

**Tabla 27.** Heteroplasma de los cigotos tras el reemplazo mitocondrial.

<b>Grupo</b>	<b>ADNn</b>	<b>ADNmt</b>	<b>Nº. cigotos</b>	<b>Heteroplasma (%)</b>
<b>MR1</b>	B6	PWD	10	16 ± 1.2
<b>MR2</b>	PWD	B6	10	10 ± 0.7

Posteriormente se estudian los niveles de heteroplasma en los individuos obtenidos tras PNT. Se recogen muestras de piel de las crías muertas al nacer, de la cola de las crías al ser destetadas y de 6 órganos (cerebro, corazón, riñón, hígado, músculo y bazo) cuando fueron sacrificadas en la edad adulta.

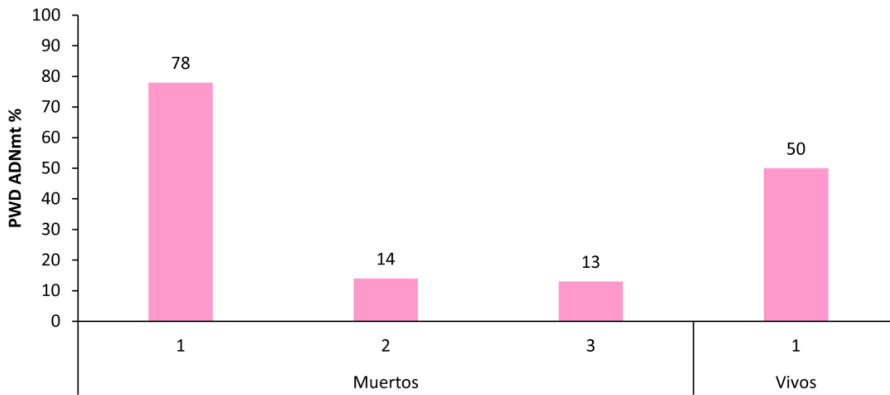
En el grupo MR1, todas las crías al nacer presentaban niveles de heteroplasma inferiores al observado en cigotos con un rango entre el 0 y el 12%, excepto una de las crías muertas al nacer que presentaba un nivel de heteroplasma del 38%. (Figura 25)



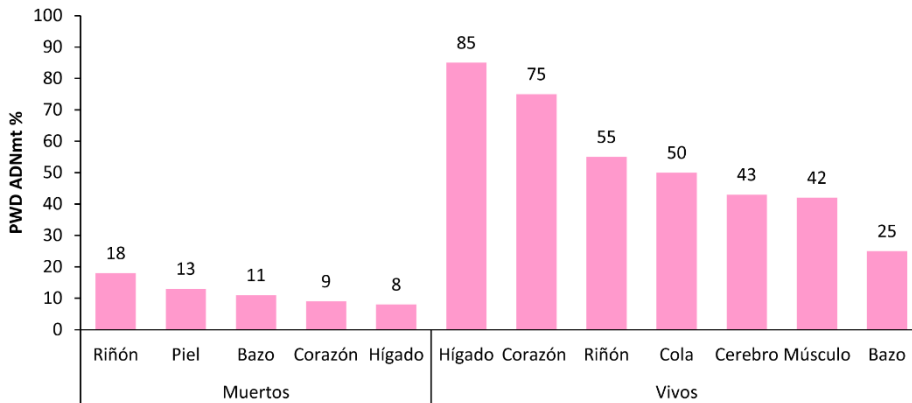
**Figura 25. Nivel de heteroplasma de los individuos F1 del grupo MR1.** Nivel de heteroplasma medido en cola tras el destete en los animales vivos y en muestra de piel en los animales muertos al nacer.

Una segregación similar hacia la homoplasma del ADNmt propio del ovocito donante de citoplasma se observó en los distintos órganos al sacrificar a los ratones en su edad adulta, tanto en el grupo MR1 como en el MR3, con la excepción del corazón y el hígado en una hembra del grupo MR3.

En el grupo MR2 se observaron bajos niveles de heteroplasma en 2 de las crías muertas al nacer, similares a la heteroplasma inicial en zigotos MR2. Sin embargo en la única cría viva de este grupo, el nivel de heteroplasma aumenta al 50% en cola, con niveles variables en otros 6 tejidos estudiados tras su muerte, en un rango desde 25% en bazo hasta 85% en hígado, siendo todos los valores superiores al nivel de heteroplasma inicial observada en los zigotos tras el reemplazo mitocondrial. (Figuras 26 y 27)



**Figura 26. Nivel de heteroplasmia de los individuos F1 del grupo MR2.** Nivel de heteroplasmia medido en cola tras el destete en los animales vivos y en muestra de piel en los animales muertos al nacer.



**Figura 27. Nivel de heteroplasmia en diferentes órganos en individuos F1 del grupo MR2.**

Tras observar estos resultados se razonó que altos niveles de recuperación del genotipo mitocondrial original en órganos con alta demanda energética han permitido la supervivencia de esta hembra. Niveles diferentes de segregación se han observado también en el grupo MR4 con fondo nuclear híbrido PwD-DBA, lo

que sugiere una segregación al azar del ADNmt B6 frente a un fondo nuclear PWD o PWD-DBA. (Tabla 28).

**Tabla 28.** Nivel de heteroplasmia en distintos tejidos de los individuos F1.

Grupo	Hembra	ADNmt	Heteroplasmia del ADNmt original (%)						
			Cola	Cerebro	Corazón	Riñón	Hígado	Músculo	Bazo
MR1	H1	PWD	2	3	1	1	1	0	1
	H2	PWD	5	2	2	3	4	3	1
	H3	PWD	1	9	1	1	0	0	5
	H4	PWD	2	0	1	0	2	0	0
	H5	PWD	7	0	0	3	0	0	0
	H6	PWD	2	0	0	0	0	0	0
	H7	PWD	0	2	1	1	1	0	2
	H8	PWD	1	1	1	1	1	0	15
	H9	PWD	0	0	1	0	1	0	0
MR2	H1	B6	50	43	75	55	85	41	25
MR3	H1	PWD	2	18	27	6	39	1	1
	H2	PWD	2	1	3	0	2	0	0
MR4	H1	B6	9	47	36	60	49	0	63
	H2	B6	10	26	13	0	1	10	27
	H3	B6	48	73	65	79	34	76	75

En resumen, los resultados indican que hay una gran tendencia a la homoplasmia del ADNmt PWD en los ratones cíbridos B6 o B6-DBA en una generación. En contraste los niveles de ADNmt B6 en los órganos del único ratón cíbrido PWD que sobrevivió disminuyen, observándose un aumento del genotipo mitocondrial original PWD, lo que sugiere que altos niveles de heteroplasmia o la

homoplasmia del ADNmt B6 es perjudicial para la supervivencia de las crías del grupo MR2.

Por último se estudiará la transmisión del ADNmt PWD en la línea germinal de las hembras MR1. Para ello dos de las hembras F2 provenientes de la hembra 1 que no produjo crías F2 muertas al nacer y otras dos hembras F2 provenientes de la hembra 5 con una alta tasa de crías F2 nacidas muertas al nacer se cruzan con machos B6.

Las cuatro hembras quedaron gestantes, dando tres de ellas una o dos camadas de tamaño normal. La cuarta hembra murió durante el parto. Una de las hembras F2 proveniente de la hembra 5 con una alta tasa de crías F2 nacidas muertas, produjo 29 crías de cuatro gestaciones distintas, sin que ninguna cría muriese al nacer. Por lo tanto la tendencia observada en algunas hembras F1 del grupo MR1 de producir crías muertas al nacer no se transmite a las siguientes generaciones (Tabla 29).

**Tabla 29.** Capacidad reproductiva de los ratones F2 del grupo MR1.

Hembras	ADNn	ADNmt	Heteroplasmia en cola (%)	Fértil	Crías / N°. gestaciones	Crías Vivas F3 (%)
F2-H1	B6	PWD	0	+	3/1	3 (100%)
F2-H2	B6	PWD	0	+	13/2	5 (38%)
F2-H3	B6	PWD	0	+	29/4	29 (100%)
F2-H4	B6	PWD	2	+	6/1	0 (0%)
Total					51/8	37 (73%)

Tres hembras F3 fueron cruzadas con machos B6 presentando una capacidad de reproducción normal y produciendo 37 crías vivas (Tabla 30).

**Tabla 30.** Capacidad reproductiva de los ratones F3 del grupo MR1.

Hembra	ADNn	ADNmt	Heteroplasmia en cola (%)	Fértil	Crías / No. Gestaciones	Crías vivas F4 (%)
F3-H1	B6	PWD	100	+	8/1	6 (75%)
F3-H2	B6	PWD	100	+	20/2	17 (85%)
F3-H3	B6	PWD	100	+	15/2	14 (93%)
Total					43/5	37 (86%)

Se recogen muestras de la cola de las 40 crías F2 vivas y de 20 crías F3 (14 vivas y 6 muertas) a los 30 días de vida. El nivel de heteroplasmia en siete de las crías F2 fue del 1-2%, mientras que el resto de crías fueron homoplásmicas para el ADNmt PWD propio del ovocito donante de ADNmt.

Resultados similares de observaron en la generación F3 donde 17 de las 20 crías fueron homoplásmicas y 3 presentaron niveles de heteroplasmia entre 3 y 4%.

Estos resultados indican que el ADNmt PWD se transmite establemente a través de la línea germinal en las generaciones F2 y F3 en los híbridos B6 y por lo tanto son genéticamente estables y pueden ser mantenidos normalmente en el laboratorio.

En resumen un desarrollo fetal normal que da lugar al nacimiento de crías sanas y fértiles se ha observado en las hembras del grupo MR1. Aunque algunas hembras de este grupo producen crías muertas al nacer, quizá debido a una interacción subóptima del ADNn y mitocondrial, la tendencia a producir crías muertas al nacer no se transmite a la siguiente generación. Esto implica que el ADNn B6 preserva su habilidad de interactuar con el ADNmt PWD.

Estos resultados respaldan la idea de que la incompatibilidad entre los genomas nuclear y mitocondrial es crítica para que se produzca la reproducción de forma correcta.

Si se extrapolan estos resultados a humanos, esta incompatibilidad es poco probable. Otros autores que han llevado a cabo reemplazamiento mitocondrial entre ratones de la misma subespecie como es el caso de BALB/cByJ (BALB) y NZB/BinJ (NZB) o entre BDF1 y NZW/LacJ han producido ratones fértiles indistinguibles de los Controles<sup>84,66</sup>. Es más, en ESC humanas obtenidas tras el reemplazamiento mitocondrial, donde no se tuvo en cuenta emparejar el ADNn con el ADNmt de la donante, no se han observado anomalías<sup>95</sup>. Las diferencias entre haplotipos humanos tienen un rango de 0 a 130 SNPs<sup>36</sup>, una diferencia mucho menor a los 393 SNPs en que difieren el ADNmt de las dos subespecies distintas de ratón que hemos usado para este estudio, así pues la divergencia entre el ADNmt de los distintos haplotipos humanos no es suficiente para que se produzcan incompatibilidades entre el genoma nuclear y mitocondrial tras el reemplazo mitocondrial.



