

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Revisión bibliográfica: Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida

Revisión bibliográfica: Biotecnoloxía da Reprodución Humana Asistida

Literature review: Biotechnology of Assisted Human Reproduction



Paula Ni3n Cabeza
Curso 2020-2021. Convocatoria: Junio

Director Acad3mico: Mar3a Isabel Gonz3lez Siso
Codirector: Manuel Becerra Fern3ndez

La Dra. María Isabel González Siso y el Dr. Manuel Becerra Fernández, en calidad de directores de este Trabajo Fin de Grado, autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

María Isabel González Siso

Manuel Becerra Fernández

ÍNDICE

Resumen/Resumo/Summary

Palabras clave

1. Introducción	6
1.1 Historia de la Biotecnología.....	6
1.2 Biotecnología Reproductiva en humanos.....	8
1.2.1 Factores asociados a la esterilidad	8
2. Objetivos	10
3. Material y Métodos	10
4. Resultados y Discusión	11
4.1 Técnicas de Reproducción Asistida	11
4.1.1 Inducción de la ovulación y coito programado	11
4.1.2 Inseminación artificial	12
4.1.3 Fecundación in vitro (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	14
4.2 Pruebas genéticas	15
4.2.1 Estudio del cariotipo, Test de cribado y Polimorfismos.....	15
4.2.2 Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP)	17
4.2.3 Aplicación de las herramientas genéticas.....	18
4.2.3.1 PCR y FISH	18
4.2.3.2 CGH.....	21
4.2.3.3 Minisequenciación.....	23
4.3 El papel de las células madre	23
4.4 Aspectos legales y éticos	24
4.4.1 El anonimato.....	25
4.4.2 La edad límite	25
4.4.3 Los embriones sobrantes.....	26
5. Conclusiones/Conclusiones	27
6. Conclusions	28
7. Bibliografía	29

RESUMEN / RESUMO

La reproducción humana asistida actualmente consta de técnicas y procesos de diagnóstico enormemente avanzados y estandarizados, lo que provoca que cada vez más parejas acudan a clínicas especializadas para tratar la infertilidad. El desarrollo exponencial de este campo biotecnológico se debe a los avances de otras disciplinas que convergen con esta, como las ciencias biomédicas o la bioética.

A su vez, los factores epidemiológicos de la esterilidad son cada vez más conocidos, que asociados a los test de cribado de enfermedades genéticas y diagnóstico genético preimplantacional, permiten que la tasa de éxito sea cada vez mayor.

A reprodución humana asistida actualmente consta de técnicas e procesos de diagnóstico enormemente avanzados e estandarizados, o que provoca que cada vez máis parellas acudan a clínicas especializadas para tratar a infertilidade. O desenvolvemento exponencial deste campo biotecnolóxico débese aos avances doutras disciplinas que converxen con esta, como as ciencias biomédicas ou a bioética.

A súa vez, os factores epidemiolóxicos da esterilidade son cada vez máis coñecidos, que asociados aos test de cribado de enfermidades xenéticas e diagnóstico preimplantacional, permiten que a taxa de éxito sexa cada vez maior.

SUMMARY

Currently, assisted human reproduction consists of highly advanced and standardized diagnostic techniques and processes, causing more and more couples to go to specialized clinics to treat infertility. The exponential development of this biotechnological field is due to the advances of other disciplines that converge with it, such as biomedical sciences or bioethics.

At the same time, the epidemiological factors of infertility are increasingly known, which, associated with genetic disease screening tests and preimplantation genetic diagnosis, allow the success rate to be ever higher.

PALABRAS CRAVE

Reproducción humana asistida, esterilidad, bioética, factores epidemiológicos, test de cribado, diagnóstico genético preimplantacional.

1. INTRODUCCIÓN

La Biotecnología Reproductiva comprende una serie de técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva y las tasas de mejoramiento genético de los animales (Palma, 2013, p.1).

La reproducción humana asistida (o fecundación artificial) tiene un papel importante en la sociedad actual, ya que las alteraciones de la fertilidad se han constituido como uno de los principales problemas de salud reproductiva. Estos tratamientos se encuentran en un desarrollo constante, y en muchos casos proporcionan una solución a parejas con problemas de fertilidad (Matorras Weining, 2011, p. 9).

La práctica de estas técnicas está sujeta a unas normas que pretenden acotar un marco estricto y limitado para su aplicación (Remohí Giménez et al., 2017, p. 991).

1.1. Historia de la Biotecnología

Los habitantes de la Edad de Piedra, seleccionaban los animales para criar ganado con mejores beneficios y las plantas que dieran las cosechas más prósperas, es ahí donde se puede marcar el punto de origen de la “manipulación genética”, en aquellos tiempos, de manera totalmente intuitiva.

No fue hasta el siglo XIX cuando realmente se desarrollaron una serie de descubrimientos con una gran implicación por parte de los científicos de aquel momento. En esta época, Mendel publica en 1865 sus resultados sobre los experimentos realizados con guisantes, dictando las leyes sobre transmisión hereditaria, sin ningún éxito en ese momento. Es en 1900 cuando se redescubren estas leyes y se considera que nace la Genética, surgiendo nuevas ramas de conocimiento (Verma et al., 2011).

Se sabía que el ADN era el que contenía la información genética, pero no fue hasta 1953 cuando *Nature* publica los resultados que revelan la estructura en doble hélice del ADN, del equipo formado por Watson y Crick, ayudados por las fotografías obtenidas con difracción de rayos X tomadas por Rosalin Franklin.

En 1966 ya se conocía el Código Genético, desarrollado por Nirenberg, Ochoa y Korana, se sabía cómo la combinación de 20 aminoácidos daba

lugar a diferentes proteínas y el importante papel que tiene el ARN en el proceso.

Finalizando la década de los 70, el manejo y conocimiento de ADN recombinante propulsa una serie de nuevos proyectos: se logra la síntesis de la hormona del crecimiento (somatotropina), insulina, vacunas, desarrollo de terapias contra el cáncer, etc (Ochando, 1989, p.10).

Comienzan a desarrollarse diferentes métodos de clonación. Como resultado de la clonación a través de la transferencia nuclear mediante células somáticas fue posible el nacimiento de la oveja Dolly, en 1996 (Palma, 2013, p. 13).

La transgénesis también cobra importancia en la década de los 90, en 1994 se aprobó la comercialización del primer alimento transgénico (Ochando, 1989, p. 35).

En los últimos años, la terapia celular ha pasado de un estado inicial de investigación clínica a una explosión de estudios clínicos regulados. La disparidad de legislación y los conflictos éticos suponen una barrera para el desarrollo del potencial de las células madre en la clínica (Lazo, 2010).

Los futuros avances que pueden surgir a partir de esta Ciencia son impredecibles, como podemos ver en la Figura 1.

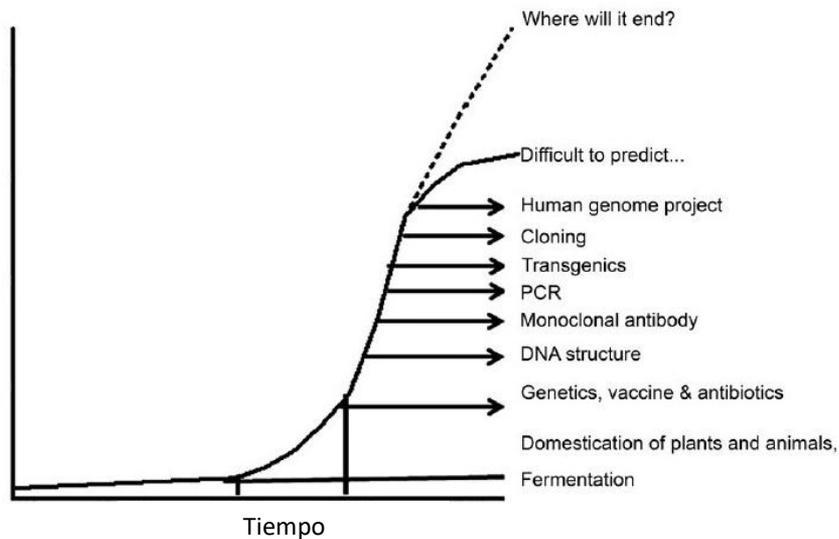


Figura 1. Historia del desarrollo de la Biotecnología. (Adaptado de Verma et al., 2011).

1. 2. Biotecnología Reproductiva en humanos

La historia de la reproducción asistida se remonta a más de 70 años atrás, cuando comenzaron los estudios que llevaron al nacimiento de los primeros niños por embarazos no espontáneos.

El primer nacimiento del mundo conseguido por fecundación *in vitro* ocurrió en 1978, en Londres, una niña llamada Louise Brown.

