

## **Patrón proteómico secretado por blastocistos viables como una posible arma diagnóstica para obtener embarazos únicos después de fecundación in vitro**

### *The implantome as research tool to prevent multiple gestation*

Carlos Simón y Antonio Pellicer

Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad.

La viabilidad embrionaria es un concepto clave en los tratamientos de fecundación in vitro. Hasta el momento, se desconocen cuáles son las características que han de reunir los embriones para garantizar que implantarán con éxito en el útero materno. Conocer las claves de la implantación, es decir, saber de antemano que embriones implantarán y cuales no, repercutiría de forma directa en el tratamiento clínico de las parejas infértiles ya que abriría las puertas a la eliminación de los embarazos múltiples. Pero además, afectaría a la implicación legal de los futuros estudios con células madre embrionarias al saber desde un principio que embriones no serán viables y, por ello, podrían emplearse para investigar al amparo de la ley vigente.

Gracias a una beca de la Bertarelli Foundation, el Instituto Valenciano de Infertilidad, a través de su fundación para la investigación, está trabajando en un proyecto de viabilidad embrionaria dirigido por Carlos Simón y llevado a cabo por los Doctores Francisco Domínguez y Jose Antonio Horcajadas en la Fundación IVI cuyo título es El patrón proteómico secretado por blastocistos viables como una posible arma diagnóstica para obtener embarazos únicos después de fecundación in vitro. El trabajo pretende encontrar marcadores objetivos y reproducibles de viabilidad embrionaria en fase de blastocisto.

A lo largo de los últimos años se ha trabajado en criterios morfológicos, metabólicos o cromosómicos para comprender mejor el desarrollo embrionario humano y las claves de la implantación del embrión, pero no se ha llegado a determinar un marcador

exacto que defina la viabilidad embrionaria. La inmensa mayoría de los marcadores son morfológicos. Existen scores, estudios multicéntricos sobre el número de blastómeras, el porcentaje de fragmentación, de simetría, de compactación. Sin embargo, hay embriones que no cumplen ningunos de estos requisitos e implantan y muchos de los embriones con estos criterios no implantan.

### **Objetivos del trabajo**

El objetivo central del trabajo, a partir de los medios tecnológicos que ofrece el campo de la proteómica, consiste en identificar las proteínas secretadas por el embrión humano de seis días (denominado blastocisto) analizando el medio de cultivo en el que se desarrolla las últimas 24 horas antes de ser transferido al útero. La identificación de los marcadores de viabilidad se obtendrá a partir de los patrones de proteínas secretados por embriones humanos que implantaron comparados con aquellos que no implantaron.

Para reconocer las moléculas que puedan servir de marcador bioquímico de viabilidad embrionaria se ha diseñado un programa de transferencia de blastocisto único, que comenzó hace dos años.

Otros objetivos secundarios son la purificación y generación de anticuerpos contra aquellas proteínas cuya presencia en el medio de cultivo esté implicada en la viabilidad del embrión. Con esto se pretende detectar dichas moléculas de forma rápida y eficaz en caso de que no existan comercialmente o sean

moléculas nuevas. También se elaborará un estudio clínico prospectivo de la producción de las proteínas identificadas en transferencias de un único embrión para demostrar que los marcadores son clínicamente útiles y por lo tanto susceptibles de ser aplicados como test diagnóstico.

Una vez analizados los resultados previos se pretende elaborar un kit de viabilidad embrionaria que permita el análisis rápido y eficaz del medio de cultivo en el que se encuentra el embrión previo a su transferencia al útero materno.

### **Muestras y técnicas de cultivo**

El proyecto lleva cinco meses de trabajo y parte de 300 muestras de 116 pacientes. A 56 se le practicaron transferencias de blastocistos simple, a 55 doble y a 5 triples. El proyecto de transferencia de blastocisto único que desarrolla el IVI se practica empleando dos técnicas: en microgota de 50 microlitros, con el medio de cultivo secuencial, o cocultivo de 500 microlitros, en el que se usan células de epitelio endometrial.

En lo referente a transferencia única en microgota se cuenta ya con 30 muestras, de las que sabemos que 12 implantaron y 17 no. Respecto a transferencias dobles en microgota, se han transferido dos blastocistos en 24 pacientes, de las que en 10 ha habido embarazo gemelar y en 7 ha implantado alguno de ellos. En cocultivo, de 26 transferencias, 10 implantaron y 13 no y de 31 dobles, en 9 implantaron los dos blastocistos y en 12 ocasiones sólo uno de ellos. Además, hubo una transferencia triple con técnica de microgota y 4 de cocultivo.

