



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
University of Oviedo



CENTRO INTERNACIONAL  
DE POSTGRADO  
CAMPUS DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL

## MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

# Genes reloj y ritmos circadianos en tejidos implicados en la reproducción

**Autora:** Ángela Niño Caballero

**Tutora:** Silvia Pérez López

Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa

Hospital Universitario Central de Asturias



**Junio 2020**

## RESUMEN

La mayoría de procesos fisiológicos y conductuales tienen lugar en períodos de 24 horas (circadianos). En mamíferos, el reloj circadiano central se encuentra en el núcleo supraquiasmático (NSQ) y coordina sus oscilaciones con los relojes presentes en los tejidos periféricos. A nivel molecular, el reloj central y los relojes periféricos presentan un circuito de retroalimentación transcripcional-traduccionaI común en el que están implicados los denominados genes reloj. Asimismo, dichos genes participan en el control de otros genes responsables, a su vez, de la mayoría de los procesos celulares fundamentales para la vida.

En este contexto, los ritmos circadianos y los genes reloj parecen estar involucrados en la competencia reproductiva y existen crecientes evidencias de que los dos genes primarios *Clock* y *Bmal1* ejercen una importante influencia en la misma. En el presente trabajo, se pretende establecer la relación entre la expresión de genes reloj y los ritmos circadianos de los tejidos implicados en la reproducción, con la capacidad reproductiva, tanto masculina como femenina.

En general, se describe la expresión de genes reloj en prácticamente todos los tejidos reproductivos, así como ritmicidad circadiana en muchos de ellos. Asimismo, muchos de estos genes se relacionan con diversos aspectos implicados en la fertilidad. Sin embargo, las referencias bibliográficas en humanos son escasas y los resultados obtenidos en modelos animales son heterogéneos por lo que se concluye que es necesario el estudio en este campo, lo que genera amplias posibilidades para la realización de investigaciones futuras.

## ABREVIATURAS

12L:12O	Doce horas de Luz – doce horas de Oscuridad
AANAT	Arilalquilamina N-acetiltransferasa
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Ácido retinoico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASMT	Acetilserotonina O-metiltransferasa
bHLH	Hélice-bucle-hélice básica
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
ChIP-seq	Secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina
CK1	Caseína quinasa 1
CREB	Elemento modulador de respuesta a AMPC
CT	Tiempo circadiano
d	Día
DAG	Diacilglicerol
eCG	Gonadotropina coriónica equina
ERR	Elemento de respuesta a ROR
F <sub>1</sub>	Generación filial 1
FOXO1	Proteína O1 de la familia Forkhead box
FSH	Hormona folículo estimulante
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
h	Hora
hCG	Gonadotropina coriónica humana

IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IRSA	Aborto espontáneo recurrente idiopático
LH	Hormona luteinizante
MSE	Metanosulfonato de etilo
MT <sub>1/2/3</sub>	Receptor de melatonina 1/2/3
min	Minuto
NAS	N-acetilserotonina
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RAR	Receptor de ácido retinoico
ROR	Receptores retinoides huérfanos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPA	Ensayo de protección de ARNasa
RXR	Receptores retinoides X
RZR	Receptores retinoides Z
s	Segundo
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
STaR	Proteína reguladora aguda de la esteroideogénesis
T <sub>1</sub>	Vértebra 1 de la región torácica
T <sub>3</sub>	Vértebra 3 de la región torácica
TPH	Triptófano hidroxilasa
TTFL	Bucle de retroalimentación transcripcional-traducciona
ZT	Tiempo Zeitgeber

# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Cronobiología.....	1
1.2. Ritmos circadianos .....	2
1.2.1. Organización del sistema circadiano .....	3
1.2.2. Melatonina.....	4
1.2.3. Genes reloj.....	7
1.2.4. Relojes secundarios en mamíferos.....	10
1.3. Ritmos circadianos y reproducción .....	11
2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	13
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	14
3.1. Hipótesis.....	14
3.2. Objetivos .....	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
4.1. Diseño de la revisión .....	15
4.2. Estrategias de búsqueda.....	15
4.3. Criterios de selección .....	15
4.3.1. Criterios de inclusión.....	15
4.3.2. Criterios de exclusión .....	16
4.4. Organización de la información.....	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
5.1. Ritmicidad de los tejidos implicados en la reproducción.....	21
5.1.1. Ritmicidad en el aparato reproductor masculino.....	21
5.1.2. Ritmicidad en el aparato reproductor femenino .....	21
5.2. Genes reloj y ritmos circadianos en tejidos implicados en la reproducción .....	23
5.2.1. Expresión de genes reloj y ritmos circadianos en el tejido reproductor masculino ...	23
5.2.2. Expresión de genes reloj y ritmos circadianos en el tejido reproductor femenino ....	28
5.3. Papel de los genes reloj en la función reproductora.....	31
5.3.1. Reproducción masculina.....	31
5.3.2. Reproducción femenina.....	34
5.4. Estudios en humanos .....	38
5.4.1. Estudios en hombres.....	38
5.4.2. Estudios en mujeres.....	39
6. CONCLUSIONES .....	41
7. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la organización circadiana de algunas variables fisiológicas en el ser humano.....	3
<b>Figura 2.</b> Esquema resumen de la secreción de melatonina sincronizada por los ciclos de luz/oscuridad.....	4
<b>Figura 3.</b> Esquema de síntesis de melatonina y metabolización hepática .....	5
<b>Figura 4.</b> Modelo de bucles de retroalimentación transcripcional-traducciona (TTFL) del mecanismo molecular de los ritmos circadianos .....	9
<b>Figura 5.</b> Representación de la dependencia, por parte del sistema reproductivo femenino, de la sincronización de los relojes circadianos del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales ritmos biológicos.....	2
<b>Tabla 2.</b> Información de interés sobre los genes reloj en humanos y ratón.....	8
<b>Tabla 3.</b> Esquema que recoge los artículos utilizados para la elaboración del presente Trabajo Fin de Máster.....	20
<b>Tabla 4.</b> Significancia estadística de la ritmicidad de la expresión de los genes reloj en los testículos .....	27
<b>Tabla 5.</b> Alteración de procesos relacionados con la reproducción en ratones macho (Mus musculus) sometidos a ciclos de 12L:12O.....	33
<b>Tabla 6.</b> Alteración de procesos relacionados con la reproducción en ratones hembra (Mus musculus) sometidas en su mayoría, a ciclos de 12L:12O.....	37

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Cronobiología

La vida es rítmica, desde la generación periódica de potenciales de acción en neuronas o células cardíacas hasta el ciclo de división celular. Muchos procesos fisiológicos clave poseen una naturaleza repetitiva y oscilatoria. El comportamiento rítmico no se limita al nivel celular, está presente también a otros niveles más complejos, así tienen lugar ciclos mensuales como el ovárico o anuales como la floración, la hibernación, la migración o la reproducción en algunas especies de mamíferos (1) (Tabla 1). En este contexto, se define período como la duración de un ciclo completo en una fluctuación rítmica, es decir, el intervalo de tiempo entre las recurrencias de la fase definida de un ritmo (2). Así, los ritmos biológicos son cambios cíclicos que se producen regularmente en un período de tiempo dado, que puede oscilar desde una fracción de segundo hasta decenas de años, y que se relacionan con procesos fisiológicos internos (1,3). Existen tres tipos de ritmos biológicos (3):

- Ritmos circadianos: ciclos de 24 horas que incluyen procesos fisiológicos y conductuales.
- Ritmos ultradianos: ciclos con un período más corto que los ritmos circadianos y con una mayor frecuencia.
- Ritmos infradianos: ciclos que tienen lugar durante un tiempo superior a 24 horas, como el ciclo menstrual.

La Cronobiología es una disciplina de la biología que estudia los ritmos biológicos que se producen en los organismos vivos en sus diferentes niveles de organización. Dicha palabra tiene como origen los vocablos griegos: *kronos* (tiempo), *bios* (vida) y *logo* (estudio) (4). El estudio molecular de la cronobiología comenzó con el trabajo de doctorado de Ronald Konopka con Seymour Benzer, publicado en 1971 y titulado “Clock mutants of *Drosophila melanogaster*”. Este consistió en el análisis de tres mutantes tras la inducción de mutagénesis con metanosulfonato de etilo (MSE) en moscas hembra vírgenes. De los 2000 machos obtenidos en la F<sub>1</sub>, tres de ellos presentaban drásticamente alterado el ritmo de 24 horas. Uno de ellos era arrítmico, otro



tenía un período de 19 horas y el tercero un período de 28 horas. Asimismo, los tres mutantes parecían involucrar a un mismo gen funcional del cromosoma X, el gen *Per* (5). Estos autores fueron los primeros en identificar uno de los genes involucrados en los ritmos biológicos. Posteriormente, Jeffrey Hall, Michael Rosbash y Michael Young, galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2017, estudiaron ese gen junto a otros y descubrieron los mecanismos moleculares que controlan el ritmo circadiano. Asimismo, lograron identificar los engranajes de este complejo sistema que permite a las células desarrollar funciones de manera cíclica produciendo cambios cada, aproximadamente, 24 horas que se repiten diariamente durante toda la vida de forma sincronizada con las rotaciones de nuestro planeta (6).

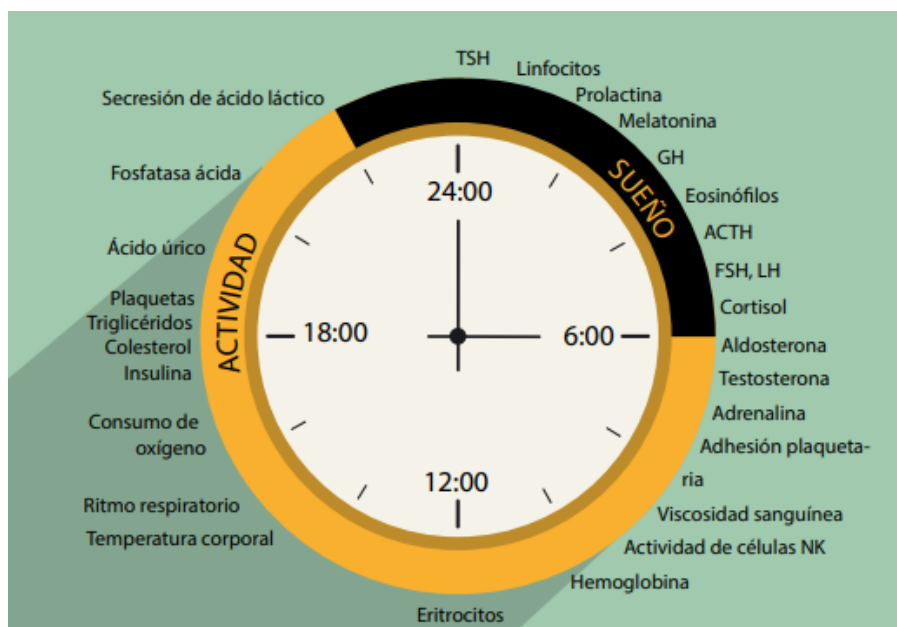
Ritmos biológicos	Período
Ritmos neurales	0,001 – 10 s
Ritmos cardíacos	1 s
Oscilaciones de calcio	De segundos a minutos
Oscilaciones bioquímicas	30 s – 20 min
Oscilador mitótico	10 min – 30 h
Reloj de segmentación	30 min – 2 h
Ritmos hormonales	10 min – 3-5 h (También de 24 h)
Ritmos circadianos	Aproximadamente 24 h
Ciclo ovárico	28 d (ciclo menstrual)
Ritmos anuales	1 año
Ritmos en ecología y epidemiología	Años

**Tabla 1.** Principales ritmos biológicos. Tabla adaptada de Goldbeter (1).

## 1.2. Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos son aquellos que con un período de 22 a 28 horas (4) permiten a los organismos adaptarse a la naturaleza periódica del ambiente y anticiparse al ciclo externo de luz-oscuridad (7). Esto posibilita la regulación de procesos fisiológicos como la homeostasis de la glucosa o el ciclo celular ya que el reloj circadiano está íntimamente relacionado con el control metabólico y, por lo tanto, su disrupción puede ser la causa de diversas alteraciones como el síndrome metabólico (8), la predisposición al cáncer (9) o la infertilidad (10). Así se sabe que el 10-30 % del

genoma humano presenta ritmos circadianos, de tal forma que la expresión de la mayor parte de las variables fisiológicas, conductuales y bioquímicas presentan este tipo de ritmo: la temperatura corporal, el ciclo sueño-vigilia o los niveles plasmáticos de leptina, melatonina, cortisol y hormona de crecimiento (4).



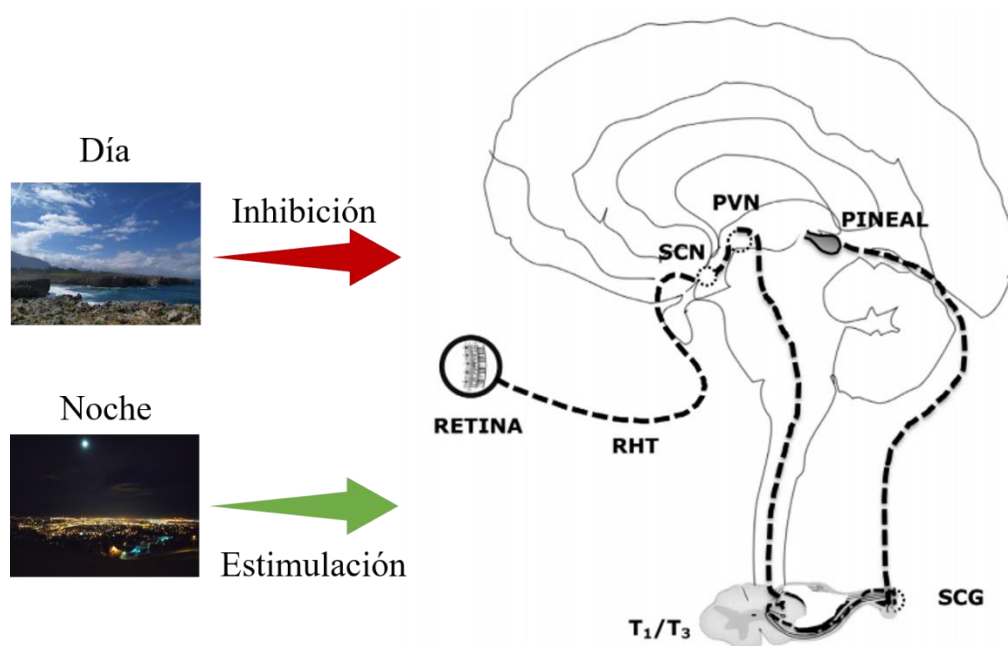
**Figura 1.** Esquema de la organización circadiana de algunas variables fisiológicas en el ser humano. Recuperada de Castellanos *et al.* (4).

### 1.2.1. Organización del sistema circadiano

El sistema circadiano en mamíferos es complejo y jerarquizado, consta de un conjunto de neuronas agrupadas en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, que se considera el reloj biológico central. La mayoría de estas neuronas producen potenciales de acción que comienzan al amanecer, aumentando su frecuencia hacia la mitad del día y disminuyendo después para hacerse casi inexistente por la noche. La luz no es la causa del ritmo, pero puede regular y sincronizar dicho reloj mediante el tracto retino hipotalámico (11,12). La actividad neural circadiana del NSQ regula la glándula pineal, productora de melatonina, por medio de nervios simpáticos; pasando por el núcleo paraventricular hipotalámico que proyecta directa e indirectamente a las neuronas preganglionares simpáticas de los primeros segmentos torácicos de la médula espinal ( $T_1 / T_3$ ), llegando al ganglio cervical superior el cual conecta con la glándula pineal (13) (Figura 2). Durante el día se inhibe la secreción de melatonina. Como resultado, la secreción de esta hormona comienza a aumentar con la oscuridad y alcanza

un máximo hacia la mitad de la noche. La capacidad de la luz para inhibir la secreción de melatonina parece estar relacionado con la melanopsina. Esta molécula es un pigmento que se encuentra en células ganglionares fotosensibles de la retina, distinto a los pigmentos presentes en conos y bastones. No obstante, la activación de rodopsina y fopsinas (en bastones y conos, respectivamente) también puede influir sobre la capacidad de la retina para regular ritmos circadianos (12).

Este reloj biológico central influye en diversos procesos como el ritmo sueño-vigilia, la síntesis de diferentes hormonas, la presión arterial, la temperatura, locomoción, ingesta de alimento, procesos fisiológicos o patológicos, ... (4)



**Figura 2.** Esquema resumen de la secreción de melatonina sincronizada por los ciclos de luz/oscuridad. Recuperada y adaptada de Amaral *et al.* (13).

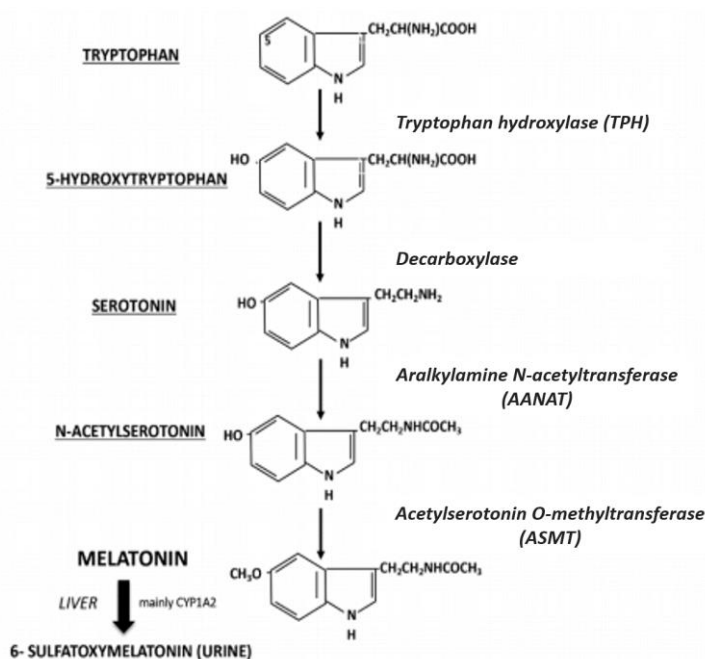
### 1.2.2. Melatonina

#### Síntesis y liberación

La melatonina es la hormona secretada por los pinealocitos presentes en la glándula pineal y está implicada en diversos procesos fisiológicos. Su síntesis (Figura 3) comienza a partir de triptófano, que bajo la acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) se transforma en 5-hidroxitriptófano que, a su vez, se convierte en serotonina y pasa a N-acetilserotonina (NAS) por la acetilación catalizada por la arilalquilamina N-

acetiltransferasa (AANAT). Finalmente, actúa la enzima acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) sobre NAS para dar lugar a la melatonina. Las enzimas mencionadas están bajo el control de los sistemas neuronales y endocrinos que regulan el tiempo, la duración y la cantidad de melatonina producida (13).

El control más importante es el que ejerce el sistema circadiano. El estímulo de luz (principalmente en el rango azul) activa a la melanopsina y desencadena la ruta anteriormente descrita. La norepinefrina liberada por los terminales simpáticos interactúa con los receptores noradrenérgicos clásicos  $\alpha$  y  $\beta$  en la membrana de los pinealocitos y activan las vías de señalización AMPc-PKA-CREB y PLC-Ca<sup>2+</sup>-PKC, involucradas en la síntesis de melatonina (13).



**Figura 3.** Esquema de síntesis de melatonina y metabolización hepática. Recuperada de Amaral *et al.* (13)

### Mecanismos de acción

La melatonina puede realizar su función de una forma independiente o dependiente de receptores. A su vez, estos receptores pueden ser nucleares (ROR/RZR), citosólicos (MT<sub>3</sub>) o de membrana (MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>), estos últimos se encuentran acoplados a proteína G. Esta hormona lleva a cabo su función utilizando diferentes mecanismos de acción y provocando distintos efectos (13):

- Efectos inmediatos. En este caso su acción no precisa de receptores celulares, la melatonina interactúa directamente con otras moléculas. Dentro de este grupo de acciones encontraríamos, por ejemplo, su función antioxidante (14). Esta hormona es uno de los antioxidantes naturales más potentes. Su acción en este ámbito no solo consiste en quelar moléculas reactivas de oxígeno y nitrógeno, sino que también moviliza sistemas enzimáticos antioxidantes intracelulares. Asimismo, está involucrada con la reducción de la vía AMPc-PKA-CREB y GMPc, el incremento de actividad de la ruta DAG-IP<sub>3</sub>-PKC, la regulación de los canales de calcio y potasio, ... (13)
- Efectos prospectivos. Son aquellos mecanismos que tienen lugar durante el día (temprano o tarde) y que se activan en ausencia de melatonina, siempre que esta hubiera estado presente la noche anterior. Estos pueden ser proximales o distales. Los proximales ocurren al principio de la mañana, justo después del cese de la producción de melatonina, y se pueden extender durante varias horas. Un ejemplo sería la hipersensibilización de la vía AMPc/PKA/CREB, observada en sistemas periféricos y centrales. Los distales o prolongados, son dependientes de la acción de control de la melatonina sobre la transcripción y/o la traducción de los genes reloj y los genes a los que estos controlan (15).
- Efectos cronobióticos. Son los debidos a la repetición diaria de la señal de melatonina durante la fase oscura. Este efecto de la hormona depende de su acción a diversos niveles del sistema circadiano, incluyendo el NSQ y los genes reloj expresados en los tejidos periféricos (órganos reproductivos, tejido adiposo, músculo, células β pancreáticas, ...) (13)
- Efectos estacionales. Estos son debidos a la duración del perfil de melatonina diurna y, sobre todo, al cambio diario debido al incremento o a la reducción de la fase oscura diaria. Estos efectos permiten al organismo anticiparse y adaptarse a los cambios del ambiente que ocurren a lo largo del año y son mediados por la acción de la melatonina en la *pars tuberalis* de la hipófisis. Como consecuencia, la melatonina es capaz de controlar eventos estacionales como la reproducción, el metabolismo energético, la respuesta inmune, la termogénesis, el crecimiento, el control de la masa corporal, ... (16)

- Efectos transgeneracionales. En mamíferos, especialmente en humanos, la producción pineal de melatonina incrementa a medida que progresa la gestación. Asimismo, la melatonina es necesaria para una adecuada formación y diferenciación del cerebro fetal ya que ejerce un efecto neuroprotector ante el estrés oxidativo (17). La melatonina materna cruza libremente la placenta y alcanza la circulación del feto, de manera que los efectos que esta hormona ocasiona, en el organismo de la madre serán vistos en el feto, particularmente, en los efectos cronobióticos y estacionales (18).

