

Nuevos avances en los métodos de selección embrionaria: el secretoma. Revisión

New advances in embryo selection methods: the secretome

María Navarro-Garberí¹, Jorge Ten Morro¹, Jaime Guerrero Villena¹; Joaquin Llácer Aparicio²; Rafael Bernabeu Pérez²

¹Dpto. Biología de la Reproducción. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante. ²Dpto. Medicina Reproductiva. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante.

Resumen

El objetivo de este trabajo es revisar los métodos que actualmente disponemos para llevar a cabo la selección embrionaria previa a la transferencia al útero materno, así como las técnicas que recientemente se han desarrollado y que pueden mejorar en las tasas de éxito de los tratamientos de fertilidad. La selección embrionaria es un paso crítico en la aplicación de las técnicas de reproducción asistida. En la actualidad, la selección se realiza mediante una evaluación del embrión en base a diferentes criterios morfológicos y cinéticos. Sin embargo, este análisis no siempre permite determinar el estado fisiológico del embrión o la presencia de alguna anomalía cromosómica, siguen siendo subjetivos, no suficientemente fiables y poco discriminativos. Por esta razón, se siguen buscando nuevos métodos de selección embrionaria, que complementen e incluso lleguen a sustituirlos. Con los recientes avances conseguidos en el campo de la proteómica, el análisis del secretoma embrionario como método de selección basado en la determinación de las proteínas presentes en el medio de cultivo embrionario, podría proporcionar parámetros de medición de calidad y potencial de desarrollo, permitiendo una selección objetiva y segura del embrión que será posteriormente transferido.

Palabras clave: Selección embrionaria. Embarazo múltiple. Proteómica. Secretoma embrionario

Summary

The aim of this work is to review the methods that nowadays are available to perform embryo selection before the transfer to the uterus, as well as the technologies that have been developed recently and can improve the rates of success of the fertility treatments. The embryo selection is a critical stage in the application of the assisted reproduction techniques. Actually, the selection is evaluated by

Correspondencia: Dr. Jorge Ten Morro
Avda. Albufereta, 31
03016 Alicante
e-mail: jten@institutobernabeu.com

means of an embryo observation which is based on different morphologic and kinetic criteria. Nevertheless, this analysis does not allow to determine the physiological condition of the embryo or the presence of some chromosomal anomaly, and they continue being subjective, not sufficiently reliable and little discriminative. For this reason, the research of new methods of embryo selection continues being important in order to complement or even to replace them. With the recent advances obtained in the area of the proteomics, the analysis of the embryonic secretome as a selection method based on the determination of proteins in the embryo culture medium, might provide parameters of quality measurement and potential of development, allowing the selection of a high quality embryo to transfer.

Key words: Embryo selection. Multiple pregnancy. Proteomic. Embryonic secretome

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) suponen una alternativa efectiva para las parejas que presentan problemas de fertilidad y han adquirido, en apenas unas décadas, una importancia significativa dentro de la medicina reproductiva. Cada vez son más el número de parejas que deben recurrir a ellas para obtener descendencia, estimándose que al menos un 1% de los nacimientos que se producen en países desarrollados, son concebidos por medio del uso de TRA (1).

Este incremento en la tasa de infertilidad es consecuencia de que la especie humana ha evolucionado hacia las llamadas formas “neoténicas”, adquiriendo la capacidad reproductiva óptima en sus fases juveniles. El claro distanciamiento existente entre la evolución biológica y la evolución social del individuo, que retarda la edad a la que sucede el primer embarazo, así como los múltiples factores ambientales (2), entre otros factores, han provocado que, en la última década, el número de personas que necesitan acudir a centros de fertilidad se haya visto incrementado notablemente, alcanzando el 10-15% de parejas en edad reproductiva (3,4).

Sin embargo, aunque son indudables los avances obtenidos en los últimos años dentro de este ámbito, las TRA continúan presentando serias limitaciones que impiden, en muchas ocasiones, llegar a cumplir el primer objetivo que se persigue con su aplicación, que no es más que la de obtener un hijo sano.