## ***V. CONCLUSIONES***

---



Las Conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- 1<sup>a</sup>** El Reemplazamiento mitocondrial no afecta al desarrollo embrionario pre-implantacional.
- 2<sup>a</sup>** El Reemplazamiento mitocondrial para prevenir enfermedades mitocondriales en la descendencia, no parece estar afectado entre haplotipos distantes debido a su cercanía genética.
- 3<sup>a</sup>** La presencia de ADNmt mutado no afecta al éxito de reemplazamiento mitocondrial.
- 4<sup>a</sup>** Es posible la utilización de ovocitos vitrificados tanto como donantes de ADNn como de citoplasma en el reemplazamiento mitocondrial.
- 5<sup>a</sup>** La recuperación del genotipo mitocondrial original en embriones pre-implantacionales es indetectable. Sin embargo algunas combinaciones de haplotipos tienen una amplificación preferencial en las células madre embrionarias, provocando la recuperación del genotipo mitocondrial original.
- 6<sup>a</sup>** Se observa por primera vez en mamíferos vivos que la incompatibilidad entre los genomas nuclear y mitocondrial puede actuar como barrera reproductora post-zigótica.
- 7<sup>a</sup>** El genoma nuclear PWD tras haber estado separado del genoma B6 durante más de 500.000 años ha perdido su habilidad para coordinarse con el ADNmt B6. Esta incompatibilidad funcional del ADNn PWD y ADNmt B6 es deletéreo para el desarrollo fetal.



## ***VI. BIBLIOGRAFÍA***

---



1. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–84 (2010).
2. Azzu, V. & Brand, M. D. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 298–307 (2010).
3. Cardoso, A. R., Queliconi, B. B. & Kowaltowski, A. J. Mitochondrial ion transport pathways: role in metabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 832–8
4. West, A. P., Shadel, G. S. & Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 389–402 (2011).
5. Murphy, M. P. *et al.* Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* **13**, 361–6 (2011).
6. Spencer, S. L. & Sorger, P. K. Measuring and modeling apoptosis in single cells. *Cell* **144**, 926–39 (2011).
7. Benard, G. & Rossignol, R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1313–42 (2008).
8. PALADE, G. E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 188–211 (1953).
9. Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1–63 (1990).
10. Skulachev, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 23–9 (2001).

11. Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* **21**, 1616–27 (2002).
12. Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* **370**, 751–62 (2003).
13. Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 359–407 (2005).
14. Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (80-. )*. **283**, 1482–1488 (1999).
15. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–65 (1981).
16. Cree, L. M. *et al.* A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat. Genet.* **40**, 249–54 (2008).
17. Wallace, D. C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 781–821 (2007).
18. St John, J. C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R. & Salah, R. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum. Reprod. Update* **16**, 488–509
19. Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 1967–71 (1979).
20. Bohr, V. A. & Dianov, G. L. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* **81**, 155–160 (1999).



21. Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 389–402 (2005).
22. Blok, R. B., Gook, D. A., Thorburn, D. R. & Dahl, H. H. Skewed segregation of the mtDNA nt 8993 (T→G) mutation in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 1495–501 (1997).
23. Larsson, N. G. *et al.* Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys) A→G(8344) mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 1201–12 (1992).
24. Krakauer, D. C. & Mira, A. Mitochondria and germ-cell death. *Nature* **400**, 125–6 (1999).
25. Lee, H. S. *et al.* Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. *Cell Rep.* **1**, 506–515 (2012).
26. St John, J. C. *et al.* The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* **7**, 141–53 (2005).
27. Facucho-Oliveira, J. M., Alderson, J., Spikings, E. C., Egginton, S. & St John, J. C. Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **120**, 4025–34 (2007).
28. Cao, L. *et al.* The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat. Genet.* **39**, 386–90 (2007).
29. Wai, T., Teoli, D. & Shoubridge, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* **40**, 1484–8 (2008).

30. Fan, W. *et al.* A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* **319**, 958–62 (2008).
31. Stewart, J. B. *et al.* Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* **6**, e10 (2008).
32. Mitchell, P. David Keilin's Respiratory Chain Concept and Its Chemiosmotic Consequences. *Nobel Lecture* (1978). at <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1978/mitchell-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1978/mitchell-lecture.html)>
33. Wallace, D. C. & Chalkia, D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a021220 (2013).
34. Wallace, D. C. Maternal genes: mitochondrial diseases. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **23**, 137–90 (1987).
35. Wallace, D. C. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120267 (2013).
36. Blanco, R., Mayordomo, E., Montoya, J. & Ruiz-Pesini, E. Rebooting the human mitochondrial phylogeny: an automated and scalable methodology with expert knowledge. *BMC Bioinformatics* **12**, 174 (2011).
37. Gropman, A. L. Diagnosis and treatment of childhood mitochondrial diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **1**, 185–194 (2001).
38. Sacconi, S. *et al.* A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1814–20 (2008).
39. Poulton, J. *et al.* Transmission of Mitochondrial DNA Diseases and Ways to Prevent Them. *PLoS Genet.* **6**, e1001066 (2010).

40. Holt, I. J., Harding, A. E. & Morgan-Hughes, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**, 717–9 (1988).
41. Wallace, D. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**, 1427–30 (1988).
42. Schaefer, A. M. *et al.* Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann. Neurol.* **63**, 35–39 (2008).
43. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L. & Chinnery, P. F. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 254–260 (2008).
44. Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K. & Morgan-Hughes, J. A. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am. J. Hum. Genet.* **46**, 428–33 (1990).
45. Goto, Y., Nonaka, I. & Horai, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348**, 651–3 (1990).
46. Burgstaller, J. P., Johnston, I. G. & Poulton, J. Mitochondrial DNA disease and developmental implications for reproductive strategies. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 11–22 (2015).
47. Monnot, S. *et al.* Segregation of mtDNA throughout human embryofetal development: m.3243A>G as a model system. *Hum. Mutat.* **32**, 116–25 (2011).
48. Yoon, K. L., Ernst, S. G., Rasmussen, C., Dooling, E. C. & Aprille, J. R. Mitochondrial Disorder Associated with Newborn Cardiopulmonary Arrest. *Pediatr. Res.* **33**, 433–439 (1993).

49. Dean, N. L. *et al.* Prospect of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 631–8 (2003).
50. Gigarel, N. *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.* **88**, 494–8 (2011).
51. Thorburn, D. Healthy baby girl born following pre-implantation Genetic diagnosis for mitochondrial DNA m. 8993t> g Mutation. *Mol. ...* (2009).
52. Clift, D. & Schuh, M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 549–62 (2013).
53. Sathananthan, A. H. *et al.* Centrioles in the beginning of human development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4806–10 (1991).
54. Ducibella, T. *et al.* Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. *Dev. Biol.* **250**, 280–91 (2002).
55. Bhattacharya, S., Basu, D., Ak, N. & Priyadarshini, A. Molecular mechanism of oocyte maturation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **63**, 45–55 (2007).
56. Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255–6
57. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–6 (1981).
58. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7634–8 (1981).

59. Thomson, J. A. *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7844–8 (1995).
60. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–7 (1998).
61. Schwank, G. *et al.* Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* **13**, 653–8 (2013).
62. Tachibana, M. *et al.* Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* **461**, 367–372 (2009).
63. Craven, L. *et al.* Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* **465**, 82–85 (2010).
64. McGrath, J. & Solter, D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.* **228**, 355–362 (1983).
65. Sato, A. *et al.* Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 16765–16770 (2005).
66. Wang, T. *et al.* Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell* **157**, 1591–1604 (2014).
67. Sathananthan, A. H. & Trounson, A. O. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum. Reprod.* **15 Suppl 2**, 148–59 (2000).
68. Paull, D. *et al.* Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature* **493**, 632–637 (2012).

69. Wakayama, T., Hayashi, Y. & Ogura, A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *J. Reprod. Fertil.* **110**, 263–6 (1997).
70. Wakayama, T. & Yanagimachi, R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol. Reprod.* **59**, 100–4 (1998).
71. Dalton, C. M. & Carroll, J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.* **126**, 2955–2964 (2013).
72. Wolf, D. P., Mitalipov, N. & Mitalipov, S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends Mol. Med.* **21**, 68–76 (2015).
73. Choi, T. *et al.* The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7032–5 (1996).
74. Weall, B. M., Al-Samerria, S., Conceicao, J., Yovich, J. L. & Almahbobi, G. A direct action for GH in improvement of oocyte quality in poor-responder patients. *Reproduction* **149**, 147–154 (2014).
75. Briggs, R., Kovacs, G., MacLachlan, V., Motteram, C. & Baker, H. W. G. Can you ever collect too many oocytes? *Hum. Reprod.* **30**, 81–7 (2015).
76. Craven, L. *et al.* Mitochondrial DNA disease: New options for prevention. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 168–174 (2011).
77. Almeida, P. A. & Bolton, V. N. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* **3**, 357–65 (1995).

78. Bayona-Bafaluy, M. P., Müller, S. & Moraes, C. T. Fast adaptive coevolution of nuclear and mitochondrial subunits of ATP synthetase in orangutan. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 716–724 (2005).
79. Johnson, N. A. Sixty years after ‘Isolating Mechanisms, Evolution and Temperature’: Muller’s legacy. *Genetics* **161**, 939–44 (2002).
80. Lee, H. Y. *et al.* Incompatibility of Nuclear and Mitochondrial Genomes Causes Hybrid Sterility between Two Yeast Species. *Cell* **135**, 1065–1073 (2008).
81. Dickman, C. T. D. & Moehring, A. J. A novel approach identifying hybrid sterility QTL on the autosomes of *Drosophila simulans* and *D. mauritiana*. *PLoS One* **8**, e73325 (2013).
82. Loi, P., Modlinski, J. A. & Ptak, G. Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology* **76**, 217–28 (2011).
83. Roubertoux, P. L. *et al.* Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nat. Genet.* **35**, 65–9 (2003).
84. Jenuth, J. P., Peterson, A. C., Fu, K. & Shoubridge, E. A. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **14**, 146–151 (1996).
85. Rienzi, L. *et al.* Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum. Reprod.* **27**, 1606–1612 (2012).
86. Tachibana, M. *et al.* Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* (2012).

87. Rienzi, L. *et al.* Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: An observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum. Reprod.* (2012).
88. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L. & Angelini, C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7**, 1235–46 (2012).
89. Wang, W.-H. & Keefe, D. L. Spindle Observation in Living Mammalian Oocytes with the Polarization Microscope and Its Practical Use. *Cloning Stem Cells* **4**, 269–276 (2002).
90. Tachibana, M., Sparman, M. & Mitalipov, S. Chromosome transfer in mature oocytes. *Nat. Protoc.* **5**, 1138–1147 (2010).
91. Gao, S., Han, Z., Kihara, M., Adashi, E. & Latham, K. E. Protease inhibitor MG132 in cloning: no end to the nightmare. *Trends Biotechnol.* **23**, 66–8 (2005).
92. Kikuchi, K. *et al.* Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* **63**, 715–22 (2000).
93. Yamada, M. *et al.* Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* **510**, 533–6 (2014).
94. Johnson, K. R., Zheng, Q. Y., Bykhovskaya, Y., Spirina, O. & Fischel-Ghodsian, N. A nuclear-mitochondrial DNA interaction affecting hearing impairment in mice. *Nat. Genet.* **27**, 191–4 (2001).
95. Ma, H. *et al.* Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature* **524**, 234–8 (2015).