### 1.2.3. Genes reloj

Los genes reloj son aquellos implicados en la generación y mantenimiento de los ritmos circadianos. Estos constituyen una maquinaria molecular compleja que incluye ciclos de transcripción y traducción y las proteínas resultantes pueden reforzar el proceso o inhibirlo, de modo que el ciclo tiene una duración de aproximadamente 24 horas. Estas proteínas también pueden controlar, durante ese ciclo de 24 horas, la expresión de otros genes que son los responsables de casi todas las funciones celulares (13). Por lo tanto, estos genes mantienen las actividades celulares en sincronía con las actividades del organismo, como la ingesta de alimento o el sueño, y ayuda a diferentes sistemas de tejidos y órganos a coordinar y optimizar su rendimiento (19). Aunque la investigación sobre el reloj circadiano en mamíferos se centró durante mucho tiempo en el NSQ como el marcapasos central (20), ahora se sabe que el reloj circadiano en sí es una propiedad intrínseca de las células en muchos de los tejidos y que el NSQ sirve para sincronizar los relojes periféricos (21). La maquinaria específica que subyace a los relojes circadianos difiere de un organismo a otro, pero a nivel celular dependen de la transcripción del conjunto de genes reloj, lo que pone de manifiesto la conservación evolutiva del mecanismo del reloj central entre especies (19).

Los primeros estudios de los genes reloj se realizaron en *Drosophila melanogaster* (11). Más adelante, se fueron descubriendo genes homólogos en ratones y otros mamíferos (10) que aparecen recogidos en la Tabla 2.

- Genes *Period* (*Per 1/2/3*)
- Genes *Cryptochrome* (*Cry 1/2*)
- *Clock* (“Circadian Locomotor Output Cycles Kaput”)
- *Bmal1* (“Brain and Muscle ARNT-Like Protein 1”)

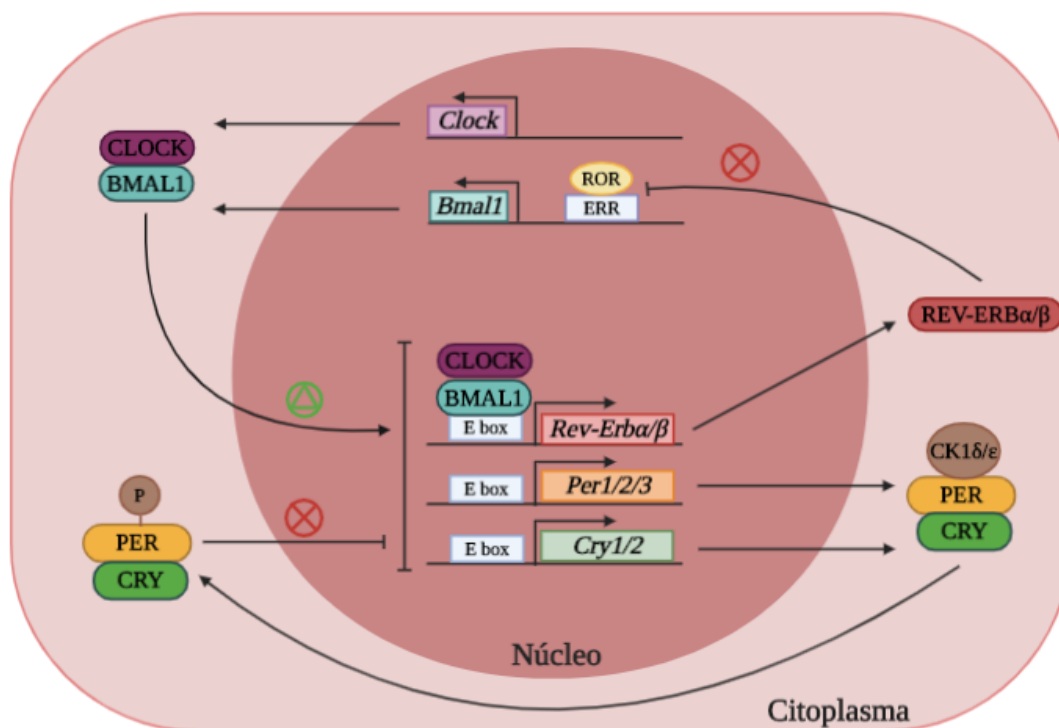
	Organismo	Localización	Ensembl	Uniprot
<b>Per1</b>	<i>Mus musculus</i>	11 B3	ENSMUSG00000020893	O35973
	<i>Homo sapiens</i>	17p13.1	ENSG00000179094	O15534
<b>Per2</b>	<i>Mus musculus</i>	1 D	ENSMUSG00000055866	O54943
	<i>Homo sapiens</i>	2q37.3	ENSG00000132326	O15055
<b>Per3</b>	<i>Mus musculus</i>	4 E2	ENSMUSG00000028957	O70361
	<i>Homo sapiens</i>	1p36.23	ENSG00000049246	P56645
<b>Cry1</b>	<i>Mus musculus</i>	10 C1	ENSMUSG00000020038	P97784
	<i>Homo sapiens</i>	12q23.3	ENSG00000008405	Q16526
<b>Cry2</b>	<i>Mus musculus</i>	2 E1	ENSMUSG00000068742	Q9R194
	<i>Homo sapiens</i>	11p11.2	ENSG00000121671	Q49AN0
<b>Clock</b>	<i>Mus musculus</i>	5 C3.3	ENSMUSG00000029238	O08785
	<i>Homo sapiens</i>	4q12	ENSG00000134852	O15516
<b>Bmal1</b>	<i>Mus musculus</i>	7 F1	ENSMUSG00000055116	Q9WTL8
	<i>Homo sapiens</i>	11p15.3	ENSG00000133794	O00327

**Tabla 2.** Información de interés sobre los genes reloj en humanos y ratón. Siendo *Ensembl* y *Uniprot* bases de datos donde encontrar más información sobre dichos genes y sus proteínas, respectivamente. Tomado de Cunningham *et al.* (22).

Michael Rosbash descubrió los cambios periódicos en la expresión del gen *Per* y propuso el modelo de bucle de retroalimentación transcripcional-traducciona (TTFL) (Figura 4) como el mecanismo molecular que regula los ritmos circadianos (11,23).

Otros genes que participan en este mecanismo molecular serían:

- *Csnk1ε/Csnk1δ*: Gen que codifica para la caseína quinasa 1 isoforma  $\epsilon/\delta$  en humanos
- *Rev-Erb*: Familia de receptores nucleares y represores transcripcionales
- *Npas2*: Gen que codifica para la proteína 2 que contiene el dominio PAS, la cual es homóloga a CLOCK y puede formar dímeros con BMAL1.



**Figura 4.** Modelo de bucles de retroalimentación transcripcional-traducciona (TTFL) del mecanismo molecular de los ritmos circadianos. (Creado en Biorender.com)

Los osciladores del reloj central incluyen a BMAL1 y CLOCK. Estas dos proteínas forman un heterodímero que se une a una secuencia de ADN específica, denominada E-box (5'-CACGTG-3'), presente en el promotor de los tres genes *Per* (*Per 1/2/3*) y de los dos genes *Cry* (*Cry 1/2*) activando su transcripción, lo que tiene como resultado la acumulación de sus proteínas en el citoplasma. Las proteínas PER y CRY, a su vez, forman complejos heterotípicos con isoformas de la caseína quinasa 1 (CK1δ y CK1ε). Posteriormente, estos complejos se fosforilan por la acción de la CK1 y se trasladan al núcleo ejerciendo una acción inhibitoria sobre la actividad de dímero BMAL1:CLOCK, lo que resulta en una disminución de su propia expresión, ya que inhiben la activación de su transcripción (10).

Por otro lado, existe un circuito de retroalimentación accesorio a través de la interacción entre los receptores nucleares huérfanos, concretamente, los activadores de la familia ROR (RORα y RORγ). RORα y RORγ incrementan la expresión de BMAL1 mediante su unión a regiones promotoras y potenciadoras del gen. Entonces, aparecen los receptores de la familia REV-ERB (REV-ERBα y REV-ERBβ) cuya expresión es



activada por la acción del dímero BMAL1:CLOCK y que compiten con los activadores ROR, ocupando los elementos de respuesta a ROR (ERR) y reclutando histonas desacetilasas. Por consiguiente, queda suprimida la transcripción de *Bmal1*. Este mecanismo tarda, aproximadamente 24 horas en completarse y proporciona una base para el establecimiento de ritmos circadianos (10).

#### 1.2.4. Relojes secundarios en mamíferos

El descubrimiento de la existencia de ritmos circadianos en el cultivo de una línea celular de fibroblastos llevó hasta la conclusión de que el NSQ no era el único reloj molecular en mamíferos (24). Hasta la fecha, se han descrito relojes periféricos en hígado, pulmón, corazón, músculos esqueléticos, tejido adiposo, ovario, ... (23)

Hay una fuerte evidencia de que los relojes periféricos en los diferentes órganos son esenciales para su funcionamiento. Así, el control de la homeostasis de la glucosa es regulado por los relojes del hígado y del páncreas, la ovulación por el reloj del ovario, la cicatrización de heridas por el reloj de la piel o el gasto energético por el reloj del hipotálamo ventromedial. Aunque estos relojes secundarios se encuentran en todo el organismo, la naturaleza, el número y la fase de los genes expresados rítmicamente son muy específicos de cada tejido en ratones, primates no humanos y humanos (23).

Los genes del reloj central se expresan cíclicamente en la mayoría de los tejidos, de forma que el oscilador circadiano molecular central es compartido por los diferentes órganos. No obstante, el perfil de expresión de estos genes es único en cada reloj periférico lo que se explica por los diferentes mecanismos de integración funcional entre los genes reloj y los reguladores de transcripción específicos de cada tipo de célula (23).

En primer lugar, algunos componentes del reloj central tienen funciones bien definidas, además de su papel en el reloj molecular, que pueden proporcionar enlaces directos a transcripciones específicas de tejidos. Así, REV-ERB $\alpha$  puede silenciar la expresión génica no solo a través de la unión directa a los elementos de respuesta a ROR en el ADN, sino también indirectamente a través de la unión a factores de transcripción específicos del tipo de células (25).

En segundo lugar, la actividad de CLOCK:BMAL1 puede verse afectada por otros factores de transcripción con motivos estructurales hélice-bucle-hélice básica (bHLH), cuya abundancia y actividad varían según los tejidos. (26).

Por último, las variaciones específicas en la topología del genoma y la accesibilidad a la cromatina en cada tipo celular pueden contribuir a la expresión de conjuntos únicos de genes reloj en diferentes órganos (23). De hecho, aunque se ha propuesto que el dímero CLOCK:BMAL1 funciona como factor de transcripción pionero que promueve la accesibilidad al ADN, a través de la eliminación de nucleosomas, datos más recientes sugieren que BMAL1 se une a sitios del ADN ya accesibles, lo que posiblemente aumenta su exposición a otros factores de transcripción (27).

### 1.3. Ritmos circadianos y reproducción

El descubrimiento de que genes como *Clock*, *Bmal1*, *Per* y *Cry* también se expresan en ovario, oviducto, útero y placenta en mamíferos (28–31) llevó a la hipótesis de que la alteración del reloj natural del cuerpo tiene un efecto negativo en el embrión, desarrollo y embarazo (32). No obstante, actualmente hay pocos estudios que relacionen los problemas de fertilidad con los genes del reloj circadiano en humanos (33).

El control reproductivo de muchas especies está conectado al ritmo circadiano a través de la luz y la duración de los días. Una de las funciones más estudiadas de la melatonina es su papel en la determinación del momento de los nacimientos de animales que se reproducen en ciertas estaciones del año. Para ello, la melatonina influye sobre el eje hipofisario-gonadal estimulándolo en animales que se reproducen durante los días cortos, como las ovejas e inhibiéndolo en animales que se reproducen durante los días largos, como los hámsteres.

En humanos, el efecto antigonadotrópico de la melatonina aún no se ha probado, aunque existen evidencias al respecto. Otros efectos sí demostrados en humanos serían algunos de los siguientes. Una secreción excesiva de melatonina se relaciona con un retraso del inicio de la pubertad. En niños de 1 a 5 años la secreción de melatonina es más alta y a partir de entonces disminuye alcanzando sus niveles más bajos tras la pubertad (un 75 % menos que durante la infancia). Esto sugiere una función de la melatonina en el inicio de la pubertad de los seres humanos. Sin embargo, la importancia de la melatonina en la reproducción de humanos es todavía muy controvertida debido a que existen muchos datos contradictorios (12).

El patrón de secreción de la melatonina se altera cuando una persona trabaja en turnos nocturnos o vuela a través de diferentes franjas horarias. De hecho, existen diversos estudios como uno realizado en 2013 a 43 azafatas de vuelo. De las encuestadas, el 21 % tenían ciclos menstruales irregulares. Además, también presentaban enfermedades tiroideas y alteraciones del sueño (34). No obstante, hay evidencias de que la melatonina exógena, tomada en píldoras, puede resultar beneficiosa en el tratamiento de los síndromes de los husos horarios, pero no se conoce la dosis óptima (12).

Otros muchos aspectos de la biología reproductiva también están regulados por el ritmo circadiano. Esto incluye el ciclo estral, los niveles de hormona luteinizante (LH), la ovulación, la producción y la maduración de los espermatozoides, la fertilización, la inseminación y la implantación de embriones (35–37). Se ha encontrado que la interrupción de la expresión de ciertos genes primarios como *Clock* y *Bmal1* podría tener un efecto perjudicial en la salud reproductiva (33,35). Sin embargo, el efecto debido a la interrupción de otros genes reloj no se conoce completamente. En los últimos años, los estudios sobre el reloj circadiano y su influencia en la reproducción han ido aumentando (33).

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En los últimos años, numerosas evidencias epidemiológicas y genéticas relacionan la disrupción del reloj circadiano con múltiples procesos patológicos, asociando dichas alteraciones con el área de la Cronobiología. En este contexto, existe una evidencia creciente de la interconexión entre la ritmicidad circadiana y la reproducción. Así, en modelos animales que presentan defectos en genes reloj se observan problemas de fertilidad. A nivel superior, la alteración de los ciclos sueño-vigilia por motivos laborales u otras causas podría provocar una ruptura en la ritmicidad de los procesos reproductivos. Hasta el momento, los estudios publicados en humanos al respecto son relativamente escasos, sin embargo, es ciertamente apropiado realizar una revisión de lo publicado hasta el momento y que relacione la expresión de los genes reloj y los ritmos circadianos con las alteraciones en la función reproductiva.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

La hipótesis principal en la que se basa esta revisión bibliográfica es la siguiente:

*“La alteración en la expresión de genes reloj y el patrón de los ritmos circadianos en los tejidos implicados en la reproducción afectan de forma negativa a la capacidad reproductiva tanto en mujeres como en hombres, pudiendo ser causa de infertilidad”*

#### 3.2. Objetivos

Partiendo de la hipótesis mencionada anteriormente los objetivos de este trabajo son:

- Estudiar la expresión de genes reloj en los tejidos implicados en la reproducción.
- Estudiar los ritmos circadianos presentes en dichos tejidos.
- Inferir si existe una relación directa entre la alteración de la expresión de genes reloj, la disrupción de los ritmos circadianos y la infertilidad.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Diseño de la revisión

Se trata de una revisión de los estudios científicos realizados sobre cronobiología de la reproducción, con el fin de aunar la información necesaria para determinar la relación entre la función de los genes reloj y el papel de los ritmos circadianos en los diferentes procesos reproductivos. Para ello, nos hemos centrado en la expresión de dichos genes en los diferentes tejidos implicados en la reproducción, en su posible papel y en la relación de los mismos con la infertilidad, haciendo una especial mención a las publicaciones en humanos. No obstante, la mayoría de los estudios incluidos son llevados a cabo en modelos murinos, debido a la dificultad que supone realizar este tipo de ensayos en humanos.

### 4.2. Estrategias de búsqueda

Con el propósito de reunir información suficiente y relevante para la redacción de la presente revisión se utilizaron bases de datos electrónicas. Siendo las más utilizadas *Pubmed*, y las bibliotecas virtuales de la Universidad de Sevilla y de Oviedo.

Asimismo, se utilizaron diferentes motores de búsqueda con términos clave como “clock genes AND reproduction”, “circadian rhythms AND reproduction”, “clock genes AND testis AND expression AND (Bmal1 OR Clock OR Per1 OR Per2 OR Cry1 OR Cry2)”, “clock genes AND female reproduction”, “clock genes AND (ovary OR oviduct OR uterus OR placenta)”, “clock gene deficiency AND human”, ...

### 4.3. Criterios de selección

#### 4.3.1. Criterios de inclusión

En la elaboración de este trabajo se seleccionaron publicaciones científicas cuyo objetivo era analizar la expresión de los genes reloj y ritmos circadianos en los diferentes tejidos involucrados en el proceso reproductivo, o bien inferir la relación de los citados genes con esta función vital de los seres vivos o con la infertilidad.

Por consiguiente, se tuvieron en cuenta estudios científicos y revisiones publicadas, desde el año 2000 hasta la actualidad, en revistas que tratan temas sobre cronobiología, reproducción, endocrinología y fisiología como *Journal of Biological*

*Rhythms, Biology of Reproduction, Endocrinology o American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism.*

Debido a la escasez de estudios realizados en humanos, la mayoría de las publicaciones seleccionadas fueron aquellas realizados en roedores, ya que son los mamíferos que más se utilizan como modelo experimental para este tipo de investigaciones.

En cuanto al idioma, la mayoría de las publicaciones recopiladas estaban escritas en inglés, aunque de forma generalizada los libros utilizados se encontraban en castellano.

#### 4.3.2. Criterios de exclusión

En este trabajo se utilizaron las publicaciones de ámbito científico que estuvieran recopiladas en revistas o libros que trataran del tema expuesto y que cumplieran los criterios de inclusión establecidos. Por lo tanto, se prescindió de cualquier fuente de información que careciera de fiabilidad.

Asimismo, con el fin de incluir publicaciones de cierta actualidad, tampoco se hizo uso de artículos publicados con anterioridad al año 2000, a menos que fuera estrictamente necesario como explicar los primeros experimentos realizados sobre un tema concreto. Por otro lado, tampoco se utilizaron aquellos estudios o revisiones a las que no se tenía acceso al texto completo.

#### 4.4. Organización de la información

Una vez recopilada la información se procedió a la organización de todos los datos procedentes de 94 referencias bibliográficas. En primer lugar, se fueron incluyendo los resultados de las diferentes publicaciones en un apartado u otro dependiendo de si trataban sobre ritmicidad de tejidos implicados en la reproducción (12 referencias), expresión de genes reloj en el tejido reproductivo (42 referencias), la función de dichos genes (33 referencias), o sobre estudios publicados en humanos hasta el momento (12 referencias). Posteriormente, se hizo una segmentación entre los estudios llevados a cabo en organismos de sexo masculino (46 referencias) y aquellos realizados en organismos de sexo femenino (53 referencias).

