



Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

# **Cambios epigenéticos asociados a la Reproducción Asistida**

**ESTRELLA FERNÁNDEZ JIMENEZ**

**TUTOR: LOURDES CASTRO SÁNCHEZ**

**Junio 2024**

**Palabras clave:** epigenética, técnicas de reproducción asistida, genes improntados, reprogramación epigenética, impronta genómica, metilación del ADN, estimulación hormonal, criopreservación, cultivo in vitro.

## **RESUMEN**

Desde 1978 con el nacimiento de Louise Brown, más de 10 millones de niños han sido concebidos gracias a las técnicas de reproducción asistida (TRA). Sin embargo, son escasos los estudios a largo plazo que confirmen la seguridad de estas técnicas. Se desconocen los efectos que pueda tener la manipulación de gametos y embriones in vitro sobre la salud de la descendencia. No obstante, cada vez hay más estudios que tratan de esclarecer estos aspectos, aunque los resultados obtenidos siguen siendo confusos, o no concluyentes en muchos casos. Probablemente debido a la heterogeneidad de la población en estudio y de la metodología empleada. La influencia de las TRA sobre la epigenética y la expresión génica es uno de los aspectos sobre los que se ha investigado. Desde el punto de vista epigenético, durante el desarrollo de la línea germinal y el desarrollo temprano del embrión preimplantacional, se producen oleadas de reprogramación epigenética, susceptibles a los cambios ambientales provocados por la estimulación ovárica, fertilización in vitro, cultivo de embriones, y/o criopreservación, lo que puede conllevar a una expresión inadecuada por alteraciones en el imprinting a consta de las TRA. Con esta revisión lo que se pretende es recopilar y analizar la información al respecto haciendo hincapié en los cambios epigenéticos ocasionados durante el procedimiento in vitro de las TRA que pudiesen tener efecto en la salud de la futura descendencia.

## ÍNDICE

1. Introducción
  - 1.1 Epigenética
  - 1.2 Impronta genómica
  - 1.3 Reprogramación epigenética
2. Objetivos
3. Diseño del estudio
4. Trastornos de impronta genómica asociados con TRA
  - 4.1 Síndrome de Beckwith Wiedemann
  - 4.2 Síndrome de Silver Russell
  - 4.3 Síndrome de Prader Willy
  - 4.4 Síndrome de Angelman
  - 4.5 Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria
5. Infertilidad y edad avanzada, influencia en la expresión epigenética
6. Interacción entre las TRA y los cambios epigenéticos
  - 6.1 Efecto epigenético de la estimulación ovárica
  - 6.2 Efecto epigenético del cultivo in vitro
  - 6.3 Efecto epigenético de la criopreservación y transferencia de embriones congelados
    - 6.3.1 Criopreservación de ovocitos
    - 6.3.2 Criopreservación de espermatozoides
    - 6.3.3 Criopreservación de embriones
  - 6.4 Efecto epigenético de la ICSI
  - 6.5 Efecto epigenético de la maduración in vitro
  - 6.6 Efecto epigenético de la biopsia del trofoectodermo
7. Conclusiones
8. Anexos
9. Bibliografía

## ABREVIATURAS

- 5mC, 5-metilcitosina
- 5hmC, 5 hidroximetilcitosina
- ADN, ácido desoxirribonucleico
- AMH, hormona antimülleriana
- ARN, ácido ribonucleico
- AS, síndrome de Angelman
- ASRM, del inglés American Society for Reproductive Medicine
- BPA, bisfenol A
- BWS, síndrome de Beckwith-Wiedemann
- CNV, del inglés, copy number variants
- CPA, crioprotectores
- CPG, células primordiales germinales
- DGP, diagnóstico genético preimplantacional
- DNMT, ADN metiltransferasas
- DMR, del inglés differentially methylated regions
- DOHaD, del inglés, Developmental Origin of Health and Disease
- E2, estradiol sérico
- ER $\alpha$ , receptor de estrógeno alfa
- FBS, del inglés fetal bovine serum
- FET, del inglés Frozen Embryos Transfer
- FIV, fecundación in vitro
- FSH, hormona folículo estimulante
- GnRH, hormona liberadora de gonadotropina
- HAT, histonas acetiltransferasas
- hCG, hormona gonadotropina coriónica humana
- HDAC, histonas desacetilasas
- ICR, del inglés Imprinting Control Region
- ICSI, inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- ID, del inglés imprinting disorders
- IFN $\gamma$ , interferón gamma

- IG, del inglés imprinting genes
- MCI, masa celular interna
- MIV, maduración in vitro
- MTHFR, metilentetrahidrofolato reductasa
- PWS, síndrome de Prader-Willi
- ROS, especies reactivas de oxígeno
- SART, del inglés Society for Assisted Reproductive Technology
- SEF, Sociedad Española de Fertilidad
- SHO, síndrome de hiperestimulación ovárica
- SNV, del inglés single nucleotide variants
- SOP, síndrome de ovarios poliquísticos
- SRS, síndrome de Silver Russell
- TET, enzimas diez-once translocación metilcitosina dioxigenasas
- TF, trofoectodermo
- TNDM, del inglés transient neonatal diabetes mellitus
- TRA, técnicas de reproducción asistida
- UDP, del inglés uniparental disomy
- uNK, del inglés natural killer cells
- VEGF, del inglés vascular endothelial growth factor
- VOCs, del inglés Volatile Organic Compounds
- ZGA, del inglés zygotic genome activation

## 1. Introducción

La reproducción asistida es una rama importante en la medicina, que ha nacido como solución a los problemas de fertilidad cada vez más presentes en la población. De hecho, desde los primeros registros europeos del uso de estas técnicas en 2014, hasta los últimos datos en 2022, se ha presenciado un incremento de hasta el 33%, superándose los 10 millones de individuos nacidos gracias a estas técnicas desde 2022 <sup>(20)</sup>.

La reproducción asistida comprende procedimientos como la estimulación ovárica, manipulación de gametos, maduración in vitro de ovocitos (MIV), fecundación in vitro (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), cultivo y transferencia de embriones, criopreservación y diagnóstico genético preimplantacional (DGP) <sup>(9,83)</sup>. Aunque la mayoría de los niños concebidos con estas técnicas presentan buena salud, diversas publicaciones han reportado que su uso podría asociarse con resultados perinatales adversos, a corto y a largo plazo, entre los que se incluyen prematuridad, bajo peso al nacer <sup>(2,3,9)</sup>, malformaciones congénitas, enfermedades músculo esqueléticas, y cardiovasculares (función diastólica deficiente, engrosamiento de la pared vascular y mayor riesgo de cardiopatías congénitas) <sup>(2,4,9,54,83)</sup>, alteraciones metabólicas, principalmente en el metabolismo glucídico y lipídico <sup>(4,9,54)</sup>, trastornos del neurodesarrollo <sup>(3,26,82)</sup>, parálisis cerebral, predisposición al cáncer, así como diversos trastornos de impronta como el síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), síndrome de Prader-Willi (PWS), síndrome de Silver Russell (SRS) y el síndrome de Angelman (AS) <sup>(4,12,22,26,45,80)</sup>. En el caso de la madre, el uso de las TRA se ha asociado a un aumento de trastornos hipertensivos durante el embarazo, desprendimiento placentario, hemorragia en el tercer trimestre y una mayor necesidad de cesárea <sup>(2,22,26,60,80,83)</sup>.

Según la teoría del Origen del Desarrollo de la Salud y de la Enfermedad (DOHaD, del inglés, Developmental Origin of Health and Disease), cambios en las condiciones ambientales durante el desarrollo embrionario, conlleva a una reprogramación epigenética y expresión genética inapropiada causando enfermedad en la edad adulta con posible efecto transgeneracional <sup>(2,3,9,59,83)</sup>.

Las TRA implican intervenciones no fisiológicas a nivel clínico y del laboratorio que podrían alterar el epigenoma de los gametos y del embrión al coincidir con el momento crítico de reprogramación epigenética global y establecimiento de huellas genéticas del embrión <sup>(2,9,83)</sup>. En ese momento, el genoma es más vulnerable a las influencias externas

ambientales como son los cambios de temperatura, pH, tensión de oxígeno, factores químicos constituyentes de los medios de cultivo o criopreservación, o factores físicos asociados a la microinyección, biopsia embrionaria, etc <sup>(2,4,22,80)</sup>, con afecto principal a genes que controlan el crecimiento y desarrollo placentario, así como el intercambio de nutrientes entre la placenta y el feto <sup>(2)</sup>. Alteraciones en el transcriptoma de estos genes modulan el desarrollo embrionario, comprometiendo el estadio fetal, postnatal y adulto de los niños concebidos por TRA, con posible efecto transgeneracional <sup>(2,4)</sup>. Se desconocen los mecanismos responsables de la aparición de estos trastornos, o si estos pudieran estar influenciados por otros factores como son la infertilidad subyacente de los progenitores, la exposición a contaminantes ambientales, el estilo de vida y hábitos de los padres durante el embarazo entre otros (Figura 1) <sup>(22,46,80)</sup>.

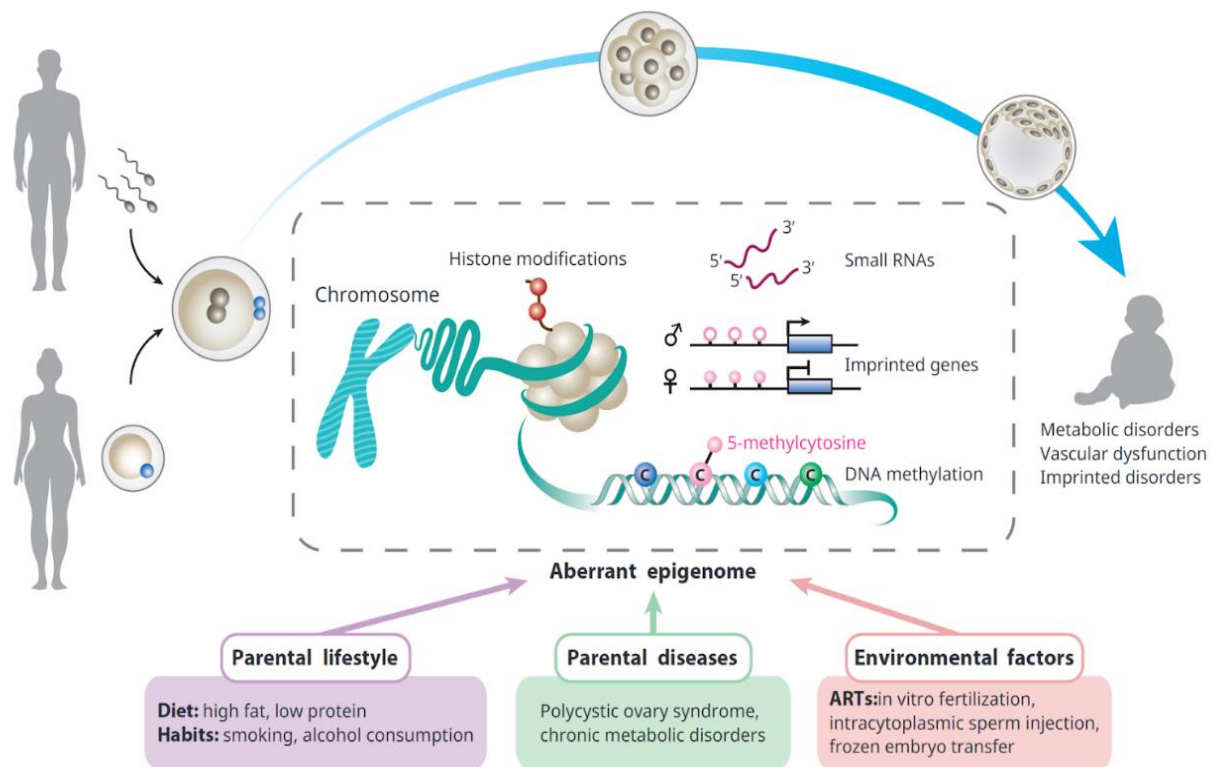


Figura 1 del artículo Wang Y et al., 2019: El epigenoma es susceptible a cambios externos durante la reprogramación del embrión en estadio temprano y en la formación de células primordiales germinales (CPG). Así, el estilo de vida de los padres, las enfermedades que pudiesen tener, u otros factores externos como las TRA, pueden tener impacto en el epigenoma de la descendencia a través de pequeños ARN, metilación del ADN o impronta genética, condicionando con todo esto la salud de la descendencia <sup>(80)</sup>.

## 1.1 Epigenética

Conrad Waddington, en 1942, fue el primero en enfatizar la importancia de los cambios ambientales en las primeras etapas del desarrollo embrionario de mamíferos, e introdujo el término de epigenética <sup>(62,65)</sup>. Actualmente se define como, un mecanismo regulador de expresión de genes que conduce a cambios hereditarios en función de las condiciones ambientales, sin implicar cambios en la secuencia de ADN. Esto permite dotar de identidad a las distintas células y tejidos a través de la reorganización de la cromatina y expresión diferencial del genoma, siendo la metilación del ADN el mecanismo principal de regulación epigenética <sup>(62,65)</sup>.

La metilación de ADN consiste en la adición de un grupo metilo, mediante las ADN metiltransferasas (DNMT), en la posición 5' del anillo de citosina pirimidina en el dinucleótido CG para formar 5-metilcitosina (5mC), motivo por el cual encontramos zonas calientes susceptibles a metilación en el ADN conocidas como islas CpG <sup>(65,68)</sup>. Estas modificaciones epigenéticas son mantenidas en las células hijas mediante las DNMT que pueden ser de cinco tipos diferentes: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b y Dnmt3L <sup>(65)</sup>. En concreto, Dnmt1 copia marcas de metilación preexistentes en cadenas de ADN hijas después de la replicación del ADN funcionando así, como una DNMT de mantenimiento, mientras que Dnmt3a y Dnmt3b metilan secuencias no metiladas previamente, es decir, de novo <sup>(68,69,80)</sup>. La metilación en regiones reguladoras como promotores y potenciadores que contienen las islas CpG, interfiere con la unión del factor de transcripción produciendo así el silenciamiento de los genes <sup>(62,65,68)</sup>. La metilación del ADN es particularmente importante en la regulación de la inactivación del cromosoma X, genes improntados y elementos transponibles, permitiendo la adquisición e identidad celular en los diferentes linajes <sup>(3,4,17,62,65)</sup>.

Otras regulaciones epigenéticas comprenden modificaciones postraduccionales de histonas como es la acetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación. A diferencia de la metilación de ADN, la acetilación de histonas, regulada por las histonas acetiltransferasas (HAT), permite la relajación de la estructura de la cromatina y con ello una mejor accesibilidad del ADN a los factores de transcripción y proteínas reguladoras, lo que conduce a una mayor actividad transcripcional. Por el contrario, la desacetilación, por las histonas desacetilasas (HDAC), se correlaciona con la inactivación transcripcional y el silenciamiento de genes. La adición o eliminación de polipéptidos SUMO, como modificadores de la ubiquitina en los residuos de lisina, son esenciales para la maduración,



reanudación meiótica y formación del huso en los ovocitos. Finalmente, la lactilación, dependiente de los niveles de lactato celular, estimula directamente la transcripción genética <sup>(62,65)</sup>.

## 1.2 Impronta genómica

Los cambios en la metilación de ADN ocurren a nivel del genoma completo, sin embargo, toma mayor importancia en los conocidos genes improntados o genes de impronta (IG, del inglés imprinting genes). Estos genes se caracterizan por tener uno de sus dos alelos silenciado epigenéticamente a través regiones diferencialmente metiladas (DMR, del inglés differentially methylated regions), lo que conduce a un patrón de expresión monoalélico <sup>(4,8,16,24,29,62,65,68,80)</sup>. Existen dos tipos de DMR: DMR primarios o de la línea germinal, que adquieren su estado de metilación durante la formación de CPG y permanecen estables durante la edad adulta; y DMR secundarios o somáticos, que adquieren sus modificaciones de metilación tras la fertilización basados en la regulación de los DMR de la línea germinal, es decir, de los progenitores <sup>(4)</sup>. Otras formas de regulación son a través de modificaciones en las histonas, o ARN no codificantes, que modifican la estructura cromosómica espacial y la accesibilidad de transcripción de los IG. En el caso de que un IG muestre una inhibición en el locus materno, pero no en el locus paterno, se dice que ese gen presenta una impronta materna. De forma contraria, un IG con inhibición en el locus paterno y expresión del locus materno, se dice que presenta impronta paterna <sup>(80)</sup>. Esto hace que actúe de forma funcional como haploide, eliminando la protección de expresión de su otro alelo en cuanto a su efecto por mutaciones recesivas o regulaciones epigenéticas <sup>(8)</sup>.