96. Burgstaller, J. P. *et al.* MtDNA Segregation in Heteroplasmic Tissues Is Common InVivo and Modulated by Haplotype Differences and Developmental Stage. *Cell Rep.* **7**, 2031–2041 (2014).
97. Sharpley, M. S. *et al.* Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell* **151**, 333–343 (2012).
98. Samuels, D. C., Wonnapijit, P. & Chinnery, P. F. Preventing the transmission of pathogenic mitochondrial DNA mutations: Can we achieve long-term benefits from germ-line gene transfer? *Hum. Reprod.* **28**, 554–9 (2013).
99. Chinnery, P. F. *et al.* The Challenges of Mitochondrial Replacement. *PLoS Genet.* **10**, e1004315 (2014).
100. Shanske, S. *et al.* Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: implications for diagnosis. *Am. J. Med. Genet. A* **130A**, 134–7 (2004).
101. Marchington, D. R., Macaulay, V., Hartshorne, G. M., Barlow, D. & Poulton, J. Evidence from human oocytes for a genetic bottleneck in an mtDNA disease. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 769–75 (1998).
102. Pallotti, F. *et al.* A Wide Range of 3243A>G/tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) (MELAS) Mutation Loads May Segregate in Offspring through the Female Germline Bottleneck. *PLoS One* **9**, e96663 (2014).
103. Brown, D. T., Samuels, D. C., Michael, E. M., Turnbull, D. M. & Chinnery, P. F. Random Genetic Drift Determines the Level of Mutant mtDNA in Human Primary Oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 533–536 (2001).
104. White, S. L. *et al.* Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 474–82 (1999).

## ***Bibliografía***

---

105. Gregorová, S. *et al.* Mouse consomic strains: Exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies. *Genome Res.* **18**, 509–515 (2008).
106. Rieseberg, L. H. & Willis, J. H. Plant speciation. *Science* **317**, 910–914 (2007).
107. Dumollard, R. *et al.* Sperm-triggered [Ca<sup>2+</sup>] oscillations and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* **131**, 3057–3067 (2004).

## *ÍNDICES DE FIGURAS Y TABLAS*

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la mitocondria .....	20
<b>Figura 2.</b> De la mitocondria a la red mitocondrial .....	20
<b>Figura 3.</b> El ADNmt humano .....	22
<b>Figura 4.</b> Historia de la migración de los haplogrupos del ADNmt humano ..	27
<b>Figura 5.</b> Maduración ovocitaria y su correspondiente configuración cromosómica .....	35
<b>Figura 6.</b> Desarrollo pre-implantacional .....	37
<b>Figura 7.</b> Transferencia de pronúcleos (PNT) .....	39
<b>Figura 8.</b> Spindle Transfer.....	42
<b>Figura 9.</b> Transferencia del primer corpúsculo polar .....	43
<b>Figura 10.</b> Transferencia del segundo corpúsculo polar.....	44
<b>Figura 11.</b> Generación de los cigotos reconstruidos en los grupos experimentales y sus controles autólogos .....	75
<b>Figura 12.</b> Transferencia de la placa metafásica .....	79
<b>Figura 13.</b> Desarrollo embrionario tras ST en ovocitos humanos .....	81
<b>Figura 14.</b> Morfología de las ESC derivadas de embriones Control y ST .....	82

<b>Figura 15.</b> Análisis de pluripotencia en ESC derivadas de embriones control y ST .....	83
<b>Figura 16.</b> Análisis histológico del teratoma inducido por la inyección de la línea HESO-ST5 en ratones SCID .....	84
<b>Figura 17.</b> Cariotipos de líneas HESO y HESO-ST .....	85
<b>Figura 18.</b> Genotipado del ADNmt mediante la secuenciación de la región control D-Loop .....	91
<b>Figura 19.</b> Resultados tras introducir el carioplasto en diferentes posiciones en el ovocito durante ST .....	96
<b>Figura 20.</b> Integridad de la placa metafásica en ovocitos tras ST .....	97
<b>Figura 21.</b> Supervivencia de los ovocitos tras ST en los grupos HAPLOTIPOS, PACIENTES y VITRIFICADOS.....	101
<b>Figura 22.</b> Desarrollo embrionario tras ST de los ovocitos correspondientes a los grupos ST1, HAPLOTIPOS, PACIENTES y CONTROL ....	107
<b>Figura 23.</b> Transmisión de la mutación en la línea germinal de las pacientes.	116
<b>Figura 24.</b> Tasa de fecundación <i>in vitro</i> en el grupo ST y Control .....	123
<b>Figura 25.</b> Nivel de heteroplasmia de los individuos F1 del grupo MR1 .....	131
<b>Figura 26.</b> Nivel de heteroplasmia de los individuos F1 del grupo MR2.....	132
<b>Figura 27.</b> Nivel de heteroplasmia en diferentes órganos en individuos F1 del grupo MR2.....	132

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fecundación normal y anómala en los grupos Control y ST.....	80
<b>Tabla 2.</b> Desarrollo embrionario de los embriones de fecundación normal en los grupos Control y ST .....	81
<b>Tabla 3.</b> Análisis STR para determinar el origen de las líneas HESO-ST2, HESO-ST3 y HESO-ST4.....	86
<b>Tabla 4.</b> Análisis STR para determinar el origen de las líneas HESO-ST5 y HESO-ST6 .....	88
<b>Tabla 5.</b> Análisis STR para determinar el origen de la línea HESO-ST7.....	89
<b>Tabla 6.</b> Nivel de heteroplasmia del ADNmt proveniente de la donante de placa metafásica.....	93
<b>Tabla 7.</b> Análisis genético de las ESC obtenidas a partir de embriones ST .....	93
<b>Tabla 8.</b> Formación de PNs en ovocitos fecundados a varios intervalos de tiempo tras ST.....	95
<b>Tabla 9.</b> Formación de PNs en ovocitos expuestos a diferentes concentraciones de citocalasina B (CB) durante el proceso de ST .....	95
<b>Tabla 10.</b> Haplotipos de donantes sanas y diferentes polimorfismo de un sólo nucleótido .....	99
<b>Tabla 11.</b> Mutación y nivel de heteroplasmia en las donantes portadoras de ADNmt mutado .....	100

<b>Tabla 12.</b> Fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo HAPLOTIPOS .....	102
<b>Tabla 13.</b> Fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo VITRIFICADOS .....	103
<b>Tabla 14.</b> Fecundación normal y anómala en los grupos ST y Control .....	104
<b>Tabla 15:</b> Fecundación y desarrollo embrionario de los embriones de fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo HAPLOTIPOS .....	104
<b>Tabla 16.</b> Fecundación y desarrollo embrionario de los embriones de fecundación normal y anómala en los subgrupos del grupo VITRIFICADOS .....	105
<b>Tabla 17.</b> Fecundación y desarrollo embrionario en los grupos ST y Control ...	106
<b>Tabla 18.</b> Determinación del origen de mutaciones mediante CNV .....	110
<b>Tabla 19.</b> Nivel de heteroplasmia en las líneas HESO-ST .....	112
<b>Tabla 20.</b> Número de SNPs diferentes entre ratones B6 y PWD.....	119
<b>Tabla 21.</b> Desarrollo embrionario pre-implantacional en cigotos híbridos B6 y PWD y grupos Control .....	122
<b>Tabla 22.</b> Desarrollo a término de los embriones híbridos PWD y los híbridos PWD-DBA .....	125
<b>Tabla 23.</b> Desarrollo a término de los embriones híbridos B6 y B6-DBA .....	125
<b>Tabla 24.</b> Parámetros reproductivos de los machos del grupo MR1 .....	126
<b>Tabla 25.</b> Resumen de la aptitud reproductiva de las crías F1 de los grupos MR1 y MR3 .....	128



<b>Tabla 26.</b> Fertilidad y Actividad mitocondrial en hembras F1 de los grupos MR2 y MR4 .....	129
<b>Tabla 27.</b> Heteroplasma de los cigotos tras el reemplazo mitocondrial .....	130
<b>Tabla 28.</b> Nivel de heteroplasma en distintos tejidos de los individuos F1.....	133
<b>Tabla 29.</b> Capacidad reproductiva de los ratones F2 del grupo MR1 .....	134
<b>Tabla 30.</b> Capacidad reproductiva de los ratones F3 del grupo MR1 .....	135



***ANEXOS***

---



## ANEXO I



Research Integrity Office, L106-R1

3181 SW Sam Jackson Park Road

Portland, OR 97239-3098

(503) 494-7887

Memo

**Date:** September 8, 2015  
**To:** Shoukhrat Mitalipov, PhD  
**From:** Kathryn Schuff, MD, MCR, Chair, Institutional Review Board  
 Elizabeth Haney, MD, Vice-Chair, Institutional Review Board  
 Lynn Marshall, ScD, Vice-Chair, Institutional Review Board  
 Penny Hogarth, MD, Vice-Chair, Institutional Review Board  
 Kara Manning Drolet, PhD, Associate Director, OHSU Research Integrity Office  
 Andrea Johnson, JD, CIP, Assistant Research Integrity Officer, Institutional Review Board  
 David Holmgren, MS, IRB Manager, Institutional Review Board  
 William Hoffman, PhD, MD, VA IRB Co-Chair  
**IRB #:** IRB00008709  
**Study Title:** [STEM CELLS] Mitochondrial gene replacement in human oocytes  
**CR ID:** CR00024772  
**CR Name:** 2015 Continuing Review

### Continuing Approval

The above submission was reviewed and approved for one year effective 9/4/2015.

Review category: Full Board

Copies of all approved documents are available in the study's Official Documents list in the eIRB. Any additional documents that require an IRB signature (e.g. IAs, IAA's, DUAs) will be posted when signed. If this applies to your study, you will receive a notification when these additional signed documents are available.

#### Ongoing IRB submission requirements:

- Six to ten weeks before the expiration date, you are to submit a continuing review to request continuing approval.
- Any changes to the project must be submitted for IRB approval prior to implementation.
- Unanticipated problems and protocol deviations must be submitted per OHSU policy.
- You are required to submit a termination request when your research is completed.

#### Guidelines for Study Conduct

In conducting this study, you are required to follow the guidelines in the document "[Roles and Responsibilities in the Conduct of Research and Administration of Sponsored Projects](#)" as well as all other applicable [OHSU IRB Policies and Procedures](#).

#### Requirements under HIPAA

If your study involves the collection, use, or disclosure of Protected Health Information (PHI), you must comply with all applicable requirements under HIPAA. See the [HIPAA and Research website](#) and the [Information Privacy and Security website](#) for more information.



ANEXO II



OREGON  
HEALTH & SCIENCE  
UNIVERSITY

eIACUC

IACUC Office (503) 494-8408

MEMORANDUM

Date: 9/2/2015

To: Shoukhrat Mitalipov

Protocol Number: IS00003690

Protocol Name: 0778: Rhesus Monkey ESCs for Transplantation Studies

Date of Approval: 9/17/2015

Type of Review: Annual Update

The IACUC reviewed your Annual Update and considered:

1. Whether there are any alternatives to the animal usage proposed in this protocol;
2. Whether there are any alternatives to the painful procedures in this protocol;
3. Whether the research protocol unnecessarily duplicates previous research;
4. Whether all of the assurances provided by the investigator(s) conform to current OL regulations as stipulated in assurance number A3304-01.