Referencia	Apartado	Subapartado
Zhang <i>et al.</i> , 2016	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
	Papel de los genes reloj	♂
Karman <i>et al.</i> , 2006	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Johnson <i>et al.</i> , 2002	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Pérez <i>et al.</i> , 2015	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Pan <i>et al.</i> , 2020	Papel de los genes reloj	♀
Tong <i>et al.</i> , 2004	Expresión de genes reloj ritmos circadianos	♂
Liu <i>et al.</i> , 2014	Papel de los genes reloj	♂
	Papel de los genes reloj	♀
Bittman <i>et al.</i> , 2016	Ritmicidad de tejidos	♂
Neto <i>et al.</i> , 2016	Ritmicidad de tejidos	♂
Guzmán <i>et al.</i> , 2005	Ritmicidad de tejidos	♂
Sugimoto <i>et al.</i> , 2012	Ritmicidad de tejidos	♂
Schuler <i>et al.</i> , 2014	Ritmicidad de tejidos	♂
Schlatt <i>et al.</i> , 2008	Ritmicidad de tejidos	♂
Veldhuis <i>et al.</i> , 2012 (a)	Ritmicidad de tejidos	♂
Veldhuis <i>et al.</i> , 2012 (b)	Ritmicidad de tejidos	♂
Makanji <i>et al.</i> , 2014	Ritmicidad de tejidos	♂
Simonneaux <i>et al.</i> , 2015	Ritmicidad de tejidos	♀
Bahougne <i>et al.</i> , 2020	Ritmicidad de tejidos	♀
Ohkura <i>et al.</i> , 2009	Ritmicidad de tejidos	♀
Zylka <i>et al.</i> , 1998	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Nishide <i>et al.</i> , 2014	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Álvarez <i>et al.</i> , 2003	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
	Papel de los genes reloj	♂
Morse <i>et al.</i> , 2003	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Álvarez <i>et al.</i> , 2005	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Mazzoccoli <i>et al.</i> ,	Expresión de genes reloj y ritmos	♂



Referencia	Apartado	Subapartado
2012	circadianos	
Klose <i>et al.</i> , 2011	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
	Papel de los genes reloj	♂
Meyer <i>et al.</i> , 2014	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Bebas <i>et al.</i> , 2009	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Barburski <i>et al.</i> , 2016	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
Chen <i>et al.</i> , 2017	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♂
He <i>et al.</i> , 2007 (a)	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
He <i>et al.</i> , 2007 (b)	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Yoshikawa <i>et al.</i> , 2009	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Johnson <i>et al.</i> , 2009	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Wiggins <i>et al.</i> , 2016	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Cushman <i>et al.</i> , 2007	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Kobayashi <i>et al.</i> , 2018	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Brzezinski <i>et al.</i> , 2018	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Kennaway <i>et al.</i> , 2003	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Johnson <i>et al.</i> , 2007	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Ratajczak <i>et al.</i> , 2010	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Akiyama <i>et al.</i> , 2010	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Horard <i>et al.</i> , 2004	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Nakamura <i>et al.</i> , 2005	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀

Referencia	Apartado	Subapartado
Uchikawa <i>et al.</i> , 2011	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
He <i>et al.</i> , 2007 (c)	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Nakamura <i>et al.</i> , 2008	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Rubel <i>et al.</i> , 2012	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Muter <i>et al.</i> , 2015	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Beesley <i>et al.</i> , 2015	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Sellix <i>et al.</i> , 2010	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Wharfe <i>et al.</i> , 2011	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Frigato <i>et al.</i> , 2009	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Papacleovoulou <i>et al.</i> , 2017	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Amano <i>et al.</i> , 2009	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
	Papel de los genes reloj	♀
Dolatshad <i>et al.</i> , 2010	Expresión de genes reloj y ritmos circadianos	♀
Bunger <i>et al.</i> , 2000	Papel de los genes reloj	♂
Bonden <i>et al.</i> , 2013	Papel de los genes reloj	♂
Álvarez <i>et al.</i> , 2008	Papel de los genes reloj	♂
Schoeller <i>et al.</i> , 2016	Papel de los genes reloj	♂
Dorantes <i>et al.</i> , 2012	Papel de los genes reloj	♂
Ratajczka <i>et al.</i> , 2009	Papel de los genes reloj	♂
Dolatshad <i>et al.</i> , 2006	Papel de los genes reloj	♂
Cheng <i>et al.</i> , 2016	Papel de los genes reloj	♂
Li <i>et al.</i> , 2018	Papel de los genes reloj	♂
Zheng <i>et al.</i> , 2001	Papel de los genes reloj	♂
Daan <i>et al.</i> , 2011	Papel de los genes reloj	♂
Raverdeau <i>et al.</i> , 2012	Papel de los genes reloj	♂
Endo <i>et al.</i> , 2015	Papel de los genes reloj	♂
Navigator-Fondo <i>et al.</i> , 2013	Papel de los genes reloj	♂

Referencia	Apartado	Subapartado
McNamara <i>et al.</i> , 2001	Papel de los genes reloj	♂
Yang <i>et al.</i> , 2010	Papel de los genes reloj	♂
Boden <i>et al.</i> , 2010	Papel de los genes reloj	♀
Xu <i>et al.</i> , 2016	Papel de los genes reloj	♀
Miller <i>et al.</i> , 2004	Papel de los genes reloj	♀
Amano <i>et al.</i> , 2016	Papel de los genes reloj	♀
Zheng <i>et al.</i> , 2019	Papel de los genes reloj	♀
Zhang <i>et al.</i> , 2019	Papel de los genes reloj	♀
Tobback <i>et al.</i> , 2011	Papel de los genes reloj	♀
Beaver <i>et al.</i> , 2003	Papel de los genes reloj	♀
Nothias <i>et al.</i> , 1995	Papel de los genes reloj	♀
Matsuo <i>et al.</i> , 2003	Papel de los genes reloj	♀
Liu <i>et al.</i> , 2019	Estudios en humanos	♂
Ramasamy <i>et al.</i> , 2015	Estudios en humanos	♂
Zhang <i>et al.</i> , 2012	Estudios en humanos	♂
Hodžić <i>et al.</i> , 2013	Estudios en humanos	♂
Shen <i>et al.</i> , 2015	Estudios en humanos	♂
Lawson <i>et al.</i> , 2011	Estudios en humanos	♀
Mills <i>et al.</i> , 2019	Estudios en humanos	♀
Begtrup <i>et al.</i> , 2019	Estudios en humanos	♀
Kovanen <i>et al.</i> , 2010	Estudios en humanos	♀
Hodžić <i>et al.</i> , 2018	Estudios en humanos	♀
Lv <i>et al.</i> , 2019	Estudios en humanos	♀
Qiu <i>et al.</i> , 2016	Estudios en humanos	♀

**Tabla 3.** Esquema que recoge los artículos utilizados para la elaboración del presente Trabajo Fin de Máster.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Ritmicidad de los tejidos implicados en la reproducción

#### 5.1.1. Ritmicidad en el aparato reproductor masculino

En este tejido nos encontramos con varios procesos fisiológicos que tienen un carácter cíclico, así los testículos no solo proporcionan uno, sino varios modelos de organización temporal. De este modo, la espermatogénesis con sus diferentes fases es un proceso que tiene lugar de manera continua y coordinada (38). Este proceso dura, aproximadamente, unos 42-76 días en humanos (39) y 35 días en ratón (40). Otro proceso cíclico sería la diferenciación de espermatogonias en la membrana basal periférica del túbulo seminífero y su movimiento hacia la luz tubular, denominado ciclo del epitelio seminífero (41). Este se compone de diferentes etapas y su duración es específica para cada especie.

Además de la producción de gametos, la secreción de andrógenos también presenta oscilaciones (42), así la pulsatilidad de esta secreción se evidencia en estudios realizados a diversos animales como jabalíes o monos rhesus (42,43). El generador de pulsos se encuentra en el hipotálamo y en el área preóptica controlando la liberación de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) al sistema porta hipotálamo-hipofisario. Esta liberación hace que se produzcan los picos de LH y esta estimulación pulsátil de la hormona está sincronizada con la función de las células de Leydig. La respuesta de los testículos a LH se atenúa cuando la estimulación es continua y se ha observado que la liberación pulsátil evita la regulación negativa de su receptor y/o la desensibilización de la cascada de transducción de señales dentro de las células de Leydig (44,45). Este aspecto de la ritmicidad testicular es, por lo tanto, relevante para la consideración de ritmo en los testículos. Por el contrario, la secreción de FSH a la que se exponen los testículos es menos pulsátil debido a que esta hormona presenta una vida media mayor y a la modulación por los complejos proteicos activina e inhibina de los testículos, modificando la biosíntesis y liberación de dicha hormona (46).

#### 5.1.2. Ritmicidad en el aparato reproductor femenino

Los ritmos en la reproducción femenina son críticos para asegurar que el tiempo de ovulación coincida con la maduración del ovocito. En los ovarios y útero de hembras

de mamífero tiene lugar de forma cíclica un conjunto de acontecimientos fisiológicos que concluyen con la producción de ovocitos maduros en un tracto reproductor receptivo. En mujeres el ciclo menstrual es de, aproximadamente, 28 días y en roedores el ciclo estral tiene una duración de 4-5 días. Estos ciclos reproductivos se encuentran dirigidos por interacciones complejas entre neuropéptidos hipotalámicos, gonadotropinas (LH y FSH), hormonas esteroideas sexuales producidas por los ovarios y el sistema circadiano (47).

En la primera parte del ciclo reproductivo (fase folicular en mujeres y metaestro-diestro en roedores) el aumento progresivo de FSH contribuye al reclutamiento y desarrollo de los folículos ováricos que conduce a un aumento gradual de la secreción de estradiol y aumenta el número de receptores para LH de las células de la granulosa (48). Durante esa fase temprana, los pulsos de LH ocurren con alta frecuencia: con un período de 1 a 2 horas en mujeres y de 20 minutos en roedores. Esta frecuencia de pulso tiende a aumentar hacia el final de la fase (47). La segunda parte del ciclo reproductivo (fase lútea en mujeres y proestro-estro en roedores) comienza con una marcada y transitoria secreción de LH que desencadena la ovulación unas horas más tarde en roedores y entre 9 y 23 horas después en mujeres. Este aumento de LH generalmente ocurre al final del período de descanso. Por lo tanto, tiene lugar en la transición entre el final del día y el principio de la noche en roedores nocturnos y en la transición del final de la noche al principio del día en roedores diurnos y mujeres (47). La secreción de LH y de FSH por las células gonadotropas se encuentra bajo el control de GnRH, sintetizada en las neuronas dispersas en el área preóptica y en el órgano vasculoso de las láminas terminales. Esta hormona se libera al sistema porta hipotálamo-hipofisario de manera pulsátil y activa los receptores específicos situados en las células gonadotropas de la hipófisis para la expresión de las dos gonadotropinas (47). Además, se ha considerado que las neuronas *Kiss* del núcleo periventricular anteroventral median los efectos de activación del estrógeno sobre la secreción de la GnRH y el aumento de LH. Por el contrario, la población neuronal del núcleo arcuato sería la diana de la retroalimentación negativa de los estrógenos y parece estar involucrada en la regulación de la liberación tónica de GnRH (49).

## 5.2. Genes reloj y ritmos circadianos en tejidos implicados en la reproducción

### 5.2.1. Expresión de genes reloj y ritmos circadianos en el tejido reproductor masculino

#### Tejido testicular

La descripción de la expresión del gen *Period* en este tipo de tejido data del año 1998, haciendo uso de la técnica Northern blot se observó abundancia de transcritos de *Per1* y *Per3* en tejido testicular de ratones sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12L:12O cuyos picos de expresión en el tiempo circadiano (CT) se encontraban en CT6 y CT9-CT15, respectivamente, mientras que los niveles de ARNm de *Per2* no pudieron ser cuantificados debido a su baja expresión (50). Sin embargo, en estudios más recientes (51) se ha descrito la expresión de *Per2*, bajo las mismas condiciones que el estudio anterior, mostrando un pico de expresión en adultos en CT12, aproximadamente, dos horas después del pico en el NSQ.

Por el contrario, la cuantificación de transcritos o proteínas de genes reloj en testículos homogeneizados recogidos de animales en diferentes momentos del día no siempre evidencia ritmicidad circadiana. Ensayos de protección de ARNasas indicaron que la expresión de *mPer1*, *mPer2*, *Bmall*, *Clock*, *mCry1* y *Npas2* era siempre constante en testículos de ratón expuestos a ciclos de 12L:12O (52,53). Posteriormente, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real de transcripción inversa (qRT-PCR) se realizaron estudios similares con el mismo objetivo (54,55). Estos últimos también mostraron la expresión no cíclica de proteínas y genes reloj en testículos. Además, en uno de ellos observaron, en ratones mutantes para el gen *Clock*, que la expresión génica del reloj circadiano en los testículos era independiente de dicho gen (54).

Asimismo, también se han realizado ensayos en otras especies de roedores. Klose *et al.* (56) no observaron fluctuaciones en los niveles de ARNm de *Bmall*, en testículos de *Phodopus sungorus* (hámster Djungarian) sometidos a ciclos de 16L:8O, pero sí en los niveles de *Per1*, que presentaba un pico en 6-8 ZT (Zeitgeber time). Mientras que Meyer y Lerchl (57) encontraron una variación significativa entre el día y la noche en las transcripciones de *Bmall* y *Per2* en testículos de tres especies de hámster; de *Per1*

en *Phodopus sungorus* y *Cricetulus griseus* (hámster Chino); y de *Clock* y *Cry2* en *Phodopus sungorus* y *Phodopus roborovskii* (hámster Enano). Por el contrario, *Cry1* no mostró variación significativa en su expresión en ninguna de las tres especies. Estos resultados ponen de manifiesto que el patrón de expresión de estos genes es especie específico. No obstante, al igual que en otros estudios, los ritmos de transcripción de genes reloj en testículos eran de menor amplitud que en otros órganos de las mismas especies de hámster.

### Tejidos accesorios

Bebas *et al.* (58) examinaron los patrones temporales de expresión de los genes *mPerl* y *Bmall* y la abundancia de sus proteínas en epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales y próstata. Los resultados mostraron una expresión variable de ambos genes, específica de cada tejido. Incluso, observaron que el ARNm de *mPerl* y *Bmall* y sus proteínas oscilaban en antifase en la próstata, lo que supone patrones similares a los observados en los núcleos supraquiasmáticos. Mientras que los picos de ambos transcritos en testículos homogeneizados eran simultáneos. Por lo tanto, los datos sugerían que algunos segmentos de los conductos espermáticos podían contener sistemas circadianos periféricos (58). La expresión en testículos de *mPerl* y *Bmall* se asemejaba a otros resultados obtenidos en hámster sirio expuestos a oscuridad constante que mostraban picos simultáneos de *haPerl* y *haBmall* en la noche subjetiva, es decir, la hora a la que el animal esperaríamos que fuera de noche (36).

Dada la heterogeneidad de los resultados en roedores se proponen diversas hipótesis para explicar esta circunstancia: diferencias de función entre los compartimentos (intersticial y tubular), la presencia simultánea de distintas células en diferentes etapas de maduración y diferenciación a lo largo del túbulo seminífero y diferencias en la transcripción de regiones basales y lumbales del túbulo. Es decir, los diferentes tipos de células presentes en los testículos homogeneizados podrían diferir en la amplitud y en la fase de las oscilaciones en la expresión de dichos genes. Esto indica que habría que estudiar la ritmicidad de expresión de los genes reloj en cada uno de los diferentes tipos de células de manera independiente. De hecho, en los últimos años se han llevado a cabo experimentos sobre la expresión de genes reloj en células de Leydig de rata Wistar y ratones Kunning White (59,60), indicando que los genes reloj se

expresaban con ritmicidad en dichas células, excepto el gen *Clock*. Asimismo, se determinó que la proteína BMAL1 se encontraba exclusivamente en las células de Leydig (60).



<i>Bmal1</i>	<i>Clock</i>	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Cry1</i>	<i>Cry2</i>	Muestra	Especie	Condiciones de luz	Métodos de análisis	Referencia
		+	-			Testículo	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	Northern blot	Zylka <i>et al.</i> (1998)
			+			Testículo	<i>Rattus norvegicus</i>	12L:12O	Bioluminiscencia, ANOVA	Nishide <i>et al.</i> (2013)
-	-	-		-		Testículo	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	RPA, ImageQuant software	Álvarez <i>et al.</i> (2003)
-		-				Testículo	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	RPA, PhosphorImager	Morse <i>et al.</i> (2003)
-		-		-		Testículo	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	qRT-PCR, ANOVA	Álvarez y Sehgal (2005)
-	-	-	-	-	-	Testículo	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	qRT-PCR, ANOVA	Mazzoccoli <i>et al.</i> (2012)
+		+				Testículo				
+		+				Epidídimo				
+		+				Conducto deferente	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	qRT-PCR, ANOVA	Bebas <i>et al.</i> (2009)
+		+				Vesículas seminales				
+		+				Próstata				
-	-	+	-			Testículo	<i>Mesocricetus auratus</i>	Constante oscuridad	Northern blot, Kruskal-Wallis	Tong <i>et al.</i> (2004)

<i>Bmal1</i>	<i>Clock</i>	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>	<i>Cry1</i>	<i>Cry2</i>	Muestra	Especie	Condiciones de luz	Métodos de análisis	Referencia
-		+				Testículo	<i>Phodopus sungorus</i>	16L:8O	qRT-PCR, ANOVA	Klose <i>et al.</i> (2011)
+	+	+	+	-	+	Testículo	<i>Phodopus sungorus</i>			
+	+	-	+	-	+	Testículo	<i>Phodopus roborovskii</i>	16L:8O	qRT-PCR, Kruskal-Wallis/cosinor	Meyer y Lerchl (2014)
+	-	+	+	-	-	Testículo	<i>Cricetulus griseus</i>			
+	-	+	+	+	+	Células de Leydig	<i>Rattus norvegicus</i>	12L:12O	qRT-PCR, cosinor	Barburski <i>et al.</i> (2016)
-		-	-	-		Testículo	<i>Mus musculus</i>	12L:12O	qRT-PCR, cosinor	Chen <i>et al.</i> (2017)
+		+	+	+	Células de Leydig					

**Tabla 4.** Significancia estadística de la ritmicidad de la expresión de los genes reloj en los testículos. (+) expresión rítmica significativa; (-) expresión rítmica no significativa.

### 5.2.2. Expresión de genes reloj y ritmos circadianos en el tejido reproductor femenino

#### Ovario

La expresión de los genes reloj en los ovarios ha sido descrita en diversas especies de mamíferos como rata (29,61–63), ratón (64,65) o rumiantes (66).

La ritmicidad del ovario está minuciosamente controlada por los marcapasos circadianos ubicados en el NSQ (Figura 5), así Karman y Tischkau (29) observaron la expresión de *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2* y *Cry1* en ovarios de rata Sprague Dawley sometidas a ciclos de luz-oscuridad 12L:12O mediante qRT-PCR. También determinaron que los patrones de transcripción y traducción de *Bmal1* y *Per2* en el ovario no se encontraban en fase con los patrones mostrados por esos mismos genes en el NSQ y que las expresiones de estos dos genes se encontraban en antifase. Mientras *Bmal1* presentaba el pico a las 0/24 ZT y su mínima expresión a las 12 ZT, el pico de *Per2* era a las 16 ZT y su mínimo a las 4 ZT. Esta expresión de *Bmal1* en proestro sugiere que es un efecto del pico preovulatorio de LH, el cual ocurre entre las 12 ZT y las 18 ZT. Para examinar esto, se utilizaron ratas hembra inmaduras hipofisectomizadas tratadas con una dosis primaria de gonadotropina coriónica equina (eCG) seguida de la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual actúa sobre receptores LH/CG e induce la rotura folicular. Entonces, observaron que se producía un ritmo diurno robusto en la expresión de *Bmal1* y *Per2* en los ovarios de dichas ratas. Por consiguiente, estos resultados sugieren que los ovarios de estos animales contienen osciladores circadianos sensibles a LH. Por otra parte, en estudios realizados en ratón también se examinaron los cambios temporales en la expresión de los genes reloj en el ovario tras la administración de hCG, en este caso la expresión de *Bmal1* en el ovario aumentó respecto a los ratones control una vez transcurrido un período de 4 a 16 horas tras la administración de hCG (67). Por tanto, los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos en rata.

La evidencia de un reloj circadiano autónomo en células específicas dentro del ovario se anunció por primera vez en trabajos de He *et al.* (61,62) haciendo uso de cultivos sincronizados de células de la granulosa y células del cuerpo lúteo de rata. Asimismo, estos autores examinaron la respuesta de estos dos tipos de células al tratamiento con gonadotropinas. No se detectó expresión rítmica de ARNm de *Per1* en

células de la granulosa de folículos inmaduros, pero sí en células del cuerpo lúteo de ratas puberales, apoyando los resultados comentados anteriormente. Asimismo, en artículos recientes algunos autores también han informado de la expresión de genes reloj en cultivos de células de la granulosa luteinizadas de humanos tras la estimulación con hCG (68).

### Oviducto

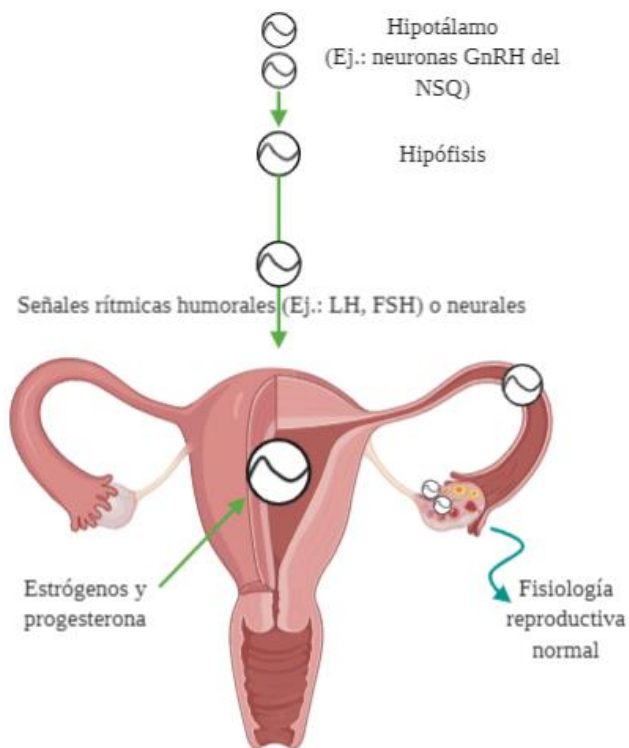
Kennaway *et al.* (69) mostraron por primera vez que el tracto reproductivo femenino de rata era rítmico y sugerían que el embrión en desarrollo podría estar sujeto a cambios periódicos en el ambiente del oviducto donde reside, aproximadamente, entre 2 y 5 días, dependiendo de la especie, antes de alcanzar al útero (70). Se observó expresión rítmica de *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* y *Cry2*, pero los análisis de periodicidad indicaron que sólo *Bmal1* y *Per2* se expresaban con ritmicidad de manera significativa, además, la proteína PER2 también mostró su ritmicidad en el oviducto (69). En un estudio más actual en el que analizaron los cambios inducidos por el pico de LH mediante el tratamiento con hCG en ratones inmaduros, se observó una modificación significativa de la expresión de *Per2* cuatro horas después de la administración de hCG (67), sugiriendo una clara relación entre la administración de dicha hormona y la expresión de genes reloj.

### Útero

En roedores, los genes reloj se expresan rítmicamente en el epitelio luminal, el estroma y el miometrio del útero, durante el período de receptividad uterina y durante la gestación (71–75). En este tejido, las hormonas esteroideas parecen estar involucradas en la modificación de los ritmos circadianos a través de la regulación de los genes reloj (Figura 5). Esta conclusión fue posible gracias a estudios en roedores ovariectomizados a los que se trataban con 17- $\beta$ -estradiol o progesterona y en los que se observaron cambios en la ritmicidad de expresión de los genes *Per1* y/o *Per2* tras la administración de dichas hormonas (74,76,77). En este contexto, otro ensayo realizado permitió concluir que la progesterona unida a su receptor aumenta la expresión de *Clock*, *Per1*, *Cry1* y *Npas2* en el útero (78).

En humanos también se ha demostrado la ritmicidad en la expresión de los genes reloj en este órgano. Muter *et al.* (79) analizaron células estromales del endometrio

humano para comprobar dicha ritmicidad y también observaron que al sufrir el proceso de decidualización estas células perdían la expresión oscilatoria de los genes reloj. En otro estudio realizado en células miometriales humanas también observaron periodicidad en la expresión de *Bmal1* y *Per2*, siendo la expresión de ambos genes antifásica (80).



