

El regreso del ovocito: de la olvidada transferencia citoplasmática a la actual transferencia del huso meiótico

Raúl Eduardo Piña-Aguilar*

RESUMEN

El ovocito es la célula fundamental gestora del desarrollo embrionario; por tanto, es materia de intensa investigación. El ovocito humano se ha utilizado en diversas técnicas de micromanipulación que tratan de funcionar como terapias que mejoren el desarrollo embrionario. La aparición reciente de una nueva técnica de micromanipulación, la transferencia del huso meiótico en primates, promete revitalizar la importancia del ovocito. En esta revisión se analizan brevemente las técnicas de micromanipulación propuestas previamente como “terapias” ovocitarias y el potencial clínico de la transferencia del huso meiótico.

Palabras clave: ovocito, transferencia cromosómica, transferencia citoplasmática, transferencia nuclear.

ABSTRACT

The oocyte is the fundamental and controlling cell of the embryo development, consequently it is matter of intense research. The oocyte has been used in diverse micromanipulation techniques that try to work as therapies to improve the embryo development. Recently the appearing of a new micromanipulation technique, the meiotic spindle transfer in primates, promises to revitalize the importance of oocyte, if it is possible to develop in humans. In this review are briefly analyzed the micromanipulation techniques previously proposed as oocyte “therapies” and the clinical potential of meiotic spindle transfer.

Key words: oocyte, chromosome transfer, cytoplasmic transfer, nuclear transfer.

El ovocito es, quizá, la célula más fascinante del cuerpo porque posee cualidades únicas: tamaño, características cromosómicas diferentes a las células somáticas, particularidades de los procesos involucrados en el ciclo celular, tiempo de desarrollo y supervivencia. Sin embargo, su cualidad más importante es ser la célula gestora y pilar del desarrollo embrionario preimplantación.

* Servicio de Genética Médica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), México DF.

Correspondencia: Dr. Raúl E. Piña-Aguilar. Servicio de Genética Médica, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE. San Lorenzo 502, Edificio E, Esq. Coyoacán, colonia Del Valle, México 03100, DF. Correo electrónico: rpina.a@hotmail.com
Recibido: junio 2011. Aceptado: enero 2012.

Este artículo debe citarse como: Piña-Aguilar RE. El regreso del ovocito: de la olvidada transferencia citoplasmática a la actual transferencia del huso meiótico. Rev Mex Reprod 2012;4(3):132-138.

www.nietoeditores.com.mx

Con base en el supuesto de que la reproducción asistida es una ciencia pero teniendo también un gran componente de arte, suele suceder que exista un tipo de “moda” en el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas. En este sentido, el ovocito ha tenido sus altibajos, desde una perspectiva de investigación el desarrollo de la transferencia somática nuclear y la carrera por la “clonación terapéutica”, lo pusieron en primer plano por varios años. No obstante, recientemente su protagonismo ha sido duramente golpeado por la aparición de las células iPS (induced pluripotent stem),^{1,2} que no requieren ovocitos para reprogramar a un estado “embrionario” a las células somáticas. Contrariamente, en el campo clínico el ovocito se encuentra en pleno estrellato, gracias al desarrollo de la vitrificación que permite congelar ovocitos con tasas de viabilidad cercanas al 100% y obtener altas tasas de embarazos,³ lo que lo mantiene firme en esta posición.

El ovocito siempre ha sido materia de intensa investigación, porque siempre se le ha considerado el

componente más importante en el potencial de desarrollo embrionario. Esto se hizo más evidente con el advenimiento de la inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) que permitió solucionar al factor masculino como causa de la falla en el desarrollo embrionario. Por tanto, la mayoría consideramos actualmente que el éxito clínico de las técnicas de reproducción asistida se sustenta en la calidad del ovocito.