***The annual review has been approved.***

To access your eIACUC account please visit the [eIACUC Login](#) page. Please feel free to contact us directly at anytime if may be of assistance.

**Central and Waterfront Campus:** (503) 494-8408 or [iacuc@ohsu.edu](mailto:iacuc@ohsu.edu)


**West Campus:** (503) 690-5289 or (503) 629-4139 or

[westcampusiacuc@ohsu.edu](mailto:westcampusiacuc@ohsu.edu)





ANEXO III

 <b>Oregon Health &amp; Science University</b> <b>Genetic Consent and Authorization</b> <b>Form</b>  IRB#: 6709	MED. REC. NO. _____ NAME _____ BIRTHDATE _____ Complete this section only if clinical services are provided.
--	---

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY**  
 Stem Cell and Genetic Research Consent and Authorization Form for Oocyte Donation

**TITLE:** Mitochondrial gene replacement in human oocytes

**PRINCIPAL INVESTIGATOR:** Shoukhrat Mitalipov, Ph.D.,

**CO-INVESTIGATORS:** Paula Amato, M.D.  
 David Battaglia, Ph.D.  
 Phillip Patton, M.D.  
 David Lee, M.D.  
 Cary Harding, M.D.  
 David Koeller, M.D.  
 Diana Wu, M.D.

**SPONSOR:** Oregon Health & Science University (OHSU)

**PURPOSE:**

You have been invited to participate in this research project because you:

- Are a healthy woman between 21- 35 years of age OR
- Are a woman who is a carrier of mtDNA mutation between 21 – 37 years of age
- Are not pregnant
- Are either in good general health OR
  - Have been diagnosed as a carrier of mtDNA mutation and have at least one child (living or deceased) diagnosed with an inherited mtDNA disease
- Have regular menstrual cycles and
- Are interested in donating oocytes (egg cells), blood and a skin cell sample (for patients diagnosed with a mtDNA mutation disorder only) for research.

In human cells, including a female's egg cells, there are two main types of genetic materials present. These materials, called genes or DNA, are passed on from parent to child and help determine the make-up of the child's body and mind.

- **Nuclear Genes/DNA** are housed in structures called chromosomes in a cell part called the nucleus. The vast majority of a cell's DNA is this type. Humans have about 25,000 nuclear genes per cell.
- **Mitochondrial (mt) DNA** is found in mitochondria, a different cell compartment than the nucleus. This type of DNA is passed *only* from mother to child. The father normally does not pass it on. This type of DNA ensures that the mitochondria are able to do their job as the energy makers of the cell. Humans have only 37 genes in their mitochondria.

When there are mutations (defects) in the mtDNA and the mother passes it on to the child, very serious human disorders can result, including seizures, strokes, dementia, liver failure, muscle weakness, blindness, deafness and diabetes. Available treatments can only improve symptoms and slow down the diseases. There are currently no cures for mitochondrial disorders.



CO1450



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

Researchers believe that the genetic cause of the diseases can be fixed by a process called mitochondrial gene replacement. To summarize this process, researchers first isolate the nuclear DNA from a mother's egg, leaving behind the mutated mtDNA, and then transfer this nuclear DNA into another woman's egg, which contains only healthy mtDNA.

Someday, we hope to use this process to create healthy egg cells for a woman who has defective mtDNA. The original nuclear DNA from the mother, together with the new healthy mtDNA in the other female's egg, could then be fertilized, and the resulting embryo could be placed back into the mother. This would allow a woman with mutated mtDNA to have a normal, healthy biological child.

This study will not attempt to create a pregnancy using mitochondrial gene replacement, but it is an important step towards developing such therapies for use in the future. When defective genes are corrected in eggs (or sperm) before fertilization to prevent mutations from being passed on, it is called germ line gene therapy. Germ line gene therapy has never been used in humans and is very controversial. At this time, we do not know if it is safe, and some people have ethical concerns about it. In the US, the Food and Drug Administration (FDA) has control over the use of such therapies. In the future, they will require extensive research before allowing the use of germ line gene therapy to treat patients.

Our goal for this study is to assess the safety and effectiveness of the mitochondrial gene replacement procedure in the lab. We will do this by first going through the process of mitochondrial gene replacement, as described above, using eggs. We will then fertilize these eggs, containing both the mother's nuclear DNA and the healthy mtDNA (donated by a healthy female) to make embryos that can be used to derive embryonic stem (ES) cells. ES cells are a type of cell that have the ability to form many different types of cells. They also do not stop regenerating. ES cells are made by growing embryos with feeder cells in a Petri dish. These special feeder cells cause the embryo to keep growing as a cluster of cells instead of developing into a human fetus. Because the ES cells do not stop regenerating themselves, they will provide a renewable source of cells that will allow us to conduct a variety of safety studies on germ line gene therapy. We hope that this study will generate the critical information needed to obtain the FDA's approval of germ line gene therapy and to support future clinical trials.

During this study, your donated eggs, blood cells, skin cells and cumulus cells, will undergo genetic testing. These tests will help researchers better understand human reproduction and how to prevent the transmission of inherited diseases in children.

At no time during this study will the eggs and other materials you donate for this research be used to establish a pregnancy. At no time will it be donated to an infertile patient. This research is expected to last for up to five years. However, stem cell lines that result from this research may be used indefinitely for future research studies. Materials donated as a part of this research study will not have future therapeutic use.

**PROCEDURES:**

If you are eligible to enroll in the study, and agree to donate oocytes, skin cells (for mtDNA mutation patients), cumulus cells and blood, your active participation will last for approximately two months (two menstrual cycles).



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

Study staff will try to sync the timing of you egg donation with that of another study participant. You may be asked to start your study visits on a particular day in order to make this possible.

Although your participation will be similarly timed, you will not meet or interact with other study participants for the purpose of this research.

All of the procedures that you will undergo in this study represent the normal standard of care for women undergoing infertility treatment with IVF and for women donating eggs to infertile couples. None of the procedures are experimental. To minimize risk of unintended pregnancy, you will be required to use barrier contraception (i.e. condoms) if you are sexually active during the course of the study and two weeks afterwards.

Your samples will be used in experiments to create embryos and embryonic stem cells. This involves the replacement of an egg's mutated mtDNA with the healthy genetic material from another human egg. The combined egg will then be fertilized (using the sperm donated for this research) to create embryos, from which researchers will derive stem cells. The sperm that is used to fertilize your egg may come from an anonymous sperm donor from this study, or it may come from your male partner should he decide to donate sperm. If your male partner donates sperm that fertilizes your egg, then the resulting embryo that is created will contain your combined genetic makeup. Creation of stem cells requires the destruction of the embryos. This means that the embryo made up of you and your partners' DNA will be destroyed for purposes of this study. You will have no opportunity to use this embryo for any reproductive or other purposes.

Please see Appendix A on the last page of this form for a chart of the procedures described below.

**Screening (1-2 visits):**

This screening visit will include a review of your medical history (e.g. if applicable, to check if you have children or parents with mtDNA syndromes, to check what type(s) of mtDNA mutations and syndromes you and/or your family members may have, etc.), demographics (date of birth, race and ethnicity), and any current medications you may be taking. We will also ask you to sign a release that permits review of your medical records. You may be asked to give us health information about your relatives. Any information you give us will be kept confidential. We will not contact your relatives without your permission.



11450

We will perform a full physical examination (including a breast and pelvic exam). A vaginal ultrasound will be performed in order to estimate the number of eggs in your ovaries. Blood will be drawn from a vein in your arm (about 2 tablespoons) to check your hormone levels and screen for genetic disorders and sexually transmitted diseases, which includes screening for HIV. Positive test results for HIV will be reported to public health authorities as required by state law. A portion of the blood collected for these hormonal assays will be used for genetic analysis and to confirm the presence of mtDNA mutations. An additional blood draw may be required during the period of the hormone treatment to obtain an adequate amount of blood cells for this study.

You will also be asked to attend one brief counseling session with mental health counselor that works with the fertility clinic. We will try to schedule this session the same day as your health exam. However, you may be required to return for a second visit in order to meet with the counselor.



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

If you are an oocyte donor with a known mtDNA mutation you will also be required to have additional consults, for added safety measures, with Internal Medicine, Anesthesia, and/or any other consult deemed necessary during your initial physical exam. This set of consults will be in addition to the standard procedures for healthy non-mtDNA donors.

The screening process should take approximately 2 hours to complete.

**Skin Biopsy for mtDNA Mutation Patients (1 visit, or combined with screening visits):**

If you are a patient diagnosed with a transmitted mtDNA mutation disorder to your child and agree to participate in this study, you will also undergo a skin biopsy procedure. Skin biopsies will be performed at the OHSU Department of Molecular & Medical Genetics by Dr. Cary Harding. During this procedure, the skin at the back of your arm will be cleaned with an alcohol swab. A solution of diluted lidocaine (a drug that will numb the surrounding skin) will be injected into the back of your arm. The provider will use a small tool called a core punch biopsy to remove a piece of skin about 1-3 mm in size (about the size of a small pencil eraser). A band-aid will be applied to the wound to prevent infection. This visit should take approximately 1 hour.

After your skin cells have been collected, they will be transferred to the OHSU Human Stem Cell Laboratory located on the 13th floor of the Center for Health and Healing and used for this research study. Your samples may be frozen and stored in liquid nitrogen and later thawed and used for future experiments. Genetic tests will be conducted to verify or identify genetic disease.

In the future, samples of your tissue and genetic information may be given to other researchers as part of a search for genetic disorders, or for other research purposes. The samples will be labeled as described in the **CONFIDENTIALITY** section.

**Enrollment and Ovarian Suppression (2-3 visits):**

Research providers will review the results of your screening exams to make sure you are healthy enough to undergo egg donation. They will also look at your blood tests to see if your eggs can be used in this research. If the results of your screening process allow you to continue in the study, you will be asked to return for enrollment.

You will be assigned to one of two protocols that are commonly used in egg donation. The first protocol uses a medication called Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) agonist, such as Lupron (leuprolide). Lupron is used to prevent the body from releasing hormones that could stimulate ovulation or allow premature ovulation. The other protocol uses a GnRH antagonist such as Antagon (ganirelix). Antagon also helps to prevent premature ovulation. The infertility physicians involved in this study will determine which protocol you will follow based on your age, hormone blood levels, and number of follicles seen on your ovaries during scans. For both protocols, you will be given 14 days of oral contraceptives to suppress your ovaries and prevent you from ovulating. Controlling your cycle helps to make the process easier.

**GnRH antagonist protocol:** If you are assigned to the GnRH antagonist protocol, you will start the ovarian stimulation process (see below) right after you complete the course of oral contraceptives.