Estos genes, a su vez, suelen verse agrupados en dominios cromosómicos, cuya expresión se encuentra controlada por una única región denominada centro regulador de la impronta (ICR, del inglés Imprinting Control Region) <sup>(29,45,80)</sup>. La expresión correcta de estos genes es fundamental para el crecimiento y desarrollo neonatal, y comportamiento postnatal, expresados predominantemente en la placenta y en el cerebro <sup>(2,10,29,60,65)</sup>. Durante el desarrollo de las líneas germinales parenterales, las DNMT metilan las ICR de forma específica a través de DMR, que se mantendrán estables durante todo el desarrollo de las células somáticas <sup>(8,68,80)</sup>. Estas variantes epigenéticas se heredan de forma autosómica dominante con penetrancia incompleta dependiendo del sexo del progenitor, persisten en la reprogramación epigenética posterior a la fertilización, y actúan como memoria del origen parental en la siguiente generación <sup>(16,29,46,80)</sup>. Esta cualidad refleja, por tanto, que

cualquier alteración en la impronta genómica, no solo podría tener influencia en el desarrollo embrionario o placentario, sino que, además, compromete el desarrollo metabólico en el adulto y en la siguiente generación <sup>(16,24,29,69,80)</sup>.

Hasta ahora, se conocen 149 IG en ratones y 128 IG en humanos <sup>(8)</sup>, que influyen principalmente en el desarrollo placentario, y crecimiento intrauterino y posnatal a través de la regulación de órganos y vías metabólicas (Anexo 1, recopilación de algunos IG en ratones y humanos que intervienen en el crecimiento y metabolismo embrionario) <sup>(16,65)</sup>. Existen algunos trastornos, denominados trastornos de impronta (ID, del inglés imprinting disorders) que han sido bien identificados como consecuencia de una alteración en la metilación del ADN en IG a causa del uso de TRA, cómo es el caso de la diabetes mellitus neonatal transitoria (TNDM, del inglés transient neonatal diabetes mellitus), BWS, AS, PWS y SRS <sup>(9,12,16,24,29,45,65,80)</sup>. La gran mayoría de ellos se diagnostican durante la infancia, aunque este puede retrasarse debido a un amplio espectro fenotípico. Estudios en ratón han demostrado que los procesos de estimulación ovárica y el cultivo de embriones in vitro, son los principales responsables de estos trastornos en comparación con otros procedimientos de las TRA. Sin embargo, que un ID esté más asociado a la influencia de las TRA que otro, tan solo indica que algunos loci son más vulnerables a las condiciones externas que otros <sup>(28)</sup>. Destacan principalmente los genes encontrados en la región 11p15.5 con su gran implicación en el crecimiento y desarrollo embrionario <sup>(16)</sup>.

Las ID pueden manifestarse por diferentes etiologías que afecten a los genes causantes como son variantes en el número de copias del gen (CNV, del inglés, copy number variants), variantes de un solo nucleótido (SNV, del inglés single nucleotide variants), disomía uniparental (UDP, del inglés uniparental disomy) o cambios epigenéticos en las DMR de los IG responsables de la enfermedad <sup>(10)</sup>. Además, alteraciones en otros genes pueden también causar ID por su influencia sobre IG. Un ejemplo de ello son los genes partícipes de la maquinaria de metilación como *PLAG1* y *HMGA2* que influyen en el funcionamiento de *IGF2* y pueden desarrollar un fenotipo tipo SRS <sup>(16)</sup>.

### 1.3 Reprogramación epigenética

Las marcas de metilación se heredan de forma estable durante las divisiones mitóticas de las células. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, se producen dos oleadas de reprogramación en el perfil de metilación de CpG en todo el genoma. La primera, en etapas previas de la implantación embrionaria o embriogénesis temprana, y la segunda durante la formación de las CPG del embrión <sup>(22,65,80)</sup>.

Tras la fertilización, se produce una ola de desmetilación del ADN diferencial en el caso del genoma paterno y materno <sup>(65)</sup>, quedando exentas las marcas de metilación establecidas en los ICR de loci de IG paternos y maternos, gracias a un mecanismo de protección KRAB-KZFP <sup>(4,16)</sup>. En concreto, la secuencia TGCCGC específica de los ICR de los ovocitos es reconocida por ZFP57 y ZFP45, quienes reclutan a las DNMT, KAP1 (proteína asociada a KRAB) y otros factores silenciadores <sup>(4)</sup>.

En ratones se ha visto que, en el caso del genoma paterno, se va a producir una rápida y activa desmetilación del ADN, entre las 6 y 8 horas tras la fertilización <sup>(46)</sup>, gracias a la acción de las enzimas diez-once translocación metilcitosina dioxigenasas 1 y 3 (TET1 y TET3), que oxidan la 5 metilcitosina (5mC) en 5 hidroximetilcitosina (5hmC), permitiendo una mayor accesibilidad al ADN <sup>(80)</sup>. Por el contrario, el genoma materno sufre una desmetilación gradual y pasiva, causada por las múltiples replicaciones del ADN en ausencia de la maquinaria de mantenimiento de metilación del ADN, DNMT (Figura 2) <sup>(69)</sup>. De hecho, la limitación en la desmetilación del genoma materno permite que algunas regiones específicas metiladas del alelo materno se mantengan durante el desarrollo embrionario previo a la implantación. Esto confirma la idea del arrastre y presencia de anomalías epigenéticas del ovocito en el genoma del embrión <sup>(4)</sup>.

Después de la fertilización, la accesibilidad al genoma de ambos padres es similar (Figura 3) <sup>(80)</sup>, aunque con un mayor porcentaje de metilación en el genoma materno que en el paterno <sup>(4)</sup>, lo cual va a permitir la activación del genoma cigótico (ZGA, del inglés zygotic genome activation) y la adquisición del potencial pluripotente, indispensable para la futura especialización del embrión en trofoectodermo (TF) y masa celular interna (MCI) <sup>(4,68,69,80)</sup>. La desmetilación del embrión continúa hasta la etapa de blastocisto alcanzando los valores mínimos de metilación (20%). Durante el estadio de blástula a gástrula se comienza la metilación en las cadenas de ADN de novo por parte de Dnmt3a y Dnmt3b, y en las marcas

preexistentes por parte de Dnmt1. La cooperación de ambas definirá y mantendrá el patrón diferencial de cada tipo celular en el embrión durante su crecimiento <sup>(68)</sup>.

Seguidamente, durante la migración de las CPG desde el epiblasto a la cresta gonadal fetal, se produce la segunda ola de desmetilación del ADN, alrededor de la 4-7 semana embrionaria, indispensable para la formación de CPG específicas de cada sexo a partir de una célula somática <sup>(80)</sup>. Una vez terminada la migración, las CPG muestran un nivel más bajo de metilación de ADN (6-7%) en comparación con las células somáticas adyacentes, alrededor de la semana 10 embrionaria <sup>(68,80)</sup>, quedando solo algunos locis metilados, principalmente asociados a elementos retrotransponibles, como son los miembros de la familia de elementos nucleares intercalados largos (LINE), y la familia de elementos nucleares intercalados cortos (Alu) <sup>(4)</sup>. Posteriormente, se procede al restablecimiento de las marcas de metilación de forma asimétrica y específica para cada sexo en las DMR. Es decir, en las CPG masculinas, la metilación de los DMR comienza inmediatamente después de la desmetilación, entre los días 59-137 de desarrollo, y se completa antes del nacimiento (80% de metilación de CpG) <sup>(4,8)</sup>. Mientras que las CPG en las mujeres, la metilación en las DMR comienza tras el nacimiento y no se restablece hasta la pubertad debido a la detención de los ovocitos en profase I <sup>(8,9,16,24,68,80)</sup>. Durante cada ciclo menstrual, la metilación se restablece gradualmente, exhibiendo un perfil de metilación entre el 50-55% en ovocitos en metafase II <sup>(4)</sup>. El hecho de que la metilación ocurra de forma progresiva en ovocitos llama la atención ante posibles desregulaciones epigenéticas inducidas por las TRA como es su afección ante la estimulación ovárica, maduración in vitro, técnicas de criopreservación y manipulación en el laboratorio <sup>(4)</sup>.

El efecto de una reprogramación epigenética anómala en las CPG por fallos intrínsecos o ambientales es complejo y multifactorial, y aún se está dilucidando, pudiendo provocar efectos duraderos que comprometan la salud reproductiva de la descendencia con posible efecto transgeneracional <sup>(69)</sup>.

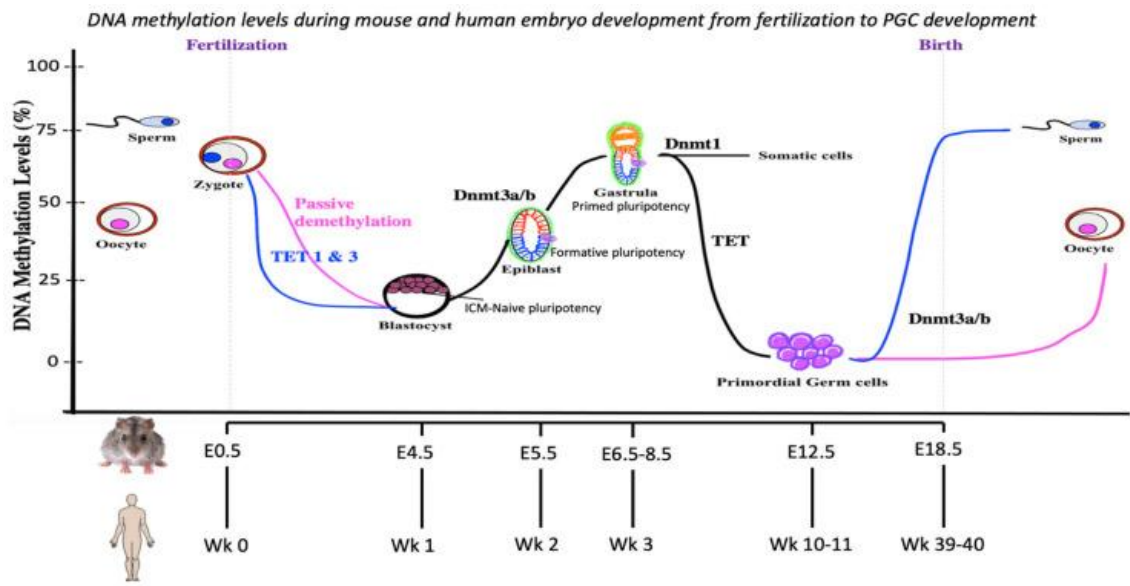


Figura 2 de la investigación de Singh A et al., 2023: Representación en el tiempo de las dos olas de reprogramación epigenética durante el desarrollo embrionario de humanos y de ratón, desde la fertilización hasta el desarrollo de las CPG. El genoma paterno comienza con una alta tasa de metilación (75-80%) en comparación con el genoma materno (45-50%). Tras la fertilización se produce una desmetilación asincrónica en ambos genomas parentales, mediado por las enzimas TET, hasta llegar al estadio de blastocisto (20-25% de metilación). A continuación, comienza el periodo de metilación por las enzimas Dnmt3a y Dnmt3b (70% metilación), hasta el periodo de gastrulación. Durante esta etapa, se produce la diferenciación de MCI y TF como células pluripotenciales. En la gastrulación, los niveles de metilación se mantienen por la Dnmt1 controlando los niveles de expresión génica diferencial en las células somáticas para formar las distintas capas embrionarias. Alrededor de la tercera semana de gestación comienza la formación y diferenciación de las CPG, que van a sufrir una segunda oleada de reprogramación epigenética, por las enzimas TET, en su transcurso hasta la cresta gonadal. Las CPG presentan el genoma menos metilado (3-4%), y es en ellas donde se establecen nuevas marcas epigenéticas, por las Dnmt3/b para la formación de las células germinales especializadas. Los espermatozoides en comparación con los ovocitos aumentan gradualmente su estado de metilación restableciéndose por completo antes del nacimiento. En cambio, la metilación de los ovocitos no se completará hasta la pubertad <sup>(69)</sup>.

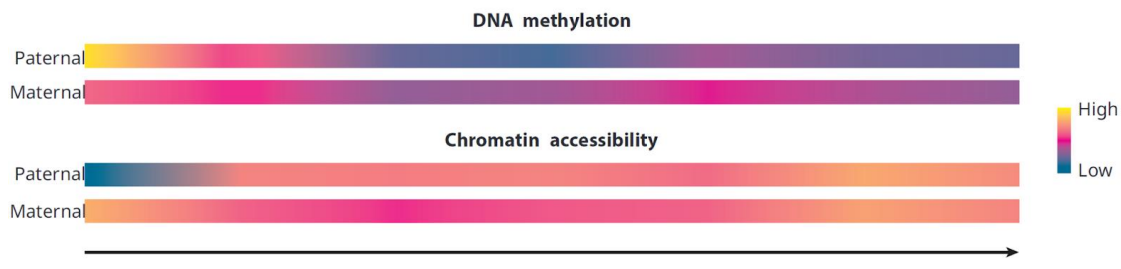


Figura 3 de la investigación de Wang Y et al., 2019: Diagrama gráfico del epigenoma de un embrión en etapa preimplantacional, en el cual se relaciona la desmetilación diferencial de ambos genomas con la accesibilidad en la cromatina. En la etapa inicial de fertilización, el ADN paterno se encuentra hipermetilado y unido a protaminas lo que dificulta su acceso y transcripción, mientras que el genoma materno hipometilado es más accesible. Conforme transcurren las divisiones celulares y la ola de reprogramación genómica se lleva a cabo, aumenta la accesibilidad cromosómica de ambos genomas hasta llegar a un punto final que permitirá la ZGA <sup>(80)</sup>.

## 2. Objetivos

El enfoque principal de este trabajo es hacer una revisión para ver si el empleo de las TRA origina de trastornos epigenéticos en la descendencia. Con la revisión realizada, se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

1. Estudiar las TRA como origen de los trastornos de impronta
2. Ver cómo afecta la fertilidad y/o edad avanzada de los progenitores a los trastornos epigenéticos de la descendencia
3. Analizar si la estimulación ovárica influye en las alteraciones epigenéticas
4. Ver si hay asociación entre el cultivo embrionario y la epigenética
5. Estudiar cómo se relaciona la criopreservación y transferencia de embriones congelados con la alteración epigenética
6. Comprobar cómo influyen técnicas como la ICSI, maduración in vitro de ovocitos, o la biopsia del trofoblasto en los trastornos epigenéticos

## 3. Diseño del estudio

Para ello, se realizaron diferentes búsquedas narrativa exhaustiva en PubMed, examinando los diferentes estudios realizados en humano y en ratón que abordan este tema, estableciendo prioridad a las investigaciones en humanos y los artículos más recientes. Los factores de búsqueda fueron “Fertilization in vitro”, “Epigenomics”, “Epigenetic Risk”, “Assisted Reproduction”, “Imprinting Disorders”, “Cryopreservation”, “Superovulation”, “Embryo culture medium”, “ICSI”. Además, se consultó información sobre la genética asociada a la infertilidad y edad paterna/materna avanzada. Para ello, se utilizaron los términos “Sterility”, “Advanced Maternal Age”, y “Advanced Paternal Age”. Se utilizaron la base de datos de PubMed genes, GeneCards para conseguir una mayor información y comprensión del papel de cada gen, así como la base de datos OMIM para consultar los últimos reportes sobre los trastornos de impronta Beckwith Wiedemann, Prader Willy, Silver Russell, Angelman y Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria.

En total se revisaron 332 estudios que evaluaban el transcriptoma y cambios epigenéticos. Entre los resultados obtenidos, se escogieron en función del título y resumen aquellos que podrían encajar con este trabajo. Se descartaron las investigaciones que no involucraban a la especie humana, y dentro de ellas, se descartaron las investigaciones que no integraban los efectos epigenéticos a nivel del individuo o relacionados con el campo de la reproducción, y por tanto, no eran de interés para dar respuesta a los objetivos de esta

revisión. Finalmente se obtuvieron 84 artículos cuya información fue leída y analizada de forma exhaustiva con la finalidad de comprender y desarrollar este escrito.

