

La expresión génica de las células del cúmulo humanas como biomarcador del resultado del embarazo después de la transferencia embrionaria simple

Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer

Kathryn Michelle Gebhardt, Ph.D.^{1,2}, Deanne Kate Feil, Ph.D.¹, Kylie Renee Dunning, Ph.D.¹, Michelle Lane, Ph.D.^{1,2}, Darryl Lyndon Russell, Ph.D.¹

¹School of Paediatric and Reproductive Health, Robinson Institute, University of Adelaide, North Adelaide

²Repromed, Dulwich, South Australia, Australia

RESUMEN

Objetivo: Identificar la expresión génica de las células del cúmulo asociadas con la competencia para el desarrollo del ovocito, sobre todo el nacimiento vivo, después de la transferencia embrionaria simple (TES) con las tecnologías de la reproducción.

Diseño: Análisis retrospectivo de la expresión génica de las células del cúmulo humanas de ovocitos que establecieron un embarazo resultando en un nacimiento vivo, comparado con células que no establecieron ningún embarazo después de la TES.

Población y ámbito: Clínica e instituto de investigación independientes de la FIV.

Pacientes: Mujeres recibiendo inyección intracitoplásmica de espermatozoides con la TES.

Intervención: Se realizó un análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en células del cúmulo recogidas antes de la inseminación. Se cultivaron y transfirieron los ovocitos y embriones de manera independiente en 38 pacientes en tratamiento electivo con la TES. Asimismo se compararon pares de muestras del cúmulo de ovocitos con embriones de calidad alta y baja.

Resultado principal medido: Los perfiles de la expresión génica del control metabólico (ALDOA, LDHA, PFKP, PKM2), de señalización (AHR, GREM1, PTGS2, STS), de la matriz extracelular (HAS2, PTX3, TNFAIP6, VCAN) y de la carga (GAODH) de las masas individuales del cúmulo.

Resultados: La expresión de VCAN y PTGS2 en ARNm era significativamente superior en los ovocitos que produjeron embarazos con nacimientos vivos. La expresión de PTX3 en ARNm tendía a ser más elevada en la muestras con embarazos. Hubo correlación entre los niveles de VCAN, GREM1 y PFKP en las células del cúmulo y el peso al nacer a las 38 semanas de gestación. No se detectó correlación entre los genes y la puntuación de la morfología embrionaria.

Conclusiones: Es posible que la expresión del VCAN, PTGS2, GREM1 y PFKP en las células del cúmulo proporcione biomarcadores para identificar ovocitos con alto potencial de desarrollo. El uso de estos análisis podría mejorar la tasa de implantación y la capacidad del ovocito para el desarrollo durante toda la gestación.

(Fertil Steril® 2011; ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Recibido 21 Enero 2011; Revisado 24 marzo 2011; Aceptado 1 abril 2011; Publicado *online* 14 mayo 2011.

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España.

Email: contacto@editorialmedica.com

Palabras clave: Células del cúmulo, ovocito, expresión génica, competencia para el desarrollo, embarazo.

SUMMARY

Objective: To identify the cumulus cell gene expression associated with oocyte developmental competence, specifically live birth, after single ET (SET) assisted reproductive technology.

Design: Retrospective gene expression analysis in human cumulus cells from oocytes that established a pregnancy resulting in live birth versus no pregnancy after SET.

Setting: Independent IVF clinic and research institute.

Patient(s): Women undergoing IVF/intracytoplasmic sperm injection with SET.

Intervention(s): Quantitative reverse-transcriptase–polymerase chain reaction analysis was performed on cumulus masses collected before insemination. Oocytes and embryos were cultured and transferred independently in 38 patients undergoing elective SET. Paired cumulus samples from oocytes that developed into high- versus low-grade embryos also were compared.

Main Outcome Measure(s): Gene expression profiles of metabolic (ALDOA, LDHA, PFKP, PKM2), signaling (AHR, GREM1, PTGS2, STS), extracellular matrix (HAS2, PTX3, TNFAIP6, VCAN), and loading control GAPDH in individual cumulus masses.

Result(s): VCAN and PTGS2 mRNA expression was significantly higher in cumulus cells from oocytes yielding a pregnancy resulting in a live birth, while PTX3 mRNA expression trended toward higher expression in pregnant samples. Cumulus cell levels of VCAN, GREM1, and PFKP correlated with birth weight in patients at 38 weeks of gestation. No genes correlated with clinical embryo morphology scores.