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**GnRH agonist protocol:** If you are assigned to the GnRH agonist protocol, you will also be instructed on how to give yourself subcutaneous (i.e. under the skin) injections of Lupron during your first enrollment visit. You will start giving yourself daily injections approximately 7 days after starting birth control pills. You will continue to take this medication for two to three weeks, at which point you will return for a blood test and

vaginal ultrasound. These tests will determine whether your ovaries have been suppressed and that you can move on to the ovarian stimulation process (see below).

#### **Ovarian Stimulation Visits (Approximately 4-5 visits):**

Once we have established that your ovaries have been suppressed, you will be instructed to stop taking the oral contraception and begin injections (shots) of follicle-stimulating hormone (FSH) and/or human menopausal gonadotropins (hMG) that will stimulate the production of eggs. These medications must be injected into a specific part of your body (generally the upper buttock, outer thigh or stomach region) in order to be effective. You or a friend will be instructed on how and where on your body to properly administer these injections so that you can take them at home. You will be taking these injections daily for approximately 10 – 14 days.

During this time, you will need to come in for frequent office visits so that we can monitor your hormone levels and follicle development. At each visit, a blood test and vaginal ultrasound will be performed. You will return to the office 3-4 days after starting hormone injections. Your next visit will occur 2-3 days after the first visit of this section (or 5-7 days after the start of hormone injections). You will then return for visits approximately every other day until your follicles are the right size and your hormone levels are adequate.

Once we can see by ultrasound that the eggs have matured, you will be instructed to stop all medications and take a one-time injection of hCG (a different hormone that helps your eggs separate from the wall of your follicles). Your egg retrieval appointment will be scheduled to be approximately 36 hours after you have taken this injection.

(If you are assigned to the **GnRH antagonist protocol**, you will follow the ovarian stimulation process as described above. However, you will also be instructed to begin taking an injection of ganirelix (Antagon or Cetrotide) once your ovarian follicles have become 12-14 mm in size. This medication helps prevent premature ovulation.)

#### **Egg Retrieval (1 visit):**

Your egg retrieval appointment will be scheduled 36 hours after your final hCG injection. This visit will take up to two hours. Eggs are retrieved through transvaginal ultrasound aspiration, a surgical procedure performed under conscious sedation.

Conscious sedation means that although you will receive sedating drugs and pain killers, which will be given to you by an anesthesiologist, you will probably not be completely asleep. You may remember part or all of the procedure, and you may feel some discomfort.

Prior to the beginning of the procedure, you will meet with an anesthesiologist. The anesthesiologist will ask you questions about your medical history, examine you, and discuss how you will be sedated during the egg retrieval. This will include receiving intravenous fluid and anesthesia drugs through an IV cannula (where a needle, attached to a flexible plastic tube, is



11450



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

placed in your vein in order to deliver medications or fluids). The anesthesiologist will place some standard monitors on you to monitor your blood pressure, your heart and your breathing during the procedure. You will also receive oxygen through tubing going to your nose. The details of this process and any additional risks associated with anesthesia will be explained to you prior to the procedure.

The drugs you may receive include midazolam, alfentanil, or fentanyl. Midazolam is a sedating drug which makes you sleepy and forgetful, and alfentanil and fentanyl are strong pain killers. The risks of these drugs are described in the RISKS AND DISCOMFORTS section of this form. However, the decision as to what you receive will be made by the anesthesiologist. You will also receive an IV antibiotic and some anti-nausea medications.

Using a tube attached to an ultrasound probe, a physician guides a suctioning needle into each ovary and removes mature eggs with surrounding cumulus cells. The procedure takes approximately 45 minutes. Following egg retrieval, you will remain in the clinic for 1 hour and then return home for further recovery. We will send you home with written instructions about the signs and complications to be aware of, antibiotics to minimize the risk of infection and with pain medication to use if you experience discomfort. You will need to have a friend accompany you to the clinic and/or arrange a ride home after your procedure.

After your egg(s) and cumulus cells have been collected and given time to mature, they will be transferred to the OHSU Human Stem Cell Laboratory located on the 13th floor of the Center for Health and Healing. Your sample, including the eggs and cumulus cells, will be used in experiments to create embryos and embryonic stem cells as described above and may be frozen for use in the future.

**Follow-up (1 visit):**

You will be asked to return for one follow-up visit after your egg retrieval procedure. This visit is to check on your health following the egg donation process. During this visit, a vaginal ultrasound may be performed to verify that there were no complications from your procedure.

**SUBJECT ACCESS TO GENETIC INFORMATION:**

The results of these studies will not be made available to you because the research is still in an early phase and the reliability of the results is unknown.

If we discover new information that is important for your health care, either in this study or the future, you will be asked whether you wish to receive the results. (You may be required to have the test repeated in a clinical laboratory). Because genetic information is complex and sensitive, the results should be discussed with a genetic counselor or your primary care giver who can answer your questions or discuss your concerns.

If you agree, we may contact you again in the future to update your information.

**RISKS AND DISCOMFORTS:**

You may have side effects while on the study. Everyone taking part in the study will be watched carefully for any side effects. However, the investigators don't know all the side effects that may happen. Side effects may be mild or very serious.



1450



IRB# 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**Blood draws:**

We will draw blood from a vein in your arm. You may feel some pain when your blood is drawn. There is a small chance the needle will cause bleeding, a bruise, an infection, or fainting.

**Pelvic exam and vaginal ultrasounds:**

The examinations in this study are of a personal nature and may cause you to feel embarrassed. Most women feel pressure, but not pain when these exams are being performed.

There are no risks to vaginal ultrasound but you may experience some slight discomfort. A female chaperone will be provided during the entire examination for your comfort if you desire.

**Oral Contraceptives:**

For the majority of women, oral contraceptives can be taken safely. However, there are some women who are at high risk of developing certain serious diseases that can be life threatening or may cause temporary or permanent disability or death. The risks associated with oral

contraceptive use increase significantly if you smoke, have high blood pressure, diabetes, high cholesterol, have or have had a clotting disorder, heart attack, angina pectoris (severe pain and constriction around the heart), cancer of the breast, jaundice (yellowness of the skin and eyes), or malignant or benign liver tumors.

The most common side effects are nausea, vomiting, bleeding between menstrual periods, vaginal discharge and discomfort, menstrual cramps and pain, headache (including migraine), weight gain, and breast tenderness. Less common side effects include jaundice, mood changes, and decrease in desire to engage in sexual activity, intolerance to contact lenses, changes in your liver and/or kidney functions, acne, and changes in your hair patterns. You should not take oral contraceptives if you suspect you may be pregnant, or if you are breastfeeding. Oral contraceptives do not protect against sexually transmitted diseases such as herpes, chlamydia, syphilis, genital warts, gonorrhea, hepatitis B and HIV (AIDS).

Certain drugs may interact with birth control pills to make the birth control pills less effective. These drugs include phenobarbital (which treats epilepsy, insomnia, and anxiety), Dilantin (which treats epilepsy and seizures), and Butazolidin (which treats arthritis) and possibly some antibiotics. If you need to use any of these medications, or if you have any questions, you can contact the study investigator or study staff.

**Hormonal Fertility Injections:**

While serious complications to fertility medications are unlikely, donors commonly experience abdominal swelling, tension and pressure in the ovarian area, mood swings, and bruising at injection sites as a result of fertility drugs. Temporary menopause-like symptoms, including vaginal dryness and hot flashes, may result. Unintentional pregnancy is another potential complication due to enhanced ovulation. You will be required to be heterosexually abstinent or, if heterosexually active, must be in monogamous relationship with a vasectomized partner or be willing to use a barrier method of contraception (i.e. condoms) if you are sexually active during the course of the study and two weeks afterwards.

11450

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

A less frequently occurring risk is ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), a serious complication marked by chest and abdominal fluid buildup and cystic enlargement of the ovaries that can cause permanent injury and even death. According to one study, severe OHSS affects between 1 and 10 percent of donors depending on the drug regimen used, although other studies show a lower incidence of the condition. Patients with OHSS may experience dehydration, blood clotting disorders, and kidney damage.

Less than one percent of the time, drugs can also cause adnexal torsion, a condition that results when a stimulated ovary twists on itself and cuts off its blood supply. Surgery is required to untwist and in some cases to remove the ovary.

You may also experience specific side effects with the different types of injections. These side effects are outlined below:

**Gonadotropins (Lupron)**

**Common:**

- Breast tenderness
- Constipation
- Decreased sex drive
- Difficulty sleeping
- Hot flashes/sweating
- Impotence
- Infection (fever, chills, sore throat)
- Nausea or vomiting
- Pain
- Swelling
- Urination problems

**Uncommon:**

- Dizziness or lightheadedness
- Fast or irregular heartbeat
- Increase in bone pain
- Severe drowsiness
- Severe headache
- Vision changes

**Rare but serious:**

- Severe allergic reactions (rash; hives; difficulty breathing; tightness in the chest; swelling of the mouth, face, lips, or tongue)
- Blood in urine
- Chest pain
- Swelling of the lungs
- Unusual or one-sided weakness

**Antagon & Cetrotide**

**Common:**

- Headache
- Mild pain, redness, pain or swelling at injection site

**Uncommon:**

- Nausea
- vaginal bleeding
- stomach pain
- bloating, or swelling
- sudden weight gain
- unusual cough
- dark urine
- decreased urination
- diarrhea
- dizziness



**Rare but serious:**

- Abdominal pain (severe)
- nausea and vomiting
- weight gain (rapid)
- Severe allergic reactions (rash; hives; itching; difficulty breathing; tightness in the chest; swelling of the mouth, face, lips, or tongue)
- Shortness of breath

**Ovidrel****Common:**

- Bloating (mild)
- stomach or pelvic pain

**Uncommon:**

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abdominal or stomach pain (severe)</li> <li>• bloating (moderate to severe)</li> <li>• Decreased amount of urine</li> <li>• Feeling of indigestion</li> <li>• Nausea, vomiting, or diarrhea (continuing or severe)</li> <li>• Weight gain (rapid)</li> <li>• Skin rash - hives or welts, itching or redness of skin; unusually warm skin</li> <li>• Severe, sudden headache</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vision changes</li> <li>• Wheezing</li> <li>• Discouragement, feeling sad or empty, irritability, loss of interest or pleasure</li> <li>• Enlargement of breasts</li> <li>• Headache</li> <li>• Lack of appetite</li> <li>• Pain at place of injection</li> <li>• Trouble concentrating</li> <li>• Trouble sleeping and tiredness</li> </ul> |
|---|---|

**Rare but serious:**

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelvic pain (severe)</li> <li>• Shortness of breath</li> <li>• Swelling of feet or lower legs</li> <li>• Difficult or labored breathing</li> <li>• Large, hive-like swelling on face, eyelids, lips, tongue, throat, hands, legs, feet, sex organs</li> <li>• Pain in chest, groin, or legs, especially the calves</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Slurred speech</li> <li>• Sudden loss of coordination</li> <li>• Sudden, severe weakness or numbness in arm or leg</li> <li>• Sudden, unexplained shortness of breath</li> <li>• Tightness in chest</li> </ul> |
|--|---|

**Egg retrieval:**

Pain medication: You will also be given a medication such as Loratab for pain both before and after your procedure. The prescribing physician will explain the risks and side effects of the specific medication you are given.