Junto a ello, las TRA deben aportar datos que nos permitan emitir un diagnóstico de la causa de la esterilidad y un pronóstico sobre las posibilidades reales de éxito en posibles futuros intentos o bien aconsejar otras TRA como donación de gametos y/o embriones, decisiones que conllevan una gran carga emocional a los pacientes y al clínico imposibilidad de emitir juicios ciertos.

Una de las principales complicaciones tras la aplicación de las TRA es el embarazo múltiple derivado

de la transferencia de más de un embrión. Aunque las probabilidades de gestación son mayores, en estos casos, suponen un elevado riesgo obstétrico y materno (5). Por lo tanto, la selección de un único embrión con capacidad implantatoria sería de vital importancia para erradicar esta situación (6, 7).

Normalmente, la elección de los embriones a transferir se lleva a cabo mediante la observación morfológica, bajo microscopio, de la cohorte embrionaria obtenida tras la inseminación/microinyección ovocitaria (8,9). Sin embargo y aunque los criterios morfológicos van mejorando continuamente, resulta imposible predecir y garantizar el potencial implantatorio embrionario. Estudios recientes apuntan a que el análisis del secretoma embrionario podría ser, en un futuro cercano, el método complementario idóneo que nos permita seleccionar un único embrión con capacidad implantatoria.

MÉTODOS ACTUALES DE SELECCIÓN EMBRIONARIA

Actualmente, el método más empleado para evaluar la calidad embrionaria es la observación de su morfología basada en diferentes criterios. Recientemente, la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha publicado un manual de clasificación en cuatro categorías, basadas en criterios morfológicos y cinéticos (10). La observación de diferentes parámetros, como la simetría, el grado de fragmentación, el ritmo de división y la multinucleación, son buenos indicadores para valorar qué embriones poseen mayor capacidad implantatoria. Sin embargo, es cierto que la morfología embrionaria no siempre es un buen indicativo de calidad, ya que puede no mostrar la presencia de anomalías cromosómicas implicadas en fallos de implantación y aborto. Además está sujeto a variaciones intra e interobservador. Por tanto, no es un método suficiente y

definitivo en la elección del embrión con mayor potencial implantatorio (11).

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP), puede emplearse en casos concretos en los que sea necesaria su aplicación, es decir, en parejas que presentan un elevado riesgo de transmisión de ciertas alteraciones genéticas/cromosómicas a su descendencia (12-14). Por tanto, el DGP nos puede ayudar a evitar la transferencia de embriones cromosómicamente anómalos, incrementando los porcentajes de implantación y embarazo evolutivo. No obstante, la eficacia del DGP está siendo cuestionada por considerarse una técnica aún experimental y con múltiples limitaciones (15). La realización de una biopsia embrionaria es una técnica invasiva para el embrión y que compromete seriamente su viabilidad (16). Además, el fenómeno de mosaicismo cromosómico no es tenido en cuenta en el análisis genético de un blastómero de forma que el resultado obtenido a partir de él puede conllevar a un error diagnóstico. La utilidad de la información que proporciona el análisis de células del trofoctodermo resulta generalmente dudosa al no implicar el examen de células de la masa interna (17). Por tanto, el empleo del DGP queda restringido a casos concretos, pero no como método rutinario complementario de la evaluación de la calidad embrionaria convencional.

Otros métodos de evaluación del estado embrionario que últimamente están siendo desarrollados se basan en el conocimiento del metabolismo embrionario mediante el análisis de determinados compuestos presentes en el medio de cultivo, como la glucosa, el lactato o el piruvato, cuyos incrementos o disminuciones en su concentración durante el desarrollo embrionario pueden ser asociados a su estado de "salud" (18). Por ejemplo, en cuanto a la presencia de glucosa, se ha observado que la duplicación en su tasa de consumo en día cuatro del desarrollo embrionario es un parámetro claramente indicativo de un elevado potencial implantatorio (19).