#### 4. Trastornos de impronta genómica asociados con TRA.

Si bien el riesgo absoluto de desarrollar un ID en niños concebidos por TRA es bajo, el riesgo relativo en comparación con los niños concebidos de forma natural es significativamente mayor <sup>(45)</sup>.

En 2009 y 2015, se realizaron dos estudios epidemiológicos en Japón con el fin de determinar la asociación y frecuencia de las ID (BWS, AS, PWS y SRS) con la TRA. En ambos, se vio un aumento paulatino de estos ID, especialmente para BWS y SRS (Tabla 1) <sup>(27)</sup>. Esto es debido a que en pacientes con SRS y BWS, los niveles de metilación no solo se vieron afectados en los dominios responsables de estos trastornos, sino que además afectó a múltiples loci adicionales. Otros autores en cambio discuten esta asociación debido a una baja cohorte de pacientes con ID y TRA <sup>(29,64)</sup>. Por tanto, aunque aún se desconoce el factor responsable de la aparición de estos efectos, diversos metaanálisis pueden confirmar que las TRA pueden provocar errores epigenéticos que influyan en la frecuencia de las ID <sup>(4,27,29)</sup>.

	The percentage of patients after ART/total: % (n) (2015)	Observed/expected ratios of ART
BWS	6.0% (7/117)	4.46
AS	1.8% (4/227)	1.32
PWS	4.6% (24/520)	3.44
SRS	11.9% (8/67)	8.91

Tabla 1: resultado de la investigación epidemiológica en Japón, 2015 por Hattori et al., 2019, de los cuatro ID. Se observan tanto las proporciones observadas como las esperadas. Para BWS y SRS, el número de pacientes con esta ID fue 4,46 y 8,91 veces mayor de lo previsto, respectivamente. En PWS fue 3,44 mayor de lo previsto, mientras que, para AS, no se encontró demasiada variación frente a lo previsto <sup>(27)</sup>.

##### 4.1 Síndrome de Beckwith Wiedemann (BWS) OMIM #130650 <sup>(85)</sup>

El BWS, también conocido como Síndrome de exónfalos-macroglosia-gigantismo <sup>(85)</sup>, muestra una prevalencia de 1/13.700-287.000 nacidos vivos <sup>(29)</sup>, se clasifica como un trastorno de crecimiento excesivo pediátrico con predisposición a tumores cancerosos y no



cancerosos, y macrosomía pre y posnatal con un fenotipo variable que incluye macroglosia, sobrecrecimiento lateralizado, anomalías del pabellón auricular, hipoglucemia (30-50% de los bebés con BWS), onfalocele, hernia umbilical, anomalías renales, organomegalia, anomalías cardíacas entre otros <sup>(10,29)</sup>.

Molecularmente se produce por alteraciones genéticas y epigenéticas en los IG del cromosoma 11p15.5, con herencia autosómica dominante con expresividad variable. La región 11p15.5 contiene dos grupos de IG controlados por dos regiones cis diferencialmente metiladas, ICR1 o *H19/IGF2* e ICR2 o *KCNQ1OT1*, implicados en la progresión del ciclo celular y control del crecimiento somático <sup>(1,6,10,12)</sup>.

En condiciones normales, ICR1 del alelo paterno se encuentra metilado e inactivo y expresión monoalélica materna, regula la expresión de *H19* (gen supresor de tumores) e *IGF2* (factor de crecimiento tipo insulina 2) con efectos antagónicos sobre el crecimiento. El ICR2 con alelo materno metilado e inactivo y expresión monoalélica paterna, regula la expresión del gen *CDKN1C* (gen inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1C, inhibidor del ciclo celular) y *KCNQ1OT1* (canal de potasio dependiente de voltaje), que al igual que los genes anteriores, regulan negativamente el crecimiento celular <sup>(1)</sup>.

El BWS, es un trastorno de impronta genómica que en términos generales incluye:

- Hipometilación en ICR2, en más del 50% de los casos <sup>(1,10,29)</sup>, responsable principalmente del aumento del crecimiento fetal como regulador negativo. Alteraciones genéticas en estos IG se han asociado con macroglosia, hepatoblastoma, neuroblastoma y tumores suprarrenales <sup>(6)</sup>. Se encuentra además una correlación entre la edad materna avanzada con la disminución significativa en la metilación del gen *KCNQ1OT1*, influyente en la placentación del individuo <sup>(9)</sup>.
- Disomía uniparental (UDP) paterna, dup(11pat en más del 20% de los casos con pérdida de metilación en ICR2 y ganancia de metilación en ICR1 <sup>(1)</sup>.
- Hipermetilación en ICR1 en el 5-10% de los casos <sup>(1,10,29)</sup>. La ganancia de metilación en ICR1 conlleva un aumento de riesgo de tumores del (15-25%) debido a la pérdida de la función supresora de *H19* <sup>(1)</sup>.
- Reordenamiento cromosómico (duplicaciones, translocaciones, inversiones y deleciones) que engloben los IG del 11p15.5, en menos del 1% de los casos. En

algunos casos, dup(11)pat se asocia a anomalías renales, nefrocalcinosis y trastorno del espectro autista <sup>(1)</sup>.

Algunos estudios no encontraron diferencias significativas entre el uso de las TRA y la prevalencia de BWS, probablemente, debido a una baja población de cohorte de BWS con TRA <sup>(29)</sup>. En cambio, los metaanálisis sugieren un mayor defecto en poblaciones sometidas a TRA con un aumento en la hipometilación en un 88% de los casos frente al 51% en individuos concebidos naturalmente <sup>(29)</sup>.

#### **4.2 Síndrome de Silver Russell (SRS) OMIM #180860 <sup>(85)</sup>**

El SRS o enanismo de Plata-Russell, con una prevalencia de 1/30.000-100.000 nacidos vivos, se caracteriza por un retraso grave del crecimiento intrauterino, con bajo peso al nacer, crecimiento postnatal lento y deficiente, asimetría corporal, y heterogeneidad de malformaciones menores <sup>(1,29)</sup>.

Su diagnóstico es complicado debido a su inespecificidad y difícil identificación molecular subyacente. En la mayoría de los casos, se produce por alteraciones en la región 11p15.5, y al contrario que en BWS, por una hipometilación en ICR1 (35-50% de los casos) paterno <sup>(1,12,74)</sup>. La pérdida de metilación paterna puede ser resultado de una metilación deficiente durante la espermatogénesis o de una falta de mantenimiento de la metilación después de la fertilización. La expresión bialélica de *H19* se correlaciona con las manifestaciones más clásicas y severas de este trastorno, incluidas la restricción del crecimiento fetal, asimetría corporal, macrocefalia relativa y rasgos faciales, los cuales no son observados en casos que no involucran el ICR1, como en la udp(7)mat característicos en el 7-10% de los casos <sup>(1)</sup>.

Los estudios epidemiológicos de Japón en 2009 y 2015, encontraron mayores errores de metilación de ADN que conduce a SRS en pacientes que se sometieron a TRA. Sin embargo, debido al bajo número de cohorte de TRA, no se puede afirmar correlación directa entre TRA y este trastorno de impronta <sup>(29)</sup>.

#### **4.3 Síndrome de Prader Willi (SPW) OMIM #176270 <sup>(85)</sup>**

El SPW presenta una amplia variedad de síntomas entre los que se incluyen crecimiento restringido por disminución de la actividad fetal, retraso mental, hipogonadismo, hiperfagia y obesidad en los primeros años de vida <sup>(29)</sup>. Los cambios genéticos y epigenéticos que cursan este trastorno afectan a los genes expresados paternalmente en el cromosoma 15q11.2-q13, especialmente al gen *SNRPN*. Generalmente por ausencia de expresión del

gen mediante deleción paterna (70-75% de los casos) o disomía materna  $udp(15)mat$  (25-30% de los casos) <sup>(12,38)</sup>. La prevalencia de SPW en niños concebidos naturalmente es de 1/10.000-30.000 niños, y su relación con las TRA es aún compleja <sup>(29)</sup>. Análisis en las poblaciones danesas, finlandesas y estadounidenses no encontraron relación. Sin embargo, otros estudios junto con el análisis epidemiológico de Japón de 2015 mostraron que sí habría incidencia, aumentando hasta un 1,5% el trastorno entre la población sometida a TRA <sup>(29)</sup>.

#### **4.4 Síndrome de Angelman (AS) OMIM #105830 <sup>(85)</sup>**

El AS es un trastorno neurológico con retrasos en el desarrollo, discapacidad intelectual, alteraciones del habla y ataxia, bien definido molecularmente, ya que en todos los casos conducen al silenciamiento del gen *UBE3A* (gen de la ubiquitina proteína ligasa E3A) de expresión materna en 15q11.2-q13 en el cerebro en desarrollo, o la pérdida de metilación materna en el ICR *SNURF-SNRPN* <sup>(12,74)</sup>. Existen cuatro etiologías que conllevan a la disminución de expresión de este gen,  $del(15q11q13)mat$  de novo,  $udp$  paterna, defectos de impronta o mutación puntual, aunque entre el 10-15% de los pacientes con AS presentan causa genética desconocida <sup>(12,16,48)</sup>. Se estima una prevalencia de 1/15.000-30.000 nacidos. En cuanto a su relación con las TRA, se postula que procedimientos pueden ocasionar desregulación epigenética durante el momento de la reprogramación y ausencia de metilación en el alelo materno del locus *SNRPN*.

#### **4.5 Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria (TNDM) OMIM #601410 <sup>(85)</sup>**

La TNDM se caracteriza por una hiperglucemia con necesidad de insulina exógena durante los primeros meses de vida. Se considera una entidad rara con una prevalencia de 1/400.000 nacidos. En la mayoría de los casos es transitoria y se resuelve en los primeros meses, aunque para el resto se queda de forma permanente <sup>(42)</sup>. Molecularmente, se trata de un IG con expresión paterna con alelo materno metilado y silenciado, en el cromosoma 6q24. Alteraciones por isodisomía paterna, duplicación de la región 6q22-q23, o por pérdida de metilación en su DMR (a consta de las TRA), conllevan a una expresión bialélica del gen *PLAG1* como gen supresor de tumores y crecimiento celular, como principal candidato de la TNDM <sup>(16,42)</sup>.

## 5. Infertilidad y edad avanzada, influencia en la expresión epigenética

La infertilidad se define como la incapacidad de concebir tras mantener al menos un año de relaciones sexuales sin protección <sup>(11)</sup>. Se considera que un 8-12% de la población presenta trastornos que comprometen su fertilidad <sup>(68)</sup>. En numerosos casos, los trastornos reproductivos son un reflejo de una patología médica subyacente, como son los problemas cardiovasculares, autoinmunes, enfermedades crónicas y oncológicas. Desde el punto de vista genético, y considerando que el 10% del genoma está destinado a la reproducción, podríamos decir que, una alteración genética que afecte a la capacidad reproductiva podría tener un efecto consecuente en otros procesos fisiológicos. Dicho esto, muchos estudios sugieren el uso de la fertilidad como biomarcador de la salud individual <sup>(11)</sup>.

En lo que se refiere a la infertilidad por causas masculinas, la práctica diaria evalúa el factor masculino a través un seminograma, contemplando parámetros como el volumen, pH, licuefacción y viscosidad seminal, así como la concentración, movilidad, vitalidad y morfología espermática, quedando la genética al margen en un segundo plano. De modo que, muchas de las alteraciones genéticas pasan desapercibidas, pudiendo transmitirse, y tener repercusiones en la salud de la descendencia <sup>(11)</sup>. Los factores genéticos pueden albergar hasta un 15% de la infertilidad masculina, siendo el síndrome de Klinefelter (47, XXY) y las microdelecciones del cromosoma Y, las causas más comunes en muestras oligozoospermicas y azoospermicas severa <sup>(11,83)</sup>.

Durante la espermatogénesis, se producen multitud de cambios a nivel de metilación de ADN y modificaciones de histonas, que darán lugar a los espermatozoides maduros a partir de las CPG. En concreto, se produce una metilación diferencial: hipometilación en promotores de genes partícipes de la espermatogénesis, e hipermetilación en promotores de genes pluripotentes y específicos de tejidos somáticos; junto con el reemplazamiento de histonas por protaminas para una mayor compactación del ADN, salvo en locis de transcripción temprana (5-15% del genoma) <sup>(7,80)</sup>. Alteraciones en el patrón de metilación o en la compactación del ADN, podrían inducir una protaminación anormal con resultado infértil, pudiendo verse reflejado en parámetros como son la concentración, morfología y/o motilidad espermática, y con efectos graves en el desarrollo de la descendencia <sup>(4,7,17,33,80)</sup>. Un ejemplo de ello es la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima partícipe en la regulación de ADN, síntesis de folato y metilación de ADN presente en muestras espermáticas con valores de concentración, motilidad o morfología alterados, o en parejas

con infertilidad por aborto espontáneo recurrente <sup>(33)</sup>. La hipermetilación de esta enzima se ha relacionado con la hipermetilación del gen *H19* con impronta paterna en muestras de esperma de hombres infértiles <sup>(17,68)</sup>. La hipermetilación del IG *MEST* (participa en la regulación del crecimiento fetal y placentario), se ha asociado con una disminución del volumen testicular, aumento de la hormona folículo estimulante (FSH) y parámetros espermáticos anormales <sup>(17)</sup>. Por otro lado, la hipometilación de la región reguladora de *H19/IGF2*, presente en muestras oligozoospermicas, astenozoospermicas y teratozoospermicas, puede reprimir la expresión de *IGF2* teniendo un efecto perjudicial en el desarrollo del embrión y embarazo <sup>(17,68)</sup>.

La infertilidad femenina también queda reflejada en la calidad ovocitaria y capacitación de fertilización, siendo las causas más comunes el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP), insuficiencia ovárica prematura, endometriosis e hiperprolactinemia <sup>(68)</sup>. La endometriosis refleja un enriquecimiento en vías metabólicas de esteroides, respuesta al estrés oxidativo, regulación del crecimiento celular, función mitocondrial, metilación y angiogénesis <sup>(16,83)</sup>. Además, algunas revisiones señalan un mayor riesgo de prematuridad y bajo peso fetal en mujeres con endometriosis <sup>(2)</sup>. En cambio, el ambiente hiperandrogénico responsable del SOP, produce anomalías transcriptómicas en genes relacionados con la meiosis, metabolismo energético, fosforilación oxidativa, elementos transponibles, y aumenta la incidencia de trastornos del espectro autista pudiendo contribuir a las anomalías tempranas del cerebro fetal <sup>(2,16,83)</sup>.

No obstante, el papel que ejerce la metilación en el ADN del ovocito no es excesivamente informativo. Cambios sutiles en los patrones de metilación no repercuten en el crecimiento o maduración ovocitaria. Aunque sí limitan la competencia ovocitaria y desarrollo embrionario por alteración en el perfil de impronta genómica <sup>(68,80)</sup>. La desacetilación de histonas, al contrario, sí juega un papel fundamental en la maduración ovocitaria. La pérdida de genes HDAC puede bloquear la maduración de los ovocitos, detener la actividad transcripcional general y provocar alteraciones en el huso meiótico <sup>(80)</sup>.

Ajeno a las causas intrínsecas de fertilidad de ambos progenitores, muchas parejas que acuden a clínicas de reproducción asistida encuentran un factor añadido y determinante, como es la edad avanzada. En los últimos años, por influencias socioeconómicas y mayor esperanza de vida, la edad promedio de los padres para lograr el primer embarazo se ha ido posponiendo, encontrando limitaciones en la concepción natural <sup>(46)</sup>. La edad materna como

la edad paterna avanzada, se asocia a un menor potencial reproductivo con malos resultados de embarazo y mayores riesgos para la salud del embrión. La baja reserva ovárica, y la mala calidad ovocitaria, son los principales inconvenientes a los que se enfrentan las parejas de edad avanzada con deseos gestacionales. Además de un aumento de anomalías meióticas, mitocondriales y citoplasmáticas, junto con complicaciones durante el embarazo (diabetes gestacional, abortos espontáneos, parto prematuro, preeclampsia y restricción del crecimiento uterino) <sup>(46,83)</sup>. De hecho, se observa una correlación negativa entre la edad materna y el peso fetal <sup>(2,4)</sup>.