El desarrollo de las “terapias” ovocitarias

Por lo que respecta al potencial terapéutico del ovocito, una de las primeras terapias que se propusieron para incrementar el desarrollo embrionario cuando la calidad ovocitaria no era óptima fue la transferencia citoplasmática, también conocida como transferencia ovoplásmica. Esta técnica consiste en transferir una parte del citoplasma de un ovocito “normal” al citoplasma de un ovocito con capacidad de desarrollo disminuida para compensar el déficit de componentes bioquímicos o estructurales dentro del citoplasma. El primer nacimiento con esta técnica fue reportado en 1997.⁴

Los dos enfoques planteados originalmente para transferir el citoplasma de ovocito donador fueron: la transferencia de citoplastos con electrofusión y la aspiración e inyección citoplasmática directa. La transferencia y electrofusión requieren que el ovocito receptor sea tratado con hialuronidasa y se haga una perforación en la zona pelúcida, mientras que al ovocito donador se le quita el cuerpo polar y se prepara un fragmento de citoplasma (sin ADN) el cual se introduce dentro de la zona pelúcida del ovocito receptor y se electrofusióna para, posteriormente, realizar la fertilización con ICSI. Este enfoque no consiguió embarazos en humanos, mientras que con la inyección sí fue posible obtener implantaciones.

La aspiración e inyección directa es una modificación a la técnica tradicional de ICSI y consiste en aspirar el espermatozoide y, posteriormente, aspirar alrededor de 5 a 15% del citoplasma del ovocito donador del lado contrario al cuerpo polar con la misma pipeta de ICSI que contiene al espermatozoide (incluso se pueden usar varios ovocitos) e inyectarlo al ovocito receptor. Todos los embarazos y los nacimientos obtenidos mediante transferencia citoplasmática se realizaron con esta técnica de inyección directa.^{5,6} La gran mayoría de los

casos reportados fueron en parejas con fallos previos en ciclos de fertilización *in vitro*. Una de las modificaciones subsecuentes a la técnica original fue el uso de ovocitos congelados como donadores de citoplasma que también permitió el establecimiento de embarazos.⁷

El grupo de Jacques Cohen, entre 1997 y 2001, en el Saint Barnabas Medical Center’s Institute for Reproductive Medicine and Science en Nueva Jersey, EUA, fue quien más experiencia clínica acumuló con este procedimiento.⁸ Sin embargo, previo a su aplicación en seres humanos no se obtuvieron estudios preclínicos o ensayos clínicos detallados que apoyaran la seguridad de este procedimiento al aplicarlo en un contexto clínico, por lo que se le ha considerado una técnica controversial. En la experiencia del grupo de Saint Barnabas se reportaron dos embarazos de los 27 casos publicados, donde se realizó la técnica, con alteraciones cromosómicas en los cromosomas sexuales (45,X), mismos que resultaron en un aborto y una reducción selectiva después de un ultrasonido anómalo del otro producto. Este grupo concursó ante la FDA para la aprobación de un protocolo de aplicación clínica de transferencia ovoplásmica como *investigative new drug* (IND). Este grupo accedió, voluntariamente, en 2001, a no continuar con esta aplicación. La FDA discutió el tema en 2002 y el proceso de evaluación de este procedimiento concluyó en 2003.⁸ La experiencia clínica con esta técnica ha sido revisada de manera detallada en otras publicaciones.^{5,6}

Otra interesante aplicación del potencial regenerador del citoplasma ovocitario es la transferencia de vesícula germinal, que consiste en transferir la vesícula de un ovocito inmaduro a un ovocito en metafase II y con ello recuperar el proceso de maduración y desarrollo embrionario postfertilización.⁹ Esta técnica se basa en el concepto de que un ovocito maduro posee los factores que pueden hacer que un ovocito en la vesícula germinal o un ovocito envejecido recuperen su capacidad de desarrollo si se transfieren a un ovocito joven o en metafase II. Técnicamente se requiere sacar la vesícula germinal del ovocito donador, introducirlo en el espacio perivitelino de un ovocito previamente enucleado e inducir la fusión de las membranas y nuevamente la división celular por electrofusión para finalmente realizar la fertilización por ICSI. Esta técnica ha sido explorada *in vitro* con ovocitos humanos.^{10,11} Incluso esta técnica se

propusó como herramienta para corregir la aneuploidía propia de los ovocitos envejecidos,¹² sin embargo su desarrollo y uso no ha progresado en los últimos años probablemente por las regulaciones vigentes para realizar este tipo de investigación.