Del mismo modo, los cambios en la composición de los aminoácidos del medio también han sido analizados con el objeto de encontrar una correlación entre su tasa de intercambio aminoacídica y la calidad embrionaria. En este caso, se ha observado que el intercambio de tres aminoácidos, Asn, Gly y Leu, indicaría qué embriones tendrían un mayor éxito de implantación (20). La comparación entre el perfil de intercambio aminoacídico de embriones que implantaron con éxito frente al de aquellos que no lo hicieron ha sido recientemente estudiada, demostrando que la presencia de elevados niveles de Met en el medio de cultivo embrionario está directamente relacionada con elevadas posibilidades de implantación (21).

Otros grupos de investigación han centrado sus estudios en el análisis del antígeno leucocitario humano (HLA-G), relacionado con la tolerancia materno-fetal durante la gestación (22, 23). El HLA-G expresado por el embrión podría establecerse como marcador indicativo de su potencial de desarrollo (24). Se han realizado múltiples estudios en los que se afirma que si se transfieren embriones que en día tres de su desarrollo expresan ciertos niveles de esta proteína, las tasas de gestación se incrementan enormemente (25, 26). No obstante, otros trabajos ponen en contradicción estos datos e incluso cuestionan los métodos de detección empleados (27).

Recientemente, la proteómica ha abierto nuevas vías de investigación ligadas a la selección embrionaria que aportarían información muy útil dentro de esta conflictiva situación que atañe al campo de la embriología.

PROTEÓMICA Y EMBRIOLOGÍA

La proteómica es la ciencia que estudia el conjunto completo de proteínas que se expresan a partir de un genoma, e implica el uso de un amplio número de técnicas bioquímicas y moleculares de alta sensibilidad. Engloba toda una serie de variantes, que son los llamados métodos Omics, todos ellos basados en el análisis de las proteínas expresadas por un genoma en un momento determinado y bajo unas condiciones concretas.

El análisis del secretoma embrionario podría ser un método de selección complementario a la clasificación morfológica actual que ayudara a la determinación objetiva de aquel embrión de mayor calidad y potencial evolutivo, reduciendo con ello las tasas de embarazo múltiple.

Este método consiste en monitorizar la actividad metabólica del embrión analizando el medio de cultivo en el que se desarrollan durante sus estadios más tempranos, determinando el perfil proteico y correlacionándolo con la presencia de alteraciones o problemas cromosómicos embrionarios, así como con su viabilidad y potencial de implantación (28).

Sin embargo, la proteómica es aún una ciencia en desarrollo que presenta ciertas limitaciones, ya que algunas de las técnicas que emplea no reúnen la suficiente sensibilidad y capacidad resolutoria para analizar las proteínas presentes en el secretoma embrionario. Sea como fuere, se han realizado análisis del medio de cultivo embrionario mediante el empleo de ciertas técnicas, como cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida

de alta presión (HPLC), cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), infrarrojo cercano (NIR), espectrometría de masas (MS), espectrometría de masas en tándem (MS-MS) y resonancia magnética nuclear (NMR), entre otras. Se han observado diferencias en el perfil proteico analizado cada veinticuatro horas (29).

Aunque hasta el momento no han sido definidos estos patrones proteicos, sí se ha observado una gran diferencia entre las proteínas expresadas por blastocistos evolutivos respecto a blastocistos degenerados (30). Entre ellas, se ha observado con especial relevancia a una proteína cuya presencia va en aumento conforme avanza el desarrollo embrionario, llegando a tener su máxima expresión en día cinco de desarrollo, y cuya detección es, además, nula en el medio de cultivo de blastocistos degenerados. La identidad de esta proteína, cuyo peso molecular es de 8,5 kDa, está siendo discutida, pero se cree que la principal candidata para ella es la ubiquitina, de la cual se piensa que tiene importante influencia en el proceso de implantación embrionaria. Niveles elevados de ubiquitina hallados en el secretoma implicarían elevadas probabilidades de gestación (29). Esta identificación no está consolidada a día de hoy, pero entraña un comienzo demostrativo de la utilidad de la información que puede obtenerse del estado metabólico y evolutivo del embrión mediante el análisis proteico del medio en el que se desarrolla. Sin embargo, existe la duda de que la ausencia de la citada proteína en el medio de cultivo de los embriones degenerados no se deba a la falta de secreción de ella por parte del embrión, sino a que el propio proceso de degeneración de éste implique la secreción de proteasas que destruyan a la proteína de estudio, de forma que no podría ser detectada. Sin duda, son necesarios nuevos estudios que continúen ahondando en este planteamiento.