En el análisis genético de los ovocitos en mujeres de edad avanzada, muestra un aumento en la metilación del ADN, que da como resultado una menor transcripción y expresión en genes que dictan la competencia del ovocito <sup>(46)</sup>. Especialmente, aquellos involucrados con el envejecimiento reproductivo y senescencia placentaria en las vellosidades del primer trimestre. De hecho, varios investigadores han advertido de un aumento en enfermedades cardiometabólicas y riesgo de autismo en hijos de mujeres en edad avanzada <sup>(30,55)</sup>. Por otra parte, la hipermetilación generalizada acorde de la edad, conlleva al silenciamiento de genes codificantes para las DNMT, produciendo fallos en la metilación y posterior desarrollo del embrión <sup>(46)</sup>. El estudio genético de placentas de embriones con edad materna avanzada muestra una hipometilación de *KCNQ1OT1*, cuya regulación positiva es una causa común del BWS <sup>(4)</sup>.

Conjuntamente, muchos investigadores expresan su preocupación ante el uso de las TRA en mujeres de edad avanzada, y la posibilidad de un efecto sinérgico en los cambios epigenéticos preexistentes, pudiendo resultar en una exacerbación de los efectos y trastornos adversos asociados <sup>(61)</sup>. En cambio, en el estudio de Saucedo Cuevas L et al., 2021, el uso de la estimulación ovárica no mostró diferencias significativas en los patrones de metilación de los ovocitos resultantes de mujeres de edad avanzada. Esto sugiere que, la estimulación hormonal no influenciará de forma diferente a la ya estudiada, o en todo caso, lo haría mínimamente sobre el ADN en blastocistos tras la estimulación <sup>(61)</sup>. No obstante, estudios individuales y algún metaanálisis discrepan en ello, mostrando una hipometilación más acentuada en mujeres de edad avanzada. Un ejemplo de ello es la hipometilación y represión del ICR del IG *KCNQ1OT1* (desencadenante de BWS) en un 88% de los casos tras TRA, frente al 51% de los casos de concepción natural en mujeres de edad avanzada <sup>(5,29)</sup>.

La edad paterna avanzada se asocia preferentemente a una bajada en los niveles de testosterona, disminución del volumen seminal, mutaciones de novo y fragmentación del ADN espermático, reflejado en una reducción de la viabilidad y motilidad espermática. Además de cambios epigenéticos a través de metilación en el ADN, remodelación de la cromatina, cambios en las colas de las histonas, ARN no codificantes y epimutaciones, que alteran la expresión genética de vías relacionadas con la diferenciación celular, embriogénesis e impronta genómica <sup>(17)</sup>. La edad paterna avanzada también está involucrada en la aparición de resultados reproductivos adversos, incluyendo el riesgo de aborto espontáneo, tasas de natalidad más bajas, defectos en el nacimiento, cánceres en primera infancia, presencia de enfermedades autosómicas dominantes, así como trastornos del desarrollo neurológico por una expresión alterada de genes relacionados con el autismo, esquizofrenia o trastorno bipolar <sup>(13,82)</sup>. Por ejemplo, la metilación anormal observada del gen *SNRPN*, está asociada con PWS y AS; alteraciones en *SCL383A* y *ADCy5* críticos en el transporte de aminoácidos y amidas, son indispensables para la proliferación de la MCI y función cerebral; alteraciones en *NOS2* provoca trastornos cerebrales por perturbaciones en la neurotransmisión; o *AGTRI* asociado a una mayor susceptibilidad de neurodegeneración cerebral. Esto reafirma la relación lineal existente entre el aumento de la edad paterna y el riesgo de trastornos de desarrollo neurológico en la descendencia <sup>(13)</sup>.

Algunos ICR que regulan la expresión de IG placentarios también se vieron afectados a consecuencia de la edad paterna, con posterior implicación en el desarrollo embrionario <sup>(13,38)</sup>. Curiosamente, algunos autores señalan la influencia de la placenta sobre la modulación y desarrollo cerebral a través de neurotransmisores. Destacando su posible implicación en los trastornos neuroconductuales <sup>(13)</sup>. Por todo ello, muchas investigaciones se están centrando en el estudio genético del espermatozoide utilizando biomarcadores epigenéticos como pronóstico de infertilidad y/o resultado consecuente del uso de la TRA sobre la salud de la descendencia <sup>(7,38)</sup>.

## 6. Interacción entre las técnicas de reproducción asistida y los cambios epigenéticos

El avance tecnológico y el conocimiento sobre la reproducción ha permitido afinar las TRA, siendo el tratamiento de elección en parejas infértiles con deseo paternal. No obstante, su seguridad aún se ve comprometida ante un mayor riesgo de resultados obstétricos y perinatales adversos del 3-4% frente al 2-3% de los concebidos naturalmente <sup>(2)</sup>. Entre los que se incluye, diferencias de peso, prematuridad, trastornos cardiovasculares (presión sanguínea elevada, función diastólica deficiente), trastornos metabólicos asociados al metabolismo de la glucosa (diabetes tipo I y obesidad), trastornos tiroideos (hipotiroidismo subclínico), enfermedades del neurodesarrollo y comportamiento, ID, e incluso, trastornos en la función reproductiva <sup>(2,12,26,43,83)</sup>.

En cuanto a la susceptibilidad a sufrir neoplasias malignas por las TRA, los datos son menos consistentes, y las discrepancias entre ellos podrían explicarse por el tiempo de seguimiento del estudio, tamaño de la muestra, o consideración de otros influyentes de riesgo como es el tabaquismo materno <sup>(83)</sup>. En general, el uso de la FIV/ICSI o los diferentes tratamientos de las TRA, no se han asociado a un incremento de cáncer infantil, a excepción de las técnicas de criopreservación, y la transferencia de embriones congelados (FET, del inglés Frozen Embryos Transfer) en ciclos estimulados con estrógeno y progesterona, donde algunos autores reportan un pequeño, pero significativo aumento en leucemia infantil o tumores en el sistema nervioso simpático <sup>(70,73,83)</sup>. Otros autores, en cambio, advierten de una mayor predisposición, aunque no significativa, a desarrollar ciertos tipos de cánceres como son el cáncer hepático y los tumores embrionarios, asociados a características maternas desventajosas, o bien, el cáncer hematológico, tumores oculares o tumores del sistema nervioso central, asociados a prematuridad y alto peso neonatal <sup>(2,83)</sup>. No obstante, se precisan de más estudios para corroborar estos resultados.

Desde el punto de vista molecular, los procedimientos de las TRA coinciden con el borrado y reconstrucción del epigenoma embrionario, momento en el cual el genoma de los gametos y embriones es más susceptible a las variaciones ambientales. En consecuencia, podrían producirse cambios epigenéticos que conlleven a una expresión anómala de genes responsables del desarrollo embrionario y placentario, condicionado el fenotipo en estado adulto <sup>(2,50,83)</sup>. Por otra parte, algunos investigadores plantean la hipótesis de que las diferencias de peso podrían estar asociadas con anomalías metabólicas, provocadas por una



disfunción mitocondrial que predisponga a la obesidad, resistencia a la insulina, y bajo peso al nacer. Fallos en la fosforilación oxidativa por la infertilidad subyacente, junto con el acúmulo de mutaciones de novo del ADNmt en mujeres de edad avanzada y/o uso de TRA, pueden tener un efecto sinérgico y negativo sobre la función mitocondrial, pudiendo ser el responsable del percentil de bajo peso en niños concebidos por TRA <sup>(47)</sup>.

En cualquier caso, es bastante probable la existencia de una asociación entre las TRA y las adversidades anteriormente descritas, y muchos metaanálisis y estudios a largo plazo así lo confirman <sup>(2,3,12,22,51,54,56,83)</sup>.

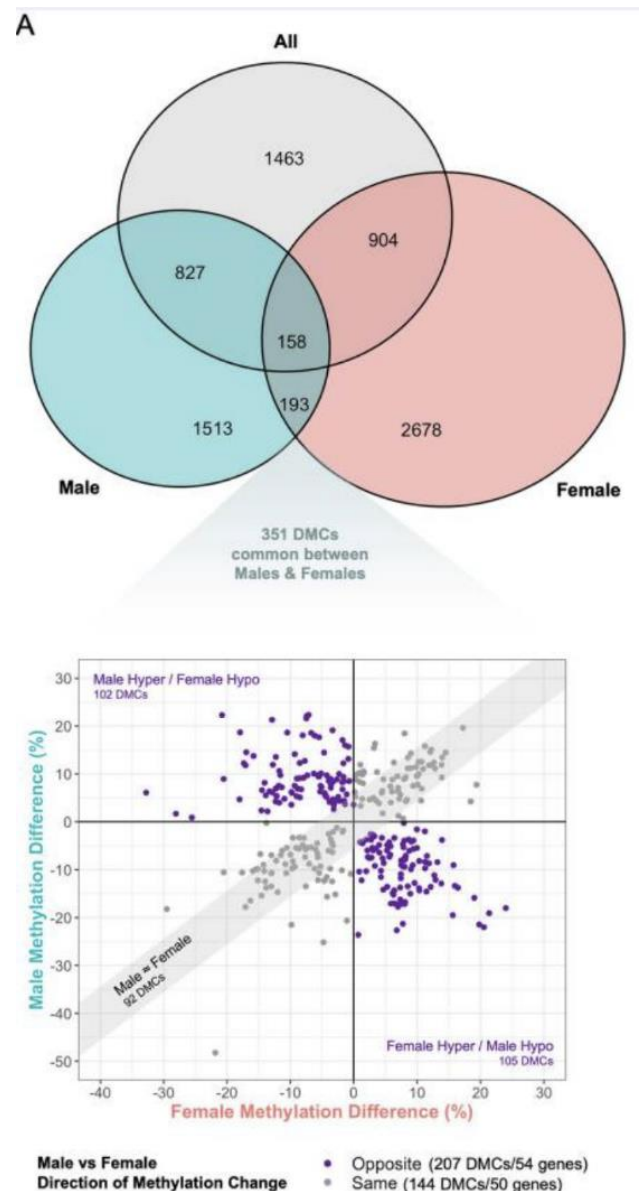
En general, se observa una pérdida de metilación significativa <sup>(17)</sup>, en IG y elementos transponibles (LINE1 y ORF2) en niños nacidos por las TRA, reduciendo así la expresión de genes implicados en el transporte de micronutrientes, placentación y diferenciación de MCI y TF <sup>(2,83)</sup>. Sin embargo, son pocas las investigaciones que concuerdan en los patrones de metilación hallados, pudiendo en algunos casos contradecirse los unos a los otros debido a la heterogeneidad de la población, factores intrínsecos influyentes, y metodología empleada en el estudio <sup>(2,26)</sup>. No obstante, parece haber un consenso entre algunos de los genes afectados, como es la hipometilación de *PEG1/MEST* <sup>(2,3)</sup>, resultando en un crecimiento embrionario y comportamiento maternal anómalo; hipermetilación en el DMR *PEG3* participe en la apoptosis celular mediada por p53, expresado en la embriogénesis temprana en la placenta, músculos y cerebro <sup>(3,4)</sup>; y el más controvertido, el DMR *H19/IGF2* (responsable de los ID BWS y PWS) con resultados opuestos cuando se estudia el perfil de metilación en sangre del cordón umbilical tras una transferencia de embriones en fresco (hipometilado), y una FET (hipermetilado) <sup>(2,3,8,9)</sup>. Además, la complejidad de interpretación aumenta cuando se tiene en cuenta el sexo del embrión en el perfil de metilación. Observándose una hipometilación más marcada en mujeres que en hombres cuando se analiza la sangre del cordón umbilical en embriones concebidos por TRA <sup>(56,79)</sup>.

Tradicionalmente, se ha señalado a la infertilidad de los padres, y especialmente la materna, como los causantes de estas alteraciones. Sin embargo, la valoración de los niveles de metilación de ADN placentario obtenido de embarazos con ovocitos de donantes, o estudios en animales en ausencia de infertilidad, corroboran que los procedimientos en las TRA, durante el periodo de fertilización y preimplantación, son responsables de gran parte de los cambios observados a posteriori <sup>(5,43)</sup>. La estimulación ovárica y la preparación endometrial interfieren tanto en el perfil epigenético del ovocito como en el del cigoto

postimplantacional tras acogerlo en un entorno uterino sobreestimulado y no fisiológico. El desarrollo postfertilización del embrión precisa de diferentes requerimientos nutricionales que son suministrados por los diferentes medios de cultivo, y sus carencias se manifiestan en un crecimiento embrionario deficiente <sup>(2)</sup>. Las técnicas de criopreservación de gametos y embriones, igualmente, producen alteraciones epigenéticas en genes que dictan el desarrollo y competencia de los mismos <sup>(5)</sup>.

Sin embargo, la sensibilidad de la metodología empleada, la susceptibilidad de los genes por el procedimiento de las TRA empleado, el motivo de infertilidad de los progenitores y el sexo del embrión (Figura 4), hace que la comprensión y la dilucidación de los mecanismos responsables sea complejo <sup>(22,24,56)</sup>. Dificultando la búsqueda de alternativas o modificaciones en los protocolos de las TRA que minimicen la aparición de estos resultados perinatales adversos <sup>(43)</sup>.

Figura 4: representación gráfica de las diferencias de metilación inducidas por las TRA en hombres y mujeres, por la investigación de Rahimi S et al., 2023. Indica, que no solo existen diferentes sitios vulnerables a las TRA, sino que afección por cambios de metilación puede diferir según el sexo del embrión <sup>(56)</sup>.



## 6.1 Efecto epigenético asociado a la estimulación ovárica

La estimulación ovárica es uno de los procedimientos principales en las TRA, mediante la cual se consigue un mayor crecimiento ovárico y desarrollo multifolicular a través del suministro exógeno de gonadotropinas a la paciente <sup>(41)</sup>. Los protocolos generalmente incluyen un tratamiento con agonista y/o antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), seguido de una estimulación con gonadotropinas vía oral durante 5-12 días, y finalmente la inducción de la ovulación mediante la inyección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) o análogos de la GnRH <sup>(39,46,63)</sup>. Pese a que las dosis y el tipo de fármaco utilizado en la estimulación varía entre clínicas y pacientes, los resultados suelen ser comparables y consistentes.

Durante los últimos años, muchos estudios han señalado la estimulación ovárica como la responsable de los efectos adversos obstétricos y relacionados con un aumento en la frecuencia de ID por trastornos en la metilación en los IG <sup>(41,45,46,66)</sup>. Argumentan, que los protocolos de estimulación ovárica podrían permitir el rescate de ovocitos de baja calidad, portadores de alteraciones genéticas, o de aquellos que hubiesen entrado en vías de atresia folicular, y que habitualmente serían excluidos de ovular en un ciclo natural <sup>(10,14,45,72)</sup>. Además, de la posibilidad de exacerbar los cambios de metilación ya presentes en mujeres de edad avanzada <sup>(46)</sup>. Sin embargo, los resultados acerca de los efectos de la estimulación sobre el perfil epigenético del ovocito y/o embrión, son aún contradictorios, y las discrepancias podrían explicarse por la heterogeneidad de los estudios.

La adquisición de metilación del ovocito se completa durante su crecimiento y maduración dentro del folículo <sup>(41,45,46,60)</sup>. De modo, que perturbaciones ambientales como la administración de hormonas exógenas durante los protocolos de estimulación, pueden provocar anomalías en el establecimiento de las marcas de metilación del ovocito <sup>(41)</sup>. Afectando tanto el imprinting del ovocito en IG completamente desarrollados (hipometilación: *PEG1/MEST*, *KCNQ1OT1*, *PLAG1*, e hipermetilación: *H19*) <sup>(24,46,63)</sup> que comprometen la calidad y competencia ovocitaria, como en el imprinting de embriones previos a la implantación <sup>(41,46,60,77)</sup>. Esto es debido a que la estimulación ovárica acelera los tiempos de desarrollo ovocitario, resultando en una adquisición inadecuada de marcas de impronta en los alelos maternos, y además, altera la acción de las enzimas DNMT responsables de la reprogramación epigenética de alelos paternos (*H19*) <sup>(2,36,41,45,77)</sup>. En cualquiera de las dos situaciones, el resultado es el mismo e implica una pérdida generalizada en los patrones de metilación comprometiendo el desarrollo embrionario por

deterioro placentario <sup>(41,45,77)</sup>. Un ejemplo de ello es la hipometilación del gen *MEST* en placentas humanas de embarazos concebidos por TRA. El gen *MEST* codifica una enzima de la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasa esencial para el crecimiento embrionario. La metilación anormal del gen se ha asociado con ciertos tipos de cánceres y un desarrollo placentario anormal <sup>(41)</sup>. Curiosamente, algunos autores reportan además, cómo las alteraciones en los patrones de metilación pueden persistir entre las diferentes generaciones, eludiendo la reprogramación epigenética y manifestándose incluso en la línea germinal F2 <sup>(46)</sup>.