**Figura 5.** Representación de la dependencia, por parte del sistema reproductivo femenino, de la sincronización de los relojes circadianos del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Los relojes circadianos de cada tejido se encuentran representados por círculos con una onda. Adaptada de Sellix y Menaker (81). (Creado en Biorender.com)

### Placenta

Wharfe *et al.* (82) determinaron que, en rata, la placenta expresaba todos los genes reloj canónicos. No obstante, la variación circadiana en la expresión de dichos genes no era marcada, aunque se observó una variación significativa de los genes *Bmal1*, *Per2* y *Per1*. Asimismo, se confirmó la expresión de estos genes en la placenta de ratón, pero de todos sólo *Cry1* y *Per1* mostraban cambios significativos en su expresión durante el día (71).

La expresión rítmica de genes reloj en células placentarias humanas se describió por primera vez en cultivos de la línea celular HTR-8/SVneo derivada del trofoblasto cuyas células fueron obtenidas durante el primer trimestre de gestación (83). No obstante, Pérez *et al.* demostraron la expresión de los genes reloj *Clock*, *Bmal1*, *Per2* y *Cry1* en placenta humana a término. De los cuatro, solo *Clock* y *Bmal1* se ajustaron mediante series de Fourier a ritmicidad circadiana (31). En otro estudio más reciente publicado por Papacleovoulou *et al.* (84), sólo *Bmal1* presentaba variación circadiana en su expresión.

### Ovocitos y embriones

Los genes reloj también se expresan en los ovocitos no fertilizados de ratón (30). Tras la fertilización, se detectó la expresión de *Per1*, *Cry1*, *Bmal1* y *Clock* de manera clara. Los niveles de transcripción para estos genes se redujeron en la etapa de dos células, pero los niveles de transcripción de *Per1*, *Cry1* y *Bmal1* se restauraron en la etapa de blastocisto, mientras que la expresión de *Clock* se recuperaba más lentamente. Sin embargo, sus niveles no oscilaban cada 24 horas en embriones de una a cuatro células ni en etapa de blastocisto, lo que sugiere que en ratón el reloj circadiano podría detenerse en ovocitos y embriones preimplantados (85). En este contexto, en otro artículo publicado por Dolatshad *et al.* (86) se examinó la expresión de genes reloj en embriones de ratón, desde el día 10 de gestación hasta el parto. Los resultados mostraban expresión de todos los genes examinados, aunque no se observaron variaciones circadianas para todos los genes en todas las etapas embrionarias estudiadas, a diferencia de lo que ocurría en los tejidos maternos. Los resultados anteriores sugieren que las células individuales dentro de los tejidos embrionarios muestran ciclos circadianos, pero que no se sincronizan con los ritmos maternos (10).

## 5.3. Papel de los genes reloj en la función reproductora

### 5.3.1. Reproducción masculina

#### *Bmal1*

Se ha descrito que en machos *Bmal1*<sup>-/-</sup> se observa una pérdida de ritmicidad circadiana y la función reproductora se ve comprometida (87,88). Álvarez *et al.* (89)

observaron una reducción en el recuento de espermatozoides, del diámetro del túbulo seminífero, del peso de los testículos y de la tasa de fertilización, pero esta última no era significativa. En un estudio publicado posteriormente en el mismo modelo experimental se describió incapacidad para aparearse con hembras receptoras y una leve afectación de la función del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (90).

En este contexto, la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (STaR) regula el transporte de colesterol citoplasmático libre al interior de la mitocondria lo que constituye un paso limitante en la síntesis de hormonas esteroideas (91). Los niveles de esta proteína se reducen en los testículos de ratones con el gen *Bmal1* silenciado (37,92); asimismo, presentan niveles más bajos de testosterona (89). Por lo tanto, este podría ser el origen de las alteraciones en la reproducción masculina atribuidas a la deficiencia de este gen.

### *Clock*

Ratones mutantes para el gen *Clock* (*Clock*<sup>Δ19</sup>) muestran una leve disminución de la fertilidad evidenciada por el descenso del tamaño de la camada engendrada, aunque se concluyó que no era esencial que el reloj circadiano central y periférico fueran completamente funcionales para la reproducción masculina (93). Asimismo, ratones con la expresión del gen *Clock* reducida mostraban un menor tamaño de la camada, de la tasa de fertilización *in vitro* y de la actividad de la acrosina (94). Esta pérdida de actividad de la acrosina podría explicarse por la presencia de CLOCK restringida a las espermátidas redondas en el acrosoma en desarrollo (52).

### *Cry*

En el caso del gen *Cry1*, su silenciamiento en ratones se relacionó con disfunción testicular y con la alteración de la expresión de genes relacionados con la espermatogénesis, la reorganización cromosómica y la respuesta inmune en los testículos (95).

### *Per*

Los ratones mutantes para el gen *Per1* presentan un período circadiano acortado y los mutantes para los genes *Per1* y *Per2* no muestran ritmos circadianos (96). No

obstante, en un estudio realizado en mutantes para *Per2* (97), se vio que el rendimiento reproductivo no disminuía.

Modificación	Resultados	Referencia
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	Reproducción comprometida, aunque no eliminada	Bunger <i>et al.</i> (2000)
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	Subfertilidad, ↓ diámetro del túbulo seminífero, ↓ recuento de espermatozoides, ↓ tasa de fertilización no significativa, ↓ de testosterona sintetizada por células de Leydig y ↓ expresión de genes esteroidogénicos	Álvarez <i>et al.</i> (2008)
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	Incapacidad para aparearse con hembras receptivas y afectación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal	Schoeller <i>et al.</i> (2016)
<i>Clock</i> <sup>Δ19</sup>	Afectación, principalmente de procesos perinatales y posteriores al parto	Dolatshad <i>et al.</i> (2006)
<i>Clock</i> <sup>-/-</sup>	↓ tamaño de la camada, ↓ tasa de fertilización <i>in vitro</i> , ↓ actividad de la acrosina	Cheng <i>et al.</i> (2016)
<i>Cry1</i> <sup>-/-</sup>	Disfunción testicular y alteración de la expresión de genes implicados en espermatogénesis, reorganización cromatínica, comunicación y respuesta inmune testicular	Li <i>et al.</i> (2018)
<i>Per2</i> <sup>m/m</sup>	No disminución del rendimiento reproductivo	Daan <i>et al.</i> (2011)

**Tabla 5.** Alteración de procesos relacionados con la reproducción en ratones macho (*Mus musculus*) sometidos a ciclos de 12L:12O.

### Función de los genes reloj en la espermatogénesis

Klose *et al.* determinaron que el desplazamiento de los ciclos de luz-oscuridad, resultando en días más cortos o más largos de 24 horas, no afectaba a la duración del ciclo del epitelio seminífero y que, por lo tanto, la precisión temporal de la espermatogénesis era independiente del reloj circadiano central (56).

En este contexto, es importante el papel del ácido retinoico (AR) al que se le otorga influencia en la periodicidad del epitelio seminífero. Esto se debe a lo descrito en estudios en los que se elimina la vitamina A de la dieta, lo que provoca deficiencia de



AR y la detención de la espermatogénesis. Además, el receptor de ácido retinoico (RAR) en células de Sertoli es necesario para el inicio de la diferenciación de las espermatogonias y el AR producido por dichas células promueve la espermiación (98,99). La transcripción de los genes reloj *Bmal1* y *Npas2* está inducida por estos receptores retinoides (10) y se ha demostrado que la deficiencia de vitamina A cambia la fase o disminuye la ritmicidad de *Bmal1* y *Per1* en el hipocampo de rata (100). Otro estudio determinó que RAR y los receptores retinoides X (RXR) pueden interactuar con la proteína CLOCK en la línea celular murina NIH3T3 impidiendo su dimerización con BMAL1 (101). Estos resultados coinciden con otro estudio posterior en el que observan que ante la deficiencia de RXR disminuye la expresión de *Bmal1* y se altera el patrón de *Cry2* (102). Por lo tanto, se propone una regulación recíproca entre los receptores de AR y los genes reloj (100), pudiendo estar relacionados de forma indirecta dichos genes con la espermatogénesis.

### 5.3.2. Reproducción femenina

#### *Bmal1*

Se ha demostrado en numerosos estudios que el gen *Bmal1* tiene un papel esencial en la reproducción femenina en mamíferos. Boden *et al.* (103) observaron como ratones hembra con el gen *Bmal1* silenciado en ambos alelos presentaban retraso en la apertura vaginal, alteración en la ciclicidad del ciclo estral, disminución del peso de los ovarios, reducción en longitud y ramificación de los conductos de las glándulas mamarias. Estos animales presentaban ovulación, pero unos niveles menores de progesterona. Además, la gestación se paralizaba antes de la implantación, el desarrollo embrionario hasta blastocisto era pobre y se perdía la ritmicidad en la expresión de genes ováricos como el que codifica para la proteína STaR. De manera similar, en otro estudio (37) se silenció el gen *Bmal1* en células que expresaban el factor esteroideogénico 1 (SF-1), es decir, en los compartimentos esteroideogénicos de la hipófisis, las glándulas suprarrenales y los ovarios. Estos ratones hembra presentaron fallos de implantación debidos a los bajos niveles de progesterona, ya que cuando se les administraba esta hormona se mantenía el embarazo y no se veía afectado el número de sitios de implantación ni el desarrollo embrionario.

Otra posible causa de la alteración de los parámetros reproductivos en ratones con *Bmal1* silenciado podría ser el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Xu *et al.* (104) observaron mayores niveles de ROS en oviducto en metaestro y en ovario en proestro en ratones *Bmal1*<sup>-/-</sup> que en ratones *Bmal1*<sup>+/+</sup>. Asimismo, también informaron de una disminución de la tasa de ovulación (aunque no significativa), de la tasa de fertilización *in vitro* e *in vivo*, del número de blastocistos obtenidos y del número de sitios de implantación. Además, la tasa de fertilización *in vitro* fue significativamente mayor que *in vivo* en ratones *Bmal1*<sup>-/-</sup>. Lo que parece recomendar la utilización de técnicas de reproducción asistida ante alteraciones en la expresión de este gen reloj.

### Clock

Miller *et al.* (105) estudiaron la función del gen *Clock* en ratones con dicho gen mutado. La alteración de este gen reloj interrumpe la ciclicidad del estro e interfiere con el mantenimiento de la preñez. Las hembras mutantes tienen ciclos estrales prolongados e irregulares, carecen del pico coordinado de LH el día del proestro, exhiben una mayor reabsorción fetal durante la preñez y tienen una baja tasa de preñeces a término. Los ratones hembra mutantes para este gen también mostraron una disminución significativa en los niveles de estrógenos a la mitad y al final del embarazo, y de progesterona, a mitad del embarazo. En un segundo conjunto de experimentos, analizaron cómo afectaba la mutación de *Clock* en cada nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. A las hembras mutantes ovariectomizadas con cápsulas de estradiol implantadas se les administró benzoato de estradiol a los seis días y no mostraron un aumento de LH, mientras que las no mutantes ovariectomizadas sí que lo presentaron. Asimismo, los niveles LH fueron similares en hembras mutantes y no mutantes tras la administración de GnRH. Por lo tanto, estos datos sugirieron que los mutantes de *Clock* carecen de una señal de tiempo circadiana diaria requerida para coordinar la secreción de GnRH por una posible afectación de las neuronas GnRH, de las neuronas *Kiss* o de las interacciones entre ambas poblaciones. En otro estudio más reciente (106), se sugiere que la mutación del gen *Clock* afecta a la reproducción alterando la capacidad de implantación, debido a que ratones hembra *Clock*<sup>A19</sup> presentaban un menor porcentaje de sitios de implantación.

### Cry

En ratones hembra el silenciamiento del gen *Cry1* puede detener la meiosis de los ovocitos y embriones preimplantados, aunque este proceso no se relaciona con la regulación del reloj circadiano debido a que la expresión de dicho gen no presentaba oscilaciones en embriones de cuatro células ni en blastocistos. Asimismo, su silenciamiento en vesículas germinales no alteró los niveles de expresión de genes regulados por el reloj molecular, pero redujo la capacidad de maduración de dichas vesículas (85). Por otro lado, el gen *Cry2* sólo se muestra involucrado en la reproducción de animales con diapausa a través de las estaciones, aunque sería necesario realizar más trabajos para identificar el papel exacto que desempeña (33).

### Per

Ratones hembra doble mutantes para el gen *Per* (*Per1m/m; Per2m/m*) presentaron una reducción significativa de la descendencia acumulada a partir de la semana 32 del desarrollo y del número de folículos ováricos a partir de la semana 26 de edad. Por consiguiente, los resultados indican que estas mutaciones resultan en un agotamiento prematuro de la reserva ovárica que conduce a la disminución de la capacidad reproductiva (107).

Por otro lado, Zhang *et al.* (108) describieron que el silenciamiento de *Per1* disminuía significativamente la expresión de algunos genes diana del receptor de progesterona y atenuaba la deciduización endometrial humana al acelerar la degradación de la proteína O1 de la familia Forkhead box (FOXO1), un factor de transcripción relevante durante este proceso.

No obstante, aún queda por determinar si *Per3* tiene un papel similar en la reproducción femenina (33).

Modificación	Resultados	Referencia
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	Retraso apertura vaginal, alteración ciclo estral, ↓ peso ovarios, ↓ longitud y ramificación de conductos en glándulas mamarias, ↓ niveles de progesterona, paralización de gestación antes de implantación, desarrollo embrionario pobre y pérdida de ritmicidad de genes como <i>STaR</i>	Boden <i>et al.</i> (2010)
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	Fallo de implantación (resuelto con administración de progesterona), ↓ expresión de genes como <i>STaR</i>	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>Bmal1</i> <sup>-/-</sup>	↓ ovulación, ↑ ovocitos anormales, ↓ tasa de fertilización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , ↓ nº blastocistos obtenidos, ↓ tasa implantación, ↑ ROS en ovario (proestro), ↑ ROS en oviducto (metaestro)	Xu <i>et al.</i> (2016)
<i>Clock</i> <sup>m/m</sup>	Alteración del ciclo estral, de la capacidad para coordinar el pico de LH y del mantenimiento del embarazo	Miller <i>et al.</i> (2004)
<i>Clock</i> <sup>Δ19</sup>	↓ del porcentaje de sitios de implantación	Amano <i>et al.</i> (2016)
ARN <sub>i</sub> <i>Cry1</i>	Detención de meiosis en ovocitos y embriones preimplantatorios (no relacionado con su función circadiana)	Amano <i>et al.</i> (2009)
<i>Per1</i> <sup>m/m</sup> ; <i>Per2</i> <sup>m/m</sup>	↓ tamaño de la camada, ↓ prematura de la reserva ovárica	Zheng <i>et al.</i> (2019)
<i>Per1</i> <sup>-/-</sup>	↓ expresión de algunos genes diana del receptor de progesterona y decidualización atenuada	Zhang <i>et al.</i> (2019) <sup>1</sup>

**Tabla 6.** Alteración de procesos relacionados con la reproducción en ratones hembra (*Mus musculus*) sometidas en su mayoría, a ciclos de 12L:12O. <sup>1</sup> Estudio llevado a cabo en células humanas (*Homo sapiens*).

### Función de los genes reloj en la ovogénesis

Estudios realizados en insectos demostraron que la mutación de genes reloj como *Per* o *Tim*, afectaban a la producción de ovocitos (109,110). No obstante, en mamíferos no está claro el papel de estos genes en la ovogénesis.

Durante la ovogénesis, en vesículas germinales de mamíferos se suprime la actividad transcripcional del genoma, y la mayoría de los ARNm se almacenan previamente como ARNm maternos para apoyar la meiosis y el desarrollo normal tras la fertilización (111), pudiendo formar parte de este proceso los genes reloj. Amano *et al.* (85) demostraron en vesículas germinales de ratón, que las transcripciones de los genes *Clock*, *Bmal1* y *Cry1* pueden inducir la supresión de la expresión de otros genes (112). Por consiguiente, sugirieron que estos genes reloj tenían una función en la supresión de la expresión de genes regulados por ellos durante la maduración de los ovocitos (85). En apoyo a esta hipótesis, se determinó que el silenciamiento de *Cry1*, sin que alterara la expresión de otros genes reloj, conducía a una ligera inhibición de la progresión de la meiosis en los ovocitos (85). Por lo tanto, estos datos proponen un papel de los genes reloj en la maduración normal de los ovocitos sin estar relacionado con su función circadiana (85).

## 5.4. Estudios en humanos

### 5.4.1. Estudios en hombres

Se ha observado en hombres que el sueño insuficiente, desplazado o interrumpido causa hipersomnolencia y déficits neuropsicológicos y también la reducción de la fertilidad y del recuento total de espermatozoides. Asimismo, el sueño insuficiente se relaciona con una disminución de los niveles de testosterona y la interrupción del mismo se relaciona con la disfunción eréctil (113).

Existen diversas evidencias que indican una posible relación entre mutaciones de genes reloj con la infertilidad en hombres. La secuenciación del exoma completo de una familia turca consanguínea con azoospermia no obstructiva reveló una mutación de *Npas2* en homocigosis (114). Además, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han aportado evidencias del impacto de la variación genética humana en la fertilidad masculina. Zhang *et al.* (115) examinaron la asociación entre variantes genotípicas del gen *Clock* y la calidad espermática en hombres con infertilidad idiopática (n = 478). En aquellos que presentaban el alelo C en la posición rs3749474 (CC y CT) se observaba un volumen de semen significativamente menor comparado con los del genotipo TT. Los que presentaban el genotipo CC también en la posición rs3749474 mostraban un menor número de espermatozoides por eyaculado y una

disminución de la motilidad. Asimismo, los poseedores del genotipo TC en rs1801260 presentaban una disminución de la motilidad espermática. Posteriormente, se han estudiado las mismas y nuevas variaciones de dicho gen, y se ha concluido que podrían utilizarse como un indicador del riesgo de infertilidad masculina (116,117).

#### 5.4.2. Estudios en mujeres

Diversos estudios han demostrado cómo el trabajo por turnos o rotación afecta a la producción de hormonas, la ciclicidad menstrual o la fertilidad. En un estudio realizado a 71.077 enfermeras con un rango de edad de 28 a 45 años que habían trabajado más de 20 meses en turnos rotativos tenían más probabilidades de tener ciclos menstruales irregulares (118), afectando posiblemente a la ovulación y, por tanto, a la fertilidad (119). Asimismo, en otro estudio en mujeres que trabajaban más de un turno nocturno a la semana observaron un mayor riesgo de aborto espontáneo después de la semana 8 de embarazo en comparación con aquellas mujeres que no trabajaban en el turno de noche. Dicho riesgo era directamente proporcional al número de noches trabajadas (120).

Kovanen *et al.* llevaron a cabo el primer estudio que relacionaba polimorfismos en los genes reloj con la infertilidad en humanos. Las mujeres con genotipo TT en la posición rs22787449 del gen *Baml1* tuvieron más abortos espontáneos (121). En otro trabajo (122) analizaron dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen *Clock* en dos grupos de estudio. En un grupo se incluyeron mujeres con antecedentes de tres o más abortos espontáneos recurrentes idiopáticos (IRSA) y en el otro a mujeres con, al menos, dos hijos vivos y ninguna patología durante el embarazo, concluyendo que los alelos G en las posiciones rs6850524 y rs11932595 podían ser factores de riesgo para IRSA (122). En este contexto, se ha demostrado una conexión entre variaciones polimórficas de algunos genes reloj como *Bmal2*, *Cry2* o *Per3* con mayores tasas de desprendimiento de placenta (123).

En otro estudio (124) se describieron niveles más bajos de proteína BMAL1 en muestras de decidua de mujeres con abortos espontáneos recurrentes. Asimismo, se estudió la expresión de dicha proteína ante la inducción *in vitro* de la decidualización en células del estroma endometrial humano observándose un aumento de la misma, lo que coincidía con la mayor expresión de BMAL1 en células del estroma decidual. Por otro

lado, el silenciamiento de *Bmal1* resultó en una decidualización deteriorada. Estos datos sugieren un papel funcional para BMAL1 en el proceso de decidualización y, por consiguiente, la posibilidad de que bajos niveles de esta proteína puedan suponer una predisposición a sufrir aborto espontáneo.

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo Fin de Máster son la siguientes:

1. Se observa expresión de genes reloj de manera generalizada en la mayoría de tejidos reproductivos tanto masculinos como femeninos.
2. Asimismo, muchos de los tejidos presentan ritmicidad circadiana, encontrándose mejor descrito en el caso de los femeninos.
3. Las alteraciones en la expresión de los genes reloj en modelos animales tienen consecuencias en la fertilidad, existiendo crecientes evidencias de que los genes *Clock* y *Bmal1* ejercen una importante influencia en la reproducción.
4. En humanos, el gen *Clock* tiene un papel clave en la fertilidad masculina, mientras que en el género femenino está relacionado con el desarrollo del embarazo.
5. En humanos, el gen *Bmal1* es esencial para la fertilidad observándose una expresión reducida de dicho gen en casos de abortos recurrentes.



## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Actualmente, al menos 50 millones de parejas en el mundo presentan problemas de fertilidad. Del total de casos, alrededor de un 20 % presenta una etiología desconocida, por esta razón, la búsqueda de una explicación plausible que nos indique la causa de este porcentaje adquiere una especial relevancia. Teniendo en cuenta que las causas de la infertilidad son multifactoriales y no del todo conocidas, en el presente TFM, se relaciona la expresión de los genes reloj y la ritmicidad circadiana con alteraciones de la función reproductora constatando la importancia de la Cronobiología en dicha función.

De forma general, en estudios realizados en modelos animales, se observa que, ante la deficiencia de alguno de los genes reloj, la tasa de fertilización *in vitro* es significativamente superior a la tasa fertilización *in vivo*. Por lo que podría proponerse la utilización de técnicas de reproducción asistida como alternativa en aquellos casos en los que se detecten alteraciones en la expresión de los genes reloj.