Investigaciones recientes concluyen que el estudio del perfil proteico presente en el medio de cultivo embrionario, mediante el empleo de espectroscopía de infrarrojo cercano y Raman, permite establecer un Índice de Viabilidad (VI) con el que se podría diferenciar entre embriones de idéntica morfología, aquel de mayor calidad y capacidad implantatoria (31). Otro trabajo hace referencia al concepto de VI, en el cual se analizaba el medio de cultivo de blastocistos en día cinco, empleando la técnica NIR. Tras realizar un estudio estadístico mediante el análisis de curvas ROC, establecieron el valor 0,52 como punto de corte en el VI, por encima del cual, el 80% de los blastocistos transferidos se implantaron con éxito, frente al 81,3% de los blastocistos situados por debajo de este VI, los cuales no anidaron. Por tanto, mediante la

combinación de los criterios de selección morfológicos con los resultados obtenidos a partir del análisis proteico de medio, se seleccionó y llevó a cabo la transferencia de un único embrión (SET) logrando un claro incremento en las tasas de implantación (32).

CONCLUSIÓN

La selección de un único embrión de mayor potencial implantatorio de entre todos los pertenecientes a una misma cohorte supone un punto crítico para los embriólogos clínicos, existiendo un gran debate entre los criterios que deben tenerse presentes en el momento de seleccionar el embrión que será transferido. Es evidente que con el aumento del número de pacientes que se someten a tratamientos de fertilidad a nivel mundial resulta fundamental conseguir mejoras y avances dentro de este campo, para poder llevar a cabo un método de selección rápido, no invasivo, fiable y objetivo.

Estudios recientes sugieren que el conocimiento del metabolismo embrionario puede dar información muy útil que, adjuntada a la información que la propia morfología del embrión proporciona sobre su estado, podría solucionar las principales limitaciones que actualmente envuelven a las técnicas de reproducción asistida, como la elevada tasa de embarazo múltiple y los fallos de implantación embrionaria.

Como quiera que la búsqueda de los criterios de calidad embrionaria son de gran importancia, resulta necesario el establecimiento de métodos resolutivos que puedan ser empleados como criterios fiables y seguros en la selección del mejor embrión de la cohorte.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Sutcliffe AG, Ludwig M.:** Outcome of assisted reproduction. *Lancet*. 2007 Jul 28; 370(9584):351-9.
2. **Hauser R, Sokol R.:** Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil Steril*. 2008 Feb;89(2 Suppl):e59-65.
3. **Leridon H, Slama R.:** The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final Lumber of children and demand for assisted reproduction technology. *Hum Reprod*. 2008 Jun; 23:1312-9.
4. **Alvarez Nieto C.:** Infertility: the magnitude of this problem. *Rev Enferm*. 2006 May; 29:59-62.
5. **Reddy UM, Wapner RJ, Rebar RW, Tasca RJ.:** Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human