A pesar de que se desconocen los responsables de estos cambios, la gran mayoría de las investigaciones apuntan al aumento de estradiol sérico (E2) junto con los cambios de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés vascular endothelial growth factor) a nivel sérico y endometrial, como los responsables principales de los cambios epigenéticos ovocitarios y endometriales que resultan en un crecimiento excesivo placentario y bajo peso fetal <sup>(5,41,66,71,83)</sup>. Niveles suprafisiológicos de E2 alteran la expresión de genes implicados en la remodelación endometrial provocando una invasión trofoblástica deteriorada (gen *MMP2*, proteasas responsables de la degradación de la matriz extracelular e invasión del trofoblasto; gen *PLAT* responsable de la conversión de plasminógeno en plasmina) <sup>(5,66)</sup>, así como la expresión génica de vías relacionadas con interacciones celulares, metabolismo de lípidos, ensamblaje y organización celular <sup>(14)</sup>. Es más, los niveles elevados de estrógeno sérico persisten durante todo el embarazo, y algunos estudios los asocian con dislipidemia en la descendencia, disfunción tiroidea (hipotiroidismo primario subclínico o hipertirotrópinemia eutiroidea), junto con resistencia a la insulina y trastornos en el metabolismo de la glucosa <sup>(26,83)</sup>. Como solución a estos desequilibrios epigenéticos se postula utilizar una estimulación más leve con menor dosis de gonadotropinas <sup>(46,60)</sup>, o uso de antiestrogénicos como letrozol, con el fin de reducir los niveles de estrógenos sin afectar a las tasas de recién nacido vivo <sup>(41)</sup>.

A nivel de afecto en la implantación, la estimulación hormonal perturba la receptividad endometrial y conexión feto-placenta por modificación de las condiciones fisiológicas del entorno uterino <sup>(39,41,66,71,72,78)</sup>. Reflejándose en un menor éxito reproductivo, menor tasa de implantación, mayor incidencia de mortalidad postimplantacional, crecimiento excesivo placentario, bajo peso fetal, retraso en el crecimiento postnatal y defectos musculoesqueléticos entre otros, incluso cuando los embriones transferidos no proceden de un ciclo estimulado previo <sup>(12-14,46,59,71,78,82,84)</sup>.

Estudios realizados en ratones muestran que la estimulación altera tanto genes de impronta materna como paterna con efecto dependiente de la dosis de gonadotropinas <sup>(41,45,71)</sup>. Las diferentes investigaciones resaltan una pérdida de metilación en múltiples IG como son *Snrpn*, *Peg3*, y *Kcnqlot1*, y ganancia de metilación en *H19*, con papel en la etiología de BWS y AS <sup>(45,46,71)</sup>. El aumento de E2 suprafisiológico aumenta la expresión de TET2 como gen transcripcional directo del receptor de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ), involucrado en la desmetilación de la impronta del ADN, sin efecto alguno entre los otros miembros TET1, y TET3. Esto explica por qué no se encuentra una alteración en los patrones de metilación del pronúcleo masculino de un cigoto tras la fertilización, mientras que sí se observa una pérdida de metilación en el pronúcleo femenino <sup>(41)</sup>. Altas dosis de FSH podrían alterar la expresión de genes involucrados en la remodelación endometrial durante la implantación, lo que conlleva a una invasión trofoblástica deteriorada <sup>(9)</sup>. El uso de agonista de la GnRH como desencadenante de la ovulación en ratones, se ha asociado con cambios en la matriz del endometrio y expresión anormal de factores angiogénicos lo que conlleva a perturbaciones en el entorno uterino y en los sitios de implantación <sup>(39)</sup>. Además, se observan diferencias de expresión en genes relacionados con la respuesta inmune y señalización del interferón (gen del interferón gamma, *ifng*), modulando la implantación y mantenimiento temprano del embarazo. En condiciones normales las células naturales asesinas uterinas (uNK, del inglés natural killer cells) secretan la molécula de interferón gamma (IFNG) que interfiere con el epitelio uterino y en las células del músculo liso vascular durante las primeras semanas de gestación. Cambios en la expresión de estos genes como consecuencia de una estimulación hormonal, conlleva a una señalización de IFNG deficiente, la cual está asociada a mayores tasas de pérdida fetal, aumento en células uNK, así como una decidua y vascularización anormal <sup>(71)</sup>.

## 6.2 Efecto epigenético del cultivo in vitro

El cultivo in vitro tras la fertilización y previo a la implantación es crucial para el desarrollo del embrión, y este, debe imitar lo máximo posible las condiciones fisiológicas in vivo, ya que acoge justamente al embrión en el momento de reprogramación epigenética cuando gran parte del genoma está desmetilado, y es más sensible a las fluctuaciones ambientales externas <sup>(2,52,84)</sup>. Actualmente existen dos tipos de medio de cultivo principales: los medios de cultivo secuenciales, diseñados para satisfacer los requisitos metabólicos e imitar los cambios ambientales de piruvato, lactato y glucosa que ocurren in vivo; y los medios de cultivo únicos que concentra todos los nutrientes necesarios en el medio y deja al embrión de libre elección para utilizarlos, minimizando así el estrés causado por los cambios ambientales perjudiciales para el embrión <sup>(59,67)</sup>. Igualmente ambos deben de contener todos los requerimientos nutricionales, aminoácidos, proteínas, azúcares y otros sustratos necesarios para el correcto desarrollo del embrión <sup>(2,52,59,67,76,84)</sup>. Variaciones en la composición puede afectar al número de células de TF, MCI, morfología del embrión y expresión genética ocasionando un desarrollo fetal placentario desequilibrado, crecimiento fetal anormal y respuestas metabólicas alteradas <sup>(2)</sup>.

El mayor conocimiento de los componentes in vivo ha permitido perfeccionar y extender el crecimiento embrionario in vitro hasta la etapa de blastocisto, permitiéndonos una mejor selección embrionaria y reducción de embarazos múltiples. Sin embargo, pese a las ventajas ofrecidas, existe una preocupación constante sobre los efectos adversos de los medios de cultivo en el embarazo y resultados neonatales, por lo que se reclama a las casas comerciales revelar la composición y concentración exacta de los medios patentados <sup>(52,84)</sup>. El estudio por Zheng et al., 2022 en la población de China reveló que el cultivo in vitro con medio de cultivo Vitrolife (G-IVF y G1, Suecia) se asocia a un mayor riesgo de placenta previa (problemas en el embarazo, en la cual, la placenta crece en la parte más baja de la matriz cubriendo toda la abertura hacia el cuello uterino o gran parte de esta, cursando con una sintomatología de sangrado vaginal intenso potencialmente mortal) (4,86%); y el medio de cultivo Cook (FM y CM, Australia) con un mayor riesgo de macrosomía (más de 4kg) (7,51%) en comparación con los concebidos naturalmente <sup>(84)</sup>. El cultivo con medio G3 (Vitrolife) se relaciona con mayor cantidad de células, mejor tasa de implantación y embarazo, y mayor peso y crecimiento fetal que puede persistir hasta los 9 años <sup>(35)</sup>. Otros trabajos señalan que el cultivo con medios que contengan una forma inestable de glutamina resulta en una mayor concentración de amonio con efecto adverso en el desarrollo

embrionario <sup>(35)</sup>; y las altas concentraciones de glucosa podrían actuar como teratógeno primario, aunque son pocas las investigaciones humanas que contemplan este factor en el desarrollo in vitro y postimplantacional <sup>(15)</sup>.

Conjuntamente, el cultivo de gametos y embriones precisa de una regulación del entorno redox para un desarrollo óptimo tanto in vivo como in vitro. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se ocasionan de forma natural como subproductos del metabolismo celular y reacciones enzimáticas <sup>(25)</sup>. Sin embargo, el cultivo in vitro exagera la producción de ellas debido a la exposición de los ovocitos y los embriones a fluctuaciones de temperatura, pH, variaciones en la concentración de oxígeno o componentes del medio causando un estrés oxidativo que repercute tanto a las tasas de embarazo, como a nivel interno del ovocito y/o embrión <sup>(25,34)</sup>. Las ROS causan peroxidación lipídica en los lípidos de membrana, altera la conformación y función proteica, promueven la fragmentación e hipometilación de ADN por la oxidación de desoxiguanosina en 8-oxodesoxiguanosina, o bien de forma indirecta por disminución de S-adenosil metionina como donante de grupos metilo, o ataque hacia las enzimas DNMT y TET <sup>(34)</sup>. Es por ello que, en muchos medios de cultivo embrionario encontramos antioxidantes como EDTA, enzima glutatión reductasa, metionina, vitamina C o la vitamina E, que reaccionan y bloquean el daño inducido por ROS, aunque su efecto es aún tema de estudio <sup>(25,34)</sup>.

Hasta la fecha no se conocen completamente los mecanismos moleculares responsables de los resultados observados por parte de los medios de cultivo. Se postula que algunos de ellos podrían actuar como disruptores de impronta, afectando principalmente a la expresión de genes reguladores de la placentación y transporte de nutrientes al feto, y como consecuente, al crecimiento intrauterino <sup>(36,52,84)</sup>. Entre los trastornos asociados al cultivo in vitro, destaca con una mayor incidencia, el BWS, con crecimiento fetal excesivo, anomalías y complicaciones placentarias, prematuridad, mortalidad prenatal y sexo sesgado a favor de los hombres <sup>(79)</sup>. Por otra parte, el cultivo in vitro normalmente es secundario a un proceso de estimulación ovárica previo, por lo que sus efectos pueden cruzarse, y resulta complejo discernir los cambios asociados entre uno y otro <sup>(49)</sup>.

Se ha establecido una relación entre la manipulación in vitro de ovocitos y embriones, con la desregulación de genes de impronta materna (*MEST*, *KCNQ1*, *SNRPN*, *PEG3*, *NNAT*, *GNASXL*, *IGF2R*, *PEG10* y *PLAG1*), elementos repetitivos, así como en los ICR *H19/IGF2*, como *KCNQ1OT1* y *PEG3* <sup>(37,79)</sup>. Otras de las vías que podrían verse

comprometidas son WNT, que interviene en la formación y vascularización de la placenta, y la vía JAK-STAT, con papel en la proliferación y supervivencia celular, así como en la angiogénesis <sup>(79)</sup>. En condiciones normales, estas marcas de metilación maternas se adquieren durante el crecimiento folicular, y resisten a la desmetilación global durante la reprogramación genética tras la fertilización y activación del genoma embrionario. Sin embargo, el cultivo in vitro parece alterar la metilación establecida causando una hipometilación general en ellos, siendo a la vez más pronunciada a mayores días de cultivo in vitro <sup>(50,79)</sup>. La hipometilación de los elementos repetitivos, SINE, LINE y TLR, a causa del cultivo in vitro promueve su activación, actuando como promotores alternativos para transcripciones específicas de tejido. Diferencias en la metilación en estos elementos repetitivos se asocia con cambios de peso fetal e inestabilidad cromosómica que puede conllevar a la sobreproducción de células trofoblásticas invasivas <sup>(79)</sup>.

Además, hay que recalcar que no todos los embriones sufren una hipometilación grave, sino que existe variabilidad de respuesta entre los individuos, sexo y especies a los factores ambientales <sup>(15,37,79)</sup>. Actualmente, existen evidencias que demuestran diferenciación en las trayectorias de desarrollo, expresión de genes placentarios y metilación del ADN entre embriones femeninos y masculinos. En el estudio de Vrooman et al., 2022, los embriones femeninos exhibieron una pérdida de metilación mayor que en embriones masculinos cultivados in vitro <sup>(79)</sup>. En cambio, Duijn et al., 2022, observó un mayor impacto en los embriones masculinos (crecimiento embrionario más rápido, mayor peso fetal, circunferencia y diámetro biparietal mayor) cultivados con medio SAGE 1-STEP en comparación con los embriones femeninos y los concebidos naturalmente <sup>(15)</sup>, por lo que se precisan de más investigaciones enfocadas en la susceptibilidad diferencial de ambos sexos ante los diferentes medios de cultivo.

El estudio a largo plazo (9 años) de Koeck et al., 2022, en niños concebidos por TRA en cultivo in vitro con medios G3 (Vitrolife) o K-SICM (Cook), no mostró diferencias significativas, a pesar de las diferencias iniciales en peso y tamaño. Lo que sugiere que la plasticidad del epigenoma podría corregir la desregulación epigenética experimentada durante el periodo previo a la implantación, y que esta no sea evidente en años posteriores, aunque se precisa de más investigación al respecto <sup>(35)</sup>.

De cualquier modo, según lo descrito anteriormente, parece probable que los medios de cultivo, en función de su composición, podrían alterar la epigenética del embrión. En



ratones, el cultivo embrionario con medio Whitten (bicarbonato de Krebs Ringer, glucosa, estreptomicina, penicilina G y albúmina sérica bovina) muestra una hipometilación del gen *h19*, *Snrpn*, *Ascl2* y *Peg3*. En cambio, su cultivo en medio M16 refleja una hipermetilación y expresión reducida en *h19* e *igf2* <sup>(36,44)</sup>. Medios de cultivo con baja concentración o ausencia de piruvato aceleran los procesos de desmetilación del ADN embrionario, y además, no consiguen progresar más allá de la etapa de 2 células <sup>(40)</sup>. En bovinos, la adición de suero fetal bovino (FBS, del inglés fetal bovine serum), provocó una hipometilación grave en el locus *Igf2r*, responsable del crecimiento fetal, relacionado con BWS y síndrome de la descendencia grande <sup>(37)</sup>. El cultivo embrionario con colina, importante para el desarrollo cerebral y sistema nervioso central posnatal, aumentó la duración de la gestación y el peso al nacer en los terneros por modificaciones en la metilación de ADN en blastocistos <sup>(18)</sup>.

No obstante, la composición del medio no es el único objetivo a tener en cuenta durante el cultivo *in vitro*, sino que otros factores como son la tensión de oxígeno, luz, temperatura o presencia de compuestos contaminantes volátiles (VOCs, del inglés Volatile Organic Compounds), podrían tener influencia en los resultados de las TRA.

En lo que se refiere a la tensión de oxígeno, en el humano se estima una tensión de oxígeno intrauterino e intratubárico entre un 2-8%. En los laboratorios, las prácticas se realizan a un 5-6%, aunque este porcentaje puede variar de forma transitoria. El oxígeno aumenta la producción de ROS con efectos citotóxicos sobre el ovocito y/o el embrión, reduciendo su potencial de desarrollo al provocar la fragmentación del ADN y modificar los patrones de metilación del ADN e histonas en genes sensibles al redox <sup>(15,25)</sup>. En humanos aún se desconoce su influencia, pero en ratones, las variaciones en el nivel de oxígeno (5-20%) pueden involucrar diferentes vías como la vía responsable de la organización de la cromatina, estrés celular, apoptosis, disfunción mitocondrial e incluso las vías de señalización de los esfingolípidos <sup>(15)</sup>.

La temperatura es crucial para el desarrollo y viabilidad del ovocito y posterior embrión, principalmente por su efecto en la despolimerización de microtúbulos del huso mitótico. Por lo cual es importante minimizar los tiempos de manipulación de ambos en el laboratorio, y en caso de realizar cualquier procedimiento realizarlo sobre una superficie calefactada que asegure la temperatura del medio a 37°C. La afección en el epigenoma está aún pendiente de evaluarse <sup>(15)</sup>.