Por otra parte, los estudios GWAS que se han realizado en humanos han relacionado algunas variaciones presentes en la secuencia de los genes reloj con un mayor riesgo de infertilidad, tanto en hombres como en mujeres. Por consiguiente, se considera recomendable la realización de más estudios al respecto con el fin de establecer una relación directa entre cada polimorfismo y la alteración concreta. De este modo, aquellas parejas con infertilidad de origen desconocido podrían hacer uso de las técnicas de secuenciación, cada vez más asequibles, para determinar si se posee alguna de esas variaciones y tratar de solucionar la afectación.

Es necesario tener en cuenta que los resultados obtenidos en modelos animales son heterogéneos y las referencias bibliográficas en humanos son escasas, por lo que es necesaria una investigación más exhaustiva de esta disciplina. Por lo tanto, se plantea la Cronobiología como campo de investigación sobre la biología reproductiva, puesto que queda por aclarar el papel concreto de algunos genes reloj en este tipo de procesos, tratándose de un campo con grandes posibilidades y en expansión y más si se tiene en cuenta el estilo de vida actual, en el que los hábitos y horas de sueño no siguen un patrón convencional.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Goldbeter A. Biological rhythms: Clocks for all times. *Curr Biol*. 2008;18(17):R751–3.
2. Aguilar-Robledo R, Días-Muñoz M, Fanjul-Moles ML. Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance. 1ª. Ciudad de México: Springer; 2015.
3. Gabbey AE, Nall R, Weatherspoon D. What are biological rhythms? [Internet]. Healthline. 2016. Available from: <https://www.healthline.com/health/biological-rhythms>
4. Castellanos MÁ, Escobar C. Medicina traslacional: De la cronobiología a la cronomedicina. *Rev la Fac Med la UNAM*. 2016;59(2):15–23.
5. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*. 1971;68(9):2112–2116.
6. Perdomo de Ponce D. Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2017. *Gac Med Caracas*. 2017;125(4).
7. Boucher H, Vanneaux V, Domet T, Parouchev A, Larghero J. Circadian clock genes modulate human bone marrow mesenchymal stem cell differentiation, migration and cell cycle. *PLoS One*. 2015;11(1):e0146674.
8. Marcheva B, Ramsey KM, Peek CB, Affinati A, Eleonore M, Bass J. Circadian clock and metabolism. *Handb Exp pharmacol*. 2013;217:127–55.
9. Masri S, Sassone-Corsi P. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms. *Nat Med*. 2018;24(12):1795–803.
10. Zhang W-X, Chen S-Y, Liu C. Regulation of reproduction by the circadian rhythms. *Sheng Li Xue Bao*. 2016;68(6):799–808.
11. Yu Q. Biological clock: the oscillator of gene expression. *Sci China Life Sci*. 2018;61(1):128–30.
12. Fox SI. Fisiología humana. 14ª. Madrid: McGraw-Hill Educación; 2017.
13. Amaral FGD, Cipolla-Nieto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone.

- Arch Endocrinol Metab. 2018;62(4):472–9.
14. Reiter RJ, Mayo JC, Tan D-X, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: Under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 2016;61(3):253–78.
  15. Kandalepas PC, Mitchell JW, Gillette MU. Melatonin signal transduction pathways require E-Box-mediated transcription of *Per1* and *Per2* to reset the SCN Clock at dusk. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157824.
  16. Dopico XC, Evangelou M, Ferreira RC, Guo H, Pekalski ML, Smyth DJ, et al. Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun.* 2015;6:7000.
  17. Sagrillo-Fagundes L, Assunção Salustiano EM, Yen PW, Soliman A, Vaillancourt C. Melatonin in pregnancy: Effects on brain development and CNS programming disorders. *Curr Pharm Des.* 2016;22(8):978–86.
  18. Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Galdames HA, Spichiger C, Richter HG, et al. Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One.* 2012;7(8):e42713.
  19. Cox KH, Takahashi JS. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *J Mol Endocrinol.* 2019;63(4):R93–102.
  20. Hasting MH, Maywood ES, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(8):453–69.
  21. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron.* 2012;74(2):246–60.
  22. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Amode MR, Armean IM, et al. *Ensembl* 2019. 2019;47:D745–51.
  23. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;21:67–84.
  24. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell.* 1998;93(6):929–37.

25. Zhang Y, Fang B, Emmett MJ, Damle M, Sun Z, Feng D, et al. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erba couple metabolism to the clock. *Science* (80- ). 2015;348(6242):1488–92.
26. Kato Y, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M. DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 coordinate physiological processes, including circadian rhythms in response to environmental stimuli. *Curr Top Dev Biol*. 2014;110:339–72.
27. Beytebierre J, Trott A, Greenwell B, Osborne C, Vitet H, Spence J, et al. Tissue-specific BMAL1 cisromes reveal that rhythmic transcription is associated with rhythmic enhancer-enhancer interactions. *Genes Dev*. 2019;33(5–6):294–309.
28. Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gras S. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*. 2006;147(8):3769–76.
29. Karman B, Tischkau S. Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biol Reprod*. 2006;75(4):624–32.
30. Johnson MH, Lim A, Fernando D, Day ML. Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reprod Biomed Online*. 2002;4(2):140–5.
31. Pérez S, Murias L, Fernández-plaza C, Díaz I, Otero J, Díaz E, et al. Systems biology in reproductive medicine evidence for clock genes circadian rhythms in human full-term placenta. *Sist Biol Reprod Med*. 2015;61:360–6.
32. Sellix M. Clocks underneath: the role of peripheral clocks in the timing of female reproductive physiology. *Front Endocrinol*. 2013;4(91).
33. Pan X, Taylor MJ, Cohen E, Hanna N, Mota S. Circadian clock, time-restricted feeding and reproduction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):831.
34. Radowicka M, Pietrzak B, Wielgoś M. Assessment of the occurrence of menstrual disorders in female flight attendants - preliminary report and literature review. *Neuro Endocrinol Lett*. 2013;34(8):809–13.
35. Chu A, Zhu L, Blum I, Mai O, Leliavski A, Fahrenkrug J, et al. Global but not gonadotrope- specific disruption of *Bmal1* abolishes the luteinizing hormone

- surge without affecting ovulation. *Endocrinology*. 2013;154:2924–35.
36. Tong Y, Guo H, Brewer J, Lee H, Lehman M, Bittman E. Expression of *haPer1* and *haBmall* in Syrian hamsters: Heterogeneity of transcripts and oscillations in the periphery. *J Biol Rhythms*. 2004;19(2):113–25.
  37. Liu Y, Johnson BP, Shen AL, Wallisser JA, Krentz KJ, Moran SM, et al. Loss of BMAL1 in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:14295–300.
  38. Bittman EL. Timing in the testis. *J Biol Rhythms*. 2016;31(1):12–36.
  39. Neto F, Bach P, Najari B, Li P, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:10–26.
  40. Guzmán L, López R, Llerena G, Pino J, Retuerto F. Male germinal epithelium recovery in mice treated with only dose of Busulfan. *Rev peru biol*. 2005;12(1):141–4.
  41. Sugimoto R, Nabeshima Y, Yoshida S. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech Dev*. 2012;128(11–12):610–24.
  42. Schuler G, Dezhkam Y, Bingsohn L, Hoffmann B, Failing K, Galuska C, et al. Free and sulfated steroids secretion in postpubertal boars (*Sus scrofa domestica*). *Reproduction*. 2014;148(3):303–14.
  43. Schlatt S, Pohl C, Ehmcke J, Ramaswamy S. Age-related changes in diurnal rhythms and levels of gonadotropins, testosterone, and inhibin B in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Biol Reprod*. 2008;79(1):93–9.
  44. Veldhuis J, Liu P, Takahashi P, Keenan D. Dynamic testosterone responses to near-physiological LH pulses are determined by the time pattern of prior intravenous LH infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303(6):E720–8.
  45. Veldhuis J, Liu P, Weist S, Wigham J. Analysis of the impact of intravenous LH pulses versus continuous testosterone secretion during GnRH receptor blockade. *Am J Physiol Endocrinol*. 2012;303(10):R994–1002.
  46. Makanji Y, Zhu J, Mishr R, Holmquist C, Wong W, Schwartz N, et al. Inhibin at

- 90: From discovery to clinical application, a historical review. *Endocr Rev.* 2014;35(5):747–94.
47. Simonneaux V, Bahougne T. A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. *Frontiers Endocrinol.* 2015;6:157.
48. Bahougne T, Kretz M, Angelopoulou E, Jeandidier N, Simonneaux V. Impact of circadian disruption on female mice reproductive function. *Endocrinology.* 2020;161(4):pii: bqaa028.
49. Ohkura S, Uenoyama Y, Yamada S, Homma T, Takase K, Inoue N, et al. Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides.* 2009;30(1):49–56.
50. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: Differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron.* 1998;20(6):1103–10.
51. Nishide S, Hashimoto K, Nishio T, Honma K, Honma S. Organ-specific development characterizes circadian clock gene *Per2* expression in rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2014;306(1):R67–74.
52. Álvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A. Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2003;69(1):81–91.
53. Morse D, Cermakian N, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P. No circadian rhythms in testis: *Period1* expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol Endocrinol.* 2003;17(1):141–51.
54. Álvarez JD, Sehgal A. The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *J Biol Rhythms.* 2005;20(2):111–21.
55. Mazzocchi G, Francavilla M, Giuliani F, Aucella F, Vinciguerra M, Paziienza V, et al. Clock gene expression in mouse kidney and testis: analysis of periodical and dynamical patterns. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012;26(2):303–11.
56. Klose M, Grote K, Lerchl A. Temporal control of spermatogenesis is independent of the central circadian pacemaker in djungarian hamsters

- (*Phodopus sungorus*). Biol Reprod. 2011;84(1):124–9.
57. Meyer V, Lerchl A. Evidence for species-specific clock gene expression patterns in hamster peripheral tissues. Gene. 2014;548(1):101–11.
  58. Bebas P, Goodall CP, Majewska M, Neumann A, Giebultowicz J, Chappell PE. Circadian clock and output genes are rhythmically expressed in extratesticular ducts and accessory organs of mice. J Fed Am Soc Exp Biol. 2009;23(2):523–33.
  59. Barburski A, Sokanovic SJ, Bjelic MM, Radovic SM, Andric SA, Kostic TS. Circadian rhythm of the Leydig cells endocrine function is attenuated during aging. Exp Gerontol. 2016;73(1):5–13.
  60. Chen H, Gao L, Xiong Y, Yang D, Li C, Wang A, et al. Circadian clock and steroidogenic-related gene expression profiles in mouse Leydig cells following dexamethasone stimulation. Biochem Biophys Res Commun. 2017;483(1):294–300.
  61. He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori MA. The disruption of circadian clockwork in differentiating cells from rat reproductive tissues as identified by in vitro real-time monitoring system. J Endocrinol. 2007;193(3):413–20.
  62. He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori MA. Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. Mol Cell Biochem. 2007;302(1–2):111–8.
  63. Yoshikawa T, Sellix M, Pezuk P, Menaker M. Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. Endocrinology. 2009;150(9):4338–47.
  64. Johnson MH, Dolatshad H, Davis FC. Circadian clock genes in reproductive tissues and the developing conceptus. Reprod Fertil Dev. 2009;21(1):1–9.
  65. Wiggins G, Michel L. Cyclic variation of cellular clock proteins in the mouse estrous ovary. J Reprod Infertil. 2016;17(4):192–8.
  66. Cushman RA, Allan MF, Jones SA, Rupp GP, Echternkamp SE. Localization of *Period 1* mRNA in the ruminant oocyte and investigations of its role in ovarian function. Anim Reprod Sci. 2007;99(1–2):93–105.

67. Kobayashi M, Watanabe K, Matsumura R, Anayama N, Miyamoto A, Miyazaki H, et al. Involvement of the luteinizing hormone surge in the regulation of ovary and oviduct clock gene expression in mice. *Genes Cells*. 2018;
68. Brzezinski A, Saada A, Miller H, Brzezinski-Sinai NA, Ben-Meir A. Is the aging human ovary still ticking?: Expression of clock-genes in luteinized granulosa cells of young and older women. *J Ovarian Res*. 2018;11(1):95.
69. Kennaway DJ, Varcoe TJ, Mau VJ. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(9):503–7.
70. Johnson MH. *Essential Reproduction (Essentials)*. 6<sup>a</sup>. Oxford: Blackwell Publishing; 2007.
71. Ratajczak CK, Herzog ED, Muglia LJ. Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(5):743–50.
72. Akiyama S, Ohta H, Watanabe S, Moriya T, Hariu A, Nakahata N, et al. The uterus sustains stable biological clock during pregnancy. *Tohoku J Exp Med*. 2010;221(4):287–98.
73. Horard B, Rayet B, Triqueneaux G, Laudet V, Delaunay F, Vanacker JM. Expression of the orphan nuclear receptor ERRalpha is under circadian regulation in estrogen-responsive tissues. *J Mol Endocrinol*. 2004;33(1):87–97.
74. Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, Shimazoe T, Watanabe S, Ebihara S, et al. Estrogen differentially regulates expression of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J Neurosci Res*. 2005;82(5):622–30.
75. Uchikawa M, Kawamura M, Yamauchi N, Hattori MA. Down-regulation of circadian clock gene *period 2* in uterine endometrial stromal cells of pregnant rats during decidualization. *Chronobiol Int*. 2011;28(1):1–9.
76. He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hattori MA. Up-regulation of *Per1* expression by estradiol and progesterone in the rat uterus. *J Endocrinol*. 2007;194(3):511–9.
77. Nakamura TJ, Sellix MT, Menaker M, Block GD. Estrogen directly modulates



- circadian rhythms of PER2 expression in the uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(5):E1025-31.
78. Rubel CA, Lanz RB, Kommagani R, Franco HL, Lydon JP, DeMayo FJ. Research resource: Genome-wide profiling of progesterone receptor binding in the mouse uterus. *Mol Endocrinol.* 2012;26(8):1428–42.
79. Muter J, Lucas ES, Chan YW, Brighton PJ, Moore JD, Lacey L, et al. The clock protein *period 2* synchronizes mitotic expansion and decidual transformation of human endometrial stromal cells. *FASEB J.* 2015;29(4):1603–14.
80. Beesley S, Lee J, Olcese J. Circadian clock regulation of melatonin MTNR1B receptor expression in human myometrial smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(8):662–71.
81. Sellix MT, Menaker M. Circadian clocks in the ovary. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(10):628–36.
82. Wharfe MD, Mark PJ, Waddell BJ. Circadian variation in placental and hepatic clock genes in rat pregnancy. *Endocrinology.* 2011;152(9):3552–60.
83. Frigato E, Lunghi L, Ferretti ME, Biondi C, Bertolucci C. Evidence for circadian rhythms in human trophoblast cell line that persist in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(1):108–11.
84. Papacleovoulou G, Nikolova V, Oduwole O, Chambers J, Vazquez-Lopez M, Jansen E, et al. Gestational disruptions in metabolic rhythmicity of the liver, muscle, and placenta affect fetal size. *FASEB J.* 2017;31(4):1698–708.
85. Amano T, Matsushita A, Hatanaka Y, Watanabe T, Oishi K, Ishida N, et al. Expression and functional analyses of circadian genes in mouse oocytes and preimplantation embryos: *Cry1* is involved in the meiotic process independently of circadian clock regulation. *Biol Reprod.* 2009;80(3):473–83.
86. Dolatshad H, Cary AJ, Davis FC. Differential expression of the circadian clock in maternal and embryonic tissues of mice. *PLoS One.* 2010;5(3):e9855.
87. Bunger M, Wilsbacher L, Moran S, Clendenin C, Radcliffe L, Hogenesch J, et al. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals.

- Cell. 2000;103(7):1009–17.
88. Bonden M, Varcoe T, Kennaway D. Circadian regulation of reproduction: from gamete to offspring. *Prog Biophys Mol Biol*. 2013;113(3):387–97.
  89. Álvarez J, Hansen A, Ord T, Bebas P, Chappell P, Giebultowicz J, et al. The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *J Biol Rhythms*. 2008;23(1):26–36.
  90. Schoeller EL, Clark DD, Dey S, Cao N V, Semaan SJ, Chao LW, et al. *Bmal1* is required for normal reproductive behaviors in male mice. *Endocrinology*. 2016;157(12):4914–4929.
  91. Dorantes Cuéllar AY, Martínez Sibaja C, Guzmán Blanno A. *Endocrinología clínica*. 4ª. México D.F.: Manual Moderno; 2012.
  92. Ratajczak CK, Boehle KL, Muglia LJ. Impaired steroidogenesis and implantation failure in *Bmal1*<sup>-/-</sup> mice. *Endocrinology*. 2009;150(4):1879–85.
  93. Dolatshad H, Campbell E, O'Hara L, Maywood E, Hastings M, Johnson M. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum Reprod*. 2006;21(1):68–79.
  94. Cheng S, Liang X, Wang Y, Jiang Z, Liu Y, Hou W, et al. The circadian Clock gene regulates acrosin activity of sperm through serine protease inhibitor A3K. *Exp Biol Med*. 2016;241(2):205–15.
  95. Li C, Xiao S, Hao J, Liao X, Li G. *Cry1* deficiency leads to testicular dysfunction and altered expression of genes involved in cell communication, chromatin reorganization, spermatogenesis, and immune response in mouse testis. *Mol Reprod Dev*. 2018;85(4):325–35.
  96. Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, Sage M, Lu W, Vaishnav S, et al. Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell*. 2001;105(5):683–94.
  97. Daan S, Spoelstra K, Albrecht U, Schmutz, Isabelle Moritz Daan I, Daan B, Rienks F, et al. Lab mice in the field: Unorthodox daily activity and effects of a dysfunctional circadian clock allele. *J Biol Rhythms*. 2011;26(2):118–29.

98. Raverdeau M, Gely-Pernot A, Féret B, Dennefeld C, Benoit G, Davidson I, et al. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(41):16582–7.
99. Endo T, Romer K, Anderson E, Baltus A, de Rooij D, Page D. Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(18):E2347-2356.
100. Navigatore-Fondo LS, Golini RL, Ponce IT, Delgado SM, Plateo-Pignatari MG, Gimenez MS, et al. Retinoic acid receptors move in time with the clock in the hippocampus. Effect of a vitamin-A-deficient diet. *J Nutr Biochemistry*. 2013;24(5):859–67.
101. McNamara P, Seo SB, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D, FitzGerald GA. Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*. 2001;105(7):877–89.
102. Yang X, Guo M, Wan YJ. Deregulation of growth factor, circadian clock, and cell cycle signaling in regenerating hepatocyte RXRalpha-deficient mouse livers. *Am J Pathol*. 2010;176(2):733–43.
103. Boden MJ, Varcoe TJ, Voultzios A, Kennaway DJ. Reproductive biology of female *Bmall* null mice. *Reproduction*. 2010;139(6):1077–90.
104. Xu J, Li Y, Wang Y, Xu Y, Zhou C. Loss of *Bmall* decreases oocyte fertilization, early embryo development and implantation potential in female mice. *Zygote*. 2016;24(5):760–7.
105. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*. 2004;14(15):1367–73.
106. Amano T, Anzai M, Matsumoto K. The *Clock* mutation reduces reproductive performance of mice by affecting the implantation capacity: Maternal *Clock* mutation is not the only factor affecting implantation. *Theriogenology*. 2016;86(7):1670–84.

107. Zheng Y, Liu C, Li Y, Jiang H, Yang P, Tang J, et al. Loss-of-function mutations with circadian rhythm regulator *Per1/Per2* lead to premature ovarian insufficiency. *Biol Reprod.* 2019;100(4):1066–72.
108. Zhang Y, Meng N, Bao H, Jiang Y, Yang N, Wu K, et al. Circadian gene *PER1* senses progesterone signal during human endometrial decidualization. *J Endocrinol.* 2019;243(3):229–42.
109. Tobback J, Boerjan B, Vandersmissen HP, Huybrechts R. The circadian clock genes affect reproductive capacity in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011;41(5):313–21.
110. Beaver LM, Rush BL, Gvakharia BO, Giebultowicz JM. Noncircadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms.* 2003;18(6):463–72.
111. Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem.* 1995;270(38):22077–80.
112. Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* (80-). 2003;302(5643):255–9.
113. Liu PY. A Clinical Perspective of Sleep and Andrological Health: Assessment, Treatment Considerations, and Future Research. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(10):4398–417.
114. Ramasamy R, Bakircioglu ME, Cengiz C, Karaca E, Scovell J, Jhangiani SN, et al. Whole-exome sequencing identifies novel homozygous mutation in *NPAS2* in family with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2015;104(2):286–91.
115. Zhang J, Ding X, Li Y, Xia Y, Nie J, Yi C, et al. Association of *CLOCK* gene variants with semen quality in idiopathic infertile Han-Chinese males. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(5):536–42.
116. Hodžić A, Ristanović M, Zorn B, Tulić C, Maver A, Novaković I, et al. Genetic variation in circadian rhythm genes *CLOCK* and *ARNTL* as risk factor for male infertility. *PLoS One.* 2013;8(3):e59220.

117. Shen O, Ding X, Nie J, Xia Y, Wang X, Tong I, et al. Variants of the CLOCK gene affect the risk of idiopathic male infertility in the Han-Chinese population. *Chronobiol Int.* 2015;32(7):959–65.
118. Lawson CC, Whelan EA, Lividoti Hibert EN, Spiegelman D, Schernhammer ES, Rich-Edwards JW. Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology.* 2011;22(3):305–12.
119. Mills J, Kouhung W. Impact of circadian rhythms on female reproduction and infertility treatment success. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2019;26(6):317–21.
120. Begtrup LM, Specht IO, Hammer PEC, Flachs EM, Garde AH, Hansen J, et al. Night work and miscarriage: a Danish nationwide register-based cohort study. *Occup Environ Med.* 2019;76(5):302–8.
121. Kovanen L, Saarikoski ST, Aromaa A, Lönnqvist J, Partonen T. ARNTL (BMAL1) and NPAS2 gene variants contribute to fertility and seasonality. *PLoS One.* 2010;5(4):e10007.
122. Hodžić A, Lavtar P, Ristanović M, Novaković I, Dotlić J, Peterlin B. Genetic variation in the CLOCK gene is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196345.
123. Qiu C, Gelaye B, Denis M, Tadesse MG, Enquobahrie DA, Ananth C V, et al. Placental genetic variations in circadian clock-related genes increase the risk of placental abruption. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2016;7(1):32–40.
124. Lv S, Wang N, Ma J, Li W-P, Chen Z-J, Zhang C. Impaired decidualization caused by downregulation of circadian clock gene BMAL1 contributes to human recurrent miscarriage. *Biol Reprod.* 2019;101(1):138–47.