Conclusion(s): Cumulus cell VCAN, PTGS2, GREM1, and PFKP expression may identify oocytes with high developmental potential, leading to enhanced implantation rates and greater developmental capacity throughout gestation.

(Fertil Steril® 2011; ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key words: Cumulus cells, oocyte, gene expression, developmental competence, pregnancy

Con el uso de las técnicas de la reproducción asistida (TRAS) es muy frecuente obtener múltiples embriones que son viables para la transferencia. No obstante en muchas instancias, la evaluación morfológica visual, la única herramienta disponible para la selección de embriones previo a su transferencia, da insuficiente información para identificar cual de los embriones reviste el mayor potencial para establecer un embarazo. A menudo se practica la transferencia embrionaria múltiple para mejorar las posibilidades de conseguir un embarazo en cada ciclo, aunque esta práctica a su vez aumenta la incidencia de las más peligrosas gestaciones múltiples sin, aun así, producir embarazos en la mayoría de los ciclos de tratamiento. Los desarrollos en las condiciones de cultivo para la producción de embriones humanos han mejorado las tasas de embarazos exitosos, pero la capacidad de un embrión de desarrollarse hasta conseguir un nacimiento vivo depende no sólo de eso, sino de la calidad de los gametos de los que deriva el embrión, y sobre todo del ovocito (1-6). Un biomarcador no invasivo del potencial de desarrollo de los ovocitos humanos

capaz de identificar los ovocitos con mayor potencial para desarrollar embarazos exitosos hará más viable practicar la TES, y mejoraría la tasa de éxitos por ciclo.

Cada ovocito está envuelto en varias capas de células formando un cúmulo que desempeñan un papel funcional en el desarrollo del ovocito, la ovulación y la fertilización (revisado en [7]). Las células del cúmulo juegan el importante papel de mediadores de las señales paracrinas del ovocito y del potencial de desarrollo, ya que vehiculizan funciones como el metabolismo de hidratos de carbono (8). Dado que muchos de los genes expresados en el cúmulo que son críticos para el desarrollo del ovocito son controlados por señales maternas u ovocitarios, se piensa que su expresión es representativa tanto del estadio de maduración del ovocito como del entorno materno (7).

Las células del cúmulo son un subproducto abundante de la fertilización in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Las técnicas de análisis

no invasivas de estas células revelan información sobre la competencia para el desarrollo del ovocito. Un estudio pionero con ocho pacientes descubrió que los niveles de expresión génica de la HAS2, la PTGS2 y el GREM1 en el cúmulo mostraban una correlación con la morfología de los embriones humanos clasificados como de mejor calidad después de tres días de cultivo (9). Otro estudio semicuantitativo basado en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) encontró niveles superiores de la expresión de la HAS2 y el GREM1, pero no de la PTX3, en los embriones humanos clasificados como de mejor calidad (10). También encontró una expresión elevada de la PTX3 en las células del cúmulo de los ovocitos que desarrollaron en embriones de aspecto normal al día 3, comparado con aquellas de los ovocitos que no llegaron a fertilizarse en 16 pacientes (11). No obstante, correlaciones observadas entre las células del cúmulo y la puntuación de la morfología embrionaria dan pocos indicios de los resultados clínicos más relevantes. Dos estudios recientes han utilizado el éxito del embarazo como medida de la calidad de los ovocitos, pero en estos casos se transfirieron embriones múltiples (12, 13). Lo que es más, es difícil interpretar los datos de comparaciones realizados con conjuntos de embriones, conjuntos de masas de células del cúmulo o resultados basados en el análisis semicuantitativo.

En este estudio utilizamos muestras de masas individuales de células de cúmulo, y cultivamos los ovocitos y los embriones de manera individual antes de proceder a la TES. Realizamos ensayos de RT-PCR a tiempo real altamente normalizados para poder hacer la asociación directa entre la expresión génica y el resultado obtenido con un ovocito determinado. Examinamos la asociación entre los genes de las células de cúmulo seleccionados y aquellos resultados claves del tratamiento que podían depender de la identificación y el uso de los gametos de mejor calidad: la puntuación de la morfología embrionaria, la consecución de implantaciones exitosas y embarazos a término y el peso al nacer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de pacientes

Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de Investigación Humana de la Women's and Children's Hospital, Adelaide, Australia, y del Consejo Científico de Repromed, Adelaide, Australia, para el uso de muestras humanas. Treinta y ocho pacientes de la clínica Repromed, Dulwich, Australia del Sur, dieron su consentimiento escrito para el uso de células de cúmulo para fines de investigación. Estas pacientes estaban recibiendo tratamiento rutinario con

la FIV/ICSI utilizando sus propios gametos. Se excluyeron del estudio pacientes con indicaciones del síndrome del ovario poliquístico.