Las toxinas ambientales, y principalmente la exposición al bisfenol A (BPA) presente en los plásticos de los consumibles en el laboratorio también tienen efectos tóxicos en la reproducción humana <sup>(2)</sup>. El BPA actúa a nivel del útero y ovario, y se ha establecido una correlación inversa de su exposición con el número de folículos antrales, ovocitos maduros, tasas de fertilización e implantación <sup>(49)</sup>. Induce cambios en la expresión génica por anomalías en la metilación en genes relacionados con la reparación del ADN, ciclo celular, señalización hormonal y regulación traduccional <sup>(49,52)</sup>. Estudios en animales sugieren, además, que la exposición a BPA durante el desarrollo embrionario activa genes que responden ante estrógenos, involucrados en la proliferación y susceptibilidad ante el cáncer en la edad adulta <sup>(2,52)</sup>. Es por ello, que se recomienda trabajar en cabinas de flujo laminar y aireación previa de placas y puntas para evitar lo máximo posible la difusión e influencia de volátiles a los embriones y gametos <sup>(15,49)</sup>.

Otro factor a tener en cuenta, y del que apenas hay investigaciones al respecto, es la exposición a la luz <sup>(2)</sup>. Durante la concepción natural, los gametos y los embriones están en oscuridad, pero su manipulación durante las TRA a luz directa puede desencadenar mecanismos de protección al respecto <sup>(52)</sup>. Estudios en embriones de ratón han observado como la exposición directa de la luz en ovocitos y embriones se asocia a una degradación mitocondrial, fragmentación de ADN y aumento de la concentración de ROS en el citoplasma. Además de la alteración de genes relacionados con la regulación de la transcripción, apoptosis, ciclo celular y respuesta celular al estímulo, lo que resulta en una menor tasa de implantación y nacidos vivos <sup>(2,15,25,52)</sup>.

Otros factores que podrían ser analizados próximamente son la fuerza empleada en el pipeteo, el tiempo de decumulación por la hialuronidasa, o el tiempo de espera en el incubador de los ovocitos antes del procedimiento con ICSI <sup>(15)</sup>.

### 6.3 Efecto epigenético de la criopreservación y transferencia de embriones congelados

La criopreservación mediante vitrificación y congelación lenta, son dos de los procedimientos más utilizados en reproducción asistida. Permiten el almacenamiento de gametos, embriones y/o tejido gonadal en nitrógeno líquido (-196°C) con motivos de preservación de fertilidad, donación de gametos, cancelación de ciclo con prevención de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) o espera de resultados de pruebas genéticas previas a la implantación <sup>(8,19,62,65)</sup>. El avance en estas técnicas, junto con el incremento en la tasa de nacidos vivos, no solo ha permitido posponer la edad del primer embarazo, sino también reducir el número de embarazos múltiples y riesgos asociados <sup>(65)</sup>. Además, muchos investigadores han puesto en el punto de mira la estimulación ovárica como la principal responsable de los efectos adversos asociados a las TRA, por lo que muchas clínicas optan por la estrategia de congelación total o “Freeze all”, y transferencia en un ciclo posterior con un endometrio más fisiológico <sup>(5)</sup>. En 2018, según los registros de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), se han realizado 14.475 criotransferencias de embriones criopreservados procedentes de ovocitos frescos propios, y en 2020, 26.743 ciclos, lo que supone un aumento aproximado del uso de estas técnicas del 85% (Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida - Registro Nacional de actividad y resultados de los centros y servicios de Reproducción Humana Asistida, s. f.).

Sin embargo, pese a las ventajas aparentes que ofrece la criopreservación, varios estudios observacionales señalan un mayor riesgo de trastornos hipertensivos en el embarazo (hipertensión gestacional, preeclampsia, eclampsia e hipertensión crónica), macrosomía, mayor peso neonatal, placentación anómala, hipoplasia pulmonar e infecciones y hemorragias neonatal que incrementan el riesgo de mortalidad neonatal en los primeros seis días de vida <sup>(5,8,21,23,43,48,62,65,73)</sup>. Además de un aumento de riesgo de leucemia infantil o tumores en el sistema nervioso simpático en la FET en ciclos estimulados con estrógeno y progesterona. Curiosamente, algún trabajo señala que la intensidad de estos efectos puede diferir en función del sexo, observándose un mayor peso tras la FET en hijos varones en comparación con el género femenino, lo cual reporta una mayor susceptibilidad de los embriones masculinos a los efectos de la vitrificación <sup>(43)</sup>.

Aún se desconoce con exactitud el factor responsable de la aparición de estas alteraciones, ya que tanto el estrés físico inducido por los cambios de temperatura y presión osmótica, como la citotoxicidad por el uso de altas concentraciones de crioprotectores (CPA), podrían

contribuir a un mal desarrollo embrionario por alteración en la epigenética de los gametos o embriones criopreservados <sup>(5,19,23,65)</sup>.

Por otra parte, estudios recientes revelan que la adicción de melatonina en los medios como posible CPA, mejora la calidad de los blastocistos y ovocitos tras una vitrificación/desvitrificación al actuar como antioxidante y eliminador de radicales libres mediante la regulación de la expresión génica de enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa, y la superóxido dismutasa <sup>(31)</sup>.

### **6.3.1 Criopreservación de ovocitos**

Desde 2013, las TRA incorporaron la técnica de vitrificación como método de criopreservación de ovocitos y embriones, la cual combina altas concentraciones de CPA, con una alta tasa de enfriamiento, induciendo un estado vítreo que evita la formación de cristales de hielo que comprometan su viabilidad <sup>(62,65)</sup>.

De forma mecánica, la vitrificación de ovocitos provoca algunos cambios estructurales en la célula, como es el endurecimiento de la zona pelúcida, daños en los orgánulos intracelulares (mitocondrias y retículo endoplasmático liso principalmente), un mayor riesgo de división partenogénica, liberación de los gránulos corticales, y el más importante, la despolimerización del huso meiótico responsable de la estabilidad y segregación cromosómica <sup>(8,19,62,65)</sup>. Además, la vitrificación produce un incremento en los niveles de ROS y eventos apoptóticos, provocando una alteración en la regulación epigenética del ovocito y comprometiendo la viabilidad y desarrollo del futuro embrión <sup>(19,65)</sup>.

En cuestión a la duración de la criopreservación de ovocitos, estos no cambiaron su expresión génica a mayor tiempo vitrificados, a pesar de la disminución en la calidad y competencia de estos. Lo cual indica que los daños potenciales observados no se correlacionan con el tiempo almacenados en nitrógeno líquido, sino que estarían relacionados con el procedo de criopreservación en sí mismo <sup>(62)</sup>.

Sin embargo, hasta ahora, el número de investigaciones que contemplan el efecto epigenético en la vitrificación ovocitaria es limitado. Principalmente debido a la escasa disponibilidad de ovocitos destinados a este fin y las restricciones éticas pertinentes sobre la utilización de gametos y embriones en investigación, dificultando la comprensión sobre el tema <sup>(8)</sup>.

### 6.3.2 Criopreservación de espermatozoides

Al igual que en ovocitos, la criopreservación de espermatozoides es una de las técnicas más utilizadas en reproducción asistida ofreciendo la oportunidad de preservar la fertilidad en pacientes oncológicos, o para el almacenaje como donante de espermatozoides. Aprovechando el pequeño tamaño de los espermatozoides y su reducido volumen citoplasmático, se sigue utilizando la congelación lenta como técnica habitual, con una menor concentración de CPA y un descenso paulatino de la temperatura. Sin embargo, estudios actuales en la vitrificación espermática muestran una mayor tasa de supervivencia y menor daño en el ADN espermático <sup>(8,9)</sup>.

En términos generales, la criopreservación de espermatozoides induce cambios físicos por descondensación de la cromatina alterando la expresión de proteínas implicadas en la permeabilidad de las membranas, metabolismo celular, motilidad (disminución de la expresión de *Tektin-1*, *ACO2*, *CATSPER2* y *TEKT2*), apoptosis, capacitación y fertilización <sup>(19,80)</sup>. Además, el aumento en los niveles de ROS provoca una mayor fragmentación del ADN espermático, así como hipermetilación en *DNMT* pudiendo condicionar el posterior desarrollo embrionario durante la reprogramación epigenética <sup>(65)</sup>. Se observan alteraciones en los genes *PRM1*, *BIK*, *FSHB*, *PEG1/MEST*, *ADD1*, *ARNT*, *UBE3A* y *SNORD116/PWSAS*, implicados en la fertilización y desarrollo embrionario <sup>(19)</sup>. En cambio, su influencia sobre los IG está aún pendiente de estudio, debido a que las investigaciones realizadas hasta el momento en espermatozoides humanos no ofrecen resultados consistentes. Además, algunos autores señalan que factores internos como la oligozoospermia, podrían hacer a los espermatozoides más susceptibles a los cambios epigenéticos <sup>(65)</sup>.

### 6.3.3 Criopreservación de embriones

Debido a las limitaciones éticas que suponen las investigaciones con embriones humanos, muchos estudios se realizaron sobre tejidos placentarios y fetales. Los resultados de las diversas investigaciones continúan siendo confusos y muchos de ellos no concluyentes, pero en su mayoría coinciden que las técnicas de criopreservación comprometen la integridad del ADN embrionario por un aumento en la expresión de vías apoptóticas <sup>(2,19)</sup>.

El análisis epigenético de placentas y tejidos fetales muestran una hipermetilación generalizada (86%) en comparación con la transferencia en fresco, que afecta a regiones críticas para el crecimiento fetal y placentación, migración celular y diabetes mellitus tipo

II <sup>(2,43)</sup>. Destaca la alteración del gen *GABRG3* presente en la región asociada con PWS (región 15q11-q13), y *ADARB2* que codifica una enzima de edición de ARN que puede afectar a la expresión genética global, y actualmente asociada como un marcador ante un IMC más alto <sup>(5,43)</sup>. Además, varios investigadores señalan la relación entre los ID con el uso de técnicas de criopreservación por alteración de los IG. Mani et al., 2022, reporta en su estudio como todos los IG a excepción de *KCNQ1DN*, estaban hipermetilados <sup>(43)</sup>. Barberet et al., 2021, observan una hipermetilación de *H19/IGF2* en FET, reduciendo su expresión hasta en un 25% en placentas. Efecto contrario al observado tras una transferencia en fresco en un ciclo estimulado (hipometilación) <sup>(5)</sup>.

Otros investigadores en cambio, discuten dicha asociación, puesto que estudios de metilación de IG en células de sangre del cordón umbilical no muestran cambios significativos cuando se comparan con la transferencia en fresco y los resultados hallados de tejidos placentarios <sup>(8)</sup>. Lo cual sugiere que el feto podría estar protegido de las perturbaciones en la metilación ocasionadas por la criopreservación <sup>(5)</sup>. Además, los resultados de las investigaciones de Chen et al., 2022, muestran variaciones en el perfil de metilación de los blastocistos antes y después de la implantación, los cuales no tienen por qué coincidir entre ellos. Dificultando aún más la comprensión y el estudio del efecto de la criopreservación como factor aislado <sup>(8)</sup>.

## 6.4 Efecto epigenético del uso de la ICSI

La técnica de ICSI surgió como solución a los problemas masculinos con una calidad o recuento espermático subóptimo, o como solución ante los fallos de fecundación con un tratamiento de FIV convencional <sup>(2)</sup>. Hoy en día, se ha convertido en una práctica estándar y el método de preferencia en la clínica <sup>(63)</sup>. Sin embargo, su aplicación no está exenta de posibles efectos perjudiciales para la salud de la descendencia. El carácter invasivo de la técnica con la microinyección directa del espermatozoide en el citoplasma del ovocito podría causar una desregulación epigenética en el embrión <sup>(64)</sup> entre otros trastornos. Por ejemplo, estudios acerca de la evolución de la capacidad reproductiva de los niños concebidos por TRA, ha observado una mayor incidencia de microdeleciones en el cromosoma Y de novo en hijos masculinos nacidos por estos procedimientos <sup>(83)</sup>. Además, teniendo en cuenta que más del 15% de las parejas con infertilidad por factor masculino con muestras oligo y azoospermicas cursan con anomalías en el cariotipo o microdeleciones en el cromosoma Y, la utilización de estos espermatozoides puede incrementar la incidencia de diferentes trastornos debido a la mala calidad de los gametos y omisión de la selección natural del esperma <sup>(63)</sup>. En general se observa una reducción de la acetilación de H4, alteraciones en la metilación de H4K20 y H3K9 en hombres astenoteratozoospermicos, e hipometilación en *H19* en muestras oligozoospermia y azoospermia <sup>(36,63,64)</sup>, aunque se precisa de más investigación para reafirmar estos hechos, y el efecto consecuente que pudiesen tener.

El seguimiento a largo plazo de los niños concebidos con ICSI ha revelado que los jóvenes varones podrían tener comprometida su capacidad reproductiva con tasas más altas de criptorquidia e hipospadias, una concentración media espermática y un recuento total más bajo que en la población general, además de niveles más bajos de inhibina B y altos de FSH <sup>(11,54,83)</sup>. Otras investigaciones, en cambio, difieren en ello, observando un recuento total de espermatozoides similar a los hombres concebidos naturalmente, pero con diferencias significativas en la motilidad progresiva, morfología, gonadotropinas y concentraciones séricas de testosterona <sup>(26)</sup>. Con respecto a las mujeres, el recuento de folículos antrales y hormona antimulleriana (AMH) en mujeres jóvenes es comparable a los valores de las mujeres nacidas de forma natural <sup>(83)</sup>.

## 6.5 Efecto epigenético de la maduración in vitro (MIV)

La maduración in vitro permite la progresión de vesículas germinales u ovocitos inmaduros hasta la etapa de metafase II, a través de medios de cultivo suplementados con factores de crecimiento, moléculas pequeñas y gonadotropinas. En ellos ha de producirse una maduración nuclear con el ensamblaje del huso meiótico y extrusión del primer corpúsculo polar, con la maduración citoplasmática de forma coordinada a través del almacenaje de proteínas y transcritos necesarios para la fertilización y soportar los primeros estadios de la embriogénesis<sup>(53)</sup>. Actualmente la Sociedad Estadounidense de Medicina Reproductiva (ASRM, del inglés American Society for Reproductive Medicine), la Sociedad de Biólogos y Tecnólogos Reproductivos y la Sociedad de Tecnología de Reproducción Asistida (SART, del inglés Society for Assisted Reproductive Technology) consideró que la MIV era segura para su uso en un contexto clínico, en mujeres en las cuales la estimulación ovárica está contraindicada, SOP o riesgo de SHO, o con motivo de preservación de la fertilidad en pacientes oncológicos con sensibilidad a los estrógenos<sup>(58)</sup>. Sin embargo, hasta ahora, los resultados obtenidos son muy heterogéneos en cuanto a las tasas de maduración, formación de blastocistos y tasas de embarazo, debido principalmente a los distintos protocolos existentes para realizar esta técnica<sup>(14)</sup>.

De forma natural, la maduración ovocitaria viene regida a través de la señalización hormonal y su efecto en el ambiente folicular a través de las células de la granulosa, células de la teca y células somáticas del ovario. La dependencia del ovocito a múltiples interacciones y la exposición a un microambiente complejo y dinámico hace que la formulación de un medio MIV sea particularmente desafiante. En la mayoría de ellos se añaden complejos proteicos biológicos indefinidos, como suero y/o albúmina materna o líquido folicular humano dificultando además la reproducibilidad del estudio. Además, investigaciones recientes contemplan la adición de melatonina al medio como regulador metabólico y antioxidante, aunque su efecto es aún tema de estudio<sup>(14,71)</sup>.

Cuando se analiza el perfil epigenético de la MCI de blastocistos obtenidos por MIV, los resultados al igual que para las otras TRA, son muy variables, con metilación diferencial en subconjuntos de CpG específicos dependientes de la composición del medio de MIV. Una gran parte de los autores observan hipometilación en locus *Igf2* y *Mest/Peg1*, e hipermetilación en el locus *H19*, en blastocistos de ratón, aunque no todos obtuvieron dichos resultados<sup>(2)</sup>. Pese a ello, todos coinciden en que las alteraciones de metilación



provocadas en estadio de vesícula germinal pueden contribuir como modificaciones epigenéticas hereditarias en blastocistos completamente expandidos y desarrollados <sup>(75)</sup>.