En España tiene lugar en 1984, nace Victoria Anna, éxito que se fue extendiendo por numerosas clínicas de reproducción asistida (Matorras Weining, 2011, p. 192).

La realidad actual es que la reproducción humana asistida es una fuente de recursos terapéuticos ampliamente estandarizados y muy difundidos en países desarrollados. La demanda de tratamientos prevé que siga aumentando el número de clínicas, muchas de ellas privadas, como se ilustra en la Figura 2 (Matorras Weining, 2011, p. 11).

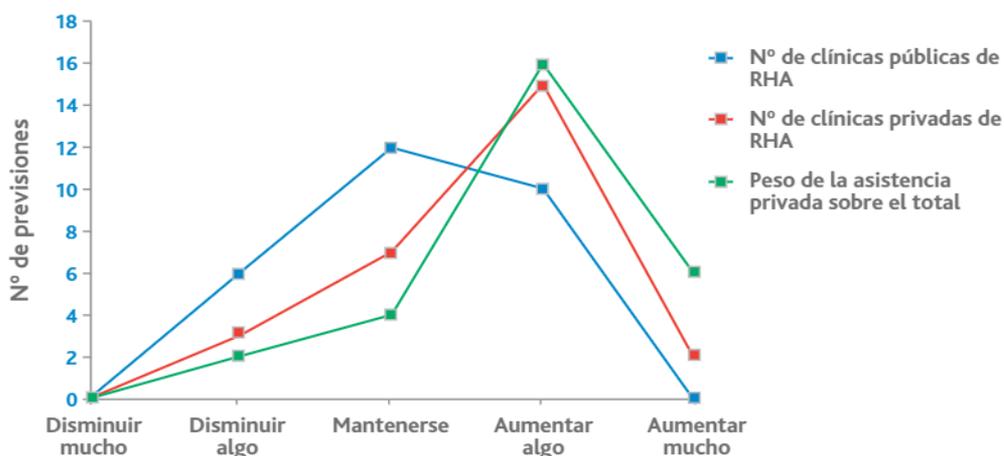


Figura 2. Tendencias e indicadores del incremento del número de clínicas. (Recuperado de Matorras Weining, 2011, p.320).

1. 2. 1. Factores asociados a la esterilidad

En nuestra sociedad, la esterilidad es un problema frecuente, pero sus aspectos epidemiológicos son poco conocidos. Actualmente se estima que el 15% de parejas en edad fértil tendrán problemas para tener un hijo de forma espontánea, aproximadamente más de 70 millones de parejas tienen problemas de esterilidad (Duque & Garcia-Velasco, p. 90, 2014; Matorras Weining, 2011, p.3).

Se cree que el factor más estrechamente ligado al aumento de parejas estériles sea el retraso en la edad en que se comienza a buscar el primer hijo (Remohí Giménez et al., 2017, cap. 2).

Otro de los factores importantes en la esterilidad es la anovulación (se produce cuando el ovario no libera óvulos), generalmente producida por desequilibrios hormonales (Camargo, 2019).

También es común el factor ovárico o tubárico (o ambos), son alteraciones en las trompas de Falopio causadas por alguna enfermedad, infecciones cérvico-vaginales, adherencia pélvica o algún tipo de esterilización quirúrgica. En la Figura 3 se indican los factores más comunes (Camargo, 2019; Remohí Giménez et al., 2017, cap. 12).

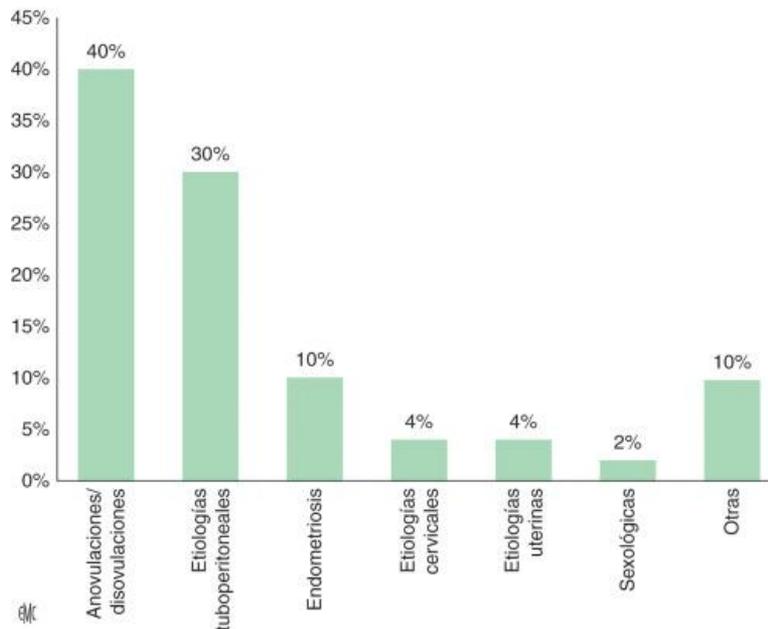


Figura 3. Principales factores que afectan a la esterilidad femenina. (Recuperado de Lepage, 2019).

Desde el punto de vista masculino, se estima que un tercio de los casos de infertilidad están relacionados con la movilidad, concentración y morfología de los espermatozoides. A diferencia de lo que ocurre en las mujeres, los hombres sufren un deterioro de la fertilidad mucho más lento, generalmente no se convierte en problema antes de que el hombre tenga 60 años (Camargo, 2019; Cates, 1982, p. 5).

La ausencia total de espermatozoides (azoospermia) afecta a un 15% de hombres infértiles, también pueden presentar una baja cantidad (oligospermia), frecuentemente producida por una enfermedad llamada varicocele, una vena agrandada en el testículo (Cocuzza et al., 2013).

Las anomalías cromosómicas más comunes que producen alteraciones en el esperma son el síndrome de Klinefelter (cariotipo 47XXY) y el síndrome de Turner (Rosas, 2007, p. 12).

El estilo de vida puede tener gran repercusión en la función reproductiva y en los tratamientos de reproducción asistida, factores como: el alcohol, el tabaco, las drogas, el estrés, la alimentación y el ejercicio (moderado o excesivo. Además, se ha demostrado que los contaminantes medioambientales (bisfenol A, pesticidas, ftalatos...) derivados de la industria de los plásticos y pesticidas pueden ocasionar la disminución de la secreción hormonal y alteración de la función reproductiva (Rashtian et al., 2019, p. 2; Remohí Giménez et al., 2017, cap. 5) .

2. OBJETIVOS

Analizar el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida (TRA) en el campo de la Biotecnología, con ayuda de búsquedas bibliográficas e información sobre el estado actual en algunas líneas de investigación.

Se pretende elaborar una visión general del tipo de pruebas, técnicas e instrumentación que se emplean en los procesos de fecundación *in vitro* (FIV) en humanos, señalando las implicaciones éticas que surgen desde su origen.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una revisión de múltiples artículos y documentos de sociedades científicas relacionadas con la Biotecnología Reproductiva y las múltiples ramas de conocimiento que engloba. Así mismo, se han consultado libros de texto relacionados con los aspectos clínicos y manuales prácticos.

Para la búsqueda de artículos, se han utilizado diferentes bases de datos como PubMed, Scopus, Web of Science y Google Scholar.

Las páginas web más visitadas han sido las correspondientes a Reproducción Asistida ORG (<https://www.reproduccionasistida.org/>) e Instituto Ingenes (<https://www.ingen.es.com/>). El período de búsqueda se realizó entre octubre de 2020 y junio de 2021.

Las palabras clave utilizadas para las búsquedas (realizadas en castellano y en inglés) han sido: “esterilidad”, “técnicas de reproducción asistida”, “causas esterilidad masculina y femenina”, “diagnóstico genético preimplantacional”, “QF-PCR diagnóstico prenatal”, “FISH diagnóstico prenatal”, “array CGH”, “bioética reproducción asistida”.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se describen las aplicaciones de las técnicas de reproducción asistida, desde las pruebas genéticas que aportan información esencial, hasta el cultivo y transferencia de embriones.

Se incluyen ventajas y puntos débiles de algunas técnicas empleadas, además de métodos en desarrollo que están sustituyendo algunas pruebas de carácter más robusto.

Finalmente, dado el tema a tratar, es pertinente ofrecer una interpretación ética y jurídica que acoge la práctica de las técnicas de reproducción asistida (TRA), concretamente en España.