Estimulación de las pacientes

Todas las pacientes recibieron estimulación con un protocolo largo de regulación a la baja con la administración de un análogo de la GnRH (Nafarelin [Synarel]) confirmada con niveles de estrógeno en sangre inferiores a 0,2 nM/L. Como se ha publicado que diferentes protocolos de estimulación alteran la expresión génica de las células somáticas (14), todas las participantes en este estudio recibieron rFSH para limitar esta variable. Las pacientes recibieron FSH recombinante (Gonal-F, Serono o Puregon) durante 9-12 días y se hizo el seguimiento con ecografía hasta que el folículo dominante tuviera el tamaño de 18 mm. Las pacientes entonces recibieron 5.000 UI de hCG (Pregnyl, Organon) 36 horas más tarde. Se utilizó ecografía transvaginal y una aguja de calibre 17 para recoger los complejos cúmulo-ovocito (COC) con folículos superiores a 14 mm.

Procedimientos de laboratorio y toma de muestras de las células del cúmulo

Los productos para el medio de cultivo y los aceites que no se identifican como provenientes de otras fuentes se compraron en Vitrolife. El cultivo se realizó a 37°C, en una atmósfera humidificada con 6% de CO₂, 5% de O₂ y 89% de N₂. Las manipulaciones se hicieron a 37°C en un atmósfera con 6% CO₂. Los COC se lavaron en el medio GFERT-plus suplementado con glucosa (2.5mm de glucosa). Se almacenaron en 1 ml del mismo medio durante 3 horas después de la recogida de los ovocitos, tanto cuando se utilizaron para la FIV como para inseminaciones ICSI. Las capas exteriores de las células del cúmulo se recortaron con una aguja de calibre 30 y una jeringa y se recogieron individualmente antes de la inseminación, para luego almacenarlas a -80°C. Los ovocitos destinados a la ICSI fueron expuestos a 75 UI de hialuronidasa (Hyalase, Aventis Pharma Pty Ltd.) en GFERT suplementado con glucosa. La ICSI se realizó en el medio G1.3 plus, y se cultivaron los embriones individualmente en gotas de 10µl del mismo medio bajo aceite durante 16-18 horas. En los ovocitos destinados a uso para la FIV se dejaron intactas las capas interiores del cúmulo, y se incubaron con 1.000 espermatozoides móviles en gotas de 10µl de GFERT-plus suplementado con glucosa bajo aceite durante 17-19 horas. Todos los ovocitos se cultivaron de manera individual, y la fertilización se evaluó a las 16-19 horas después de la inseminación. Se dejaron los embriones con dos pronúcleos en el cultivo en gotas de 10µl del medio de G1.3-plus bajo aceite durante las siguientes 48 horas, para ser transferidos a un medio de G2.3 fresco para las últimas 24 horas de cultivo.

Aislamiento del ARN y RT-PCR a tiempo real

El ARN de las células del cúmulo se extrajo utilizando el kit RNAqueous Micro (Ambion). El ANR total fue eluido en 20 μ l de buffer de elución, y tratado con 1 U de DNase (Ambion). Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 110-330 ng de ANR total utilizando cebadores hexámeros aleatorios (Geneworks, Hindmarsh) y transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen Australia Pty. Ltd). La masa del producto del ADNc fue cuantificado con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Se diseñaron los cebadores de la RT-PCR a tiempo real a partir de secuencias de ARNm publicadas (NCI PubMed database), utilizando el software Primer Express (PE Applied Biosystems). Se sintetizaron por Sigma Genosys (Sigma-Aldrich Pty Ltd.). La RT-PCR se realizó en triplicado para cada muestra en un Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen). A cada reacción se añadieron 2 μ l de ADNc (equivalente a 1.000 ng de ADNc total), 0,2 μ l de cebadores directo e inverso y 10 μ l de la mezcla maestra SYBR Green (Applied Biosystems), junto con H₂O para obtener un volumen final de 20 μ l. Todos los cebadores se utilizaron a una concentración optimizada de 50 μ M. Las condiciones para los ciclos de la RT-PCR eran 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los controles incluyeron la omisión de la plantilla del ADNc o de la enzima transcriptasa inversa en mezclas por otra parte completas; ninguna presentó evidencia de amplificación del producto ni de la creación de dímeros de los cebadores. Después de la RT-PCR a tiempo real, un análisis de las curvas de disociación confirmó que se había amplificado un solo producto en todas las reacciones?