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*



SERVICIO DE SALUD  
DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

HOSPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

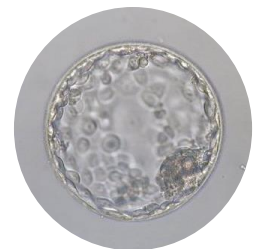
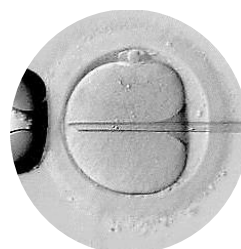
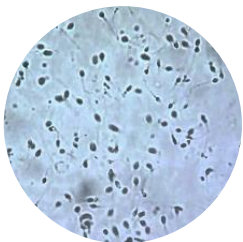
# Memoria Practicum

**Alumna:** Ángela Niño Caballero

**Tutora:** Vanesa Castañón Bernardo

Unidad de Reproducción Asistida

HOPITAL UNIVERSITARIO CENTRAL DE ASTURIAS



**Junio 2020**

## ABREVIATURAS

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CP	Corpúsculo polar
COVID-19	Enfermedad por coronavirus de 2019
D+X	Día X tras la fecundación
EOC	Estimulación ovárica controlada
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FORT	Tasa de recuperación folicular
FSH	Hormona folículo estimulante
g (RCF)	Fuerza centrífuga relativa
HAM	Hormona antimulleriana
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
IA	Inseminación artificial
ICSI	Inyección intracitoplasmática
LH	Hormona luteinizante
MCI	Masa celular interna
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGT-a	Test genético preimplantacional de aneuploidías
PN	Pronúcleos
PVP	Polivinilpirrolidona

REM	Recuperación de espermatozoides móviles
RFA	Recuento de folículos antrales
rpm	Revoluciones por minuto
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
TRA	Técnicas de reproducción asistida
URA	Unidad de reproducción asistida
ZP	Zona pelúcida



# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción .....	1
1.1. Características de la URA .....	1
2. Técnicas aprendidas y/o llevadas a cabo .....	2
2.1. Laboratorio de andrología .....	2
2.1.1. Recepción de la muestra de semen .....	2
Muestra conyugal .....	2
Biopsia testicular .....	2
Muestra criopreservada .....	3
Semen de donante.....	3
2.1.2. Seminograma.....	3
2.2.3. Recuperación de espermatozoides móviles (REM) .....	4
Swim-up.....	5
Gradiente de densidad .....	6
2.2. Laboratorio de embriología .....	6
2.2.1. Punción ovárica .....	6
2.2.2. FIV .....	7
2.2.3. Inseminación intracitoplasmática (ICSI) .....	8
2.2.4. Desvitrificación embrionaria .....	10
2.2.5. Seguimiento y evaluación del proceso.....	11
2.2.6. Transferencia embrionaria .....	13
2.2.7. Vitrificación embrionaria .....	14
2.2.8. Biopsia embrionaria en D+3.....	15
3. Actividades complementarias.....	16
3.1. COVID-19 y TRA.....	16
3.1.1. Entrevista y cribado.....	17
3.1.2. Adaptaciones de los servicios de TRA .....	20
3.1.3. COVID-19 y el laboratorio de TRA .....	20
3.2. Protocolos de estimulación ovárica individualizados .....	21
3.2.1. Reserva ovárica .....	22
3.2.2. Tasa de recuperación folicular.....	22
3.2.3. Número óptimo de ovocitos obtenidos .....	22
3.2.4. Protocolos de estimulación .....	23
4. Reflexión personal.....	25
5. Bibliografía .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cámara Makler y la cuadrícula de 1 mm <sup>2</sup> con 100 microcuadrados que se localiza en el centro de la misma.....	4
<b>Figura 2.</b> Placa de ICSI con gotas de medio de fertilización para los ovocitos y en el centro dos gotas (en amarillo) con PVP para los espermatozoides. ....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema de clasificación de calidad embrionaria en D+2 y D+3 según los criterios propuestos por ASEBIR .....	12
<b>Figura 4.</b> Esquema de clasificación de calidad embrionaria en D+4 y D+5 según los criterios propuestos por ASEBIR .....	13
<b>Figura 5.</b> Cribado orientado al personal ante su reincorporación a la actividad recomendado por la ESHRE.....	18
<b>Figura 6.</b> Cribado orientado a los pacientes previo al comienzo del tratamiento recomendado por la ESHRE.....	18
<b>Figura 7.</b> Cribado de SARS-CoV-2 orientado a los pacientes propuesto por la SEF y ASEBIR.....	19

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Dosis de gonadotropinas y protocolo a utilizar según el recuento de folículos antrales.....	24
---	----

## 1. Introducción

En esta memoria se recogen las técnicas aplicadas a la biología de la reproducción aprendidas durante la realización de prácticas en la Unidad de Reproducción Asistida (URA) del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) llevadas a cabo desde el 24 de febrero del 2020 hasta el 5 de marzo del mismo año. Debido a las medidas planteadas ante el aumento del número de casos de COVID-19, enfermedad declarada como pandemia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de marzo del 2020, no se llegó a completar el período de tiempo previamente establecido para realizarlas. Por consiguiente, dicho trabajo se complementó con una serie de actividades adicionales.

### 1.1. Características de la URA

Esta unidad del hospital incluye el laboratorio de reproducción comunicado con el quirófano y aislado del resto de habitaciones, encontrándose en otro lugar del hospital el quirófano de urología. Dicho laboratorio se encuentra en condiciones asépticas, la puerta permanece siempre cerrada, todo aquel que tenga permiso para acceder tiene que hacerlo equipado con una ropa específica y no se permite la entrada al mismo con productos que puedan implicar la suspensión de sustancias volátiles al ambiente como perfumes u otros cosméticos, ya que esto podría afectar al cultivo embrionario. Además, también hay una consulta médica y otra de enfermería, una sala de espera, un aseo específico para recogida de muestras seminales y otro general, una sala de trabajo, una habitación para la recuperación de las pacientes y un almacén.

El laboratorio se encuentra equipado con:

- ✚ Incubador tri-gas *K-Systems*® para cultivo embrionario
- ✚ Cuatro incubadores de CO<sub>2</sub> *Thermo Scientific Heracell 150i*®
- ✚ Incubador *Labotect C200*®
- ✚ Dos centrífugas *Thermo Fisher Scientific*®
- ✚ Micromanipulador *Nikon Narishige*®
- ✚ Micromanipulador *Eppendorf*® con microscopio *Leica*®
- ✚ Microscopio *Leica*®
- ✚ Campana de flujo *IVFtech*® con dos lupas *Leica*®
- ✚ Campana de flujo *K-Systems*®
- ✚ Frigorífico
- ✚ Tanques de nitrógeno líquido para almacenamiento de muestras crioconservadas

## 2. Técnicas aprendidas y/o llevadas a cabo

### 2.1. Laboratorio de andrología

#### 2.1.1. Recepción de la muestra de semen

Para poder llevar a cabo las técnicas de reproducción asistida (TRA) se requiere de la obtención de una muestra de semen. Esta puede ser de la pareja de la paciente, a lo que se le denomina semen conyugal, o de un donante. La necesidad de recurrir a la donación de semen puede ser debida a que no exista pareja masculina o a que el cónyuge presente azoospermia, factor genético o cualquier condición que desaconseje el uso de su propia muestra.

#### Muestra conyugal

Se recomienda a los pacientes no tardar más de media hora en entregar la muestra tras su recogida. La muestra viene etiquetada con el nombre de la mujer y se coloca en la zona calefactada de la campana de flujo (37 °C).

#### Biopsia testicular

Es posible que en el eyaculado no se encuentren espermatozoides, lo que se denomina azoospermia. La azoospermia puede ser debida a la obstrucción de las vías espermáticas o a la interrupción parcial o total de la espermatogénesis, es decir, obstructiva o secretora, respectivamente. En este tipo de ocasiones se requiere acceder al epidídimo, si la causa es obstructiva, o al testículo, si la azoospermia tiene un origen no obstructivo, para tratar de obtener espermatozoides (1). No obstante, en la práctica siempre se accede al testículo.

La técnica quirúrgica es llevada a cabo por el urólogo en otro lugar del hospital. Previamente, se prepara una placa de Petri con medio de cultivo para gametos y se lleva al quirófano de urología para recoger la muestra. Una vez de vuelta en el laboratorio de reproducción, con ayuda del bisturí, se disgrega el tejido biopsiado para que si hay espermatozoides estos salgan. A veces, es necesaria la repetición de la biopsia porque no se encuentran espermatozoides. Si hay, se recogen con la micropipeta y se extienden en otra placa para verlo al microscopio. Es posible añadir Hemovas (pentoxifilina) para activar la movilidad de los espermatozoides ya que actúa aumentando el AMPc. A continuación, se pasa el contenido a dos tubos Falcon y se centrifugan 10 minutos a 80 g

(300 rpm) para separar los restos de tejido de la biopsia. Se coge el sobrenadante en un tubo y se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 520 g (2000 rpm). Los espermatozoides ahora se encuentran en el pellet. Por lo tanto, se retira el sobrenadante. Si la muestra precisa de vitrificación, se añaden 600 µl de medio y 600 µl de crioprotector. El crioprotector se añade despacio para evitar el choque osmótico. Entonces, se mezcla, se carga una jeringuilla con la muestra, se coloca en la pajuela y se llena. Finalmente, la pajuela se sella por calor y se envía al banco de tejidos para su criopreservación.

No obstante, ante la situación de no encontrar espermatozoides en la muestra se cursa una petición y se envía una muestra al servicio de Anatomía Patológica para analizar las causas de parada de la espermatogénesis.

### Muestra criopreservada

La muestra de semen de la pareja puede estar criopreservada cuando se precise de su utilización para la TRA. Esto puede deberse a diferentes motivos como la realización previa de una preservación de la fertilidad en el caso de un paciente oncológico, muestras muy pobres que precisen congelaciones sucesivas o dificultades a la hora de la obtención de la muestra.

La muestra se saca del nitrógeno líquido, se cortan las puntas de las pajuelas y se colocan en un tubo de ensayo que pasa al incubador durante 5 minutos.

### Semen de donante

Cuando una pareja necesita un donante de semen, los profesionales de la URA son los encargados de solicitud de la muestra al banco de semen que la receptora o receptores hayan elegido. Para ello se requiere el envío del fenotipo de la mujer receptora a dicho banco para la elección del donante.

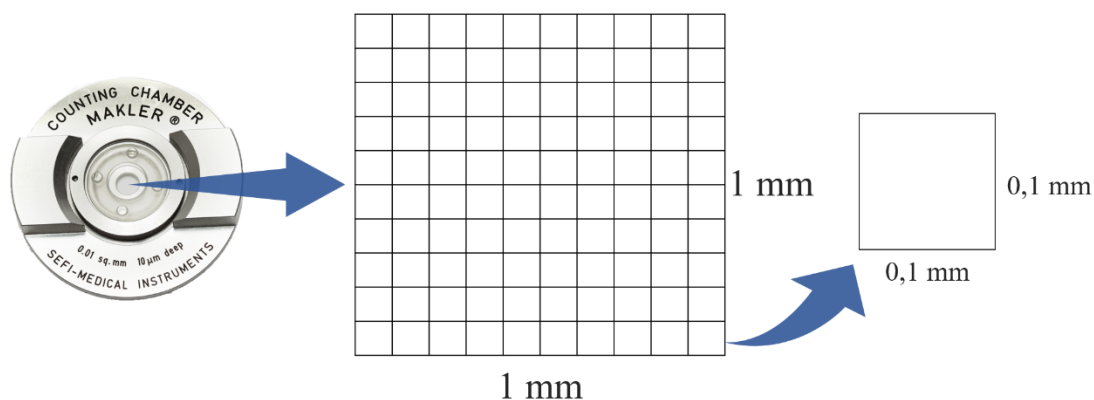
Estas muestras llegan criopreservadas en nitrógeno líquido, por lo que se pasa a su descongelación del mismo modo que en el caso anterior.

### 2.1.2. Seminograma

Es necesario determinar la calidad de la muestra de semen por lo que se estudian diferentes parámetros macroscópicos, como el volumen o la viscosidad, y microscópicos, como la motilidad y la concentración espermática. En cuanto a la motilidad, se recomienda un sistema simple para clasificar a los espermatozoides (2):

- ✚ Motilidad progresiva: espermatozoides que se mueven activamente, ya sea linealmente o en un círculo grande. Estos se clasificarían en dos grupos dependiendo de la velocidad, distinguiendo entre aquellos con un movimiento más rápido (a) y los que presentan uno más lento (b).
- ✚ Motilidad no progresiva (c): todos los demás patrones de motilidad con ausencia de progresión, nadando en círculos pequeños, cuando la fuerza flagelar apenas desplaza la cabeza o cuando sólo se puede observar un latido flagelar.
- ✚ Inmovilidad (d): espermatozoides sin movimiento.

El análisis de la muestra comienza con la determinación del volumen y se anota si presenta viscosidad. Para el recuento de espermatozoides se hace uso de una cámara Makler (Figura 1), a la que se le añaden 10 µl de la muestra para su observación en el microscopio. Entonces, se realiza el recuento de espermatozoides correspondiente a una línea de la cuadrícula, anotando el número total; los espermatozoides con movilidad tipo a, b, c y d; y el número total de móviles. El cómputo de una línea de la cuadrícula habría que multiplicarlo por 10<sup>6</sup> para extrapolar la concentración a espermatozoides/eyaculado. Este recuento se realiza antes y después de la recuperación de espermatozoides móviles.



**Figura 1.** Cámara Makler y la cuadrícula de 1 mm<sup>2</sup> con 100 microcuadrados que se localiza en el centro de la misma.

### 2.2.3. Recuperación de espermatozoides móviles (REM)

La preparación de los espermatozoides es un requisito previo para la realización de cualquier técnica de reproducción asistida y tiene dos objetivos principales:

- ✚ La eliminación del plasma seminal que contiene sustancias inhibitoras de la capacitación, prostaglandinas, agentes infecciosos y proteínas antigénicas.
- ✚ La separación de los espermatozoides móviles de los inmóviles, de los leucocitos, de las células germinales inmaduras y de otras células.

Por consiguiente, la finalidad de este proceso es seleccionar los espermatozoides móviles morfológicamente normales y mejorar la calidad de los mismos, porque disminuye la liberación de linfoquinas y reduce la formación de radicales libres. Finalmente, el correcto procesamiento de la muestra va a influir en la capacidad fecundante del espermatozoide *in vivo* e *in vitro* (3).

Dependiendo de la TRA que se vaya a implementar la preparación de la muestra se realiza de un modo u otro. Si la técnica a realizar es la fecundación *in vitro* (FIV), se hace swim-up, pero si lo que se va a realizar es una inseminación artificial (IA) se prepara mediante gradientes de densidad. A su vez, la técnica a realizar depende de la concentración de la muestra seminal, si hay  $5 \cdot 10^6$  espermatozoides con motilidad progresiva tipo a por ml, se puede realizar IA. Siempre que el resto de los factores, como la edad de la mujer, lo permitan.

### Swim-up

Para cada muestra de semen se preparan dos tubos de ensayo entre los que se divide a partes iguales. Si el semen está muy viscoso se trabaja con agujas, en vez de con la pipeta de vidrio y el aspirador electrónico. Para comenzar, se añade una cantidad de medio equivalente al volumen de la muestra (dilución 1:1), se mezclan y se centrifugan durante 7 minutos a 500 g (1800 rpm). Entonces, se retira el sobrenadante que sería el plasma seminal, ya que los espermatozoides quedan en el pellet, y se añaden 300  $\mu$ l de medio de cultivo HEPES. Dicho medio se deja caer por la pared del tubo con cuidado para que no se resuspendan los espermatozoides. A continuación, se colocan los tubos inclinados para aumentar la superficie por las que han de moverse los espermatozoides y se dejan en esa posición durante, aproximadamente, 20 o 30 minutos a 37 °C. Después, se recoge medio de la parte superior de cada tubo, donde se encuentran los espermatozoides móviles, se colocan en un único tubo que se centrifuga durante 5 minutos a 500 g (1800 rpm). Se elimina todo el sobrenadante que se pueda y se añaden 300  $\mu$ l de medio.



### Gradiente de densidad

Los gradientes de densidad separan las partículas en función de su densidad de flotación. Los diferentes componentes de la muestra se separan hasta alcanzar una posición donde ya no se desplazan más porque en ese punto su densidad es igual a la de su entorno. Los espermatozoides maduros son células compactadas y alcanzan el gradiente de mayor densidad, que se encuentra en el fondo del tubo. El plasma seminal permanece flotando sobre el gradiente de menor densidad y las células, los espermatozoides inmaduros y muertos se sitúan en la interfase entre los dos gradientes. Los gradientes de densidad utilizados parten de una suspensión coloidal de partículas de sílice unidas de forma covalente a moléculas de silano y se utilizan en soluciones isotónicas a una concentración del 80 % y del 40 % (3).

El día anterior se preparan dos tubos Falcon añadiendo primero unos 2 ml de la solución al 80 % y en segundo lugar la misma cantidad de la solución al 40 % y se dejan en el incubador. Al día siguiente, cuando se tiene la muestra de semen esta se reparte en los dos tubos de gradientes, dejándola caer con cuidado por la pared. Se centrifuga 20 minutos a 300 g (1200 rpm). Entonces, se recogen los espermatozoides del fondo con una pipeta de vidrio y una pera de succión y se pasan a un tubo de ensayo donde se añaden, además, 200 µl de medio. A continuación, se centrifuga 5 minutos a 500 g, se retira el sobrenadante y se añaden 300-500 µl de medio de cultivo para resuspender.

## 2.2. Laboratorio de embriología

### 2.2.1. Punción ovárica

Para la realización de técnicas de fecundación *in vitro* se necesitan ovocitos, que se obtienen mediante la punción folicular. Las mujeres que precisan de este procedimiento tienen que someterse a una estimulación ovárica controlada (EOC) con el objetivo de reclutar el mayor número de folículos posible y tratando de evitar la aparición del Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).

Antes de comenzar la punción ovárica hay que preparar la aguja, que se lava con medio HEPES en campo estéril. Asimismo, se preparan 10 tubos de ensayo con medio HEPES que se guardan en el incubador hasta que se necesiten en el quirófano.

Posteriormente, se van trayendo al laboratorio los tubos con fluido folicular y se vierten en placas de Petri dispuestas en la zona calefactada de la campana de flujo *IVFtech*®. Bajo la lupa se observan dichas placas en busca de los complejos cúmulo-ovocitos. Para separar las células epiteliales se utilizan agujas. Entonces, se llevan a otra placa para su lavado haciendo uso de la *Stripper*. Finalmente, se colocan en una placa de 5 pocillos con medio de fertilización, los pocillos utilizados se cubren con aceite mineral y la placa se lleva al incubador.

### 2.2.2. FIV

Una vez los ovocitos han estado en el incubador durante 2-4 horas y se ha realizado la recuperación de espermatozoides móviles, se puede llevar a cabo la FIV convencional. Para ello se ponen en la misma placa los ovocitos sin decumular con una cantidad determinada de la muestra de espermatozoides y se deja que la fecundación ocurra de manera espontánea.

Para saber el volumen que tenemos que utilizar de la muestra de espermatozoides se realizan una serie de cálculos haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Se requiere una concentración de unos 100.000 espermatozoides/ml con movilidad tipo a ( $C_f$ ) en un volumen de 800  $\mu$ l ( $V_f$ ).

*Ej.:* Si la concentración de espermatozoides con movilidad tipo a del paciente es  $4 \cdot 10^6$  spz/ml:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$\frac{4 \cdot 10^6 \text{ spz}}{\text{ml}} \cdot V_i = \frac{1 \cdot 10^5 \text{ spz}}{\text{ml}} \cdot 0,8 \text{ ml}$$

$$V_i = 0,02 \text{ ml} = 20 \mu\text{l}$$

Tendríamos que coger 20  $\mu$ l de la muestra de espermatozoides.

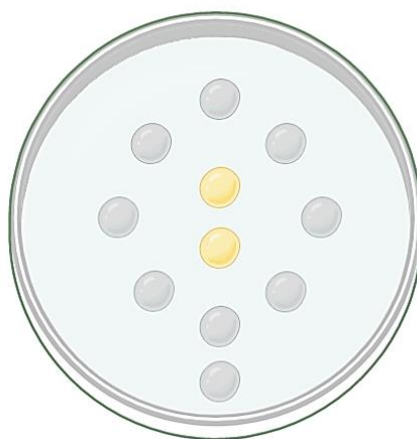
Se realiza en una placa de 5 pocillos con medio de fertilización, aunque no se utilicen todos los pocillos ya que en cada uno se colocan varios ovocitos, y se cubre con

aceite mineral. Finalmente, se comprueba que los espermatozoides se mueven y la placa se coloca en el incubador individual (37 °C, CO<sub>2</sub> 5,8 %, O<sub>2</sub> 5,7 %).

Al día siguiente de la fertilización, unas 16-20 horas después, se procede a la decumulación para poder ver cómo ha ido el proceso. En este caso, la decumulación se realiza únicamente con la *Stripper* pequeña ya que la hialuronidasa ya ha sido aportada por el espermatozoide. A medida que se van lavando los embriones se van pasando a cada uno de los pocillos de una placa de cultivo, se cubren con aceite mineral y se devuelven al incubador.

### 2.2.3. Inseminación intracitoplasmática (ICSI)

Antes de comenzar este procedimiento es necesario realizar una serie de pasos previos. Mientras se lleva a cabo el swim-up de la muestra de semen, se puede ir preparando en la campana de flujo la placa para ICSI (Figura 2). Se utiliza una placa especial con menor altura que las convencionales. En esta se colocan diferentes gotas con medio de fertilización, donde posteriormente en cada una de ellas se colocará un ovocito, dos gotas de polivinilpirrolidona (PVP) para los espermatozoides y hay que tener en cuenta que sobren gotas para el lavado de las agujas. Entonces, se cubre con aceite mineral y se lleva al incubador. Asimismo, es importante comentar que para muestras de semen muy patológicas no es recomendable utilizar PVP.



