

# Prevención de enfermedades mitocondriales: una esperanza a través del uso de técnicas de reproducción asistida

Raúl Eduardo Piña-Aguilar\*

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yuc.

## Resumen

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo y pobremente estudiado de enfermedades, consideradas graves en la mayoría de los casos y actualmente sin tratamiento. Aunque la reproducción asistida ha propuesto estrategias para prevenirlas, como es el diagnóstico genético preimplantacional, éstas no han sido lo suficientemente exitosas. Sin embargo, la reciente publicación de dos técnicas de reproducción asistida –la transferencia del huso meiótico en primates no humanos y la transferencia pronuclear en embriones humanos– genera una luz de esperanza tangible para la prevención de estas enfermedades. Esta revisión analiza las características y el significado de estos nuevos hallazgos y sus implicaciones clínicas futuras.

**PALABRAS CLAVE:** Enfermedades mitocondriales. mtDNA. Transferencia nuclear. Transferencia cromosómica. Transferencia pronuclear.

## Abstract

Mitochondrial diseases are a heterogenic and poorly studied group of diseases, considered serious in most cases and currently without treatment. Although assisted reproduction proposed strategies to prevent them, such as pre-implantation genetic diagnosis, these techniques are not sufficiently successful. However, the recent publication of two assisted-reproduction techniques – meiotic spindle transfer in nonhuman primates and pronuclear transfer in humans – generate a clear ray of hope for the prevention of these diseases. This review analyzes the characteristics and meaning of these new findings and their future clinical implications.

**KEY WORDS:** Mitochondrial disease. mtDNA. Nuclear transfer. Chromosome transfer. Pronuclear transfer.

La mitocondria es un organelo con funciones importantes en el metabolismo celular eucariótico. Entre estas funciones se encuentran la producción de energía, específicamente en forma de adenosina trifosfato (ATP), el transporte de electrones, la apoptosis y las vías de señalización dependientes de calcio. Pese a esto, las enfermedades genéticas mitocondriales son un grupo bastante heterogéneo y pobremente estudiado de enfermedades, caracterizadas por disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, las cuales fueron descritas por primera vez en 1988<sup>1</sup>.

Estas enfermedades pueden ser causadas por alteraciones en las proteínas mitocondriales sintetizadas en el núcleo celular o por las alteraciones en las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial (mtDNA). Entre las principales enfermedades causadas por alteraciones en el mtDNA se incluye la oftalmoplejia externa crónica progresiva, el síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke* (MELAS), el síndrome de Pearson, el síndrome de Leigh, la debilidad neurogénica con ataxia y retinitis pigmentosa, la epilepsia mioclónica con fibras rojas rotas y la neuropatía óptica hereditaria de Leber. Todas éstas tienen un espectro de gravedad variable, la mayoría son severas, incluso algunas fatales, y hasta ahora se consideran incurables.

### Correspondencia:

\*Raúl Eduardo Piña-Aguilar

Apartado Postal 3, Administración de Pensiones

C.P. 97212, Mérida, Yuc.

E-mail: rpina.a@hotmail.com

Fecha de recepción en versión modificada: 19-11-2010

Fecha de aceptación: 24-11-2010

Desde la perspectiva de la reproducción asistida, una de las primeras propuestas para la prevención de las enfermedades mitocondriales fue el uso de diagnóstico genético preimplantacional (PGD) para estas enfermedades. El PGD para prevención de enfermedades por mutaciones de ADN consiste básicamente en tomar una o dos células de un embrión producido por fertilización *in vitro*, normalmente en etapa de división, extraer el ADN y usarlo para el análisis de las mutaciones presentes. El primer reporte de la aplicación del PGD fue para la debilidad neurogénica con ataxia y retinitis pigmentosa<sup>2</sup>. También se ha reportado el nacimiento de un niño libre del síndrome de Leigh a través del PGD<sup>3</sup>. Sin embargo, dada la heterogeneidad de estas enfermedades y las dificultades que implica el diagnóstico molecular usando mtDNA, su uso hasta ahora se encuentra limitado.

Otro enfoque más complicado que ha sido propuesto es la transferencia citoplásmica, también llamada transferencia ovoplásmica. Esta técnica se basa en el hecho de que la herencia mitocondrial se transmite por vía materna y que el mtDNA del futuro embrión solo proviene de las mitocondrias presentes en el ovocito. La transferencia citoplásmica consiste en transferir al ovocito afectado por una enfermedad mitocondrial el citoplasma de un ovocito normal con el propósito de «diluir» o reducir el efecto de las alteraciones en el mtDNA. Adicionalmente se propone que al restablecer la presencia de mitocondrias sin alteraciones esta técnica puede dar la energía suficiente para permitir el desarrollo embrionario preimplantacional. Sin embargo, esta técnica tiene limitantes importantes, como es el hecho de que solo es factible transferir aproximadamente un 15% del volumen citoplasmático, cuando para prevenir los defectos se necesitaría un 50%. También se considera el hecho de generar heteroplasma mitocondrial en el ovocito al introducir mitocondrias del ovocito donante, lo que tiene consecuencias para el desarrollo del feto y el embrión resultante que no son claras hasta ahora. Aunque existen algunas decenas de niños nacidos a través de este procedimiento y la heteroplasma mitocondrial no se ha demostrado en todos los casos, actualmente la transferencia ovoplásmica no se considera un procedimiento seguro ni suficientemente exitoso para considerarse como herramienta con posible aplicación clínica para prevenir las enfermedades mitocondriales.