4.1. Técnicas de reproducción asistida (TRA)

4.1.1 Inducción de ovulación y coito programado

El objetivo es el desarrollo de un folículo mediante el tratamiento con fármacos orales, los cuales se unen a los receptores de estrógenos hipotalámicos bloqueando la retroalimentación negativa de estradiol, lo que aumenta a su vez la hormona liberadora de gonadotropinas. La liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) aumenta, lo cual estimula los ovarios y favorece la maduración de ovocitos, esto permite programar el coito o la inseminación (Matorras Weining, 2011, p. 224; Remohí Giménez et al., 2017, p. 521).

Esta técnica se aplica a mujeres con insuficiencias ováricas, con SOP (síndrome del ovario poliquístico), con baja producción de gonadotropinas, etc (Remohí Giménez et al., 2017, p. 517).

4.1.2 Inseminación artificial

Es una técnica que consiste en depositar espermatozoides de una forma no natural en el aparato reproductor de la mujer en su período ovulatorio, con el objetivo de lograr la gestación (Remohí Giménez et al., 2017, p. 527).

Tras una estimulación ovárica previa y la captación del semen (conyugal o donante), existen varios tipos de inseminación dependiendo de dónde se implante el semen: intracervical (la más utilizada), intrauterina, intratubárica, intraperitoneal e intrafolicular (Duque & Garcia-Velasco, 2014, p. 8; Remohí Giménez et al., 2017, p. 530).

Se aconseja realizar siempre la capacitación espermática de la muestra en fresco para seleccionar los espermatozoides con mejor movilidad y eliminar el plasma seminal y la fracción de espermatozoides inmóviles, además de las células inmaduras y aquellos detritos que puedan estar presentes (Duque & Garcia-Velasco, 2014, p. 3).

Las dos técnicas más utilizadas actualmente en los laboratorios de los centros de infertilidad son el *swim up* y los gradientes de densidad. Los espermatozoides se separan del líquido seminal y se agrupan según su funcionalidad, obteniendo así los más aptos (Álvarez, 2005; Gijón et al., 2020; Remohí Giménez et al., 2017, p. 530).

- **Swim up:** se seleccionan los espermatozoides en función de su capacidad para ascender en un determinado medio. Se centrifuga para eliminar el plasma seminal y restos celulares, se añade el medio de cultivo y se deja en posición inclinada para que asciendan los espermatozoides, recogiendo posteriormente los que se encuentran en la zona superior, que son los que poseen mayor movilidad, como se puede observar en la Figura 4 (Gijón Tevar et al., 2020).

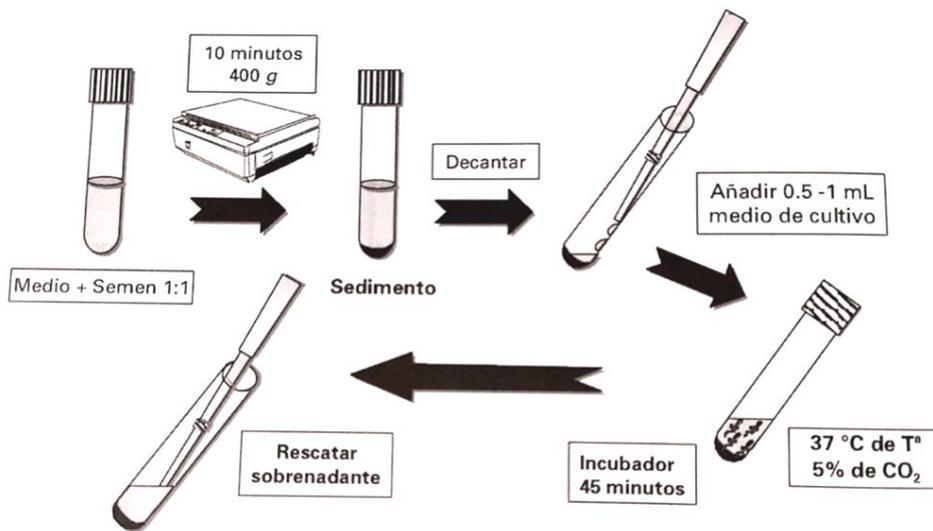


Figura 4. Capacitación por swim up. (Recuperado de Remohí et al., 2005, p. 284).

- **Gradientes de densidad:** los espermatozoides con mejor calidad y movilidad serán capaces de llegar al fondo del tubo, ya que atraviesan un mayor gradiente de densidad, tras la centrifugación son seleccionados. Este proceso se ilustra en la Figura 5 (Cervantes Ibarra et al., 2019 p. 36-37; Gijón Tevar et al., 2020).

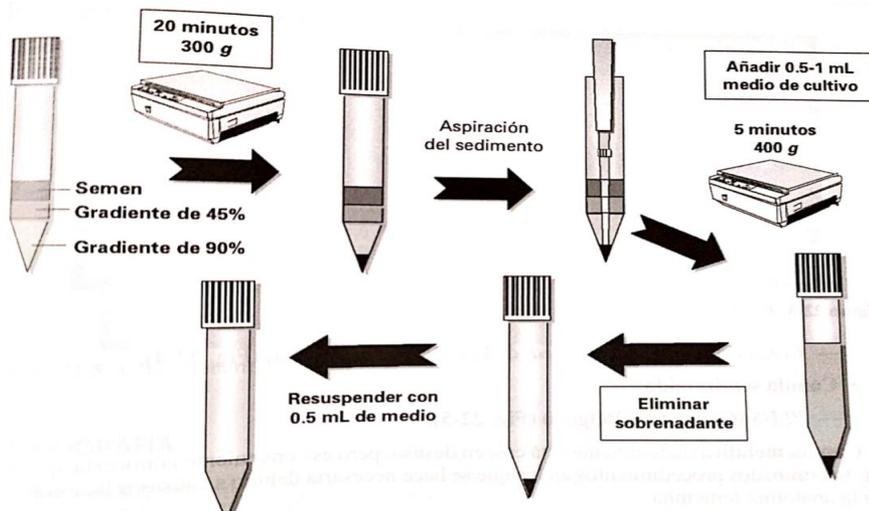


Figura 5. Capacitación por gradientes de densidad. (Recuperado de Remohí et al., 2005, p. 285).

4.1.3 Fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Esta técnica se basa en fecundar el ovocito en condiciones de cultivo *in vitro* para posteriormente transferir los embriones a la cavidad uterina. La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) consiste en la microinyección de un sólo espermatozoide en un ovocito previamente tratado (Duque & Garcia-Velasco, 2014, p. 90; Remohí Giménez et al., 2017, p. 551).

La FIV consta de unas fases principales:

- Estimulación ovárica e inducción de la ovulación (procesos ya descritos anteriormente).
- Punción folicular, consiste en la aspiración folicular por vía vaginal, recuperando los ovocitos. Tras la aspiración, se limpian los ovocitos con la ayuda de agujas y jeringas de insulina y una vez limpios se llevan a la placa de cultivo (Matorras Weining, 2011, p. 225; Remohí Giménez et al., 2017, p.53).
- Fecundación *in vitro*. Es necesario inmovilizar los espermatozoides previamente, se debe romper el flagelo para facilitar su manipulación y para que no destruya las estructuras del ovocito una vez dentro.

Una vez se ha localizado el ovocito, se debe de enfocar la zona media, donde se tenga un plano en el que aparecen nítidamente la membrana plasmática y las paredes internas y externas de la zona pelúcida, el corpúsculo polar debe de estar visible.

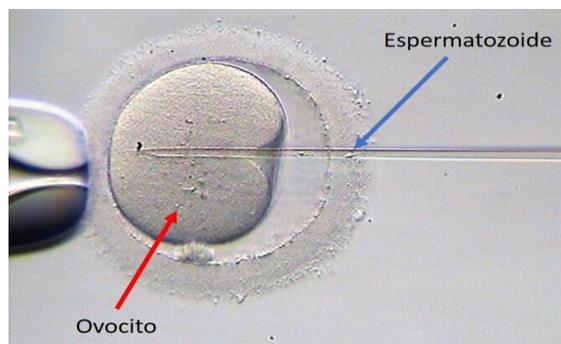


Figura 6. Inyección intracitoplasmática. (Recuperado de *Ginecualitas*).

Para llevar a cabo la microinyección, se presiona con la pipeta suavemente y se atraviesa la zona pelúcida formando un cono alrededor de la pipeta.

A continuación se rompe la membrana plasmática, como se ve en la Figura 6, y se inyecta el espermatozoide.

- Cultivo de embriones. Durante el tiempo que los embriones permanecen en el laboratorio, se les debe de proporcionar un ambiente nutritivo adecuado para que no se produzca un desarrollo disfuncional, bajo unas condiciones muy controladas (Ochoa Marieta et al., 2020; Remohí Giménez et al., 2017, p. 553).
- Transferencia de embriones, los cuales se depositan en el útero de la paciente a través del canal cervical. Se transfiere a la madre uno o dos embriones que alcanzan el estado de blastocisto, el resto son vitrificados (Matorras Weining, 2011, p. 226; Remohí Giménez et al., 2017, p. 554).