Otra técnica ovocitaria relacionada y aun más controversial es la haploidización o semi-clonación,^{13,14} que consiste en usar la capacidad del ovocito para reprogramar una célula somática y posteriormente que esta célula reprogramada se convierta en una célula haploide (extruyendo la mitad de los cromosomas), la cual finalmente se pueda fertilizar posteriormente con un espermatozoide para formar un embrión. Esta técnica ha sido reportada en un contexto clínico, donde se han obtenido ovocitos fertilizables usando células somáticas de una paciente y ovoplastos donados, los cuales fueron fertilizados y se logró el desarrollo un embrión.¹³ El hecho que esta técnica este directamente relacionado con la transferencia somática nuclear¹⁴ hace que sea altamente controversial desde una perspectiva ética y hasta ahora no hay reportes de otros grupos de investigación que hayan conseguido desarrollo embrionario en humanos. Por tanto su desarrollo se ha visto de igual manera limitado, ya que es difícil separar las implicaciones de esta técnica respecto a la transferencia nuclear con fines reproductivos.

La transferencia del huso meiótico

Después de un largo periodo en que la transferencia citoplasmática y otras técnicas relacionadas se abandonaron, quizá a causa de las dificultades técnicas propias del mismo procedimiento, las regulaciones que limitaron su posible aplicación clínica y la falta de interés en su aplicación en la práctica médica que permitiera que se impulsara su desarrollo. Hace poco, el grupo liderado por Mitalipov, en el Oregon National Primate Research Center, en EUA, desafió en un solo experimento lo imposible en materia de terapias ovocitarias: realizó la transferencia del huso meiótico y cromosomas adyacentes de un ovocito donador a un ovocito receptor y logró obtener crías normales de monos Rhesus transfiriendo embriones producidos por este procedimiento.¹⁵ Este hito en la historia de la reproducción asistida seguramente modificará nuestra visión y el futuro de la investigación en “terapias ovocitarias” y técnicas de reproducción asistida.

Los principios básicos que sustenta este proceso se ilustran en la Figura 1. Para esta técnica se requieren equipos especiales adicionales a los utilizados comúnmente en los laboratorios de micromanipulación embrionaria, como el microscopio de polarización y un láser. El primer paso en los experimentos de transferencia del uso meiótico consistió en que ovocitos en metafase II -donadores de carioplasto- obtenidos *in vivo* por laparoscopia y estimulación hormonal, se les extrajo el huso y los cromosomas. Esto se consiguió haciendo un orificio en la zona pelúcida mediante un laser (*XYClone® RED-i*, Hamilton Thorne) y visualizando el huso por microscopia de polarización (*Oosight®*, CRi) y la extracción utilizando una pipeta con diámetro de 20-25µm, visualizando el huso por microscopia de polarización; mientras que los ovocitos se encontraban en medio de manipulación con una inhibidor de la polimerización de microtúbulos (Citocalasina B) (Figura 2). Posteriormente el carioplasto (conteniendo huso meiótico y cromosomas) fue expuesto al virus Sendai (*HVJ-E*, Cosmobio), el cual tiene la capacidad de fusionar membranas. El carioplasto ya expuesto al virus se introdujo al ovocito donador de citoplasma (previamente enucleado) en zona contraria al primer cuerpo polar y se posicionó lo más cercano posible al citoplasma para permitir la interacción de membranas. Una vez verificada la fusión de membranas, aproximadamente después de 30 minutos de la inyección, se procedió a la realización de una ICSI de manera convencional con cultivo posterior a blastocisto de los ovocitos fertilizados.

Dos blastocitos obtenidos fueron transferidos quirúrgicamente a hembra Rhesus receptora con ovulaciones naturales, obteniendo tasas de embarazo de 33% (3/9), lo que permitió el nacimiento de dos gemelos: Mito y Tracker (Figura 3). En las crías sanas nacidas por la transferencia cromosómica (tres en total en el reporte original¹⁵) se consiguió el remplazo completo del ADN mitocondrial, es decir se puede considerar que eran homoplásmicas para el ADNmt de las donadoras de citoplastos. Tampoco se detectaron secuencias del genoma del virus Sendai en las crías nacidas. Para los interesados en los detalles técnicos completos asociados a esta técnica se tiene un video disponible en línea que demuestra el proceso.¹⁶ Además, este grupo de investigación ha publicado un artículo detallado sobre la metodología de la transferencia cromosómica paso a paso.¹⁷