En el perfil transcriptómico de la MIV, algunos autores señalan variaciones mínimas cuando se comparan con ovocitos madurados in vivo <sup>(62)</sup>. Se observa una pequeña regulación positiva sobre genes relacionados con la transducción de señales y metabolismo; y una regulación negativa en genes implicados en la biosíntesis de proteínas, regulación traslacional, ciclo celular y homeostasis lo que conlleva a una maduración deficiente o incompleta <sup>(81)</sup>. Otros en cambio, observan una alteración en la transcripción de genes responsables del ciclo celular, transporte y metabolismo celular y embriogénesis, lo cual podría explicar la dificultad de estos ovocitos en obtener tasas de embarazo exitosas <sup>(14,32)</sup>.

Como solución a estos posibles efectos se ha propuesto la MIV en cocultivo con células ovárica. Esta técnica no solo ha permitido mejorar la morfología como la competencia ovocitaria de la MIV, sino que también genera embriones con un perfil epigenético global similar a los obtenidos por procedimientos convencionales en reproducción asistida <sup>(53)</sup>.

El seguimiento a largo plazo de los niños nacidos de MIV en mujeres con SOP no mostró diferencias en el peso, prematuridad, diabetes gestacional o desarrollo físico y mental de los recién nacidos con MIV o con estimulación ovárica. En cambio, sí encontraron un aumento en los trastornos hipertensivos durante el embarazo y aborto espontáneo, aunque estos podrían ser una condición de las mujeres con SOP y no del uso de MIV. Además, hay que tener en cuenta que el procedimiento de MIV implica una gran manipulación en el laboratorio que puede influir en la reprogramación epigenética del embrión posterior, por lo que aislar el efecto exclusivo de la MIV en el genoma del ovocito es realmente complejo <sup>(58)</sup>.

## 6.6 Efecto epigenético de la biopsia de trofoectodermo

La biopsia de trofoectodermo consiste en la extracción de 5 o más células del trofoectodermo embrionario para el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), permitiendo con ello la detección de trastornos genéticos hereditarios y/o anomalías cromosómicas responsables del fallo de implantación. El estrés mecánico inducido ha cuestionado si pudiese conllevar una alteración epigenética adicional en el desarrollo placentario y fetal.

El trabajo realizado por Rhon Calderon et al., 2024, muestra que el uso de la biopsia embrionaria en combinación con los procedimientos de FIV exacerba los fenotipos observados en comparación con la FIV únicamente. Ambos procedimientos conllevan un aumento de peso placentario y disminución del peso fetal, pero entre ellos no se observan diferencias al respecto. En cambio, si manifiestan una pérdida en la densidad de vasos sanguíneos placentarios, perjudicando la transferencia de nutrientes y oxígeno al feto. A largo plazo, el efecto de la biopsia aumentó los trastornos metabólicos, incluyendo niveles elevados de glucosa, insulina, triglicéridos, y niveles más bajos de colesterol y HDL, aunque se necesita de más investigación para su comprensión <sup>(57)</sup>. En cuanto a los efectos adversos maternos, no se encontró ninguna correlación ni aumento de ellos por el uso de la biopsia, aunque, actualmente, no existe una comprensión clara debido a la limitación de datos existentes <sup>(57)</sup>.

En cuestión a los cambios epigenéticos, se observa una hipometilación general mayor en el ADN y en ICR involucrados en el desarrollo fetal y placentario en embriones biopsiados con diferencias específicas entre sexos, y en comparación con la FIV y los concebidos naturalmente. La expresión génica coordinada es fundamental para el desarrollo durante las primeras etapas embrionarias, y su desregulación, potenciada por el uso de la biopsia, podría ser la responsable de un mayor bloqueo y muerte fetal <sup>(57)</sup>.

Por otra parte, debemos de tener en cuenta que la gran mayoría de las clínicas vitrifican los blastocistos biopsiados hasta la obtención e interpretación de los resultados. La adición de la vitrificación después de la biopsia mostró una descendencia con peso fetal y placentario similar a cuando se realiza una FIV únicamente. Sin embargo, la morfología placentaria y las diferencias de metilación se vieron más exacerbadas cuando se combinaron ambas técnicas <sup>(57)</sup>.

## 7. Conclusiones

- Los resultados sugieren que puede haber una asociación entre los trastornos de impronta y las técnicas de reproducción asistida por errores epigenéticos que aumenten la frecuencia de aparición de estos.
- Los factores genéticos y epigenéticos que acompañan a la infertilidad y/o edad avanzada de las parejas, pueden ser condicionantes de la aparición de las adversidades descritas. No obstante, se precisan de más estudios que corroboren dicha asociación.
- Se sugiere la estimulación ovárica como el responsable de la alteración de los patrones de metilación ovocitarios, aunque los resultados no son concluyentes. Además, la alteración de las condiciones fisiológicas del ambiente uterino compromete el desarrollo embrionario con posible efecto posterior.
- La manipulación in vitro, y las diferentes técnicas aplicadas, se relacionan con alteraciones epigenéticas, pero los resultados son inconclusos.
- En general, se requieren de estudios bien diseñados, y con un seguimiento a largo plazo, para extraer conclusiones válidas acerca de la salud de los niños concebidos por técnicas de reproducción humana asistida.

## 8. Anexos

Anexo 1: recopilación de algunos de los IG que intervienen en el crecimiento y desarrollo embrionario <sup>(16,65)</sup>.

Ratón		Humano				Función
<i>Zac1</i>	Paterno	<i>ZAC1/PLAG1</i>	Paterno	6q24	TNMD	Promueve el crecimiento, formación ósea y letalidad neonatal. Codifica una proteína que actúa como supresor del crecimiento celular
<i>Grb10</i>	Materno	<i>GRB10</i>	Materno	7q12.1	SRS TNMD	Alelo paterno expresado en el cerebro y alelo materno expresado en trofoblastos placentarios. 'se transcribe a una proteína que interactúa con los receptores de insulina y del factor del crecimiento similares a la insulina. Su sobreexpresión da como resultado la supresión del crecimiento. Tras el nacimiento, el aumento de su expresión se ha relacionado con diabetes tipo 2 y Alzheimer <sup>(2)</sup> .
<i>Peg10</i>	Paterno	<i>PEG10</i>	Paterno	7q21.3	SRS BWS	Implicado en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Responsable de la organización estructural de la placenta, asegurando tanto la diferenciación celular como el transporte de nutrientes dentro de la misma. En humanos, alteraciones moleculares en estos genes han sido observadas en SRS y BWS <sup>(16)</sup>
<i>Mash2</i>	Materno	<i>ASCL2</i>	Materno	11p15.5	BWS	Determinación de precursores neuronales
<i>Mest/Peg1</i>	Paterno	<i>MEST</i>	Paterno	7q32.2	SRS	Regulación del crecimiento fetal y placentario. Recientemente se ha observado una regulación negativa en mujeres con preeclampsia de aparición temprana.
<i>Igf2</i>	Paterno	<i>IGF2</i>	Paterno	11p15.5	BWS/SRS	Promueve el crecimiento placentario, y se encuentra bajo el control del ICR1 <i>H19/IGF2</i> : IG-DMR, con impronta paterna. Su transcrito es clave para el crecimiento embrionario y placentario. Disminuciones en su transcripción causa una reducción pasiva de los nutrientes, y como consecuencia, un retraso en el crecimiento intrauterino y postnatal, como en BWS <sup>(2,16)</sup> . Además, se encuentra relacionado con la regeneración vascular cardíaca en la miocardiopatía diabética tipo 2 <sup>(9)</sup>
<i>Cdkn1c</i>	Materno	<i>CDKN1C</i>	Materno	11p15.5	BWS/SRS	Regulado por el ICR2 ( <i>KCNQ1OT1</i> :TSS-DMR, codifica una proteína que actúa como regulador negativo de la proliferación celular. Variantes patogénicas con pérdida de función se han observado en BWS, y al contrario, variantes con ganancias de función es característica de SRS. Además de su influencia prenatal, las variantes patogénicas también se han asociado a un mayor riesgo de preeclampsia durante el embarazo <sup>(16)</sup> . Las epimutaciones de estos DMR son más susceptibles al efecto de la TRA en comparación con otras etiologías genéticas como la disomía uniparental (UDP) de los cromosomas 7 y 11 <sup>(24)</sup> .

<i>Kcnq1ot1</i>	Paterno	<i>KCNQ1OT1</i>	Paterno	11p15.5	BWS	Se transcribe a un ARN no codificante que ayuda a la regulación de genes esenciales para el crecimiento y desarrollo normal del embrión.
<i>Gtl2</i>	Materno	<i>MEG3</i>	Materno	14q32.2	Síndrome de Temple (TS14) / Síndrome de Kagami Ogata (KOS14)	Responsable del crecimiento y desarrollo embrionario de forma similar al locus <i>H19/IGF2</i> <sup>(3)</sup>  Inhibe la proliferación de células tumorales in vitro. interactúa con p53 (supresor de tumores) a través de la regulación de un gen diana.
<i>Peg3</i>	Paterno	<i>PEG3</i>	Paterno	19q13.43	TNDM	Participa en la proliferación celular y apoptosis mediada por p53. Se expresa en la embriogénesis temprana en la placenta, gónadas, músculo y cerebro, e interviene en el crecimiento fetal a través de la reducción de masa muscular. Alteraciones en su expresión conduce a un retraso en el crecimiento fetal, y anomalías en el desarrollo neurológico por aumento de apoptosis neuronal <sup>(3,71)</sup> .
<i>snrpn</i>		<i>SNRPN</i>	Paterno	15q11.2	PWS o AS	Contribuye al empalme alternativo específico del tejido. Se expresa principalmente en el corazón y en el cerebro. El estudio de la población infértil manifiesta un patrón de metilación anormal en SNRPN el cual podría transmitirse a la descendencia dando lugar a la aparición de los ID (PWS, y AS). Además, muestra una correlación directa entre la metilación del mismo y la edad avanzada paterna, y el espectro autista.
<i>h19</i>	materno	<i>H19</i>	Materno	11p15.5	BWS	Regula la traducción y expresión de <i>IGF2</i> <sup>(17)</sup> . Gen supresor de tumores. Desarrolla un papel importante controlando y limitando el crecimiento placentario y fetal <sup>(2)</sup> . En términos generales las TRA producen una hipometilación del alelo paterno, lo que conlleva a una expresión bialélica errónea en blastocistos de ratón. Además, las alteraciones persisten tras la implantación teniendo efecto directo en el crecimiento intrauterino. En cambio, cuando se observan los niveles de metilación después de una FET, el DMR <i>H19/IGF2</i> se encuentra hipermetilado en sangre del cordón umbilical <sup>(5,8)</sup>

Anexo 2: Tabla resumen de las principales características moleculares responsables de la aparición de los ID <sup>(16)</sup>.

Trastorno de impronta	Cromosoma	DMR específico	Fenotipo intrauterino	Parto prematuro	Fenotipo placentario	Defectos moleculares y frecuencia confirmada
<b>Diabetes mellitus neonatal transitoria</b>	6q24	PLAGL1:alt-TSS-DMR	restricción de crecimiento y defectos en la pared abdominal	30-37%		upd(6)pat 41% dup(6q24)pat 29% PLAGL1:alt-TSS-DMR:LOM 30%
<b>Síndrome de Silver-Russell</b>	7	<i>GRB10</i> :alt-TSS-DMR a, <i>MEST</i> :alt-TSS-DMR a		sí	calcificación	upd(7)mat 15,8%
	11p15.15	<i>H19/IGF2:IG-DMR</i>	restricción en el crecimiento		en ratones se ha visto un bajo crecimiento placentario y vascularización	upd(11p15)mat (un único caso) del(11p15)pat (un único caso) dup(11p15)mat 2,3% Hipometilación en <i>H19/IGF2:IG:DMR</i> : 67,6% <i>CDKN1C</i> (GoF), <i>IGF2</i> , <i>HMGA2</i> , <i>PLAG1</i> : SNVs, CNVs (muchos casos)
<b>Síndrome de Beckwith-Wiedemann</b>	11p15.5	<i>H19/IGF2:IG-DMR</i>		sí		upd(11p15)pat 19,5%
		<i>KCNQ1OT1:TSS-DMR</i>	sobrecrecimiento. defectos en la pared abdominal. displasia placentaria. preeclampsia		placentomegalia	dup(11p15)pat <1% Hipermetilación ICR1 <i>H19/IGF2:IG-DMR</i> : 11,8% Hipometilación ICR2 <i>KCNQ1OT1:TSS-DMR</i> : 64% <i>CDKN1C</i> : (LoF) SNVs: sporadic, familiar 5-40%
<b>Síndrome de Prader Willy</b>	15q11q13	<i>SNRPN</i> :alt-TSS-DMR	SGA: 53%	26%		del(15q11q13)pat 70-75% upd(15)mat 25-30% SNURF:TSS-DMR:GOM 1%
<b>Síndrome de Angelman</b>	15q11.2-q13	<i>UBE3A</i>				del(15q11.2q13)mat 65-75%

LOM: pérdida de metilación. GOM: ganancia de metilación.

## 9. Bibliografía

1. Acosta-Fernández E, Corona-Rivera JR, Ríos-Flores IM, Torres-Anguiano E, Corona-Rivera A, Peña-Padilla C, et al. Usefulness of the MS-MLPA technique in the diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Gac Med Mex.* 2022;158(4):202-9.
2. Ahmadi H, Aghebati-Maleki L, Rashidiani S, Csabai T, Nnaemeka OB, Szekeres-Bartho J. Long-Term Effects of ART on the Health of the Offspring. *Int J Mol Sci.* 1 de septiembre de 2023;24(17):13564.
3. Barberet J, Binquet C, Guilleman M, Doukani A, Choux C, Bruno C, et al. Do assisted reproductive technologies and in vitro embryo culture influence the epigenetic control of imprinted genes and transposable elements in children? *Hum Reprod.* 25 de enero de 2021;36(2):479-92.
4. Barberet J, Ducreux B, Guilleman M, Simon E, Bruno C, Fauque P. Effects of assisted reproductive technology on gene expression in heart and spleen tissues of adult offspring mouse. *Hum Reprod Update.* 25 de agosto de 2022;28(5):629-55.
5. Barberet J, Romain G, Binquet C, Guilleman M, Bruno C, Ginod P, et al. Do frozen embryo transfers modify the epigenetic control of imprinted genes and transposable elements in newborns compared with fresh embryo transfers and natural conceptions? *Fertil Steril.* diciembre de 2021;116(6):1468-80.
6. Cammarata-Scalisi F, Avendaño A, Stock F, Callea M, Sparago A, Riccio A. Beckwith-Wiedemann syndrome: clinical and etiopathogenic aspects of a model genomic imprinting entity. *Arch Argent Pediatr.* 1 de octubre de 2018;116(5):368-73.
7. Caroppo E, Skinner MK. Could the sperm epigenome become a diagnostic tool for evaluation of the infertile man? *Hum Reprod.* 1 de marzo de 2024;39(3):478-85.
8. Chen H, Zhang L, Meng L, Liang L, Zhang C. Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. *Clinical Epigenetics.* 3 de noviembre de 2022;14(1):141.
9. Chen H, Zhang L, Yue F, Cui C, Li Y, Zhang Q, et al. Effects of assisted reproductive technology on gene expression in heart and spleen tissues of adult offspring mouse. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1035161.
10. Chen Z, Hagen DE, Elsik CG, Ji T, Morris CJ, Moon LE, et al. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 de abril de 2015;112(15):4618-23.
11. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril.* octubre de 2018;110(5):810-4.
12. Cortessis VK, Azadian M, Buxbaum J, Sanogo F, Song AY, Sriprasert I, et al. Comprehensive meta-analysis reveals association between multiple imprinting disorders and conception by assisted reproductive technology. *J Assist Reprod Genet.* junio de 2018;35(6):943-52.