Other risks associated with the egg retrieval include intra-abdominal or vaginal bleeding, infection, possible injury to bowel or urinary tract and potential psychological risks. If there is a complication with your procedure, or you develop an infection, there is also a remote risk to future fertility.



CO1450

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**Anesthesia:**

The risks of anesthesia include some very serious complications such as death, heart attack, stroke and brain damage, although these problems are very rare in healthy people. You may experience nausea and vomiting after the procedure. This can last for several hours and may delay you going home.

You may feel pain while the IV cannula is placed. You may have pain, bruising or infection at the IV site afterwards. You may also experience some discomfort with the cuff used to monitor your blood pressure, and the oxygen tubing going to your nose.

You will receive an antibiotic IV, which may cause pain in your arm as it is administered. Rarely, the antibiotic can cause a severe allergic reaction called anaphylaxis, which can be a life-threatening emergency.

The anesthetic drugs that you will receive will make you sleepy. Some people feel that they are not sleepy enough with these drugs, while others become very sleepy. Sometimes these drugs will stop your breathing, and the anesthesiologist will need to help you to breathe.

The side effects associated with the anesthetic drugs commonly used are listed below:

**Midazolam:**

**Common:**

- Blurred vision
- changes in blood pressure, breathing, and heartbeats
- coughing;
- dizziness or drowsiness
- dry mouth
- headache
- hiccups
- nausea or vomiting
- pain, redness, or tenderness at the injection site

**Rare but serious:**

- short-term memory loss
- slurred speech
- Severe allergic reactions (rash; hives; difficulty breathing; tightness in the chest; swelling of the mouth, face, lips, or tongue);
- agitation or combativeness
- chest pain
- irregular breathing patterns
- unusual or involuntary muscle movements or muscle tremor

**Alfentanil:**

**Common:**

- Muscle stiffness
- Nausea or vomiting
- pruritus (itchiness)
- confusion, somnolence or agitation
- dizziness or drowsiness
- Blurred vision

**Rare but serious:**

- Severe allergic reactions (rash; hives; difficulty breathing; tightness in the chest; swelling of the mouth, face, lips, or tongue);
- pain, redness, or tenderness at the injection site
- irregular breathing patterns
- hypotension
- bradycardia
- hypertension
- arrhythmia

**Fentanyl:****Common:**

- anxiety or confusion
- constipation
- difficulty walking
- dizziness or drowsiness
- dry mouth
- headache
- indigestion, nausea or vomiting
- itching

**Rare but serious:**

- Severe allergic reactions (rash; hives; difficulty breathing; tightness in the chest; swelling of the mouth, face, lips, or tongue)
- hallucinations
- muscle rigidity
- seizures
- slow or irregular heartbeat
- slowed or trouble breathing
- weakness

If you have any further questions about side effects, please ask one of the investigators.

**Skin Biopsy:**

Prior to biopsy, the skin on the back of your arm will be cleaned with an alcohol swab, and then a few milliliters of 1% lidocaine with epinephrine diluted 1:100,000 will be injected to achieve local anesthesia. Some people (fewer than 1 in 10,000) have an allergic reaction to lidocaine, the numbing medicine used in the shot. A 1-3 mm core punch biopsy instrument will be used to remove a piece of skin and the specimen will be placed on saline. You may experience some pain or discomfort from the biopsy procedure. Heavy bleeding from a skin biopsy is rare. There is a small chance, about 10%, that you may get an infection from the biopsy. Sterile conditions will be used to minimize any risk. A small scar will form at the biopsy site. The scar is usually much smaller than the original biopsy.

The side effects associated with the lidocaine and epinephrine used are listed below:

**Lidocaine and Epinephrine:****Common:**

- Bruising, redness, itching or swelling at injection site
- Dizziness
- Nausea

**Rare but serious:**

- Severe allergic reactions (rash; hives; itching; difficulty breathing; tightness in the chest; swelling of the mouth, face, lips or tongue)



CO1450

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

- Blurred vision
- Chest pain
- Fainting
- Signs of infection in the affected area (e.g. oozing, pus discharge)
- Depression
- Drowsiness
- Vomiting
- Seizures
- Fast heart rate
- Slow heart rate

**Genetic Testing:**

Although we have made every effort to protect your identity, there is a small risk of loss of confidentiality. If the results of these studies of your genetic makeup were to be accidentally released, it might be possible that the information we will gather about you as part of this study could become available to an insurer or an employer, or a relative, or someone else outside the study. Even though there are discrimination protections in both Oregon law and Federal law, there is still a small chance that you could be harmed if a release occurred.

A new Federal law, called the Genetic Information Nondiscrimination Act (GINA), generally makes it illegal for health insurance companies, group health plans, and most employers to discriminate against you based on your genetic information. Be aware that this new Federal law does **not** protect you against genetic discrimination by companies that sell life insurance, disability insurance, or long-term care insurance. GINA also does not protect you against discrimination if you have already been diagnosed with the genetic disease being tested.

**BENEFITS:**

You will not personally benefit from participating in this study. However, by serving as a subject, you may contribute new information which may benefit mtDNA patients in the future.

**ALTERNATIVES:**

You may choose not to participate in this study.

**CONFIDENTIALITY AND PRIVACY OF YOUR PROTECTED HEALTH INFORMATION:**

Neither your name nor your identity will be used for publication or publicity purposes. As part of this study we may share a small amount of information about your genetic code and mutation in papers we write about this study. This could mean that others could identify that you were in this study, but they could only do so if they also had your DNA so that they could "match" your genetic code to what was published. Other people would not be able to tell anything about you (such as your hair or eye color) from the small amount of your genetic code (e.g. the mitochondrial d-loop sequence and microsatellite markers) that we may publish.

If you sign this form, you are agreeing that OHSU may use and disclose protected health information collected and created in this research study. The specific health information and purpose of each use and disclosure are described in the table below:

Health Information (Check as applicable)	Purpose(s) (Enter corresponding letter(s) from Purpose Categories)
---	--

Revised 08/31/2004

Page 12 of 18  
Scan to CO1450

IRB# 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

<input type="checkbox"/> Your complete existing health record **	_____
<input checked="" type="checkbox"/> Limited information from your existing health record** (specify): <u>Medical, obstetric, and psychological history</u>	<u>a,b,e</u>
** If we are requesting existing health records that are located outside of OHSU, you will need to complete an additional authorization to release these records to OHSU.	
<b>THE FOLLOWING CHECKED ITEM(S) WILL BE GENERATED/COLLECTED DURING THE COURSE OF THIS STUDY:</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> History and physical examinations	<u>a,b,e</u>
Reports: <input checked="" type="checkbox"/> Laboratory <input checked="" type="checkbox"/> Operative <input checked="" type="checkbox"/> Discharge <input checked="" type="checkbox"/> Progress	<u>a,b,e</u>
<input type="checkbox"/> Photographs, videotapes, or digital or other images	_____
<input checked="" type="checkbox"/> Diagnostic Images/X-ray/MRI/CT	<u>a,b,e</u>
<input type="checkbox"/> Bioelectric Output (e.g., EEG, EKG)	_____
<input checked="" type="checkbox"/> Questionnaires, interview results, focus group survey, psychology survey, behavioral performance tests (e.g., memory & attention)	<u>a,b,e</u>
<input checked="" type="checkbox"/> Tissue and/or blood specimens	<u>a,b,d,e</u>
<input type="checkbox"/> Other: _____	_____
<b>Purpose Categories</b>	
a.	To learn more about the condition/disease being studied
b.	To facilitate treatment, payment, and operations related to the study
c.	To comply with federal or other governmental agency regulations
d.	For teaching purposes
e.	Other <u>To determine if you are eligible for the study; To place in a repository or information/tissue "bank"</u>

A code number will be assigned to you, your cells and genetic information, as well as to information collected about you. Only the investigators named on this consent and authorization form and their research staff will be authorized to link the code number to you.

Other investigators who may receive samples of your tissue and genetic information for research will be given only the code number which will not identify you.

Other persons who are authorized to receive this information are: federal or other governmental agencies as required for their research oversight and public health reporting in connection with this research study, including OHRP and the FDA. Research records may also be reviewed and/or copied by the OHSU IRB.

All other parties including employers, insurance companies, personal physicians, and relatives will be refused access to the information or to the samples, unless you provide written permission, or unless we are required by law to do so.

We may continue to use and disclose protected health information that we collect from you in this study indefinitely.

While this study is still in progress, you may not be given access to medical information about you that is related to the study. After the study is completed and the results have been analyzed, you may be permitted access to medical information collected about you in the study.

You have the right to revoke this authorization and can withdraw your permission for us to use your information for this research by sending a written request to the Principal Investigator listed

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

on page one of the research consent and authorization form. If you do send a letter to the Principal Investigator, the use and disclosure of your protected health information will stop as of the date he receives your request. However, the Principal Investigator is allowed to use and disclose information collected before the date of the letter or collected in good faith before your letter arrives. If you withdraw any tissue or blood samples that were collected from you, they either will be destroyed or stored without any information that identifies you. Revoking this authorization will not affect your health care or your relationship with OHSU.

The information about you that is used or disclosed in this study may be re-disclosed and no longer protected under federal law.

If the information to be used or disclosed contains any of the types of records or information listed just below, additional laws relating to use and disclosures of the information may apply. You understand and agree that this information will be used and disclosed only if you place your **INITIALS** in the applicable space next to the type of information.

\_\_\_\_\_ Genetic testing information

**COSTS:**

There will be no cost to you for participating in this research. If the results are important for your health care, you will be asked to have the tests repeated in a clinical laboratory. The costs for the repeat testing and the counseling necessary to be certain that you understand what the results mean may be billed to you or to your third party carrier. Note that this will probably make the results available to the third party carrier and to your clinical record. You may choose to pay out of pocket instead.

During your participation, an insurance policy will be purchased by the researchers to cover any adverse events that may occur as a result of the research experience. The coverage will include the possibility of hospitalization in the rare case that ovarian hyperstimulation or other complications occur. The policy will not extend beyond your participation in this study.

Upon full completion of this study you will be paid \$5000 for egg donation and \$50 for skin donation (if applicable) as compensation for your time and costs related to this study. If you stop participating before all your visits are complete, a pro-rated portion of this amount based on the number of visits completed following enrollment, will be paid to you. Please see the table at the end of this form for details on how compensation will be pro-rated. For patients diagnosed with a mtDNA mutation enrolled in the current study, reimbursement for travel expenses incurred during the study participation period is negotiable and can be discussed and agreed upon during the initial screening process. No other compensation is offered.

Compensation for study participation counts as part of your income for Internal Revenue Service (IRS) purposes. OHSU is required to report to the IRS if you receive more than \$750 during one year, for participation in the study. We may ask you for your social security number for this purpose.

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**COMMERCIAL DEVELOPMENT:**

By consenting to participate, you authorize the use of your samples for the research described in the PURPOSE and PROCEDURES sections of this document. In addition, you acknowledge that OHSU may make any lawful use of your samples, including, but not limited to, future research studies, destroying them, or transferring them to a public or private entity.