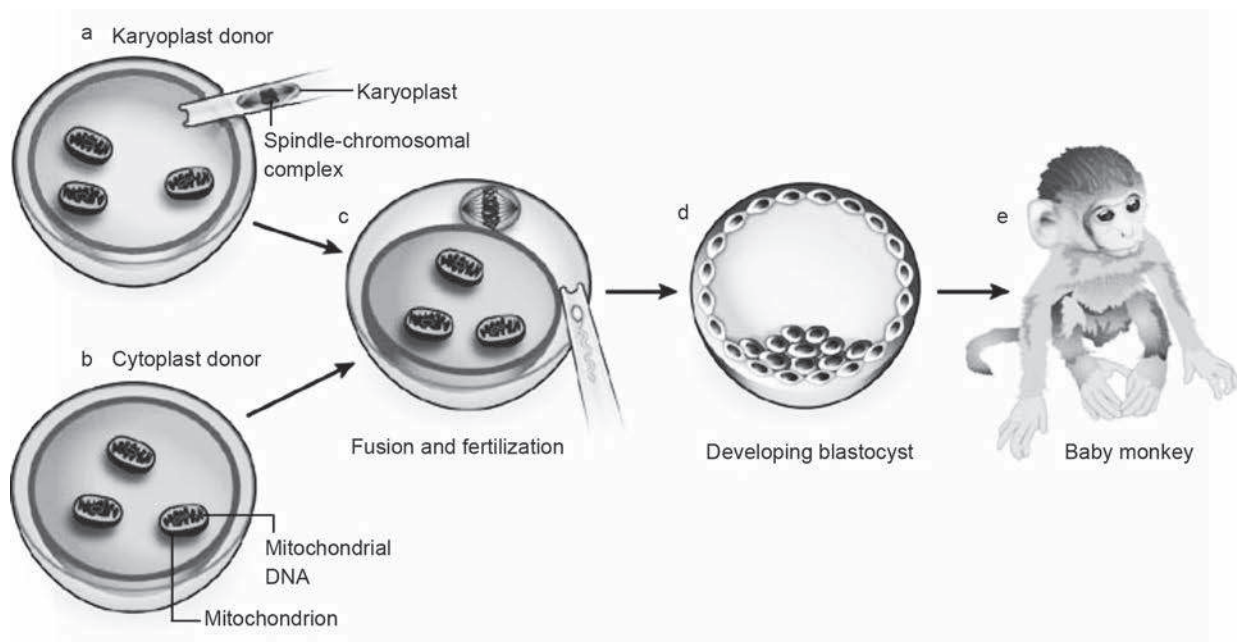


Figura 1. La técnica de la transferencia del huso meiótico. Reimpresa con autorización de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (461: 354-355.)[©] 2009.

Trabajando con monos Rhesus, Tachibana *et al.* removieron la membrana nuclear más el material nuclear (carioplasto) de un ovocito maduro, dejando las mitocondrias (a). Posteriormente transfirieron el carioplasto a un ovocito cuyo núcleo había sido removido (citoplasto) (b). El material nuclear en el carioplasto consiste en los cromosomas condensados adheridos a las fibras del huso (el complejo huso-cromosomas). Los autores fusionaron el carioplasto con el citoplasto y después fertilizaron el ovocito reconstruido (c). El blastocisto en desarrollo (d) fue implantado en una madre subrogada, quien dio nacimiento a una cría sana (e). Esta técnica tiene el potencial de prevenir la transmisión del DNA mitocondrial mutado de la madre al hijo.

Los resultados obtenidos por el grupo de Mitalipov nos hacen pensar inmediatamente en su posible aplicación clínica, en este sentido son muchos los obstáculos para el desarrollo de la transferencia del huso en humanos usando la misma técnica de Mitalipov, como son el uso de virus Sendai, que la electrofusión no fuera efectiva para la fusión de membranas y la capacidad técnica necesaria para los procedimientos de micromanipulación. No obstante, previo a la publicación del trabajo de Mitalipov ya se había propuesto en humanos la posibilidad de la transferencia de cromosomas en ovocitos en metafase II¹⁸, con resultados *in vitro* lamentablemente no tan alentadores. Este grupo que trabajo con ovocitos humanos utilizó originalmente en sus experimentos la microscopia de polarización, pero consideró que era inadecuada para la visualización y la micromanipulación simultánea por lo que cambiaron a un enfoque de localización de los cromosomas usando solamente mi-