**Figura 2.** Placa de ICSI con gotas de medio de fertilización para los ovocitos y en el centro dos gotas (en amarillo) con PVP para los espermatozoides. Tener en cuenta que queden gotas de medio de fertilización libres para el lavado de las agujas. (Creado con Biorender.com)

Por otro lado, es imprescindible realizar la decumulación de los ovocitos antes de empezar el proceso. En esta ocasión, se lleva a cabo una decumulación química-mecánica.

En primer lugar, se prepara una placa con una gota de 60  $\mu\text{l}$  de hialuronidasa donde se van a colocar los ovocitos durante 30 segundos. A veces, debido a un elevado número de ovocitos pueden ser necesarias varias gotas de hialuronidasa. Una vez pasado ese período de tiempo, los ovocitos se mueven a otra placa y se continúa con la decumulación mecánica por la acción de la *Stripper* pequeña.

El micromanipulador utilizado funciona con aceite mineral. Por consiguiente, al ponerlo a punto para su funcionamiento es indispensable eliminar las burbujas de aire de los conductos, lo que se denomina purgar. A continuación, se colocan las agujas, la *holding* y la de microinyección. Entonces, en la campana de flujo y con ayuda de la lupa se añade 1  $\mu\text{l}$  de la muestra de espermatozoides móviles en una gota de 4  $\mu\text{l}$  de PVP y se posicionan los ovocitos sacados del incubador en cada una de las gotas dispuestas en la placa. Después, se lleva la placa al micromanipulador y se purgan las agujas en la gota preparada para ello. De hecho, esto se repite cada vez que las agujas salen del aceite mineral.

La técnica de ICSI, puede llevarse a cabo de dos modos. La forma convencional de hacerla es inyectar el espermatozoide una vez aspirado. Sin embargo, también se pueden reunir varios espermatozoides en la otra gota de PVP y después pasar a la microinyección. En la segunda opción, cuando se tienen ya varios espermatozoides en la otra gota es cuando se sacan los ovocitos y se colocan en la placa de ICSI, de este modo se encuentran menos tiempo fuera del incubador. Por lo tanto, suele realizarse de este modo en el caso de muestras seminales complicadas en las que se prevé tardar más en seleccionar los espermatozoides.

Antes de capturar los espermatozoides es necesario “pararlos”, lo que consiste en doblarles la cola para activar la reacción acrosómica. Cuando ya se tiene el espermatozoide bien posicionado en la aguja de microinyección, es decir, con la cabeza hacia el exterior, hay que desplazarse hacia la gota en la que se encuentra el ovocito. Entonces, se localiza el ovocito, se sujeta con la aguja *holding* y se coloca de tal modo que el corpúsculo polar quede “a las doce o a las seis horas” como si el ovocito se tratara de un reloj. Es importante que la *holding* y el oolema se encuentren los dos enfocados. Cuando el ovocito se aspira se suele ver una contracción del mismo. Después, la aguja de inyección se acerca a la zona pelúcida, el espermatozoide se lleva a la punta de la aguja

para minimizar la cantidad de PVP que entre en el ovocito, se aspira un poco de citoplasma, se inyecta y se deja el espermatozoide dentro del ovocito y se retira la aguja. Por último, es de suma importancia, cerciorarse de que el espermatozoide no salga.

Las inyecciones se clasifican según su calidad, de mayor a menor, en tipo I, II y III. Un buen indicativo de calidad sería la resistencia que ofrece la membrana del ovocito, lo que se visualiza como la formación de un cono a la entrada de la aguja de inyección, catalogándose como inyección tipo I.

Una vez terminado el proceso, se ponen en una placa de cultivo de embriones con pocillos pequeños para cada ovocito fertilizado, se cubre con aceite mineral y se lleva al incubador individual.

#### 2.2.4. Desvitrificación embrionaria

Cuando no se puede realizar la transferencia embrionaria en fresco o quedan embriones sobrantes de una estimulación, los embriones se vitrifican. Por lo tanto, para realizar la transferencia han de desvitrificarse y se retira el crioprotector. Para ello se utiliza el kit de desvitrificación *RapidWarm Omni™* de *Vitrolife®*, que sirve para embriones y ovocitos, con cuatro soluciones que consisten en un medio tamponado con MOPS que contiene gentamicina y albúmina sérica humana. Los tres primeros medios tienen además sacarosa, mientras que el cuarto medio no (4). Además, se necesita una placa con cuatro pocillos, en cada uno de ellos se añaden unos 300 µl de cada medio y se lleva la placa al incubador para conseguir la temperatura adecuada, 37 °C. A continuación, se saca la pajuela del banco y se coloca en el soporte *Vitrolife®* con nitrógeno líquido. Entonces, se le quita la cubierta a la pajuela dentro del nitrógeno y se introduce en el pocillo con el primer medio, esperando que el embrión caiga del soporte. El embrión ha de permanecer en cada pocillo un tiempo determinado: en el primer medio, 1 minuto; en el segundo medio, 3 minutos; en el tercer medio, 5 minutos; y en el cuarto medio, 10 minutos. Es importante que en los cambios del embrión de un medio a otro se haga con la mínima cantidad posible. Por último, se pasa a una placa de cultivo y al incubador.

### 2.2.5. Seguimiento y evaluación del proceso

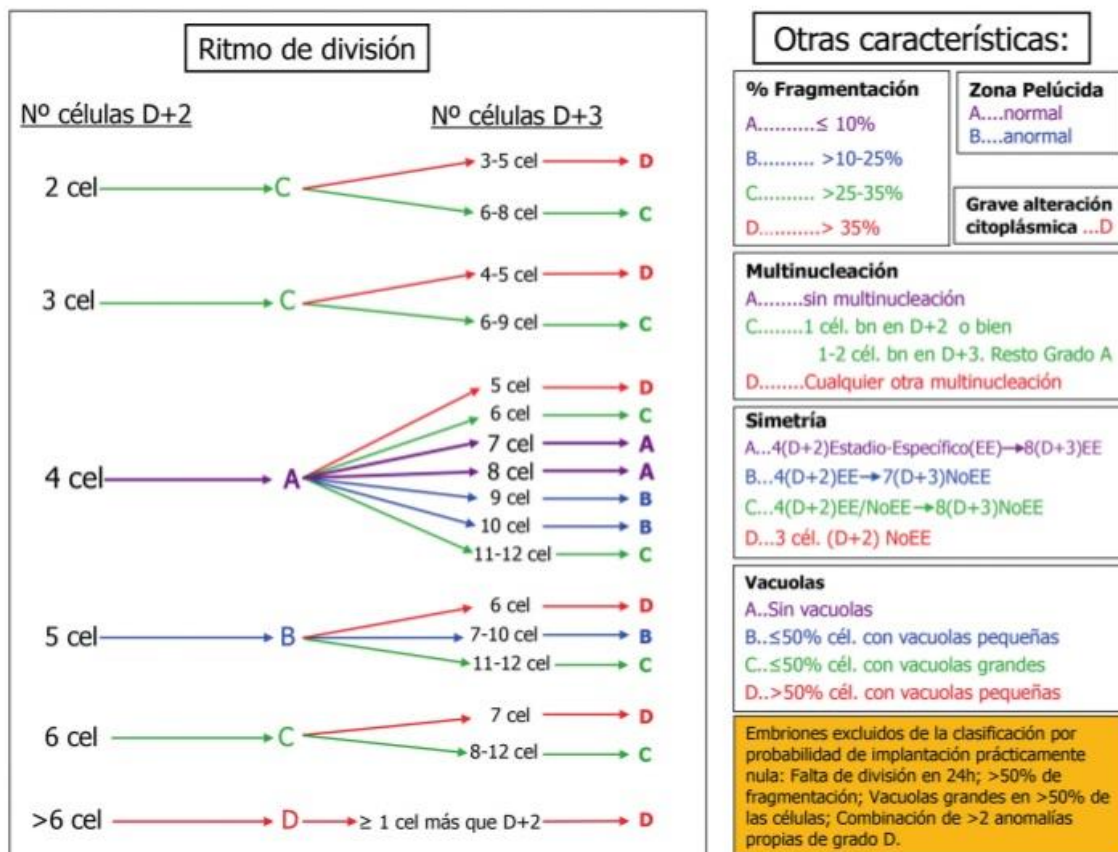
En cuanto a las posibilidades de gestación en la especie humana, la evidencia científica indica que dependen en gran medida de la receptividad endometrial y de la calidad embrionaria. Centrándonos en la calidad embrionaria esta se estudia principalmente mediante la valoración de la morfología (5). Por consiguiente, se hace indispensable el seguimiento y la evaluación de los embriones haciendo uso del microscopio. Siendo de suma utilidad para el trabajo diario en el laboratorio un esquema de clasificación embrionaria (Figura 3) (Figura 4) (5).

En primer lugar, se evalúa la fertilización al siguiente día de su realización ya que esta se aprecia unas 17-20 horas después. Entonces, se anota el número de pronúcleos (PN) y corpúsculos polares (CP) que presentan los embriones en D+1, los cuales deberían ser dos en cada caso. Además, también se indica si se observan halos citoplasmáticos, vacuolas o una zona pelúcida anómala. Siendo la presencia de halo citoplasmático una característica positiva mientras no sea excesiva. Los parámetros desfavorables serían cualquier estado diferente a 2 PN + 2 CP, un solo precursor nucleolar en alguno de los PN, PN separados o de tamaño desigual o la división directa a tres células. No obstante, para la visualización de dicha división se requeriría de la tecnología *Time-Lapse*. Por otro lado, se descartan inmediatamente los embriones 1 PN + 1 CP, 2 PN + 1 CP o aquellos con más de 2 PN (5).

Las características evaluadas en D+2 y D+3 son el número de células, el ritmo de división, el porcentaje y tipo de fragmentación celular, el tamaño de los blastómeros estadio-específico, la visualización de los núcleos, el grado de multinucleación, la forma de los blastómeros, la zona pelúcida (ZP), el grado de compactación/adhesión temprana y anomalías citoplasmáticas como la presencia de anillo, vacuolas o moteado (*pitting*) (5).

Los parámetros analizados en D+4 son la división celular, adhesión celular, compactación, fragmentación y vacuolización. Mientras que en D+5 y D+6 es preciso diferenciar en el blastocisto el blastocele, zona pelúcida, masa celular interna (MCI) y trofoectodermo. Teniéndose en cuenta el grado de expansión del blastocele; cuándo comienza a adelgazar la ZP; la homogeneidad del epitelio del trofoectodermo; el número

de células, la forma y la compactación de la MCI; y el nivel de fragmentación y vacuolización (5).



**Figura 3.** Esquema de clasificación de calidad embrionaria en D+2 y D+3 según los criterios propuestos por ASEBIR (5).

Por otro lado, la calidad ovocitaria también es evaluable en aquellos casos en los que la técnica implementada es la ICSI, puesto que se decumulan previamente y se pueden observar. En este caso podríamos distinguir vesículas germinales de ovocitos maduros, granulosidad central, acumulaciones de retículo endoplasmático liso (REL), vacuolas, inclusiones citoplasmáticas, restos celulares en el espacio perivitelino, anomalías en la zona pelúcida, espacio perivitelino aumentado y alteraciones en el primer CP como fragmentación o un tamaño anómalo. Además, sin ser necesaria la decumulación se puede determinar el grado de madurez por la compactación del complejo cúmulo-corona radiata-ovocito. Los ovocitos maduros muestran el cúmulo expandido (5).



D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoctodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión"  Hasta: "Eclosionando"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
		C	A	A
			B	B
D	C	C		
	D	D		
		A,B,C o D	D	
	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)		C	
Mórula no compacta	Mórula		D	

**Figura 4.** Esquema de clasificación de calidad embrionaria en D+4 y D+5 según los criterios propuestos por ASEBIR (5).

### 2.2.6. Transferencia embrionaria

El estadio de blastocisto es el más recomendable para la transferencia embrionaria siendo la práctica más estandarizada, aunque el día óptimo puede variar en los diferentes casos (6). Esta URA no se encuentra activa durante los fines de semana por lo que las transferencias también tienen que ajustarse al horario establecido, siempre que el endometrio se encuentre sincronizado con el tiempo del embrión.

El embrión se prepara para la transferencia en una placa con medio de cultivo en la campana de flujo. Cuando en el quirófano está todo preparado para la realización del procedimiento, el embrión se carga en un catéter. Para ello debe aspirarse aire, medio, aire, el embrión con medio de cultivo, aire y, finalmente, medio. Entonces el ginecólogo, con el catéter y con ayuda de un ecógrafo deposita el embrión en el endometrio de la paciente. Finalmente, es imprescindible comprobar en el laboratorio que el embrión no se haya quedado en el catéter.



### 2.2.7. Vitrificación embrionaria

Los embriones no transferidos, requieren de la vitrificación para su conservación en el tiempo. El objetivo fundamental de esta práctica es la criopreservación exitosa de las células en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  lo que implica: la detención del metabolismo de manera reversible, el mantenimiento de la integridad estructural y genética, lograr tasas de supervivencia aceptables y mantener la competencia de desarrollo tras la descongelación (7). Los agentes crioprotectores son esenciales en este procedimiento. De hecho, durante el proceso los embriones se someten a concentraciones crecientes de estas sustancias químicas. En este caso, se utiliza el kit de vitrificación *RapidVit Omni*<sup>TM</sup> de *Vitrolife*<sup>®</sup> que contiene tres soluciones para vitrificar ovocitos y embriones en todos los estadios. Las soluciones consisten en un medio tamponado con MOPS que contiene gentamicina y albúmina sérica humana. El primer medio no contiene crioprotectores, el segundo tiene etilenglicol y propanodiol y el tercero presenta los mismos crioprotectores que el medio anterior y sacarosa (8).

En primer lugar, se añaden 300  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tres botes del kit, previamente homogenizados, en una placa de cuatro pocillos. Una vez preparada la placa esta se introduce en el incubador para que alcance  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, se preparan las pajuelas de sistema cerrado, con la identificación de la paciente, y el nitrógeno líquido en el soporte *Vitrolife*<sup>®</sup>. Después, se introduce el soporte de pajuelas y se sumerge en el nitrógeno líquido. A continuación, se colocan las pajuelas con varillas de metal en su interior en la zona de carga del soporte de nitrógeno líquido. Entonces, se procede a pasar a los embriones por cada pocillo durante un tiempo determinado y manteniendo la temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En el primer medio permanece unos 5-20 minutos; en el segundo medio, 2-5 minutos; y en el tercer medio, 30-45 segundos. Los cambios de pocillo han de realizarse con el mínimo volumen de medio posible. En el segundo medio los embriones tienden a subir a la superficie. Si esto ocurre, habría que recogerlos y volverlos a colocar en el fondo del pocillo. Para facilitar el procedimiento se toma una gota del tercer medio, de unos 20  $\mu\text{l}$ , y se coloca en otra placa. Mientras el embrión se encuentra en la gota con el tercer medio, se retira la varilla de metal de pajuela. El embrión se coloca, con ayuda de la lupa, en el *Rapid-i*<sup>TM</sup> con el mínimo medio posible y se introduce dentro de la cubierta de la pajuela, haciendo presión con la mano durante unos segundos. Por último, se sellan las pajuelas con ultrasonido. Este proceso se repite para todos los embriones y, finalmente,

se colocan todas las pajuelas en el soporte y se almacenan en el tanque de nitrógeno correctamente identificadas.

### 2.2.8. Biopsia embrionaria en D+3

La biopsia embrionaria es la técnica que consiste en la extracción de una o varias células del embrión, según el estadio en el que se realice (D+3 o D+5), para el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Este procedimiento se lleva a cabo con el fin de detectar, antes de la transferencia embrionaria, alteraciones cromosómicas o enfermedades genéticas hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal. Por consiguiente, permite seleccionar aquellos embriones exentos de las anomalías estudiadas.

Para comenzar es necesario colocar una aguja extra en el micromanipulador para el ácido tyrode. Por lo tanto, quedan dos agujas en la parte derecha, esta y la aguja de extracción. La aguja de extracción hace uso de la respiración bucal para el control de la succión. Asimismo, sería interesante comentar que el especialista que vino a realizar la biopsia mencionó el uso de ácido tyrode para llevar a cabo el *hatching* en el caso de la biopsia en D+3 y el uso del láser para biopsiar en D+5, aunque generalmente se realizan con láser.

El embrión se sujeta con la *holding* mientras se añade un poco de ácido tyrode para realizar un orificio en la zona pelúcida, que permita la salida del blastómero. Una vez realizado esto, se acerca la aguja de extracción y se trata de sacar, con cuidado, una célula. Es importante que la célula extraída tenga núcleo visible. Entonces, el embrión se devuelve al incubador o se vitrifica y el blastómero obtenido se entuba. A continuación, se prepara una placa con diferentes gotas de PBS para lavar las células extraídas. Continuando con el proceso de entubación, se añaden 5 µl de PBS en cada tubo Eppendorf® de PCR. Además, se prepara un tubo adicional con la misma cantidad de PBS que servirá como blanco.

Es imprescindible extremar las precauciones para que en el tubo de PCR no entre ADN contaminante de cualquier otro origen que no sea el blastómero biopsiado. Para evitar confusiones, la empresa encargada de realizar el DGP tiene secuenciado el genoma del especialista que realiza la biopsia.

### 3. Actividades complementarias

Con el fin de completar los créditos necesarios de la asignatura se procedió a ver una serie de *webinars* sobre la vuelta a la rutina en el laboratorio de TRA tras el cese temporal de la actividad debida a la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2. Asimismo, se quiso ampliar el presente trabajo con información sobre la estimulación ovárica.

- 📌 COVID-19 and ART (ESHRE) (9)
- 📌 Recomendaciones para el Laboratorio frente a SARS-CoV-2 (ASEBIR) (10)
- 📌 Individualised Ovarian Stimulation Protocols (My IVF answers) (11)

#### 3.1. COVID-19 y TRA

SARS-CoV-2 es el coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave que ocasiona COVID-19, tratándose de un virus de ARN monocatenario (12). En base a la bibliografía actual (13–17), este virus puede tener potencial para infectar tejidos reproductivos, aunque la información no es consistente. No se ha detectado transmisión vertical (18–23), al igual que con otros coronavirus. No obstante, aún no se tiene información de los resultados en TRA. Por otro lado, parece ser que las mujeres embarazadas no presentan un riesgo mayor de infección o de morbilidad relacionada con COVID-19 (24,25).

Ante esta situación diferentes sociedades como la SEF, ASEBIR o ESHRE han elaborado una serie de recomendaciones y medidas específicas relacionada con las técnicas de reproducción asistida con el fin de disminuir el riesgo de contagio por este virus. En el caso de la SEF y ASEBIR se resumen en cuatro puntos principales (26):

- 📌 Manejo y evaluación de pacientes, acompañantes y donantes que pueden tener la infección antes o durante la realización del tratamiento.
- 📌 Recomendaciones de bioseguridad para cultivo y almacenamiento de gametos y embriones durante la pandemia COVID-19.
- 📌 Proteger la salud del personal brindándoles los medios y las pautas necesarias para actuar en esta situación excepcional.

- ✚ Información a las pacientes sobre las medidas que deben seguirse después de la aplicación de los tratamientos para prevenir la infección durante el embarazo.

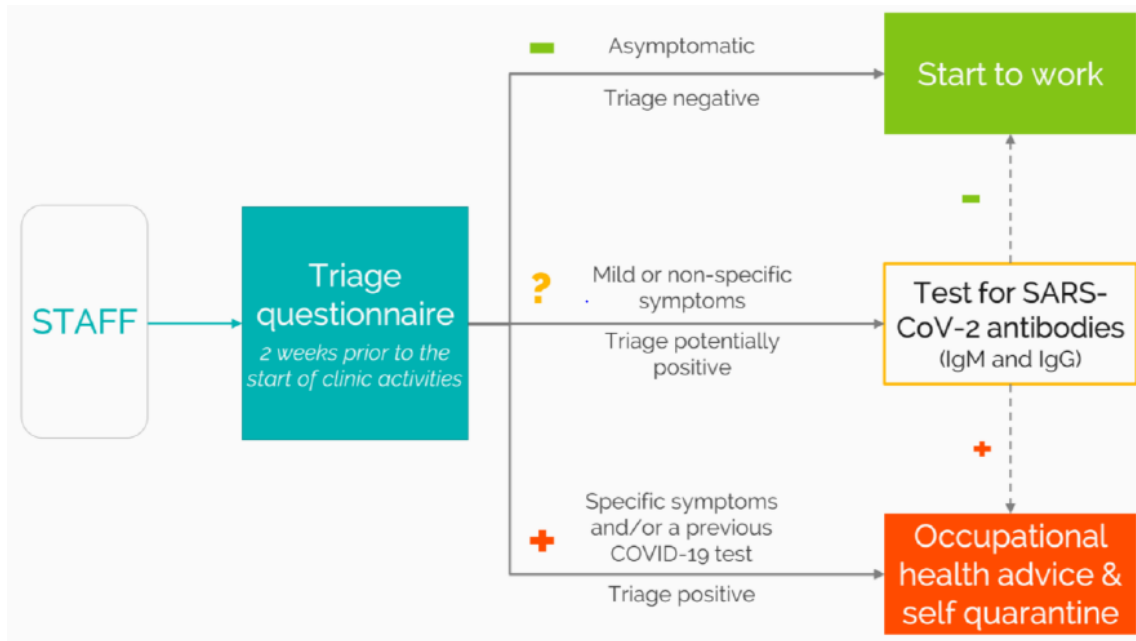
### 3.1.1. Entrevista y cribado

La ESHRE propuso un cuestionario de trece preguntas para los pacientes y el personal que la SEF y ASEBIR redujeron a esta serie de preguntas en referencia a las tres últimas semanas (26):

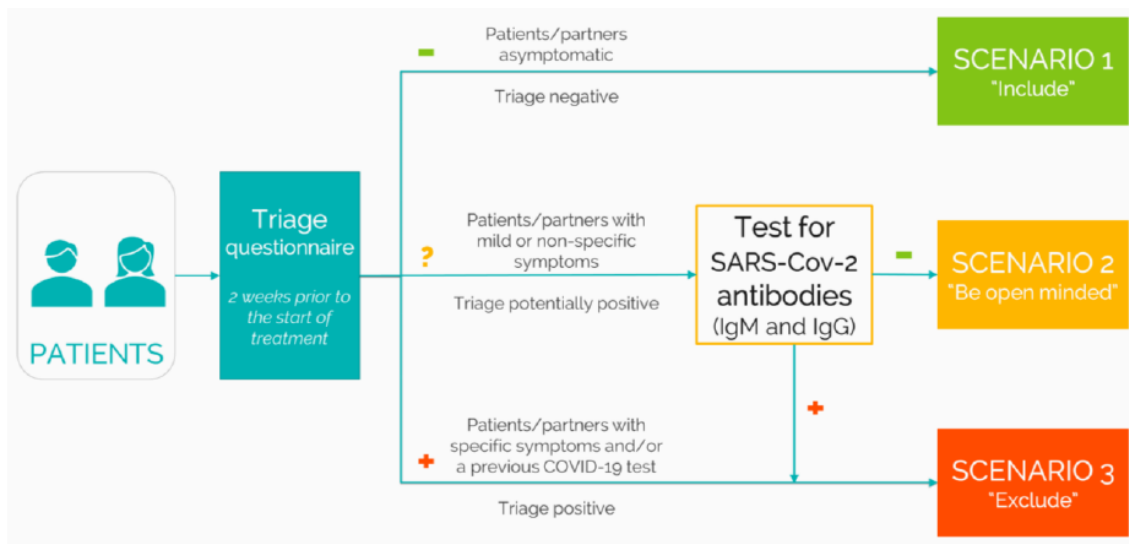
- ✚ ¿Ha tenido contacto con personas con sospecha o afectadas por COVID-19? En caso afirmativo con quién y cuándo.
- ✚ ¿Ha tenido uno o más de los siguientes síntomas: Tos, fiebre, fatiga, dolor muscular, diarrea u otros síntomas sospechosos de COVID-19? Si es así, ¿en qué plazo?
- ✚ ¿Ha sido sometido a aislamiento o cuarentena?
- ✚ ¿Ha sido sometido a alguna prueba diagnóstica (hisopo o análisis de sangre) para COVID-19?
- ✚ ¿Lleva a cabo actividades profesionales con alto riesgo de contagio COVID-19 (médico, enfermera, asistente de trabajador social, etc.)?