La otra herramienta probable que ha sido propuesta, la cual está relacionada con la transferencia ovoplásmica, es la transferencia nuclear. Considerando que un ovocito donador «sano» no llevaría los defectos

mitocondriales, el transferir el núcleo de una célula somática de la paciente afectada o embrionaria a un ovocito sano prevendría las enfermedades mitocondriales. No obstante, este enfoque se había mantenido sin explorar en primates y el desarrollo de la transferencia nuclear en primates se había enfocado a la producción de células madres a partir de embriones clonados, hasta que Tachibana, et al. reportaron el nacimiento de crías de monos Rhesus (*Macaca mulatta*) en los que se remplazaron los genes mitocondriales<sup>4</sup>.

Este hito en la reproducción asistida implicó el desarrollo de una metodología diferente a aquella utilizada tradicionalmente en los procedimientos de transferencia nuclear. Este grupo de investigación, el cual tiene el antecedente de haber derivado células madre embrionarias de primates no humanos provenientes de embriones clonados, generó la hipótesis de que la transferencia de solamente el complejo huso-cromosomas de una paciente afectada a ovocitos maduros donados podía evitar la presencia de mtDNA con alteraciones, y permitir el desarrollo embrionario después de la fertilización con el esperma de la pareja y el consiguiente nacimiento de hijos.

Inicialmente, ellos encontraron que las mitocondrias activas en los ovocitos de monos Rhesus están distribuidas uniformemente en el citoplasma, pero el huso meiótico y los cromosomas se encuentran depletados de ellas. El siguiente paso a conseguir fue el hallar cómo realizar la enucleación sin dañar el huso y los cromosomas, los cuales se descartan en los procedimientos tradicionales de transferencia nuclear. Para esto, ellos usaron la visualización no invasiva del huso a través de microscopía de polarización y lograron extraer el huso con aproximadamente el 1.5% del citoplasma ovocitario que lo rodea. Posteriormente, exploraron la reintroducción del complejo huso-cromosomas, para este propósito la electrofusión –procedimiento tradicional de la transferencia nuclear– no fue efectiva, ya que ocasionó una activación prematura del ovocito con la consiguiente progresión de la meiosis. Para evitar este inconveniente, ellos utilizaron la fusión carioplásmica con virus Sendai (una técnica no eléctrica de fusión celular). Ésta permitió la fusión exitosa y que los ovocitos solo fueran activados hasta la fertilización por el esperma. Este procedimiento les permitió obtener unas tasas del 90% de fusión, fertilización del 95 *versus* 94% del control y desarrollo de blastocistos de 61 *versus* 60% del control<sup>4</sup>.

Finalmente, después de derivar líneas de células madres de los embriones producidos por transferencia del huso, las cuales no demostraron anomalías

cromosómicas, este grupo exploró el potencial de desarrollo *in vivo* de embriones obtenidos por esta técnica. Transfirieron 15 embriones, los cuales dieron una tasa de gestación del 33%; esta cifra fue mayor que la obtenida con embriones control producidos por inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). Se obtuvieron tres crías sanas, las cuales demostraron por análisis de microsatélites la identidad genética de las células donadoras de huso. También, el análisis del mtDNA de las crías por secuenciación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) mitocondriales, polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y análisis de SNPs usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real demostró que éste provenía exclusivamente de los donadores de citoplasma<sup>4</sup>. Esta investigación representa el primer reporte de «reemplazo completo de mtDNA», y aunque esta técnica no se puede transpolar directamente a humanos, representa una gran esperanza para explorar la transferencia de huso meiótico en humanos como tratamiento de las enfermedades mitocondriales.