croscopia de Nomarski. Emplearon ovocitos madurado *in vitro* como donadores de carioplasto y frescos como receptores, la unión de los carioplastos fue realizada por electrofusión, la fertilización por ICSI permitió obtener desarrollo hasta blastocistos.¹⁸ Aunque no son directamente comparables por ser especies diferentes, la tasa de desarrollo a blastocisto del grupo de Mitalipov usando fusión con virus Sendai fue de 45%,¹⁵ mientras que en este último trabajo con ovocitos humanos fue de 28%,¹⁸ es probable que estas diferencias estén relacionadas principalmente con el uso de la electrofusión.

Es necesario considerar que probablemente la técnica desarrollada por el grupo de Mitalipov, la cual ya logró superar los desafíos propios de la transferencia del huso si se modificara para realizarse en un contexto clínico y poder aplicarse a gametos humanos puede hacer factible obtener éxito en la transferencia del huso meiótico en humanos en un futuro cercano.

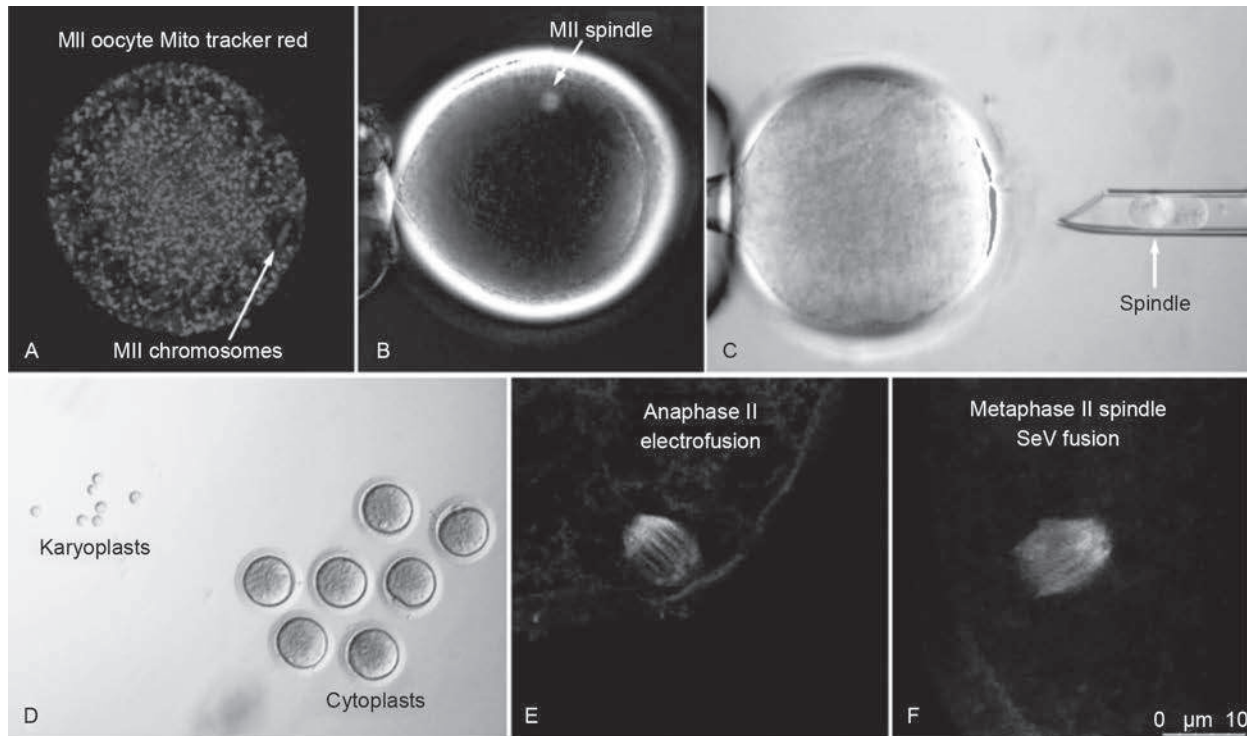


Figura 2. Transferencia del complejo huso-cromosomas y análisis meiótico de los ovocitos reconstruidos. Reimpresión con autorización de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (461: 367-372.)[®] 2009.