4.2. Pruebas genéticas

4.2.1. Estudio del cariotipo, Test de cribado y Polimorfismos

Los donantes de gametos se deben de someter a una serie de pruebas y determinaciones analíticas. Además de pruebas serológicas, se realizan pruebas genéticas, como puede ser el estudio del cariotipo para descartar la posibilidad de que el donante sea portador de alguna enfermedad que pueda ser transmitida a la descendencia. Para ello se realiza un análisis de sangre y se prepara un cultivo de linfocitos, de los cuales se compactarán al máximo los cromosomas para poder identificar al microscopio su número y estructura. Sin embargo, la capacidad de detección de anomalías no es muy específica, por lo que se precisa de otras técnicas para identificar duplicaciones o ausencias de pequeñas regiones cromosómicas (Carmona Serrano, 2015, p .14; Ortiz, 2013).

También se realizan test de cribado de enfermedades monogenéticas (TCG), que provocan enfermedades que están causadas por mutaciones en un único gen debido a cambios en la secuencia de ADN y que en consecuencia alteran a la proteína que es codificada por ese gen. La anemia falciforme o la fibrosis quística se producen debido a la mutación en un único gen. La técnica utilizada es la secuenciación masiva del ADN. No obstante, el TCG no incluye todas las enfermedades genéticas existentes,

ya que se desconoce la base genética, así como mutaciones que no han sido descritas todavía. Que el test sea negativo tampoco implica con certeza que no aparezca una enfermedad genética en la descendencia, ya que existe la posibilidad de que se produzcan mutaciones *de novo*, las cuales surgen de manera espontánea (Duque & Garcia-Velasco, 2014, p. 92-93; Remohí Giménez et al., 2017, p. 619).

Las técnicas de secuenciación no sólo se emplean para analizar a los donantes, sino también a progenitores que se sospecha que pueden ser portadores de ciertas enfermedades genéticas. Se recomienda su realización a personas que presentan casos de enfermedades genéticas en su familia, así como en ciertos grupos étnicos donde la incidencia de algunas enfermedades es mayor, como puede ser la enfermedad de Tay-Sachs en los judíos Ashkenazis (Remohí Giménez et al., 2017, p. 617).

El estudio de polimorfismos se utiliza para diagnosticar enfermedades en la que la mutación provoca la creación o destrucción de sitios dentro del amplicón, permiten utilizar un panel con varios marcadores para todos los portadores de una enfermedad monogénica (Carmona Serrano, 2015; Remohí Giménez et al., 2017, p. 598).

Existen diferentes polimorfismos que se pueden detectar mediante secuenciación, recopilados en la Figura 7.

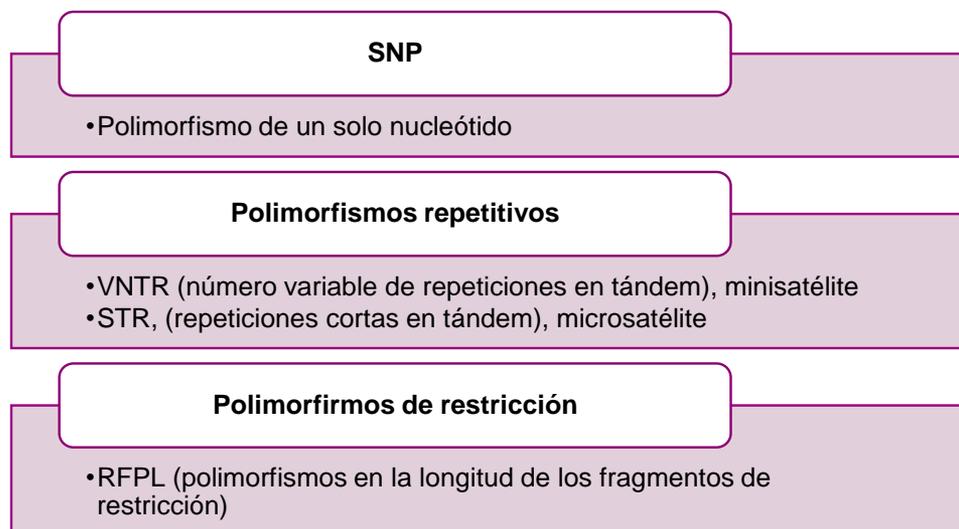


Figura 7. Tipos de polimorfismos analizados por secuenciación. (Adaptado de Torrades S., 2002).

4.2.2 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)

Este diagnóstico permite analizar la presencia de anomalías cromosómicas y genéticas en los embriones antes de ser transferidos al útero. Las indicaciones actuales del DGP para el estudio cromosómico son los casos de enfermedad hereditarias relacionadas con alteraciones cromosómicas, o bien con mutaciones genéticas, así como para seleccionar un embrión sano e histocompatible en casos de DGP con fines terapéuticos a terceros (Carmona Serrano, 2015, p. 36; Remohí Giménez et al., 2017, cap. 51).

Para la realización de este tipo de prueba se lleva a cabo una biopsia embrionaria para extraer un pequeño número de células de cada uno de los embriones y son procesadas para el estudio genético. Estos cribados del blastocisto mejoran significativamente las tasas de implantación (Scott et al., 2013; Wang et al., 2014. p. 1).

En los casos donde se requiere analizar la dotación cromosómica de los embriones, ya sea por riesgo incrementado de aneuploidías o debido a reorganizaciones cromosómicas se utiliza la técnica de NGS (*Next Generation Sequencing*). Este método es rápido y permite analizar un alto número de muestras, lo que lo hace más asequible. (Del Chierico et al., 2015; Remohí Giménez et al., 2017, p. 593).

Otra técnica ligada al DGP es el tipaje de antígenos de histocompatibilidad, estas moléculas son las responsables de que los órganos o tejidos trasplantados puedan ser reconocidos como extraños. El complejo principal de histocompatibilidad comprende más de 200 genes localizados en el cromosoma 6, estos genes poseen múltiples variantes lo que los hace únicos. El análisis se realiza mediante marcadores polimórficos de tipo microsatélite, determinando qué preembriones de los obtenidos *in vitro* son compatibles (Rodríguez Purata & Cervantes Bravo, 2020, p. 694).

Esta opción les ofrece una oportunidad a las parejas que quieran tener un hijo histocompatible con otro afectado por algún trastorno. Con un tratamiento de células hematopoyéticas, se puede utilizar las células del cordón umbilical o las células de la médula ósea del recién nacido para tratar al hijo enfermo. Es importante mencionar que esta práctica debe de

ser revisada por la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, autorizando o no el caso en cuestión (Matorras Weining, 2011, p. 103-104; Marbán Bermejo & Salvador, 2019).

4.2.3 Aplicación de las herramientas genéticas

El desarrollo de técnicas de biología molecular ha sido de vital importancia para la aplicación en diagnóstico.

4.2.3.1 PCR y FISH

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación de fragmentos de ADN. En el DGP, la más utilizada es la QF-PCR (*Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction*), que consiste en la amplificación de secuencias genómicas repetitivas, localizadas en cromosomas de interés. Se analizan el número de alelos por cromosoma y la intensidad fluorescente relativa, permitiendo conocer el número de cromosomas presentes por célula (Sabaleta Moya et al., 2015, p. 21).

Es un tipo de prueba rápida, ya que no se necesita un cultivo, aunque siempre es recomendable realizar un estudio del cariotipo o un microarray. Se realiza para estudiar los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, los cuales presentan con mayor frecuencia aneuploidías. Permite detectar si hay contaminación materna, por eso hay que analizar por separado una muestra de la madre si se sospecha que se pueda dar el caso. Así mismo, esta prueba de diagnóstico rápido permite detectar la zigosidad de los gemelos en caso de gestación múltiple (Barranco et al., 2011, p. 87; Borrell et al., 2019, p. 2).

En la Figura 8, se puede ver la detección de trisomía mediante QF-PCR, el cromosoma extra se marca con dos flechas, se detecta como un alelo extra pequeño para dos microsatélites (Cirigliano et al., 2004, p.843).