Samples obtained from you in this research may be used to make a discovery that could be patented or licensed to a company. There are no plans to provide financial compensation to you should this occur. However, should OHSU ever provide your samples to anyone else for research or commercial use, it will do so in such a way as to protect your privacy and confidentiality as stated in the CONFIDENTIALITY section of this document. Further, you will have no responsibility or liability for any use that may be made of your samples.

**LIABILITY:**

If you believe you have been injured or harmed while participating in this research and require immediate treatment, contact Dr. Paula Amato (503) 418-3700 or (503) 494-8311 and ask to have the "on call" Reproductive Endocrinologist paged.

You have not waived your legal rights by signing this form. If you are harmed by the fertility medication or study procedures, you will be treated. Oregon Health & Science University does not offer to pay for the cost of the treatment. Any claim you make against Oregon Health & Science University may be limited by the Oregon Tort Claims Act (ORS 30.260 through 30.300). If you have questions on this subject, please call the OHSU Research Integrity Office at (503) 494-7887.

Oregon Health and Science University is also subject to the Oregon Genetic Privacy law (ORS 192.531 through ORS 192.549) and its requirements concerning confidentiality and the legal remedies provided by that law for breach of its requirements. You have not waived your legal rights by signing this form. For clarification on this subject, or if you have further questions, please call the OHSU Research Integrity Office at (503) 494-7887.

**PARTICIPATION:**

You are under no obligation to participate in this study. You may withdraw your consent to donate at any time **up until the eggs and cells have been used for the purpose of research.** If you withdraw your consent prior to the usage of your donated material by the researchers, your unused eggs and cells (including blood, cumulus, and skin cells) will be destroyed. Your identity and the data obtained from this study will be kept strictly confidential. Only the investigators listed above and their research staff will have access to identifying information and the data will be maintained indefinitely.

Paula Amato, MD (503) 418-3700 and Shoukhrat Mitalipov, Ph.D., (503) 614-3709 have offered to answer any other questions you may have about this study. If you have any questions regarding your rights as a research subject, you may contact the OHSU Research Integrity Office at (503) 494-7887.

You do not have to join this or any research study. If you do join, and later change your mind, you may quit at any time. If you refuse to join or withdraw early from the study, there will be no penalty or loss of any benefits to which you are otherwise entitled.

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

Your health care provider may be one the investigators of this research protocol, and as an investigator is interested in both your clinical welfare and in the conduct of this study. Before entering this study or at any time, you may ask for a second opinion about your care from another doctor who is in no way involved with this project. You do not have to be in any research study offered by your physician.

Your donated material may be developed into cell lines that researchers manipulate using the cell lines from animals. This means that the cells lines created from your sample may be combined with the cells of animals as part of this research. These cell lines will not be used for fertility purposes in either human or animal.

In the future, the cells derived from your donation may be used to develop treatments for other individuals. By signing this consent and authorization form, you agree to donate without and restriction or indication for who may receive these treatments.

The lab responsible for the collection and storage of your sample has been certified by the Food and Drug Administration (FDA) and follows the Good Laboratory Practices required by that certification. The laboratory in which the research of your samples will take place has agreed to follow the National Institute of Health (NIH) guidelines for human stem cell research.

You may be removed from the study if the investigator stops the study, if you develop serious side effects or if you do not follow study instructions.

**Egg donation to alternative Stem Cell Research:**

As outlined in the **PROCEDURES** section of this form, study staff will try to line up your egg donation timing with that of another study participant. This can be quite difficult to accomplish and providers would not know if they were successful in syncing your donation until the final stages of your participation. If this happens, we will be unable to use your eggs, skin, blood and cumulus cells for this study.

In this event, there is currently another research study happening to which your eggs and cells could be donated. In this study, researchers use a process called somatic cell nuclear transfer (SCNT). This involves the replacement of an egg's genetic material located in chromosomes (known as DNA) with the genetic material from the skin cells of patients with a particular disease.

If researchers use your eggs for this alternative research, your study visits and procedures will not change.

\_\_\_\_\_ (initial) I would like for my eggs, blood cells, cumulus cells, and skin cells (for mtDNA mutations patients) to be used in the alternative Stem Cell Research study, if they cannot be used for this research.

You will be given a copy of this consent and authorization form.



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**SIGNATURES:**

I give my consent for my blood and tissue samples to be used for this and future studies of this and related research, and recognize that I will not be contacted for permission in the future.

**Your signature below indicates that you have read this entire form and that you agree to be in this study.**



\_\_\_\_\_  
Subject Signature

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Social Security number (for tax purposes, we must have this in order to pay you)

\_\_\_\_\_  
Person Obtaining Consent Signature

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Person Obtaining Consent-Printed Name

IRB#: 6709


MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

APPENDIX A

Schedule of Events											
Study Section	Screening	Ovarian Suppression			Ovarian Stimulation					Egg Retrieval	Follow-up
Visit #	1	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	4	5
Consent Discussion	X										
Medical and gynecological history and demographic information	X										
Physical exam (including height)	X										
Gynecological & breast exam	X										
Skin Biopsy		X									
Blood samples	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
Vaginal ultrasound	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Clinic Counselor	X										
Oral Contraception Dispensed		X									
Hormonal Injections Dispensed					X	X	X	X	X		
Health review			X	X	X	X	X	X	X	X	X
Transvaginal Ultrasound Aspiration										X	
Compensation Pro-rated Amount	\$50	\$50		\$250					\$1500	\$3000	\$200

## ANEXO IV

 <b>Oregon Health &amp; Science University Genetic Consent and Authorization Form</b>  IRB#: 6709	MED. REC. NO. _____ NAME _____ BIRTHDATE _____
	Complete this section only if clinical services are provided.

---

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY**  
Stem Cell and Genetic Research Consent and Authorization Form for Sperm Donation

**TITLE:** Mitochondrial gene replacement in human oocytes

**PRINCIPAL INVESTIGATOR:** Shoukhrat Mitalipov, PhD

**CO-INVESTIGATORS**

Paula Amato, MD  
David Battaglia, PhD  
Phillip Patton, MD  
David Lee, MD  
Cary Harding, MD  
Diana Wu, MD

**SPONSOR:** Oregon Health & Science University (OHSU)

**PURPOSE:**  
You have been invited to participate in this research project because you are a healthy man between 21-60 years of age willing to donate a semen and blood sample to stem cell research.


In human cells, including a female's egg cells, there are two main types of genetic materials present. These materials, called genes or DNA, are passed on from parent to child and help determine the make-up of the child's body and mind.

- **Nuclear Genes/DNA** are housed in structures called chromosomes in a cell part called the nucleus. The vast majority of a cell's DNA is this type. Humans have about 25,000 nuclear genes per cell.
- **Mitochondrial (mt) DNA** is found in mitochondria, a different cell compartment than the nucleus. This type of DNA is passed *only* from mother to child. The father normally does not pass it on. This type of DNA ensures that the mitochondria are able to do their job as the energy makers of the cell. Humans have only 37 genes in their mitochondria.

When there are mutations (defects) in the mtDNA and the mother passes it on to the child, very serious human disorders can result, including seizures, strokes, dementia, liver failure, muscle weakness, blindness, deafness and diabetes. Available treatments can only improve symptoms and slow down the diseases. There are currently no cures for mitochondrial disorders.

Researchers believe that the genetic cause of such diseases can be fixed by a process called mitochondrial gene replacement. To summarize this process, researchers first isolate the nuclear DNA from a mother's egg, leaving behind the mutated mtDNA, and then transfer this nuclear DNA back into another woman's egg, which contains only healthy mtDNA.

Someday, we hope to use this process to create healthy egg cells for a woman who has defective mtDNA. The original nuclear DNA from the mother, together with the healthy mtDNA



CO1450

Revised 08/31/2004

Page 1 of 8  
Scan to CO1450

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

in the other female's egg, could then be fertilized, and the resulting embryo could be placed back into the mother. This would allow a woman with mutated mtDNA to have a normal, healthy biological child.

This study will not attempt to create a pregnancy using mitochondrial gene replacement, but it is an important step towards developing such therapies for use in the future. When defective genes are corrected in eggs (or sperm) before fertilization to prevent mutations from being passed on, it is called germ line gene therapy. Germ line gene therapy has never been used in humans and is very controversial. At this time, we do not know if it is safe, and some people have ethical concerns about it. In the US, the Food and Drug Administration (FDA) has control over the use of such therapies. In the future, they will require extensive research before allowing the use of germ line gene therapy to treat patients.

Our goal for this study is to assess the safety and effectiveness of the mitochondrial gene replacement procedure in the lab. We will do this by first going through the process of mitochondrial gene replacement, as described above, using eggs. We will then fertilize these eggs, containing both the mother's nuclear DNA and the healthy mtDNA (donated by a healthy female) to make embryos that can be used to derive embryonic stem (ES) cells. ES cells are a type of cell that have the ability to form many different types of cells. They also do not stop regenerating. ES cells are made by growing embryos with feeder cells in a Petri dish. These special feeder cells cause the embryo to keep growing as a cluster of cells instead of developing into a human fetus. Because the ES cells do not stop regenerating themselves, they will provide a renewable source of cells that will allow us to conduct a variety of safety studies on germ line gene therapy. We hope that this study will generate the critical information needed to obtain the FDA's approval of germ line gene therapy and to support future clinical trials.

During this study, both your donated semen and blood samples will undergo genetic testing. These tests will help researchers better understand human reproduction and how to prevent the transmission of inherited diseases in children.

At no time during this study will the material you donate for stem cell and gene therapy research be used to establish a pregnancy. At no time will it be donated to an infertile patient. The donated semen will be used to fertilize the eggs that have undergone the mitochondrial gene replacement procedure described above. Your semen and blood samples will be used for this research, which is expected to last for up to five years. However, stem cell lines that result from this research may be used indefinitely for future research. Materials donated as a part of this research study will not have future therapeutic use.

**PROCEDURES:**

If you are eligible to enroll in the study, and agree to donate semen and blood, your active participation will last for approximately two hours.

**Screening:**

The screening process will include a review of your medical history, demographics (date of birth, race and ethnicity), and any current medications you may be taking. You may be asked to give us health information about your relatives. This interview can be done in person at the OHSU IVF clinic or over the telephone. The process may take up to 30 minutes.

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**Enrollment & Donation:**

If the results of your screening process allow you to continue in the study, you will be asked to come to the OHSU IVF clinic for enrollment. You will be asked to provide up to two blood samples during this visit. Blood will be drawn from a vein in your arm (about 2 tablespoons) to screen for genetic disorders and sexually transmitted diseases, which includes screening for HIV. Positive test results for HIV will be reported to public health authorities as required by state law.

After your blood has been collected, you will be asked to produce a semen sample, by ejaculating once into a clean sample cup. You can do this in a private room at the IVF clinic at OHSU. The most common way to collect semen is by masturbation, directing the semen into a clean sample cup.

After your sample has been collected, it will be transferred to the OHSU Human Stem Cell Laboratory located on the 13th floor of the Center for Health and Healing. Your sample will be used in experiments to fertilize eggs with corrected gene mutations as described above. Created embryos will be used to derive stem cells. Creation of stem cells usually leads to destruction of embryos. Cells may also be frozen and stored in liquid nitrogen and later thawed and used for future experiments. The stem cells are permanent cell lines that will be studied using various techniques with the hope of gaining new knowledge on genetic diseases. Your sperm could also be used to fertilize eggs that still have mtDNA mutations. This process will be done to provide what researchers call "controls." This allows the researchers to see if their experimental techniques are working or not.