(a) Microscopía confocal de un ovocito en metafase II teñido con DAPI (azul) para demostrar los cromosomas y con MitoTracker[®] (rojo) para demostrar las mitocondrias activas. (b) Visualización del huso en MII con el sistema Oosight[®]. (c) Aislamiento de carioplastos. (d) Carioplastos y citoplastos aislados. (e) Microscopía confocal de la progresión a anafase II inducida por la electrofusión. (f) Huso en MII después la fusión con virus Sendai. Los husos están teñidos con DAPI (azul) para demostrar los cromosomas y con tubulina α/β (verde) para mostrar los microtúbulos.

Potencial de la transferencia cromosómica en la práctica clínica

¿Cuáles son las posibles aplicaciones clínicas de la transferencia del huso meiótico? La aplicación más obvia es la que generó su desarrollo: la prevención de enfermedades mitocondriales. Para este fin se usaría como donador un ovocito con mitocondrias normales lo que permitiría a una pareja afectada por una enfermedad mitocondrial tener sus propios hijos (desde una perspectiva genética) y no tener que recurrir a la donación de ovocitos con el consiguiente complemento genético diferente. Para más detalles del uso de nuevas técnicas de reproducción asistida para tal aplicación, se sugiere consultar una revisión reciente.¹⁹

Sin embargo, la transferencia del huso meiótico también puede tener indicaciones más interesantes como

sería su uso en el fallo repetido de la fertilización *in vitro* como fue propuesto originalmente para la transferencia citoplásmica o en la corrección de defectos presentes en ovocitos en metafase I. También se podría usar en el caso de pacientes con baja reserva ovárica u ovocitos de mala calidad, lo que permitiría usar ovocitos donados pero manteniendo el ADN de la paciente. Incluso esto último podría eliminar la reticencia de algunas donadoras de ovocitos que les preocupa el hecho de que sus genes se transmitan y ellas no lo sepan, lo que de alguna manera limita la disponibilidad de donadoras de ovocitos.

A su vez, si en algún momento la maduración ovocitaria *in vitro* combinada con ciclos no estimulados logrará extenderse y perfeccionarse hasta el punto de que sea utilizada en ciclos de donadoras de ovocitos (como fue reportado por el grupo de reproducción humana de la



Figura 3. Mito y Tracker, los primeros primates producidos por transferencia del complejo huso-cromosomas a ovocitos enucleados, seguida de fertilización y transferencia embrionaria. Reimpresión con autorización de Macmillan Publishers Ltd: [Nature] (461: 367-372.)[®] 2009.

El embarazo fue establecido después de la transferencia de dos blastocitos a una receptora. Ambos infantes fueron sanos con crecimiento y desarrollo dentro del rango normal para macacos Rhesus. La foto fue tomada a los 6 días de edad.

Universidad de McGill²⁰) o usando estimulación con una cantidad mínima de hormonas; la inherente necesidad de ovocitos para el desarrollo de esta nueva técnica en un contexto clínico, se podría satisfacer sin un riesgo importante para las donadoras. Esto permitiría en un plazo razonable incorporar esta nueva técnica al arsenal del clínico en el tratamiento de la patología genética y reproductiva en el futuro.

Por lo que respecta al posible costo-beneficio de esta nueva técnica; es claro que en algunos casos de patología ovocitaria o enfermedades mitocondriales la única opción disponible para las pacientes es el uso de ovocitos donados, con la consiguiente pérdida de la posibilidad de transmitir sus genes. Por tanto la transferencia del huso meiótico permitiría que mantengan su ADN y solo representaría un costo adicional para los laboratorio que ofrezcan esta técnica generada por el uso de técnicas más complejas de micromanipulación y la necesidad de equipo especializado como es el microscopio de polarización, ya que incluso el láser se encuentra en la mayoría de los laboratorios de embriología actualmente. No obstante, día a día, es más común que en los laboratorios se estén incorporando nuevos equipos que permiten realizar técnicas no tradicionales en la

práctica clínica rutinaria, como son los microscopios invertidos con mayores aumentos y/o los equipados con óptica de Nomarski (también conocida como DIC: Differential interference contrast) para realización de la IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection). Incluso en algunos centros, la microscopía de polarización ya comienza ser parte de la rutina clínica para evaluación del estado del huso meiótico y el momento óptimo de inseminación. Por tanto, aunque la transferencia del huso meiótico significaría equipo especializado y sobre todo capacitación especial a los recursos humanos, los últimos años nos han demostrado que este esfuerzo adicional se justifica perfectamente si los resultados clínicos son alentadores.