Se elaboraron curvas normalizadas de la RT-PCR a tiempo real para todos los genes mediante la ligación de los productos de la PCR en vectores TOPO 2.1 o TOPO 4.0 (Invitrogen). La masa de plásmidos conteniendo las secuencias dianas clonadas se calculó con el vector y la secuencia de la PCR insertada. Para cada gen se generó una curva normalizada de cinco diluciones logarítmicas ajustadas a la gama de la concentración encontrada en las células del cúmulo humanas. Cada curva normalizada era lineal y tenían todas la misma eficiencia.

Evaluación de la calidad embrionaria

Se realizaron las TES los días 2/3 (estadio de división, embriones n=30) o los días 4/5 para cultivo más extenso. El día de la TES se había determinado previamente al inicio del tratamiento tras consulta con la paciente, tomando en cuenta el diagnóstico de la infertilidad, el historial de tratamiento, la edad materna y consideraciones de índole prácticas para la paciente, el médico y el laboratorio. Para la selección de

FIGURA 1

La expresión génica de las células del cúmulo asociadas con el embarazo y nacimientos vivos. Análisis cuantitativo a tiempo real de RT-PCR de la expresión en ARNm (número de copias en ARNm relativo a la GAPDH) de (A) Versican, (B) PTGS2 y (C) PTX3 en células del cúmulo humanas que produjeron nacimientos vivos, comparadas con las que no produjeron embarazos tras la TES. (Diferencia significativa [P=.02]; Tendencia [P=.06]).

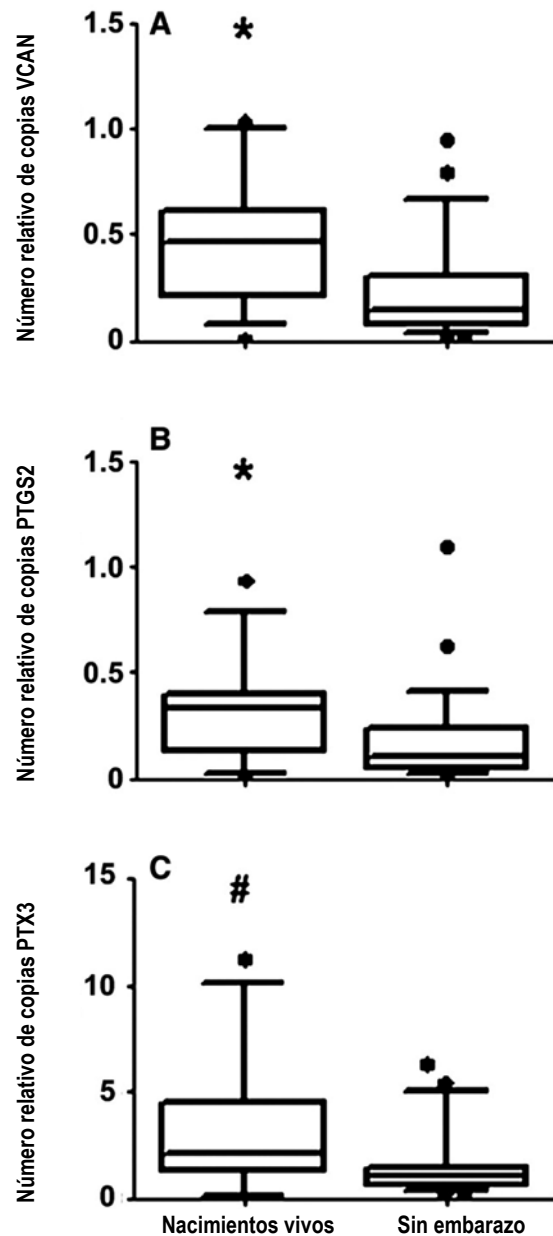
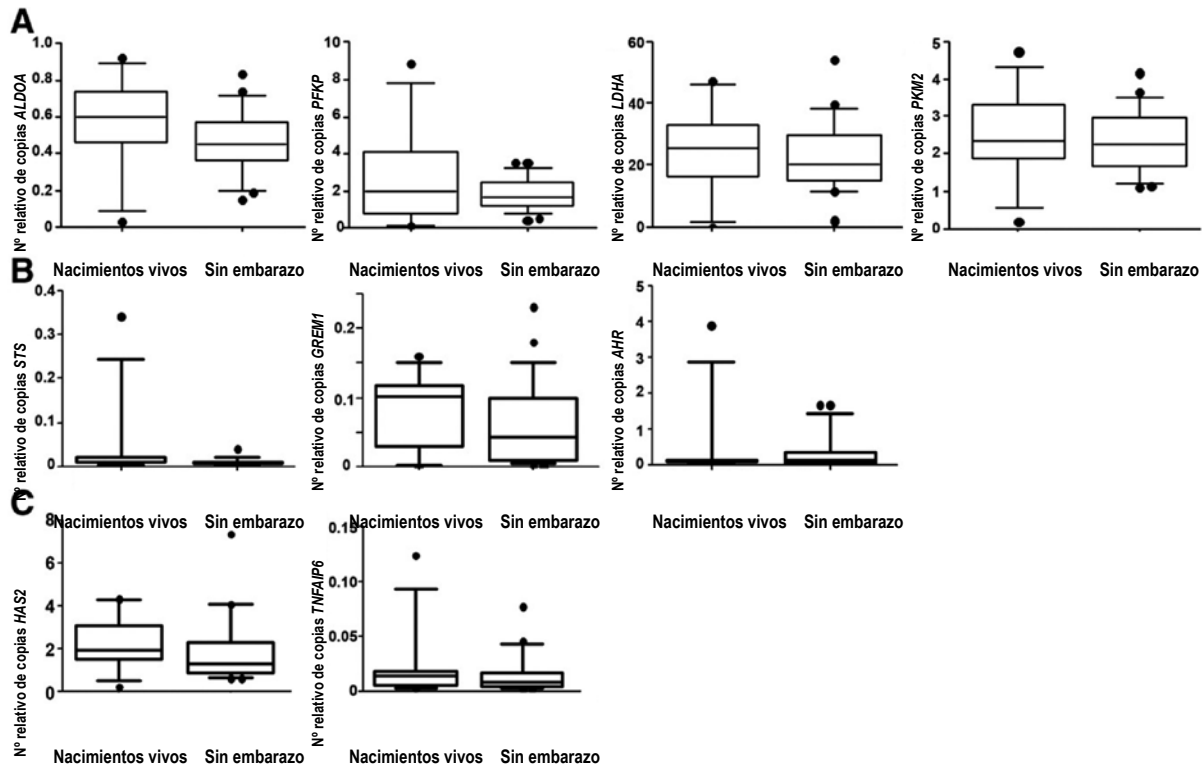