Con todas estas muestras, se han obtenido los medios condicionados de las últimas 24 horas del blastocisto. Se han almacenado congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  aguardando a la espera de los resultados clínicos. Una vez se sepa si el embrión ha implantado o no, pasaran por la batería de pruebas que hemos diseñado.

### **Resultados iniciales**

La primera técnica empleada fue la más rudimentaria, la electroforesis de dos dimensiones. Luego se continuó con High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Maldy-TOF y en la actualidad ya se están analizando muestras con microarrays de proteínas con 120 proteínas fijadas.

Con electroforesis de dos dimensiones se han procesado 10 muestras analizadas con las variables de punto isoeléctrico y de masa molecular. Sólo en una de ellas apareció una proteína distinta que no figura-

ba en ninguna otra muestra y cuando se secuenció, a través de una espectrofotometría de masas resultó ser queratina. Este hallazgo mostró que la técnica sería insuficiente ya que, después de analizar una decena de muestras y sólo encontramos aspectos diferenciales en una.

Para el análisis con el HPLC se tomó la muestra completa y se analizó por un sistema que revela los picos de péptidos. Se observó que la albúmina cegaba prácticamente todo el espectro, por lo que se optó por eliminarla. Sin embargo, esta decisión repercutió en la sensibilidad al dejar un rango de detección muy bajo. La conclusión fue que el HPLC tampoco ofrecía garantías.

La espectrofotometría de masas ofreció muestras de picos diferenciales pero arrojaba problemas de resolución en determinados rangos de peso molecular.

El siguiente paso, en estudio en este momento, es una técnica nueva que combina la electroforesis de dos dimensiones con el HPLC, que se denomina proteomelab. Esta técnica da un rango de peso molecular para cada rango de punto isoeléctrico de forma dinámica.

Junto a estos ensayos, se está trabajando con chips de proteínas, con un equipo que cuenta como referencia a 120 proteínas. Con este método se analiza el medio condicionado del blastocisto que implantó comparado con el que no implantó para encontrar proteínas diferenciales y ver si se puede aislar este patrón diferencial, de nuevo empleando los dos sistemas, cocultivo y microgotas.

## **DISCUSIÓN**

Una de las cuestiones que se plantearon tras la exposición fue por qué buscar determinadas proteínas que sirvieran para identificar los embriones viables y no buscar como posibles marcadores diferentes cantidades de proteínas. Carlos Simón señaló que podría ser éste también un camino válido, aunque comentó que tomando en consideración como es un embrión humano y el medio en el que está cultivado en el proceso de una fecundación in vitro, esperar que el embrión cree una avalancha de proteínas sobre las que ya existen en el medio es bastante difícil, aunque no descartó que fuera posible. Simón comentó que lo esperable es que el embrión que logre implantar cuente con elementos diferenciadores respecto al que no sea capaz de hacerlo, que exprese unas características identificables a través de unas proteínas propias que son las que buscan. Además, recordó que el blastocisto tiene 60 células y que es improbable que este redu-

cido número de células origine un importante flujo de proteínas.

Carlos Simón apuntó que ya existen diferentes patrones de adhesión embrionaria, fundamentalmente basados en criterios metabólicos, para diferenciar un embrión competente de uno que no es. Pero, según indicó, estos procedimientos sólo permiten abordar los procesos de forma parcial.

Otra pregunta abordó la posibilidad de buscar como patrones diferenciadores las proteínas adheridas al endometrio, algo que Simón calificó de muy difícil. El investigador de la Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad comentó que cuentan con un trabajo pendiente de mandar a publicar en el que se han procesado arrays, no de proteínas sino de DNA, para estudiar las sustancias que induce producir el embrión al endometrio. Simón destacó que hay cambios producidos por esta relación y la queratina es uno de ellos, pero el problema es que es muy complicado de determinar si fue el embrión quien indujo

la producción de determinadas sustancias al endometrio o el endometrio lo hizo por sí solo. Aunque es evidente que para que el embrión implante son necesarios tanto el embrión como el endometrio, Simón señaló que el equipo que desarrolla la investigación consideró que el mejor sistema de trabajo era el elegido.

Ante la pregunta de por qué se había decidido analizar a los embriones desarrollados en cocultivo y microgota, el investigador del IVI apuntó que se trata de observar si con los dos procesos se reproduce el mismo patrón, lo que aportaría solidez a la investigación. Además, comentó que no creía que el modelo fuera aplicable a estadios más iniciales del desarrollo del embrión, es decir con dos o tres células. De hecho, apuntó que todas las proteínas secretadas en estados más primigenios se puede detectar más adelante, lo que no sucede al revés, porque se elimina la posibilidad de apreciar proteínas que se hubieran secretado más tarde que pueden ser claves en el proceso de implantación.