13. Denomme MM, McCallie BR, Haywood ME, Parks JC, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Paternal aging impacts expression and epigenetic markers as early as the first embryonic tissue lineage differentiation. *Hum Genomics*. 26 de marzo de 2024;18(1):32.
14. Ducreux B, Patrat C, Trasler J, Fauque P. Transcriptomic integrity of human oocytes used in ARTs: technical and intrinsic factor effects. *Hum Reprod Update*. 3 de enero de 2024;30(1):26-47.
15. Duijn L van, Steegers-Theunissen RPM, Baart EB, Willemsen SP, Laven JSE, Rousian M. The impact of IVF culture medium on post-implantation embryonic growth and development with emphasis on sex specificity: the Rotterdam Periconceptual Cohort. *Reproductive BioMedicine Online*. 1 de diciembre de 2022;45(6):1085-96.
16. Eggermann T. Human Reproduction and Disturbed Genomic Imprinting. *Genes (Basel)*. 26 de enero de 2024;15(2):163.
17. Erdoğan K, Sanlier NT, Sanlier N. Are epigenetic mechanisms and nutrition effective in male and female infertility? *J Nutr Sci*. 2023;12:e103.
18. Estrada-Cortés E, Ortiz W, Rabaglino MB, Block J, Rae O, Jannaman EA, et al. Choline acts during preimplantation development of the bovine embryo to program postnatal growth and alter muscle DNA methylation. *FASEB J*. octubre de 2021;35(10):e21926.
19. Estudillo E, Jiménez A, Bustamante-Nieves PE, Palacios-Reyes C, Velasco I, López-Ornelas A. Cryopreservation of Gametes and Embryos and Their Molecular Changes. *Int J Mol Sci*. 8 de octubre de 2021;22(19):10864.
20. European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Smeenk J, Wyns C, De Geyter C, Kupka M, Bergh C, et al. ART in Europe, 2019: results generated from European registries by ESHRE†. *Hum Reprod*. 4 de diciembre de 2023;38(12):2321-38.
21. Ginod P, Dahan MH. Polygenic embryo screening: are there potential maternal and fetal harms? *Reproductive BioMedicine Online [Internet]*. 1 de diciembre de 2023 [citado 2 de mayo de 2024];47(6). Disponible en: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(23\)00427-3/fulltext](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(23)00427-3/fulltext)
22. Graham ME, Jelin A, Hoon AH, Wilms Floet AM, Levey E, Graham EM. Assisted reproductive technology: Short- and long-term outcomes. *Dev Med Child Neurol*. enero de 2023;65(1):38-49.
23. H Petersen S, Westvik-Johari K, Spangmose AL, Pinborg A, Romundstad LB, Bergh C, et al. Risk of Hypertensive Disorders in Pregnancy After Fresh and Frozen Embryo Transfer in Assisted Reproduction: A Population-Based Cohort Study With Within-Sibship Analysis. *Hypertension*. febrero de 2023;80(2):e6-16.
24. Hara-Isono K, Matsubara K, Mikami M, Arima T, Ogata T, Fukami M, et al. Assisted reproductive technology represents a possible risk factor for development of



- epimutation-mediated imprinting disorders for mothers aged  $\geq 30$  years. *Clin Epigenetics*. 22 de julio de 2020;12(1):111.
25. Hardy MLM, Day ML, Morris MB. Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed In Vivo and In Vitro. *Int J Environ Res Public Health*. 29 de octubre de 2021;18(21):11374.
  26. Hart RJ, Wijs LA. The longer-term effects of IVF on offspring from childhood to adolescence. *Front Reprod Health*. 2022;4:1045762.
  27. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, et al. Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenetics*. 7 de febrero de 2019;11(1):21.
  28. Henningsen AA, Gissler M, Rasmussen S, Opdahl S, Wennerholm UB, Spangsmose AL, et al. Imprinting disorders in children born after ART: a Nordic study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod*. 1 de mayo de 2020;35(5):1178-84.
  29. Horánszky A, Becker JL, Zana M, Ferguson-Smith AC, Dinnyés A. Epigenetic Mechanisms of ART-Related Imprinting Disorders: Lessons From iPSC and Mouse Models. *Genes (Basel)*. 26 de octubre de 2021;12(11):1704.
  30. Hua L, Chen W, Meng Y, Qin M, Yan Z, Yang R, et al. The combination of DNA methylome and transcriptome revealed the intergenerational inheritance on the influence of advanced maternal age. *Clin Transl Med*. septiembre de 2022;12(9):e990.
  31. Ji P, Liu Y, Yan L, Jia Y, Zhao M, Lv D, et al. Melatonin improves the vitrification of sheep morulae by modulating transcriptome. *Front Vet Sci*. 18 de octubre de 2023;10:1212047.
  32. Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, et al. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod*. mayo de 2008;23(5):1138-44.
  33. Karami Hezarcheshmeh F, Yaghmaei P, Hayati Roodbari N, Yari K. Methylation Status of cAMP-responsive Element Modulator (CREM) Gene in Infertile Men and Its Association with Sperm Parameters. *Reprod Sci*. 18 de marzo de 2024;
  34. Keane JA, Ealy AD. An Overview of Reactive Oxygen Species Damage Occurring during In Vitro Bovine Oocyte and Embryo Development and the Efficacy of Antioxidant Use to Limit These Adverse Effects. *Animals (Basel)*. 21 de enero de 2024;14(2):330.
  35. Koeck RM, Busato F, Tost J, Zandstra H, Remy S, Langie S, et al. At age 9, the methylome of assisted reproductive technology children that underwent embryo culture in different media is not significantly different on a genome-wide scale. *Hum Reprod*. 31 de octubre de 2022;37(11):2709-21.
  36. Kopca T, Tulay P. Association of Assisted Reproductive Technology Treatments with Imprinting Disorders. *Glob Med Genet*. marzo de 2021;8(1):1-6.

37. Lafontaine S, Labrecque R, Palomino JM, Blondin P, Sirard MA. Specific imprinted genes demethylation in association with oocyte donor's age and culture conditions in bovine embryos assessed at day 7 and 12 post insemination. *Theriogenology*. diciembre de 2020;158:321-30.
38. Leanza C, Cannarella R, Barbagallo F, Gusmano C, Calogero AE. Does Sperm SNRPN Methylation Change with Fertility Status and Age? A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Biomedicines*. 16 de febrero de 2024;12(2):445.
39. Li M, Han J, Yang N, Li X, Wu X. Transcriptome profiling reveals superovulation with the gonadotropin-releasing hormone agonist trigger impaired embryo implantation in mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1354435.
40. Li P, Zhang H, Yan K, Sui L, Du Y, Hu J, et al. Insufficient pyruvate in culture medium arrests mouse embryos at the first cleavage stage associated with abnormal epigenetic modifications. *Theriogenology*. 15 de marzo de 2022;181:119-25.
41. Lu X, Mao J, Qian C, Lei H, Mu F, Sun H, et al. High estrogen during ovarian stimulation induced loss of maternal imprinted methylation that is essential for placental development via overexpression of TET2 in mouse oocytes. *Cell Commun Signal*. 19 de febrero de 2024;22(1):135.
42. Mackay DJG, Temple IK. Transient neonatal diabetes mellitus type 1. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 15 de agosto de 2010;154C(3):335-42.
43. Mani S, Ghosh J, Rhon-Calderon EA, Lan Y, Ord T, Kalliora C, et al. Embryo cryopreservation leads to sex-specific DNA methylation perturbations in both human and mouse placentas. *Hum Mol Genet*. 10 de noviembre de 2022;31(22):3855-72.
44. Mani S, Mainigi M. Embryo Culture Conditions and the Epigenome. *Semin Reprod Med*. mayo de 2018;36(3-04):211-20.
45. Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MRW. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet*. 1 de enero de 2010;19(1):36-51.
46. Marshall KL, Rivera RM. The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev*. febrero de 2018;85(2):90-105.
47. Mertens J, Belva F, van Montfoort APA, Regin M, Zambelli F, Seneca S, et al. Children born after assisted reproduction more commonly carry a mitochondrial genotype associating with low birthweight. *Nat Commun*. 9 de febrero de 2024;15(1):1232.
48. Mim RA, Soorajkumar A, Kosaji N, Rahman MM, Sarker S, Karuvantevida N, et al. Expanding deep phenotypic spectrum associated with atypical pathogenic structural variations overlapping 15q11-q13 imprinting region. *Brain Behav*. abril de 2024;14(4):e3437.

49. Moreau J, Gatimel N, Lippi Y, Tavenier G, Fauque P, Guilleman M, et al. Impact of the polycarbonate strippers used in assisted reproduction techniques on embryonic development. *Hum Reprod.* 25 de enero de 2021;36(2):331-9.
50. Mulder CL, Wattimury TM, Jongejan A, de Winter-Korver CM, van Daalen SKM, Struijk RB, et al. Comparison of DNA methylation patterns of parentally imprinted genes in placenta derived from IVF conceptions in two different culture media. *Hum Reprod.* 27 de marzo de 2020;35(3):516-28.
51. Ochoa E. Alteration of Genomic Imprinting after Assisted Reproductive Technologies and Long-Term Health. *Life (Basel).* 22 de julio de 2021;11(8):728.
52. Paulson RJ, Adashi EY. The unbearable ignorance of the composition of IVF culture media. *Reprod Biomed Online.* marzo de 2024;48(3):103645.
53. Piechota S, Marchante M, Giovannini A, Paulsen B, Potts KS, Rockwell G, et al. Human-induced pluripotent stem cell-derived ovarian support cell co-culture improves oocyte maturation in vitro after abbreviated gonadotropin stimulation. *Hum Reprod.* 4 de diciembre de 2023;38(12):2456-69.
54. Pinborg A, Wennerholm UB, Bergh C. Long-term outcomes for children conceived by assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* septiembre de 2023;120(3 Pt 1):449-56.
55. Qin M, Chen W, Hua L, Meng Y, Wang J, Li H, et al. DNA methylation abnormalities induced by advanced maternal age in villi prime a high-risk state for spontaneous abortion. *Clin Epigenetics.* 21 de marzo de 2023;15(1):44.
56. Rahimi S, Shao X, Chan D, Martel J, Bérard A, Fraser WD, et al. Capturing sex-specific and hypofertility-linked effects of assisted reproductive technologies on the cord blood DNA methylome. *Clin Epigenetics.* 11 de mayo de 2023;15(1):82.
57. Rhon-Calderon EA, Hemphill CN, Vrooman LA, Rosier CL, Lan Y, Ord T, et al. Trophectoderm biopsy of blastocysts following IVF and embryo culture increases epigenetic dysregulation in a mouse model. *Hum Reprod.* 5 de enero de 2024;39(1):154-76.
58. Rodrigues P, Marques M, Manero JA, Marujo MD, Carvalho MJ, Plancha CE. In vitro maturation of oocytes as a laboratory approach to polycystic ovarian syndrome (PCOS): From oocyte to embryo. *WIREs Mech Dis.* 2023;15(3):e1600.
59. Salvaing J, Peynot N, Bedhane MN, Veniel S, Pellier E, Boulesteix C, et al. Assessment of «one-step» versus «sequential» embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes. *Hum Reprod.* noviembre de 2016;31(11):2471-83.
60. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod.* enero de 2007;22(1):26-35.
61. Saucedo-Cuevas L, Ivanova E, Herta AC, Krueger F, Billooye K, Smitz J, et al. Genome-wide assessment of DNA methylation alterations induced by superovulation,

- sexual immaturity and in vitro follicle growth in mouse blastocysts. *Clin Epigenetics*. 16 de enero de 2023;15(1):9.
62. Sciorio R, Campos G, Tramontano L, Bulletti FM, Baldini GM, Vinciguerra M. Exploring the effect of cryopreservation in assisted reproductive technology and potential epigenetic risk. *Zygote*. octubre de 2023;31(5):420-32.
  63. Sciorio R, El Hajj N. Epigenetic Risks of Medically Assisted Reproduction. *J Clin Med*. 12 de abril de 2022;11(8):2151.
  64. Sciorio R, Esteves SC. Contemporary Use of ICSI and Epigenetic Risks to Future Generations. *J Clin Med*. 11 de abril de 2022;11(8):2135.
  65. Sciorio R, Manna C, Fauque P, Rinaudo P. Can Cryopreservation in Assisted Reproductive Technology (ART) Induce Epigenetic Changes to Gametes and Embryos? *J Clin Med*. 2 de julio de 2023;12(13):4444.
  66. Senapati S, Wang F, Ord T, Coutifaris C, Feng R, Mainigi M. Superovulation alters the expression of endometrial genes critical to tissue remodeling and placentation. *J Assist Reprod Genet*. octubre de 2018;35(10):1799-808.
  67. Sfontouris IA, Martins WP, Nastri CO, Viana IGR, Navarro PA, Raine-Fenning N, et al. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet*. octubre de 2016;33(10):1261-72.
  68. Shacfe G, Turko R, Syed HH, Masoud I, Tahmaz Y, Samhan LM, et al. A DNA Methylation Perspective on Infertility. *Genes (Basel)*. 27 de noviembre de 2023;14(12):2132.
  69. Singh A, Rappolee DA, Ruden DM. Epigenetic Reprogramming in Mice and Humans: From Fertilization to Primordial Germ Cell Development. *Cells*. 17 de julio de 2023;12(14):1874.
  70. Spaan M, Pontesilli M, van den Belt-Dusebout AW, Burger CW, van den Heuvel-Eibrink MM, Ravelli ACJ, et al. Cancer risk in children, adolescents, and young adults conceived by ART in 1983-2011. *Hum Reprod Open*. 2023;2023(3):hoad027.
  71. Sullivan-Pyke C, Mani S, Rhon-Calderon EA, Ord T, Coutifaris C, Bartolomei MS, et al. Timing of exposure to gonadotropins has differential effects on the conceptus: evidence from a mouse model†. *Biol Reprod*. 5 de octubre de 2020;103(4):854-65.
  72. Taher L, Israel S, Drexler HCA, Makalowski W, Suzuki Y, Fuellen G, et al. The proteome, not the transcriptome, predicts that oocyte superovulation affects embryonic phenotypes in mice. *Sci Rep*. 9 de diciembre de 2021;11:23731.
  73. Terho AM, Tiitinen A, Martikainen H, Gissler M, Pelkonen S. Health of singletons born after frozen embryo transfer until early adulthood: a Finnish register study. *Human Reproduction*. 1 de diciembre de 2022;37(12):2899-907.

74. Trapphoff T, Dieterle S. Cryopreservation of Ovarian and Testicular Tissue and the Influence on Epigenetic Pattern. *Int J Mol Sci.* 4 de julio de 2023;24(13):11061.
75. Tutt DAR, Guven-Ates G, Kwong WY, Simmons R, Sang F, Silvestri G, et al. Developmental, cytogenetic and epigenetic consequences of removing complex proteins and adding melatonin during in vitro maturation of bovine oocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1280847.
76. Uysal F, Kahveci S, Sukur G, Cinar O. Embryo culture media differentially alter DNA methylating enzymes and global DNA methylation in embryos and oocytes. *J Mol Histol.* febrero de 2022;53(1):63-74.
77. Uysal F, Ozturk S, Akkoyunlu G. Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *J Assist Reprod Genet.* marzo de 2018;35(3):503-13.
78. Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod.* junio de 2001;16(6):1237-43.
79. Vrooman LA, Rhon-Calderon EA, Suri KV, Dahiya AK, Lan Y, Schultz RM, et al. Placental Abnormalities are Associated With Specific Windows of Embryo Culture in a Mouse Model. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:884088.
80. Wang Y, Liu Q, Tang F, Yan L, Qiao J. Epigenetic Regulation and Risk Factors During the Development of Human Gametes and Early Embryos. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 31 de agosto de 2019;20:21-40.
81. Wells D, Patrizio P. Gene expression profiling of human oocytes at different maturational stages and after in vitro maturation. *Am J Obstet Gynecol.* abril de 2008;198(4):455.e1-9; discussion 455.e9-11.
82. Zeng Z, Wang Z, Yu P, Wang Y, Pei Y, Dai Y, et al. The Association between Assisted Reproductive Technologies and Neurodevelopmental Disorders in Offspring: An Overview of Current Evidence. *J Integr Neurosci.* 16 de enero de 2024;23(1):15.
83. Zhang S, Luo Q, Meng R, Yan J, Wu Y, Huang H. Long-term health risk of offspring born from assisted reproductive technologies. *J Assist Reprod Genet.* marzo de 2024;41(3):527-50.
84. Zheng Y, Dong X, Sui C, Zhang S, Yao J, Jin L, et al. Culture medium is associated with the risks of placenta previa and macrosomia in pregnancies after in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet.* julio de 2022;306(1):239-47.
85. Home - OMIM [Internet]. [citado 13 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://omim.org/>