La ESHRE recomienda realizar un cribado al personal de la clínica dos semanas antes de retomar la actividad (Figura 5) y a los pacientes dos semanas antes de comenzar el tratamiento (Figura 6) (27). En el caso de los pacientes nos podríamos encontrar tres situaciones: paciente y pareja asintomáticos con cribado negativo; paciente y/o pareja con síntomas suaves o con síntomas no específicos con cribaje potencialmente positivo, a los que se le realizaría el test de anticuerpos; y paciente y/o pareja con síntomas específicos y/o con un test positivo previo con cribado positivo.

Por otro lado, la SEF y ASEBIR proponen un cribado para SARS-CoV-2 en pacientes que tiene en cuenta el test mediante PCR que sería el que nos indicaría una infección actual (Figura 7) (26).



**Figura 5.** Cribado orientado al personal ante su reincorporación a la actividad recomendado por la ESHRE (27).



**Figura 6.** Cribado orientado a los pacientes previo al comienzo del tratamiento recomendado por la ESHRE (27).

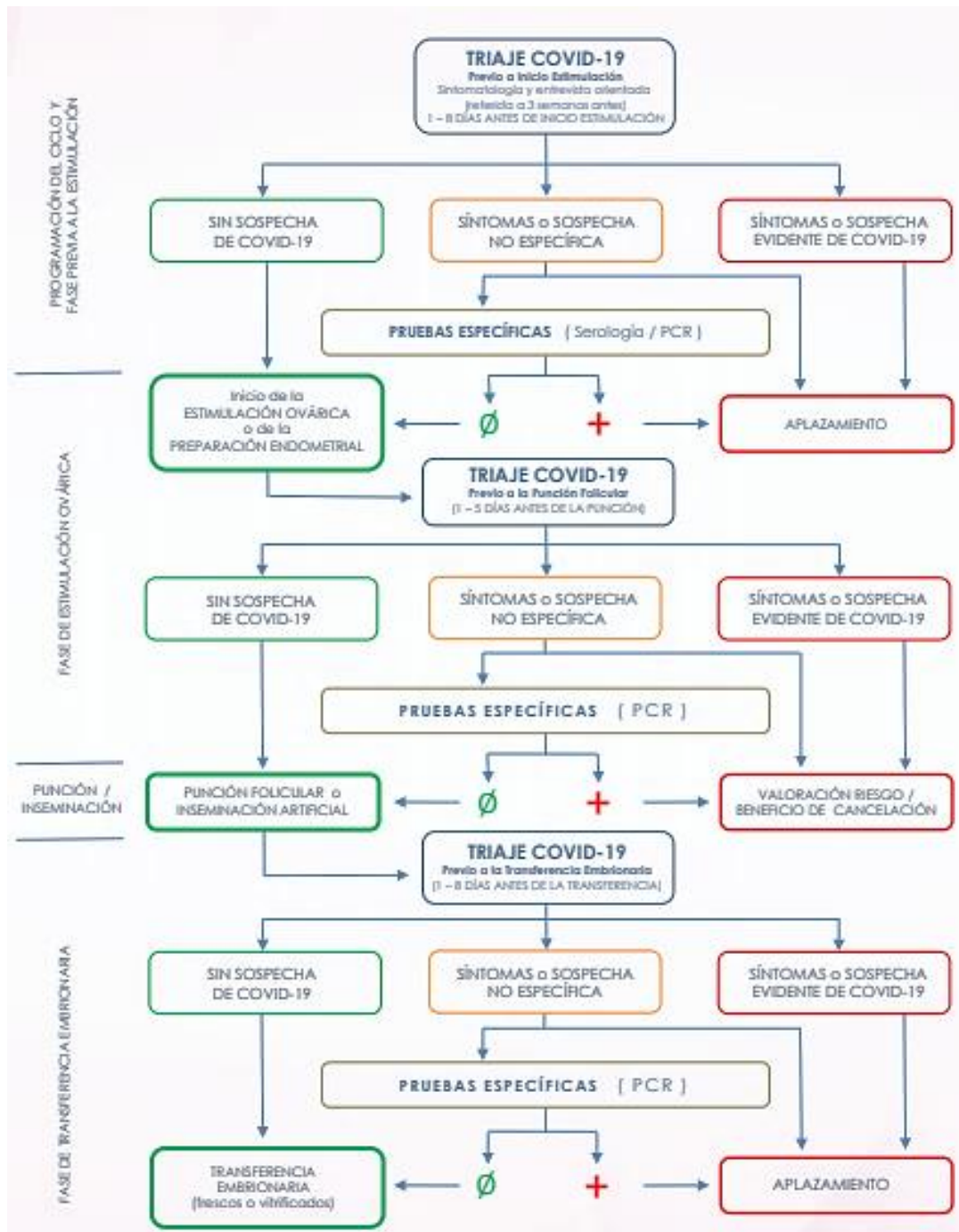


Figura 7. Cribado de SARS-CoV-2 orientado a los pacientes propuesto por la SEF y ASEBIR (26).

Además, se considera imprescindible que antes de comenzar cualquier tratamiento se discuta con los pacientes el conocimiento científico sobre la infección e informarles sobre los riesgos para su salud si se infectan y sobre las medidas de protección que deben adoptar. Finalmente, la decisión final sobre si continuar con el tratamiento debe acordarse

y quedar reflejada en la historia clínica y realizarse la firma del consentimiento informado, además del habitual, que contempla los riesgos específicos por COVID-19 (26).

### 3.1.2. Adaptaciones de los servicios de TRA

Existe la posibilidad de que el cribado falle. Por lo tanto, son necesarias una serie de medidas para la reducción del riesgo (27):

- ✚ Saneamiento. Continuar con la rutina de limpieza habitual y en caso de paciente o personal positivo para COVID-19 utilizar saneamiento específico. No obstante, se desaconsejan los productos químicos tóxicos para los embriones.
- ✚ Adaptación del centro y el personal. Instrucción al personal y a los pacientes, procedimientos adaptados a la situación, trabajo por turnos y grupos reducidos.
- ✚ Procedimientos de acceso. Limitación del número de personas presentes de manera simultánea, pantallas de protección para el personal administrativo, equipos de protección personal y dispositivos de saneamiento, restricción de acceso para socios y acompañantes, rediseño de salas de espera y espacios de trabajo para garantizar un distanciamiento adecuado, gestión de citas según horarios específicos y valorar la instauración de otras formas de comunicación no presencial como videollamada o llamadas telefónicas.

### 3.1.3. COVID-19 y el laboratorio de TRA

Se considera que la buena práctica de los protocolos habituales dentro del laboratorio de reproducción humana es suficiente para prevenir el contagio entre embriólogos, pacientes y la contaminación de muestras reproductivas para agentes biológicos como es el SARS-CoV-2. Además, no hay una evidencia consistente de que los pacientes COVID-19 positivos suelen presentar partículas virales en el eyaculado, lo que en el caso de haberse reducida con el tratamiento de la muestra, o en los ovocitos. Asimismo, se considera que el personal del laboratorio tiene una exposición baja al riesgo, dado que no tiene contacto estrecho con los pacientes. No obstante, atendiendo al principio de precaución universal se recomiendan una serie de adaptaciones (26):

- ✚ Distancia de seguridad entre embriólogos, si el diseño del laboratorio lo permite.
- ✚ En caso de compartir lupas o microscopios, utilizar protección ocular o llevar a cabo la limpieza de los mismos.
- ✚ Uso de gafas o máscara de protección, mascarillas FFP2 y guantes.
- ✚ Considerar las muestras y fluidos corporales (eyaculado, tejido testicular o tejido folicular) como potencialmente contagiosas.
- ✚ Se recomienda procesar todas las muestras de eyaculado y líquido folicular en una cabina de seguridad biológica tipo II, a menos que no estuviera disponible o se considere perjudicial para el material biológico por no tener placa calefactada. Sin embargo, aunque los ovocitos una vez decumulados y las muestras capacitadas de pacientes estándares, pueden manipularse sin guantes al considerarse no infecciosas, se usarán los equipos de protección mientras duren las restricciones de las autoridades sanitarias.
- ✚ Cuando se deba almacenar material biológico reproductivo de pacientes con infección por SARS-CoV-2, se recomienda, mientras no haya más información, el uso de soportes de seguridad, tanques de vapor de nitrógeno líquido o tanques independientes para estos pacientes.

### 3.2. Protocolos de estimulación ovárica individualizados

Para comenzar un ciclo de FIV es necesaria la estimulación ovárica para lo que pueden utilizarse diversos tratamientos. El protocolo elegido debe ajustarse a cada paciente. Por consiguiente, se evalúan diferentes parámetros predictivos de la respuesta ovárica con el fin de encontrar el más adecuado para cada mujer. La optimización de dicha respuesta se basa, fundamentalmente, en la determinación de la reserva ovárica y en resultados de ciclos previos. Además, también se tienen en cuenta otros factores como la edad de la mujer, la historia reproductiva, la causa de subfertilidad, la duración de la subfertilidad y el número de ovocitos recuperados, ovocitos fertilizados, de embriones de buena calidad y de blastocistos disponibles en ciclos previos. Por lo tanto, la elección del protocolo debe fundamentarse en la experiencia clínica y práctica, en la mejor evidencia publicada, en las características de la paciente y en las expectativas que se tienen.



En el caso de la estimulación hay tres grupos de pacientes que suponen un reto mayor: aquellas mayores de 37 años, las que presentan una reserva ovárica muy alta o muy baja y las pobres respondedoras recurrentes. En cuanto a la edad, se sabe que va disminuyendo el número de folículos y aumenta la proporción de ovocitos de mala calidad (28), aunque hay una fuerte variabilidad para la reserva ovárica entre individuos en el mismo grupo de edad (29).

### 3.2.1. Reserva ovárica

En realidad, no se puede medir la reserva ovárica, se evalúa su función. Los parámetros que se han sugerido como medidas más certeras de la reserva de folículos primordiales son la edad, el recuento de folículos antrales (RFA) y la determinación de la hormona antimulleriana (HAM) (30).

### 3.2.2. Tasa de recuperación folicular

La respuesta a la estimulación puede determinarse mediante la tasa de recuperación folicular (FORT) que se define como la relación del recuento de folículos preovulatorios (16-22 mm) en el día de la administración del desencadenante de la ovulación y el recuento de folículos antrales pequeños al inicio de la estimulación (3-8 mm). En este contexto, las pacientes se dividen en tres grupos (31):

- ✚ Tasa de recuperación folicular baja → FORT < 42 %
- ✚ Tasa de recuperación folicular media → FORT = 42-58 %
- ✚ Tasa de recuperación folicular alta → FORT > 58 %

Aunque una buena respuesta ovárica a la estimulación no depende solo del número de ovocitos recuperados, habría que valorar el número obtenido de ovocitos en metafase II y de embriones, el porcentaje de embarazo clínico por cada ovocito recuperado y la tasa de implantación.

### 3.2.3. Número óptimo de ovocitos obtenidos

La oportunidad de niño nacido vivo en un ciclo de FIV se asocia con el número de ovocitos, obteniéndose los mejores resultados con unos 15 ovocitos y disminuyendo con más de 20. Por lo tanto, esto podría ser utilizado para informar sobre el potencial de los resultados y reducir el riesgo de complicaciones. No obstante, esta probabilidad disminuye con la edad (32).

### 3.2.4. Protocolos de estimulación

- ✚ Protocolo con antagonistas de GnRH. Lo suelen recomendar en mujeres con Síndrome de ovarios poliquísticos, hiperrespondedoras y donantes de ovocitos. Entre sus características se encuentran: ausencia del efecto flare-up al inicio de la estimulación, son ciclos más cortos, se utiliza una menor cantidad de gonadotropinas, la estimulación es más individualizada, presenta una menor incidencia de SHO y se pueden elegir los desencadenantes de la ovulación.
- ✚ Protocolo largo con agonistas de GnRH. Se recomienda en mujeres con endometriosis y normo-respondedoras. Consiste en un tratamiento más largo que suele comenzar entre los días 21-28 del ciclo anterior, permite el ajuste de la dosis de gonadotropinas, se trata de una estimulación menos individualizada, presenta una incidencia baja de SHO y es necesario desencadenar la ovulación con hCG.
- ✚ Protocolo micro-flare, una adaptación del protocolo con agonistas de GnRH. Se recomienda en mujeres con baja reserva ovárica y bajas respondedoras. Se trata de un tratamiento más corto, pueden utilizarse anti-estrógenos o inhibidores de la aromatasa para aumentar la estimulación, permite el ajuste de la dosis de gonadotropinas (FSH y LH), permite la estimulación individualizada y se desencadena la ovulación con hCG.

Para llevar a cabo la estimulación ovárica es necesario también el tratamiento con gonadotropinas. La administración con FSH es suficiente, sin embargo, en la práctica clínica, las mujeres con peores factores de pronóstico son tratadas, generalmente, con una combinación de LH y FSH ya que hay estudios que sugieren que esta modificación podría mejorar la calidad de los ovocitos recuperados (33).

En el contexto de la elección del protocolo más adecuado para una paciente, la dosis de gonadotropinas depende del recuento de folículos antrales, la edad y la respuesta a una estimulación previa (Tabla 1)

RFA	Dosis de gonadotropinas	Protocolo
≥ 25	100 UI FSH	Antagonista de GnRH
> 16	112,5 / 150 UI FSH	Antagonista de GnRH o agonistas de GnRH largo
[8 – 16]	225 / 150 UI FSH	Agonistas de GnRH largo
[4 – 8)	225 UI FSH + 75 UI LH	Micro-flare
	150 UI r-LH	Micro-flare (si la respuesta anterior fue baja o tiene más de 37 años)
< 3	225 UI r-FSH + 150 UI LH	Micro-flare

**Tabla 1.** Dosis de gonadotropinas y protocolo a utilizar según el recuento de folículos antrales (11).

Por otro lado, también se consideran los ciclos de estimulación ovárica consecutivos para acumular un mayor número de ovocitos que aumente el número de blastocistos disponibles en pacientes que pueden presentar una respuesta subóptima o que ya la hayan presentado. Este procedimiento puede ser de bastante utilidad para PGT-a, limitar el impacto de la edad en la función ovárica y reducir los costes de repetir ciclos en fresco y diferidos.

#### 4. Reflexión personal

Las prácticas realizadas han sido una perfecta oportunidad para el conocimiento del funcionamiento de una Unidad de Reproducción Asistida sujeta a la sanidad pública y para la aplicación de la teoría estudiada en el máster. No obstante, debido a la interrupción de las mismas por motivos excepcionales no he podido realizar muchos de los procedimientos que se llevan a cabo de manera habitual. Aún así, aunque no realizara muchas en primera persona, presencié todas las técnicas rutinarias en el período que acudí a la unidad y me las explicaron paso por paso, resolviendo todas las dudas que me surgían. Por lo tanto, sería importante destacar el gran trabajo de Vanesa y Lourdes como instructoras de dichas prácticas y a las que me gustaría agradecer su implicación.

## 5. Bibliografía

1. Dorado M, López-Granollers G, Bataller J, Domingo A, Munuera A, García-Mengual E, et al. Biopsia testicular. ASEBIR. 2019;24:23–31.
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>a</sup>. Geneva; 2010.
3. Sánchez I, Mar C, Castilla JA, Marcos M, Martín I, Galán A, et al. Técnicas para la preparación de semen en reproducción asistida. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2009.
4. Vitrolife®. Manual de RapidWarm Omni. 2019.
5. ASEBIR. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 3<sup>a</sup>. 2015.
6. González Iglesias G. Ventajas e inconvenientes de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto y d+3 en la reproducción asistida. ASEBIR. 2017;22(1):11–5.
7. Liebermann J. Chapter 11 Human Embryo Vitrification. *Methods Mol Biol*. 2017;1568:141–59.
8. Vitrolife®. Manual de RapidVit Omni. 2019.
9. Veiga A, Ata B, Vermeulen N, Gianaroli L, Mocanu E. COVID-19 and ART [Internet]. European Society of Human Reproduction and Embryology. 2020 [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.eshre.eu/COVID19/webinar>
10. Urrías A, Buch B, González de Bustamante B, Prados N. Recomendaciones para el Laboratorio frente a SARS-CoV-2 [Internet]. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. 2020 [cited 2020 May 24]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=3G2eml34G4Y&feature=youtu.be>
11. Nardo L. Individualised ovarian stimulation protocols [Internet]. MyIVFanswers. 2020 [cited 2020 May 25]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=ohSJ2FN04R8&t=14s>
12. Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (Novel

- Coronavirus 2019) – recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Scienses*. 2020;24(4):2006–11.
13. Li D, Jin M, Bao P, Zhao W, Zhang S. Clinical characteristics and results of semen tests among men with coronavirus disease 2019. *JAMA Netw Open*. 2020;3(5):e208292.
  14. Wang Z, Xu X. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. *Cells*. 2020;9(4):920.
  15. Reis FM, Bouissou DR, Pereira VM, Camargos AF, dos Reis AM, Santos RA. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertil Steril*. 2011;95(1):176–81.
  16. Colaco S, Singh N, Bhide A, Singh D, Singh A, Husein A, et al. Expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and the spike protein processing enzymes in developing human embryos. 2020.
  17. Hosier H, Farhadian S, Morotti R, Deshmukh U, Lu-Culligans A, Campbell K, et al. First case of placental infection with SARS-CoV-2. 2020.
  18. A case report of neonatal COVID-19 infection in China. *Clin Infect Dis Soc Am*. 2020;ciaa225.
  19. Yu N, Li W, Kang Q, Xiong Z, Wang S, Lin X, et al. Clinical features and obstetric and neonatal outcomes of pregnant patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective, single-centre, descriptive study. *Lancet*. 2020;20(5):559–64.
  20. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in infants born to mothers with COVID-19 pneumonia. *JAMA*. 2020;323(18):1848–9.
  21. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers With COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. 2020;323(18):1848–9.
  22. Zamaniyan M, Ebadi A, Aghajanoor Mir S, Rahmani Z, Haghshenas M, Azizi S. Preterm delivery in pregnant woman with critical COVID-19 pneumonia and vertical transmission. *Prenat Diagn*. 2020;

23. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn. *JAMA*. 2020;323(18):1846–8.
24. Mullins E, Evans D, Viner RM, O'Brien P, Morris E. Coronavirus in pregnancy and delivery: rapid review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2020;55(5):586–92.
25. Chen L, Li Q, Zheng D, Jiang H, Wei Y, Zou L, et al. Clinical characteristics of pregnant women with Covid-19 in Wuhan, China. *N Engl J Med*. 2020;NEJMc2009226.
26. ASEBIR, SEF. Recomendaciones para la seguridad y reducción de riesgos ante la infección por coronavirus (SARS-CoV-2) en las unidades de reproducción asistida. 2020.
27. ESHRE. ESHRE guidance on recommencing ART treatments. 2020.
28. P de BJ, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CWN, et al. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod*. 2004;70(2):419–24.
29. Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*. 2010;5(1):e8772.
30. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril*. 2011;95(1):170–5.
31. Gallot V, Berwanger da Silva AL, Genro V, Grynberg M, Frydman N, Fanchin R. Antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration assessed by the Follicular Output RaTe (FORT) may predict in vitro fertilization-embryo transfer outcome. *Hum Reprod*. 2012;27(4):1066–1072.
32. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod*. 11AD;26(7):1768–74.

33. Levi-Setti PE, Zerbetto I, Baggiani A, Zannoni E, Sacchi L, Smeraldi A, et al. An observational retrospective cohort trial on 4,828 IVF cycles evaluating different low prognosis patients following the POSEIDON criteria. *Front Endocrinol.* 2019;10:282.