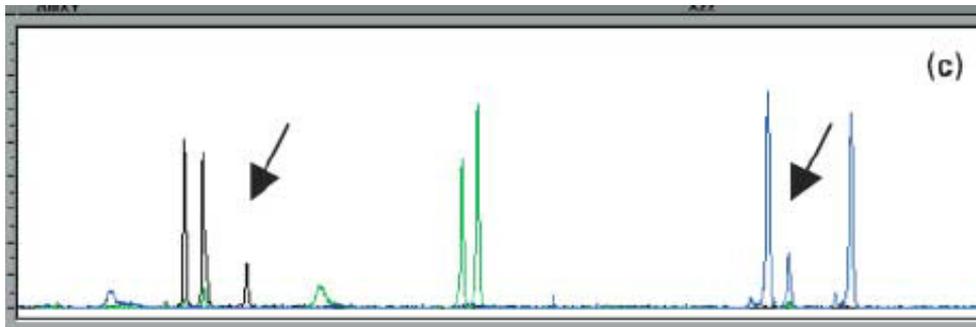


Figura 8. *Detección de trisomía mediante QF-PCR.* (Recuperado de Cirigliano et al., 2004).

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) consiste en hibridar células con sondas específicas marcadas con fluorescencia. Generalmente, las células normales se estudian con una combinación de sondas y posteriormente se procesan con otra mezcla para detectar células anormales (Carmona Serrano, 2015, p. 36-37).

En la Figura 9, se muestra una hibridación *in situ* realizada con dos sondas de copia única, una de color verde y otra de color rojo. A la izquierda de la imagen se observa un núcleo con dos señales verdes para el cromosoma 13 y dos rojas para el 21. En cambio, a la derecha, hay tres señales para el cromosoma 21, lo cual puede ser clínicamente compatible con una trisomía para ese cromosoma (Carrasco Salas et al., 2019).

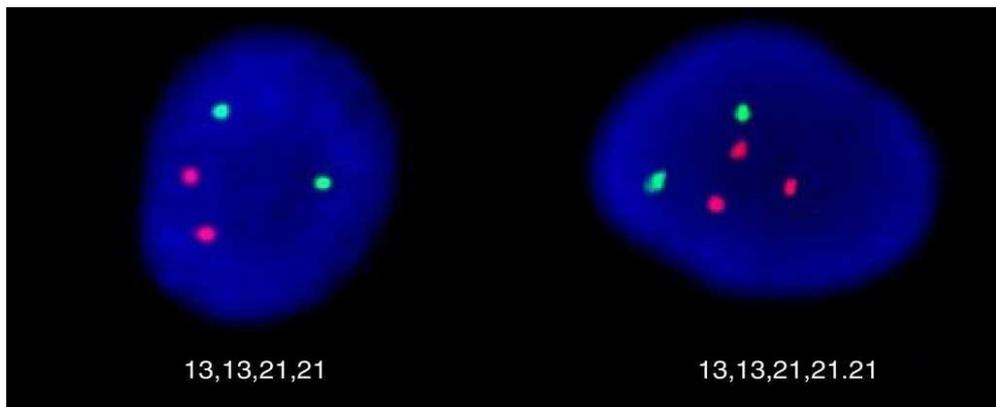


Figura 9. *Detección de trisomía mediante FISH.* (Recuperada de Carrasco Salas et al., 2019).

Si el trastorno está ligado al cromosoma sexual X y es de carácter recesivo se puede seleccionar el sexo del embrión mediante la técnica FISH, para evitar que sufra la enfermedad. Sobre todo se recomienda cuando no se pueda localizar con exactitud el gen responsable de la enfermedad en el cromosoma X o que no sea posible identificarlo. Se pueden abortar así enfermedades como la hemofilia, el síndrome de Hunter y el retraso asociado al cromosoma X, entre otras (Munné et al.,1994; Scriven et al., 2011).

La FISH también se emplea para evaluar espermatozoides, este análisis citogenético consiste en marcar con sondas de ADN fluorescente cromosomas específicos en el núcleo de los espermatozoides en estadio de interfase, para poder determinar si la dotación cromosómica es correcta (Remohí Giménez et al., 2005, p. 315-316).

En la Figura 10, se muestra una recopilación de las aplicaciones de las técnicas según el objetivo que se pretende analizar:

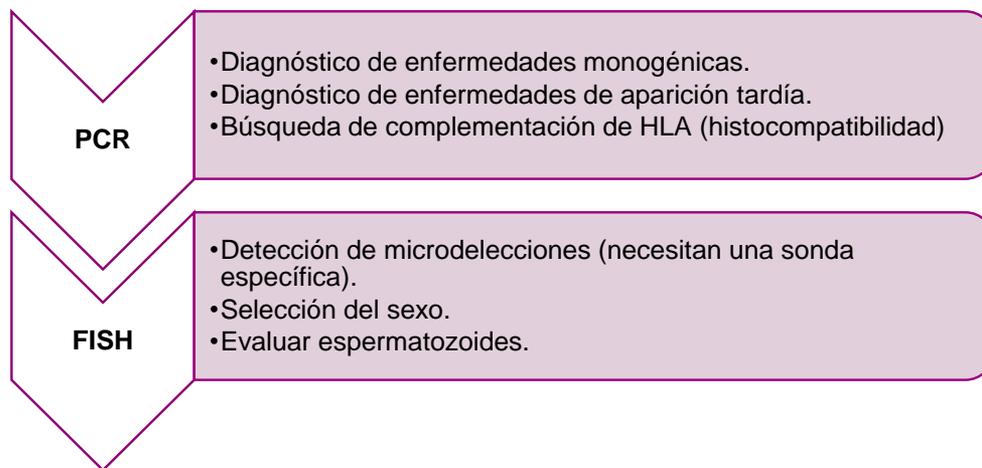


Figura 10. Aplicaciones de las técnicas PCR y FISH. (Adaptado de Sabalette et al., 2015).

A pesar de la inmensa funcionalidad de ambas técnicas, cada una presenta una serie de limitaciones a evaluar en función de lo que se vaya a analizar, que se muestran en la Figura 11.

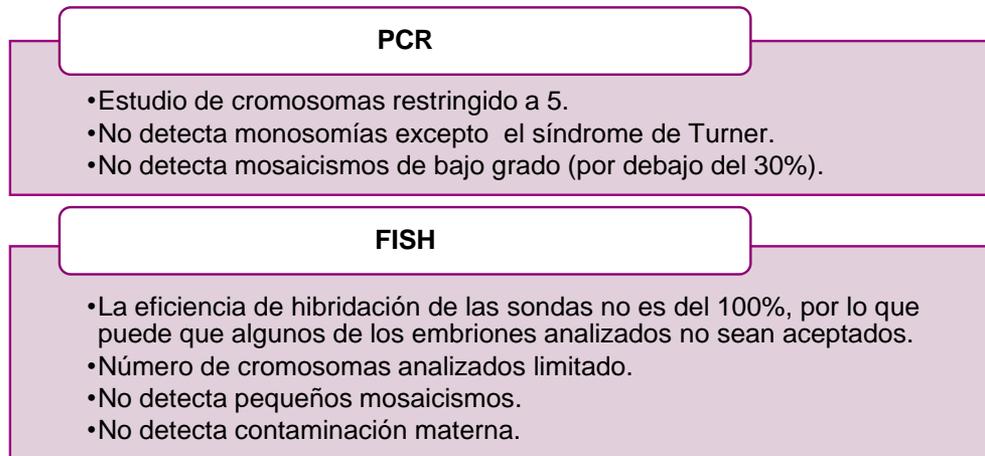


Figura 11. Limitaciones de las técnicas PCR y FISH. (Adaptado de Borrell et al., 2019, p. 3).

4.2.3.2 CGH

La técnica CGH (hibridación genómica comparada) está sustituyendo poco a poco a la FISH, ya que permite evaluar la totalidad del ADN de la célula mientras que en la FISH es parcial (Carmona Serrano, 2015; Vendrell, 2015). Hay dos métodos de CGH:

- **CGH convencional:** consiste en el marcaje diferencial de los cromosomas en metafase de una muestra a analizar y de otra muestra control. Los coeficientes de fluorescencia a lo largo de la longitud de los cromosomas informan de la variación de las copias del ADN (Martí, 2019).
- **aCGH:** las sondas empleadas como ADN molde pueden ser fragmentos de secuencias extraídas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o de oligonucleótidos (Carrasco Salas et al., 2019).

En esta variante, ilustrada en la Figura 12, se hibrida el ADN del paciente y un ADN de control, el cual debe de ser del mismo sexo que el del paciente. Ambos se marcan con dos fluorocromos distintos y se hibridan sobre una plataforma de CGH, en la que se encuentra la parte del genoma que interesa. Si una región es igual en ambas muestras, en ese punto hibrida la misma cantidad de ADN para los dos tipos, por lo que el color que se va a detectar es amarillo (la suma de los dos fluoróforos).