Recientemente, el uso de la micromanipulación en embriones ha dado otro paso importante en lo que respecta a la prevención de las enfermedades mitocondriales. Craven, et al. reportaron la transferencia pronuclear en embriones humanos para prevenir la transmisión de estas enfermedades<sup>5</sup>. En un enfoque diferente al artículo descrito en la sección anterior, ellos utilizaron cigotos en lugar de ovocitos para realizar la transferencia nuclear. Trabajaron con embriones con fertilización anormal (unipronucleados o tripunucleados) para explorar la factibilidad de la transferencia de uno o dos pronúcleos entre cigotos. Para esto trataron los embriones con inhibidores del citoesqueleto, removieron los pronúcleos acompañados de un pequeño volumen de citoplasma y para la fusión usaron virus japonés inactivado. Su primer hallazgo fue confirmar el cambio en el genotipo nuclear analizando microsatélites. Posteriormente exploraron el desarrollo *in vitro* de los embriones en los que se había hecho la transferencia pronuclear, obteniendo un 22.7% de embriones en etapa mayor a ocho células en los cigotos transferidos con un pronúcleo y un 22.2% en los transferidos con dos pronúcleos. Un 8.3% de los embriones con dos pronúcleos llegaron a la etapa de blastocisto. Siendo establecida esta capacidad de desarrollo, el siguiente paso fue analizar el genotipo de mtDNA, en el cual encontró cierto grado de heteroplasmia en los embriones resultantes y diferencias en la cantidad de mtDNA del donador entre

las blastómeras de estos; para este análisis usaron RFLP para variantes de mtDNA y determinaron el número de copias de mtDNA por PCR en tiempo real. Para superar el inconveniente de la heteroplasmia, el grupo se enfocó en una micromanipulación más cuidadosa que minimizara el volumen de citoplasma a transferir, con esto se obtuvo que casi el 50% de los embriones tenían niveles indetectables de mtDNA del donador pronuclear y que en los restantes la cantidad de mtDNA del donador era menor al 2%<sup>5</sup>.

Este trabajo representa una aproximación al potencial real de las técnicas de micromanipulación en la prevención de enfermedades mitocondriales, ya que a pesar de haber sido realizado con células con una capacidad de desarrollo disminuida, se demostró la factibilidad de estos procedimientos. Aún queda por comparar en un mismo experimento el potencial sobre el desarrollo embrionario *in vitro*, el nivel de heteroplasmia de los embriones resultantes, el desarrollo *in vivo* y finalmente el nacimiento y la normalidad de las crías producidas por ambas técnicas descritas.

Interesantemente, en el contexto de la transferencia nuclear y la prevención de enfermedades mitocondriales que se han discutido en esta revisión, se ha demostrado recientemente y por primera vez la producción de crías ovinas con mtDNA homoplásmico, producidas por transferencia nuclear<sup>6</sup>. Para este propósito, el grupo de investigación depleto las células somáticas donadoras cultivándolas con bromuro de etidio por dos semanas; este proceso reduce la cantidad de mtDNA a 1.05%, el uso de estas células no modifica el desarrollo embrionario *in vitro* después de la transferencia nuclear, solamente la fusión celular fue menos efectiva. Se obtuvo un 6.1% de nacimiento de crías y el análisis de mtDNA de los corderos nacidos, reveló que la cantidad de mtDNA proveniente de la célula donadora fue menor al 0.0001% del mtDNA total incluso analizando diversos tejidos<sup>6</sup>. Este artículo demuestra que modificando el protocolo tradicional de transferencia nuclear es posible obtener embriones y crías con el ADN nuclear del donador y el mtDNA solamente del ovocito receptor. También estimula la idea de su posible aplicación en los procedimientos de transferencia del huso meiótico y pronuclear descritos anteriormente, e incluso como posible terapia para disminuir la carga de mtDNA en células de pacientes afectados.

En conclusión, aunque la aplicación clínica de las técnicas descritas en el presente artículo dista de ser factible a corto plazo, y aunque las barreras que se deben vencer para su aplicación son muchas, entre

las que se encuentran: el uso de virus provenientes de animales para la fusión celular, la infraestructura y la capacidad técnica para realizar la micromanipulación, el determinar los efectos sobre la epigenética de los embriones y fetos resultantes, la incompatibilidad de los procedimientos con el número de ovocitos humanos disponibles para cada tratamiento. Estas técnicas generan una esperanza tangible para las enfermedades mitocondriales, que hasta el día de hoy se mantienen incurables, sin tratamientos efectivos en el horizonte y que en la mayoría de los casos son completamente devastadoras para las familias que las padecen.

## **Bibliografía**

1. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331:717-9.
2. Steffann J, Frydman N, Gigarel N, et al. Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet*. 2006; 43:244-7.
3. Unsal E, Aktaş Y, Uner O, et al. Successful application of preimplantation genetic diagnosis for Leigh syndrome. *Fertil Steril*. 2008;90:2017:e11-3.
4. Tachibana M, Sparman M, Sritanaudomchai H, et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*. 2009;461:367-72.
5. Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, et al. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*. 2010;465:82-5.
6. Lee JH, Peters A, Fisher P, Bowles EJ, St John JC, Campbell KH. Generation of mtDNA homoplasmic cloned lambs. *Cell Reprogram*. 2010;12:347-55.