CONCLUSIONES

Debemos considerar que trabajos como el recientemente publicado por el grupo de Mitalipov, nos deben hacer reflexionar que la medicina, incluida la medicina reproductiva, es una ciencia para la que no existe la respuesta: “es completamente imposible” a ninguno de sus planteamientos, por más desafiantes que parezcan a nuestro entendimiento y a lo que actualmente conocemos como “posible”.

Finalizaré esta contribución recordando la frase expresada por William Harvey: “*Ex ovo omnia*” (Todo proviene del huevo). Expresada en la portada de su tratado *Exercitationes de generatione animalium* (publicado en 1651 y que representó el fundamento de la embriología). Esta frase cobra vigencia en estos días, más que nunca y nos hace recordar que desde hace de 400 años, Harvey y la ciencia de aquella época no estaba equivocados, ya que el ovocito es sin lugar a dudas el origen de la vida y por tanto la célula más importante de la naturaleza.

REFERENCIAS

1. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-1920.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.

3. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 2011;96:277-285.
4. Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levrone J, et al. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997;350:186-187.
5. Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998;4:269-280.
6. Barritt J, Willadsen S, Brenner C, Cohen J. Cytoplasmic transfer in assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:428-435.
7. Lanzendorf SE, Mayer JF, Toner J, Oehninger S, et al. Pregnancy following transfer of ooplasm from cryopreserved-thawed donor oocytes into recipient oocytes. *Fertil Steril* 1999;71:575-577.
8. Cohen J. Manipulation as clinical tool. En: Gardner DK. *In vitro fertilization: A practical approach*. New York: Informa Health Care, 2006;283-312.
9. Liu H, Chang HC, Zhang J, Grifo J, et al. Metaphase II nuclei generated by germinal vesicle transfer in mouse oocytes support embryonic development to term. *Hum Reprod* 2003;18:1903-1907.
10. Zhang J, Wang CW, Krey L, Liu H, et al. In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. *Fertil Steril* 1999;71(4):726-731.
11. Takeuchi T, Gong J, Veeck LL, Rosenwaks Z, et al. Preliminary findings in germinal vesicle transplantation of immature human oocytes. *Hum Reprod*. 2001;16:730-736.
12. Palermo GD, Takeuchi T, Rosenwaks Z. Technical approaches to correction of oocyte aneuploidy. *Hum Reprod* 2002;17:2165-173.
13. Tesarik J, Nagy ZP, Sousa M, Mendoza C, et al. Fertilizable oocytes reconstructed from patient's somatic cell nuclei and donor ooplasts. *Reprod Biomed Online* 2001;2:160-164.
14. Tesarik J, Mendoza C. Somatic cell haploidization: an update. *Reprod Biomed Online* 2003;6:60-65.
15. Tachibana M, Sparman M, Sritanadomchai H, Ma H et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 2009;461:367-372.
16. Tachibana M, Sparman M, Sritanadomchai H, Ma H, et al. Supplementary information. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v461/n7262/extref/nature08368-s2.mov>
17. Tachibana M, Sparman M, Mitalipov S. Chromosome transfer in mature oocytes. *Nat Protoc* 2010;5:1138-1147.
18. Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S, Himeno N, et al. Metaphase II karyoplast transfer from human in-vitro matured oocytes to enucleated mature oocytes. *Reprod Biomed Online* 2009;19:514-520.
19. Piña-Aguilar RE. Prevención de enfermedades mitocondriales: una esperanza a través del uso de técnicas de reproducción asistida. *Gac Med Mex* 2011;147:172-175.
20. Holzer H, Scharf E, Chian RC, Demirtas E, et al. In vitro maturation of oocytes collected from unstimulated ovaries for oocyte donation. *Fertil Steril* 2007;88:62-67.