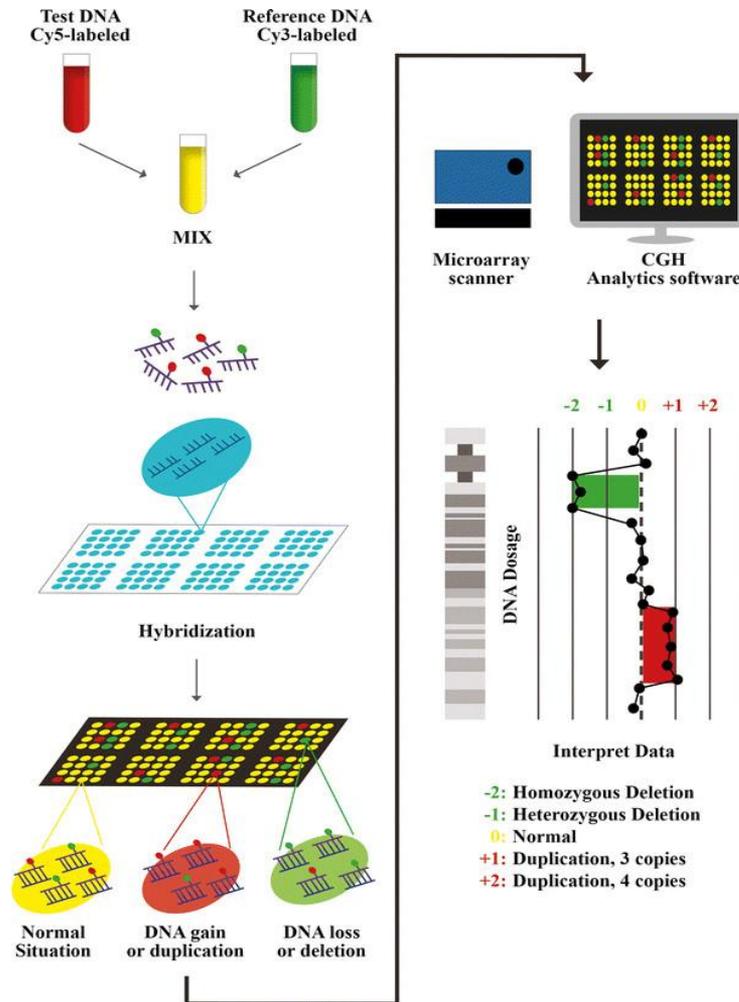


Figura 12. Principio de la hibridación genómica comparada de array. (Recuperado Colaianni et al., 2016).

Por otra parte, si el ADN presenta una delección en alguna región, se hibridará más cantidad de ADN de muestra, por lo que se verá de color verde. Si se encuentra en mayor cantidad el ADN del paciente, el color será rojo. Este conglomerado de puntos se escanean con escáneres específicos para detectar la intensidad de cada punto y posteriormente un programa informático procesa los datos y proporciona las delecciones o duplicaciones posibles.

Para que la técnica sea eficiente, en el caso de plataformas CGH *array* prenatal, tienen que estar muy enriquecidas en las regiones de interés en comparación al resto del genoma, para que a la hora del diagnóstico no haya un grado elevado de incertidumbre (García Hoyos, 2014, p. 4-8).

4.2.3.3 Minisequenciación

Para el genotipado de mutaciones puntuales se utiliza la minisequenciación, particularmente en los casos en los que las mutaciones implicadas son difíciles de analizar mediante otros métodos (Fiorentino, 2003, p. 399).

Consiste en la extensión de un cebador no marcado en el que su posición 3' está justo antes de la mutación y en la reacción de secuenciación con didesoxinucleótidos (marcados con distintos fluorocromos), en la cual se incorpora un único nucleótido al carecer del extremo 3'-OH. Cada producto da lugar a un color, esto permite conocer si la mutación está presente o no.

Esta tecnología provocará un descenso significativo de las tasas de recién nacidos afectados por enfermedades raras (aproximadamente un 0,5% de recién nacidos), por lo que es una de las mayores contribuciones del proyecto genoma humano (Remohí Giménez et al., 2017, p. 598-599).

4.3 El papel de las células madre

Las técnicas basadas en células madre experimentales, podrían dar la oportunidad a ciertos pacientes de tener sus propios hijos biológicos, por ejemplo, a varones en edad reproductiva que sufran infertilidad como efecto secundario de algún tratamiento contra el cáncer (Díaz López, 2018, p. 105).

En 2016 se obtuvieron las primeras células embrionarias con la mitad de los cromosomas, una mezcla entre un gameto (el cual posee la mitad de cromosomas) y célula madre (la cual posee la capacidad de división y diferenciación). Además, se demostró la utilidad de estas células como plataforma de cribado genético y como herramienta para la edición genética, ya que la dotación haploide proporciona una mayor facilidad de manipulación (Sagi et al., 2016).

Generación de óvulos y espermatozoides:

En ese mismo año, un grupo de científicos de la Universidad de Kyushu en Japón, desarrollaron la generación de óvulos de ratón a partir de

fibroblastos embrionarios y adultos mediante desdiferenciación y reprogramación previa como células IPS (*Induced Pluripotent Stem Cell*). Estos óvulos resultaron funcionales, los cuales se fertilizaron *in vitro* y se implantaron en ratonas para dar lugar a una descendencia con una elevada tasa de eficiencia (Hikabe et al., 2016).

La regeneración de espermatozoides también fue objeto de estudio, en 2016, un equipo de científicos de la Universidad de Nanjing, en China, consiguieron su generación a partir de células embrionarias de ratón. La inyección intracitoplasmática de células semejantes a las espermátidas masculinas produjo una descendencia euploide y fértil (Zhou et al., 2016).

4.4 Aspectos legales y éticos

Para hablar de aspectos morales, es necesario mencionar que la Bioética es la ciencia que nace de la ética médica y de diversas corrientes filosóficas, donde el hombre es el objeto de estudio. Temas como el trasplante de órganos, la criogénesis, la fecundación artificial o la clonación de seres humanos, exigen una legislación que limite las prácticas de investigación protegiendo la dignidad humana (Bergessio Fernando, 2019, p. 2).

En cuanto a la legalidad, en España surgió una de las primeras regulaciones que abordaban las TRA. Se materializó con la *Ley 35/1988*, el 22 de noviembre. La *Ley 45/2003*, de 21 de noviembre, modificó ciertos aspectos relacionados con el problema del destino de los preembriones supernumerarios, dando autorización a la utilización, bajo condiciones muy restrictivas, en investigación.

En España, actualmente la legislación vigente es la *Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida*. Esta norma posee un carácter progresista y avanzado, aunque tampoco está exenta de imprecisiones.

Uno de los aspectos a destacar es la ampliación de los usos de las TRA, que inicialmente surgieron para dar fin a problemas de fertilidad y

actualmente permiten la prevención de la transmisión de enfermedades hereditarias. Por otra banda, algunas de las imprecisiones que se pueden encontrar en la legislación vigente, es la edad máxima de una mujer para ser usuaria de estos tratamientos, ya que no se menciona. También resulta confuso que uno de los destinos de los embriones crioconservados sea la utilización por la propia mujer o su cónyuge (con otra pareja), ya que esto contradice uno de los pilares básicos de esta Ley, que es el anonimato de la donación (Remohí Giménez et al., 2017, p. 991-993).

4.4.1. El anonimato

En España, la normativa sobre TRA humana ampara el derecho a la intimidad en dos cuestiones: a la persona que recibe el tratamiento y al anonimato del donante. Los hijos tienen derecho a recibir información general de los donantes, pero no incluye su identidad (solo de modo excepcional, cuando sea necesario para evitar un peligro para la vida o la salud). En cambio, en países como Noruega, Países Bajos, Reino Unido y Finlandia, derogaron el anonimato que se implantó originalmente. Estos cambios jurídicos se han producido por actitudes de los padres hacia una mayor transparencia.

Es indiscutible que se ha generado un debate entre quienes sostienen que este anonimato se debe de seguir conservando y los que opinan que un hijo nacido por estos medios tiene el derecho a conocer la identidad de sus progenitores biológicos, estos últimos argumentan que se vulnera el derecho a la investigación a la paternidad que la Constitución reconoce, y que esto podría repercutir en el desarrollo de la propia identidad y personalidad. No obstante, hay quien opina que este conocimiento podría generar confusión y ser negativo para los hijos (Gallego Riestra & Riaño Galán, 2018).

4.4.2. La edad límite

Otro de los puntos que generan controversia es la edad a la que se le permite a una mujer participar en un programa de reproducción asistida. Tanto ANACER (Asociación Nacional de Clínicas de Reproducción Asistida)

como el Servicio de Medicina de la Reproducción del Instituto Universitario Dexeus de Barcelona acordaron estimar la edad límite en 50 años, coincidiendo con la edad en la que la mayoría de las mujeres inician la menopausia. Es oportuno mencionar, que por encima de los 40 años aumenta el riesgo del embarazo y del parto, multiplicándose al superar esta edad (Martínez González & Sánchez Jacob, 2008).