- Development workshop. *Obstet Gynecol.* 2007 Apr; 109:967-77.
6. **Devoe LD.:** Antenatal fetal assessment: multifetal gestation-an overview. *Semin Perinatol.* 2008 Aug; 32:281-7.
 7. **Mazhar SB, Rahim F, Furukh T.:** Fetomaternal outcome in triplet pregnancy. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008 Apr; 18(4):217-21.
 8. **Sjöblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF.:** Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril.* 2006 Oct; 86:848-61.
 9. **Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C, Coticchio G.:** Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod Biomed Online.* 2005 May; 10:653-68.
 10. **Cuadernos de Embriología Clínica. II Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos. Embriones tempranos y Blastocistos Humanos.** Ed: ASEBIR, Asociación para el estudio de la Biología e la Reproducción. 2007.
 11. **Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C, Coticchio G.:** Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod Biomed Online.* 2005 May; 10:653-68.
 12. **Kuliev A, Verlinsky Y.:** Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications. *Reprod Biomed Online.* 2008 Apr; 16:532-8.
 13. **Lledó B, Bernabeu R, Ten J, Galán FM, Cioffi L.:** Preimplantation genetic diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy with gender determination using multiple displacement amplification. *Fertil Steril.* 2007 Nov; 88(5):1327-33.
 14. **Lledó B, Ten J, Rodríguez-Arnedo D, Llácer J, Bernabeu R.:** Preimplantation genetic diagnosis of X-linked retinoschisis. *Reprod Biomed Online.* 2008 Jun; 16:886-92.
 15. **Gleicher N, Weghofer A, Barad D.:** Preimplantation genetic screening: "established" and ready for prime time? *Fertil Steril.* 2008 Apr; 89:780-8.
 16. **Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, Lissens W, Vandervorst M, Van Ranst H, Liebaers I, Van Steirteghem A.:** Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn.* 2000 Dec; 20:1030-7.
 17. **Brisol DR, Hollywood K, Arnesen R, Goodacre R.:** Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online.* 2007 Sep; 15:296-302.
 18. **Bromer JG, Seli E.:** Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008 Jun; 20:234-41.
 19. **Gadner GK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB.:** Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.* 2001 Dec; 76:1175-80.
 20. **Brison DR, Houghton FD, Roberts DA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA, Leese HJ.:** Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod.* 2004 Oct; 19:2319-24.
 21. **Virant-Klun I, Kriman M, Korosec S, Zorn B, Bacer-Kermavner L, Mivsek J, Tomazevic T, Heden H.:** Turnover of amino acids in human blastocysts according to their implantation potential after in vitro fertilization natural cycle. *ESHRE BARCELONA 2008.*
 22. **Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, Biagiotti R, Pellegrini S, Menicucci A, Baricordi OR.:** Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod.* 2005 Jan; 20:138-46.
 23. **Martí S, Ten J, Marcos P, Artacho M.J., Galán F.J., Bernabeu R, Rubio G.:** Quantifying soluble HLA-G in supernatants of cultured embryos as a marker of implantation potential in an assisted reproduction program. *Inmunología Vol. 26 / Núm 3/ Julio-Septiembre 2007:* 127-134.
 24. **Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, Haentjens P.:** Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2008 May-Jun; 14:209-18.
 25. **Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, Ahlering P, Batzofin J, Ginsburg M.:** Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril.* 2005 May; 83:1410-3.
 26. **Fisch JD, Keskinetepe L, Ginsburg M, Adamowick M, Sher G.:** Graduated Embryo Score and soluble human leukocyte antigen-G expression improve assisted reproductive technology outcomes and suggest a basis for elective single-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2007 Apr; 87:757-63.
 27. **Ménézo Y, Elder K, Viville S.:** Soluble HLA-G release by the human embryo: an interesting artefact? *Reprod Biomed Online.* 2006 Dec; 13:763-4.
 28. **Katz-Jaffe MG, Gardner DK.:** Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology.* 2007 Sep 1; 68 Suppl 1:S125-30.
 29. **Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK.:** Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 2006 Sep; 86:678-85.

30. **Domínguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C.:** Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. Hum Reprod. 2008 Jun 12.
31. **Seli E, Vergouw C.G, Kato O, Botros L, Roos P, Morita H, Lambalk C.B, Yamashita N, Sakkas D.:** A viability index determined by non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media correlatos with ART outcome. ESHRE BARCELONA2008.
32. **Hardarson T, Rogberg L, Ahlström A, Wikland M, Botros L, Roos P, Sakkas D, Hillensjö T, Burns D.:** Non-invasive metabolomic profiling of day 5 spent culture media aids in the prediction of blastocyst viability. ESHRE BARCELONA2008.