As described, mitochondrial gene replacement involves putting genes, gene products or chemicals into human cells to create stem cells. During this process, your sample will be destroyed in order to create stem cells.

In the future, samples of your tissue and genetic information will be published in scientific literature and may be given to other researchers as part of researcher on genetic disorders, or for other research purposes. The samples will be labeled as described in the **CONFIDENTIALITY** section.

We may also ask you to sign a release that permits review of your medical records.

**SUBJECT ACCESS TO GENETIC INFORMATION:**

The results of these studies will not be made available to you because the research is still in an early phase and the reliability of the results is unknown.

If we discover new information that is important for your health care, either in this study or the future, you will be asked whether you wish to receive the results. (You may be required to have the test repeated in a clinical laboratory). Because genetic information is complex and sensitive, the results should be discussed with a genetic counselor or your primary care giver who can answer your questions or discuss your concerns

If you agree, we may contact you again in the future to update your information.

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

**RISKS AND DISCOMFORTS:**

**Semen Donation:**

Producing a semen sample does not cause any discomfort. However, you may feel embarrassed about the method used to collect it. If masturbation is against your religious beliefs, you may discuss alternate methods of collection with an OHSU health provider.

**Blood draws:**

We will draw blood from a vein in your arm. You may feel some pain when your blood is drawn. There is a small chance the needle will cause bleeding, a bruise, an infection, or fainting

**Genetic Testing:**

Although we have made every effort to protect your identity, there is a small risk of loss of confidentiality. If the results of these studies of your genetic makeup were to be accidentally released, it might be possible that the information we will gather about you as part of this study could become available to an insurer or an employer, or a relative, or someone else outside the study. Even though there are discrimination protections in both Oregon law and Federal law, there is still a small chance that you could be harmed if a release occurred.

A new Federal law, called the Genetic Information Nondiscrimination Act (GINA), generally makes it illegal for health insurance companies, group health plans, and most employers to discriminate against you based on your genetic information. Be aware that this new Federal law does **not** protect you against genetic discrimination by companies that sell life insurance, disability insurance, or long-term care insurance. GINA also does not protect you against discrimination if you have already been diagnosed with the genetic disease being tested.

**BENEFITS:**

You will not personally benefit from participating in this study. However, by serving as a subject, you may contribute new information that may benefit mtDNA patients in the future.

**ALTERNATIVES:**

You may choose not to participate in this study. You do not need to participate in this research to receive infertility care.

**CONFIDENTIALITY AND PRIVACY OF YOUR PROTECTED HEALTH INFORMATION:**

Neither your name nor your identity will be used for publication or publicity purposes. As part of this study we may share a small amount of information about your genetic code in papers we write about this study. This could mean that others could identify that you were in this study, but they could only do so if they also had your DNA so that they could "match" your genetic code to what was published. Other people would not be able to tell anything about you (such as your hair or eye color) from the small amount of your genetic code (e.g. the mitochondrial d-loop sequence or microsatellite markers) that we may publish.

If you sign this form, you are agreeing that OHSU may use and disclose protected health information collected and created in this research study. The specific health information and purpose of each use and disclosure are described in the table below:

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

Health Information (Check as applicable)	Purpose(s) (Enter corresponding letter(s) from Purpose Categories)
<input type="checkbox"/> Your complete existing health record ** <input checked="" type="checkbox"/> Limited information from your existing health record** (specify): <u>Medical history</u>	  <u>a, b, e</u>
** If we are requesting existing health records that are located outside of OHSU, you will need to complete an additional authorization to release these records to OHSU.	
<b>THE FOLLOWING CHECKED ITEM(S) WILL BE GENERATED/COLLECTED DURING THE COURSE OF THIS STUDY:</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> History and physical examinations Reports: <input checked="" type="checkbox"/> Laboratory <input type="checkbox"/> Operative <input type="checkbox"/> Discharge <input type="checkbox"/> Progress <input type="checkbox"/> Photographs, videotapes, or digital or other images <input type="checkbox"/> Diagnostic Images/X-ray/MRI/CT <input type="checkbox"/> Bioelectric Output (e.g., EEG, EKG) <input checked="" type="checkbox"/> Questionnaires, interview results, focus group survey, psychology survey, behavioral performance tests (e.g., memory & attention) <input checked="" type="checkbox"/> Tissue and/or blood specimens <input checked="" type="checkbox"/> Other: Semen specimen	 <u>a, b, e</u> <u>a, b, e</u>     <u>a, b, e</u> <u>a, b, d, e</u> <u>a, b, e</u>
<b>Purpose Categories</b> a. To learn more about the condition/disease being studied b. To facilitate treatment, payment, and operations related to the study c. To comply with federal or other governmental agency regulations d. For teaching purposes e. Other <u>To determine if you are eligible for the study; To place in a repository or information/tissue "bank"</u>	

A code number will be assigned to you, your cells and genetic information, as well as to information collected about you. Only the investigators named on this consent and authorization form and their research staff will be authorized to link the code number to you. Other investigators who may receive samples of your tissue and genetic information for research will be given only the code number which will not identify you.

Other persons who are authorized to receive this information are: federal or other governmental agencies as required for their research oversight and public health reporting in connection with this research study, including OHRP and the FDA. Research records may also be reviewed and/or copied by the OHSU IRB.

All other parties including employers, insurance companies, personal physicians, and relatives will be refused access to the information or to the samples, unless you provide written permission, or unless we are required by law to do so.

We may continue to use and disclose protected health information that we collect from you in this study indefinitely.

While this study is still in progress, you may not be given access to medical information about you that is related to the study. After the study is completed and the results have been analyzed, you may be permitted access to medical information collected about you in the study.

IRB#: 8709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

You have the right to revoke this authorization and can withdraw your permission for us to use your information for this research by sending a written request to the Principal Investigator listed on page one of the research consent and authorization form. If you do send a letter to the Principal Investigator, the use and disclosure of your protected health information will stop as of the date he receives your request. However, the Principal Investigator is allowed to use and disclose information collected before the date of the letter or collected in good faith before your letter arrives. If you withdraw any tissue or blood samples that were collected from you, they

either will be destroyed or stored without any information that identifies you. Revoking this authorization will not affect your health care or your relationship with OHSU.

The information about you that is used or disclosed in this study may be re-disclosed and no longer protected under federal law.

If the information to be used or disclosed contains any of the types of records or information listed just below, additional laws relating to use and disclosures of the information may apply. You understand and agree that this information will be used and disclosed only if you place your **INITIALS** in the applicable space next to the type of information.

\_\_\_\_\_ Genetic testing information

**COSTS:**

There will be no cost to you for participating in this research. If the results are important for your health care, you will be asked to have the tests repeated in a clinical laboratory. The costs for the repeat testing and the counseling necessary to be certain that you understand what the results mean may be billed to you or to your third party carrier. Note that this will probably make the results available to the third party carrier and to your clinical record. You may choose to pay out of pocket instead.

In the event an additional blood draw is required solely for research purposes, the cost of this additional procedure will be covered by the researchers.

Upon completion of this study you will be paid \$100 as compensation for your time and costs related to this study.

**COMMERCIAL DEVELOPMENT:**

By consenting to participate, you authorize the use of your samples for the research described in the PURPOSE and PROCEDURES sections of this document. In addition, you acknowledge that OHSU may make any lawful use of your samples, including, but not limited to, future research studies, destroying them, or transferring them to a public or private entity.

Samples obtained from you in this research may be used to make a discovery that could be patented or licensed to a company. There are no plans to provide financial compensation to you should this occur. However, should OHSU ever provide your samples to anyone else for research or commercial use, it will do so in such a way as to protect your privacy and confidentiality as stated in the CONFIDENTIALITY section of this document. Further, you will



IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

have no responsibility or liability for any use that may be made of your samples.

**LIABILITY:**

If you believe you have been injured or harmed while participating in this research and require immediate treatment, contact Dr. Paula Amato (503) 418-3700 or (503) 494-8311 and ask to have the "on call" Reproductive Endocrinologist paged.

You have not waived your legal rights by signing this form. If you are harmed by the study procedures, you will be treated. Oregon Health & Science University does not offer to pay for the cost of the treatment. Any claim you make against Oregon Health & Science University may be limited by the Oregon Tort Claims Act (ORS 30.260 through 30.300). If you have questions on this subject, please call the OHSU Research Integrity Office at (503) 494-7887.

Oregon Health and Science University is also subject to the Oregon Genetic Privacy law (ORS 192.531 through ORS 192.549) and its requirements concerning confidentiality and the legal remedies provided by that law for breach of its requirements. You have not waived your legal rights by signing this form. For clarification on this subject, or if you have further questions, please call the OHSU Research Integrity Office at (503) 494-7887.

**PARTICIPATION:**

You are under no obligation to participate in this study. You may withdraw your consent to donate at any time **up until your sample has been used for the purpose of research**. Once your samples are already being used in an on-going research project, their withdrawal would jeopardize the success of the entire project. Therefore, we will be unable to revoke or destroy your sample once it is with the research team.

Shoukhrat Mitalipov, Ph.D., (503) 614-3709 has offered to answer any other questions you may have about this study. If you have any questions regarding your rights as a research subject, you may contact the OHSU Research Integrity Office at (503) 494-7887.

You do not have to join this or any research study. If you do join, and later change your mind, you may quit at any time.

Your health care provider may be one the investigators of this research protocol, and as an investigator is interested in both your clinical welfare and in the conduct of this study. Before entering this study or at any time during the research, you may ask for a second opinion about your care from another doctor who is in no way associated with this project. You are not under any obligation to participate in any research project offered by your physician.

Your donated material may be developed into cell lines that researchers manipulate using the cell lines from animals. This means that the cells lines created from your sample may be combined with the cells of animals as part of this research. These cell lines will not be used for fertility purposes in either human or animal.

In the future, the cells derived from your donation may be used to develop treatments for other individuals. By signing this consent and authorization form, you agree to donate without and restriction or indication for who may receive these treatments.

IRB#: 6709

MED. REC. NO.: \_\_\_\_\_

NAME: \_\_\_\_\_

The lab responsible for the collection and storage of your sample has been certified by the Food and Drug Administration (FDA) and follows the Good Laboratory Practices required by that certification. The laboratory in which the research of your samples will take place has agreed to follow the National Institute of Health (NIH) guidelines for human stem cell research.

You may be removed from the study if the investigator stops the study, if you develop serious side effects or if you do not follow study instructions.

You will be given a copy of this consent and authorization form.

**SIGNATURES:**

If in the future I decide that I no longer wish my blood or tissue samples to be used in this research study with information that can identify me, I agree that these samples may continue to be retained and used for anonymous research by removing all identifying information from my samples.

I give my consent for my blood and tissue samples to be used for this and future studies of this and related research, and recognize that I will not be contacted for permission in the future.

Your signature below indicates that you have read this entire form and that you agree to be in this study.



\_\_\_\_\_  
Subject Signature

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Person Obtaining Consent Signature

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Person Obtaining Consent-Printed Name