4.4.3. Los embriones sobrantes

La *Ley 14/2006* (LRA) y la *Ley 14/2007 de investigación biomédica* (LIB) consideran al embrión reproducido *in vitro* desprovisto de los caracteres que otorgan la dignidad al ser humano, lo que permite investigar y experimentar con los preembriones sobrantes de estos procesos, así como clonar estos embriones con fines terapéuticos. Por último, se admite la realización de una selección embrionaria para que los que sean implantados puedan servir como donantes de material genético que sirva como tratamiento de enfermedades de otros hijos de la mujer que se somete a la FIV.

Todos los preembriones que no vayan a ser transferidos a la mujer durante el ciclo han de crioconservarse y mantenerse adecuadamente en bancos autorizados (cada dos años, como mínimo, se solicitará de la mujer o de la pareja progenitora la renovación o modificación del consentimiento firmado previamente). Esta crioconservación se podrá prolongar hasta el momento que se considere, o bien cuando la mujer haya finalizado su etapa reproductiva, o por alguna incapacidad abalada por los responsables médicos, con el dictamen favorable de especialistas independientes y ajenos al centro correspondiente, de que la receptora no reúne los requisitos clínicos adecuados para la práctica de la TRA (Corral García, 2009, p. 188; De Pablo et al., 2018).

La polémica nace de los embriones sobrantes crioconservados que no son utilizados, cesando su conservación, lo que algunos califican como “permitir su muerte”. La razón de que haya embriones sobrantes es porque la LRA establece que “*sólo se autoriza la transferencia de un máximo de tres preembriones en cada mujer en cada ciclo reproductivo*” (art. 3.2).

Se contempla que una de las posibilidades sea su donación para la obtención de células madre embrionarias, las cuales son potencialmente valiosas para tratamientos de numerosas enfermedades (Corral García, 2009, p. 191).

5. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS

Es un hecho que el desarrollo de las TRA supone un gran avance para la ciencia médica y para mejorar la calidad de vida de aquellas parejas que se enfrentan a problemas de infertilidad. Actualmente, son necesarios multitud de análisis procedentes de diferentes campos (clínicos, genéticos, legislativos...) para llevar a cabo un tratamiento de esta índole.

El conocimiento de los factores epidemiológicos y los estudios genéticos previos, son cruciales para entender mejor las causas de esterilidad en hombres y mujeres, así como para ofrecer el mejor tratamiento posible en función de la patología diagnosticada. El amplio abanico de herramientas como el DGP permite a muchas parejas tener hijos reduciendo el riesgo de transmisión de anomalías cromosómicas, o seleccionar el sexo del embrión mediante la FISH para evitar las enfermedades genéticas ligadas al sexo.

No obstante, se debe de seguir trabajando para mejorar aquellas limitaciones que presentan estas técnicas, así como para lograr un diagnóstico con un riesgo mínimo y ampliar el espectro de enfermedades génicas que puedan ser detectadas.

Finalmente, dado que la demanda de la FIV en las clínicas de fertilidad se encuentra en auge, en un futuro, estos recursos podrían ser más accesibles al conjunto de la población. Este progreso debe ir de la mano de una legislación exenta de imperfecciones y de carácter avanzado.

É un feito que o desenvolvemento da TAR supón un gran avance para a profesión médica e para mellorar a calidade de vida daquelas parellas que se enfrentan a problemas de infertilidade. Actualmente, son necesarias

multitude de análises de diferentes campos (clínicos, xenéticos, legislativos...) para levar a cabo un tratamento destas características.

O coñecemento de factores epidemiolóxicos e estudos xenéticos previos son cruciais para comprender mellor as causas da infertilidade en homes e mulleres, así como para ofrecer o mellor tratamento posible baseado na patoloxía diagnosticada. A ampla gama de ferramentas como a PGD permite a moitas parellas ter fillos reducindo o risco de transmisión de anomalías cromosómicas ou seleccionar o sexo do embrión usando FISH para evitar enfermidades xenéticas relacionadas co sexo.

Non obstante, débese seguir traballando para mellorar as limitacións destas técnicas, así como para lograr un diagnóstico cun risco mínimo e ampliar o espectro de enfermidades xenéticas que se poden detectar.

Finalmente, dado que a demanda de FIV nas clínicas de fertilidade está en aumento, no futuro estes recursos poderían ser máis accesibles para a poboación no seu conxunto. Este progreso debe ir parello a unha lexislación libre de imperfeccións e de carácter avanzado.

6. CONCLUSIONS

It is a fact that the development of ART represents a great advance for the medical profession and to improve the quality of life of those couples who face infertility problems. Currently, a multitude of analyses from different fields (clinical, genetic, legislative ...) are necessary to carry out a treatment of this nature.

The knowledge of epidemiological factors and previous genetic studies is crucial to better understand the causes of infertility in men and women, as well as to offer the best possible treatment based on the diagnosed pathology. The wide range of tools such as PGD allows many couples to have children reducing the risk of transmission of chromosomal abnormalities, or to select the sex of the embryo using FISH to avoid genetic diseases linked to sex.

However, the work should continue to improve the limitations of these techniques, as well as to achieve a diagnosis with minimal risk and to broaden the spectrum of genetic diseases that can be detected.

Finally, since the demand for IVF in fertility clinics is on the rise, in the future, these resources could be more accessible to the population as a whole. This progress must go hand in hand with a legislation that is free from imperfections and of an advanced nature.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, J. G. (2005). Preparación del semen para Técnicas de Reproducción Asistida. *Revista Asebir*, 10(1) 28–35. <https://revista.asebir.com/preparacion-del-semen-para-tecnicas-de-reproduccion-asistida/>
- Barranco, L., Cirigliano, V., Lloveras, E., Ordonez, E., Herrero, M., Fernández, D., Palau, N., Canellas, A., Costa, M., Martín, S., Mendoza, J., Pérez, E., & Plaja, A. (2011). Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y cultivo largo: ¿el mejor método para el estudio citogenético de muestras de vellosidad corial? *Diagnostico Prenatal*, 22(3), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2011.06.003>
- Borrell, A., Sabrià, J., Badenas, C., Rodriguez-Revenga, L., & Soler, A. (2019). Estudios genéticos en muestras fetales. *Protocols Medicina Maternofoetal*, 1–15. <https://medicinafetalbarcelona.org/protocolos/es/patologia-fetal/EstudiosGeneticosEnMuestrasFetales.pdf>
- Camargo. (2019). *Instituto ingenes*. Causas de la infertilidad. <https://www.ingen.es.com/primeros-pasos/entendiendo-la-infertilidad/causas/factor-ovulatorio/anovulacion/>
- Carmona Serrano, C. (2015). *Diagnóstico genético preimplantacional: Revisión de la metodología y de las aplicaciones clínicas actuales*. [Trabajo de Grado, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/56317>
- Carrasco Salas, P., Gómez González, C., Prior de Castro, C., Cuesta Peredo, A., Santamaría González, M., Granell Escobar, R., Alcaine, M. J., Torreira Banzas, C., Reparaz Andrade, A., & Ezquieta Zubicaray, B. (2019). Estudios genéticos en diagnóstico prenatal. *Revista del Laboratorio Clínico*, 12(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2018.10.001>
- Cates, W. (1982). Age and fertility. *Hospital Practice (Office Ed.)*, 17(8), 21.
- Cervantes Ibarra, E., Durán Monterrosas, L. A., Carballo Mondragón, E., & Kably Ambe, A. (2019). Capacitación espermática: una herramienta para las técnicas de reproducción asistida. *Acta Med*, 17(S1), 34–41. <https://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2019/ams191g.pdf>

- Cirigliano, V., Voglino, G., Cañadas, M. P., Marongiu, A., Ejarque, M., Ordoñez, E., Plaja, A., Massobrio, M., Todros, T., Fuster, C., Campogrande, M., Egozcue, J., & Adinolfi, M. (2004). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18 000 consecutive clinical samples. *Molecular Human Reproduction*, 10(11), 839–846. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah108>
- Cocuzza, M., Alvarenga, C., & Pagani, R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*, 68(S1), 15–26. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(Sup01\)03](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(Sup01)03)
- Colaiani, V., Mazzei, R. & Cavallaro, S. (2016). Copy number variations and stroke. *Neurol Sci* 37, 1895–1904. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2658-y>
- Corral García, E. (2009). Reproducción Humana Asistida Y La Ley De Investigación Biomédica * The Juridical Desprotection of the Human Embryos Post the New Law of Human Assisted Reproduction and the Law of Biomedical Investigation. *Cuadernos de Bioética: Revista Oficial de La Asociación Española de Bioética y Ética Médica*, 20(69), 183–200. https://observatorio.campus-virtual.org/uploads/2446_Corral-CB2009_Desproteccion-juridica.pdf
- De Pablo, J. L., Reus, R., & Dolz Arroyo, M. (2018). *Reproducción asistida ORG*. Destino de los embriones sobrantes de una fecundación ‘in vitro.’ <https://www.reproduccionasistida.org/embriones-sobrantes-de-fecundacion-in-vitro/#:~:text=%2C%20Si%20se%20realiza%20una%20inseminaci%C3%B3n,de%20los%20embriones%20congelados%3F>
- Del Chierico, F., Ancora, M., Marcacci, M., Cammà, C., Putignani, L., & Conti, S. (2015). Choice of Next-Generation Sequencing Pipelines. In A. Mengoni, M. Galardini, & M. Fondi (Eds.), *Bacterial Pangenomics* (vol 1231, pp. 31–47). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1720-4_3
- Duque, L., & Garcia-velasco, J. A. (2005). Hablemos de...Técnicas de Reproducción Asistida. *Anales de Pediatría Continuada*, 3 (4), 199-203. https://www.researchgate.net/publication/228671412_Tecnicas_de_reproduccion_asistida
- Fiorentino, F. (2003). The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Molecular Human Reproduction*, 9(7), 399–410. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag046>
- Gabriel, B. F. (2019). *Embriones no implantados y fecundación post mortem: sus problemáticas actuales*. [Trabajo de Grado, Universidad Siglo 21]. <https://repositorio.uesiglo21.edu.ar/bitstream/handle/ues21/17400/BERGESSIO%20FERNANDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gallego Riestra, S., & Riaño Galán, I. (2018). Who decides what data should be recorded in the medical history in relation to the biological origin? *Atencion Primaria*, 50(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2017.01.009>
- García Hoyos, M. (2014). CGH array. De la muestra al informe. *Genotipia*. <https://genotipia.com/wp-content/uploads/2019/04/8.-CGH-array.-De-la-muestra->

al-informe.pdf

- Gijón Tevar, L., Ortega López, L., Rodríguez, A., & P.Trolice, M. (2020). *Reproducción Asistida ORG*. ¿En qué consiste la capacitación de los espermatozoides? <https://www.reproduccionasistida.org/capacitacion-espermatoca/>
- Hikabe, O., Hamazaki, N., Nagamatsu, G., Obata, Y., Hirao, Y., Hamada, N., Shimamoto, S., Imamura, T., Nakashima, K., Saitou, M., & Hayashi, K. (2016). Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*, 539(7628), 299–303. <https://doi.org/10.1038/nature20104>
- Lazo, P. A., Sánchez García, I. (2010). *Medicina regenerativa y células madre*. CSIC.
- Lepage, J., Epelboin, S. (2019). Primera consulta de la pareja infértil y estudio de infertilidad. *Tratado de Medicina*, 23(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(18\)41696-0](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(18)41696-0)
- Ley 14 de 2006. Sobre técnicas de reproducción humana asistida. 27 de mayo de 2006. BOE núm.126.
- Marbán Bermejo, E., & Salvador, Z. (2019). *Reproducción Asistida ORG*. ¿Qué es un “Bebé Medicamento”? Indicaciones y casos reales. <https://www.reproduccionasistida.org/bebes-medicamento/>
- Martí, I. (2019). *IFAPES*. Hibridación Genómica Comparada (CGH). <https://www.ifapes.com/hibridacion-genomica-comparada-cgh/>
- Martínez González, C., & Sánchez Jacob, M. (2008). Should there be legal or ethical restrictions on maternity achieved with techniques to assist reproduction? *Atencion Primaria*, 40(3), 145–146. <https://doi.org/10.1157/13116630>
- Matorras Weining, R. (2011). *Libro Blanco Sociosanitario. La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas*. Imago Concept & Image Development.
- Munné, S., Tang, Y. X., Grifo, J., Rosenwaks, Z., & Cohen, J. (1994). Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. *Fertility and Sterility*, 61(1), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)56462-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)56462-0)
- Ochando, M. (1989). Orígenes y bases de la revolución biotecnológica. *Centro de Estudios Constitucionales*, 1982, 168–169.
- Ochoa Marieta, C., C. Duque Royo, C., De las Heras Martínez, M., & Reus, R. (2020). *Reproducción asistida ORG*. Cultivo de embriones en el laboratorio de fecundación ‘in vitro’ (FIV). <https://www.reproduccionasistida.org/cultivo-de-embriones/>
- Ortiz, J. A. (2013). *Instituto Bernabeu Medicina Reproductiva*. Array-CGH: Comprehensive Chromosome Screening (PGS/PGT-A/CCS). <https://www.institutobernabeu.com/foro/array-cgh-descubriendo-los-misterios-del-embrion/>
- Palma, G. A. (2013). Biotecnología de la reproducción. Ciencia, Tecnología y Sociedad. *Libro Biotecnología de La Reproducción*, 1(1), 1–9.

http://www.reprobiotec.com/libro_verde/cap_01.pdf

- Rashtian, J., Chavkin, D. E., & Merhi, Z. (2019). Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0448-5>
- Remohí Giménez, J., Bellver Pradas, J., Ferrando Serrano, M., Requena Antonio, M., & Pellicer Antonio, M. (2017). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Editorial Médica Panamericana S.
- Remohí, J., Cobo, A., Romero, J.L., Pellicer, A., Simón, C. (2005). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. S.A. McGraw-Hill / Interamericana de España.
- Rodríguez Purata, J., & Cervantes Bravo, E. (2020). Conceptos básicos en inmunología de la reproducción: revisión narrativa de la bibliografía *Ginecol Obstet Mex*, 88(10), 692–699.
- Rosas, M. R. (2007). Infertilidad masculina. *El Día Médico*, 27(89), 2959–2964. <https://doi.org/10.18597/rcog.1679>
- Sabaleta Moya, T., Carlos Gil, A. M., Beltrán Calvo, A., & Romero Tabares, C. (2015). Utilidad de QF-PCR en el diagnóstico prenatal de aneuploidías fetales. *Informes de evaluación de tecnologías sanitarias AETSA*. https://www.aetsa.org/download/5_AETSA_Utilidad-de-QF_PCR-en-el-diagnostico-prenatal-de-aneuploidias-feta_DEF_NIPO.pdf
- Sagi, I., Chia, G., Golan-Lev, T., Peretz, M., Weissbein, U., Sui, L., Sauer, M. V., Yanuka, O., Egli, D., & Benvenisty, N. (2016). Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 532(7597), 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature17408>
- Scott, R. T., Upham, K. M., Forman, E. J., Hong, K. H., Scott, K. L., Taylor, D., Tao, X., & Treff, N. R. (2013). Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 100(3), 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.035>
- Scriven, P. N., Kirby, T. L., & Ogilvie, C. M. (2011). FISH for Pre-implantation Genetic Diagnosis. *Journal of Visualized Experiments*, 48. <https://doi.org/10.3791/2570>
- Torrades, S. (2002). Diversidad de los polimorfismos. *Offarm*, 21(5), p. 122-126. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13031745>
- Vendrell, X. (2015). Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana. *Diagnóstico Genético Preimplantación de Aneuploidías: de la FISH a la secuenciación masiva*, 3–11. <http://www.revistafertilidad.org/articulo/Diagnoacutestico-geneacutetico-preimplantacioacuten-de-aneuploidiacuteas-de-la-FISH-a-la-secuenciacion-acuten-masiva/187>
- Verma, A., Rastogi, S., Agrahari, S., & Singh, A. (2011). Biotechnology in the realm of history. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 321.

<https://doi.org/10.4103/0975-7406.84430>

Wang, L., Wang, X., Zhang, J., Song, Z., Wang, S., Gao, Y., Wang, J., Luo, Y., Niu, Z., Yue, X., Xu, G., Cram, D. S., & Yao, Y. (2014). Detection of Chromosomal Aneuploidy in Human Preimplantation Embryos by Next-Generation Sequencing1. *Biology of Reproduction*, *90*(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116459>

Zhou, Q., Wang, M., Yuan, Y., Wang, X., Fu, R., Wan, H., Xie, M., Liu, M., Guo, X., Zheng, Y., Feng, G., Shi, Q., Zhao, X.-Y., Sha, J., & Zhou, Q. (2016). Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. *Cell Stem Cell*, *18*(3), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.017>