FIGURA 2

La expresión génica de las células del cúmulo no asociadas con el embarazo. Análisis cuantitativo a tiempo real de RT-PCR de la expresión en ARNm (número de copias en ARNm relativo a la GAPDH) en células del cúmulo humanas que produjeron nacimientos vivos, comparadas con las que no produjeron embarazo tras la TES. (A) Enzimas metabólicas de la vía glucolítica ALDOA, PFKP, LDHA y PKM2 (B) mediadores de la señalización celular STS, GREM 1 y AHR y (C) genes de la matriz extracelular HAS2 y TNFAIP6. No se observaron diferencias significativas.



los embriones para transferencia se utilizaron las evaluaciones normalizadas basadas en la puntuación de la morfología embrionaria del día 2, y en cada uno de los casos se realizó la transferencia del embrión que presentaba la mejor calidad morfológica. El día 2 después de la fertilización, se realizó la clasificación de los embriones en estadio de división a base del número de células, el grado de fragmentación y la presencia de células multinucleadas. Se consideró que los embriones con la mejor calidad presentaban cuatro células el día 2, con fragmentación limitada y la ausencia de blastómeros multinucleados.

Resultados de embarazos y nacimientos vivos

Los embarazos clínicos se determinaron con la detección del latido del corazón del feto seis semanas después de la transferencia. Los resultados de nacimientos vivos se comunicaron por el tocólogo responsable del parto. El tocólogo también proporcionó la información sobre la fecha de nacimiento, el peso al nacer,

el género y la necesidad o no de realizar intervenciones o bien en la madre o bien en el recién nacido y otros complicaciones.

Análisis estadístico

Los datos que se presentan reflejan el número medio de las copias obtenidas, yendo desde el primer cuartil hasta el tercero (encuadrado), y los puntos de datos dentro de los percentiles 10 y 90 (líneas verticales) (fig. 1, 2; fig 1 adicional). Los valores inferiores al primer percentil y superiores al percentil 99 se representan con puntos cerrados. Los datos están normalizados según el GAPDH seleccionado por el algoritmo GeNorm con la transcripción de control más estable. Los datos referentes a la puntuación de los embriones se analizaron con el test no paramétrico de rangos con signos de Wilcoxon (Graph-Pad Prism versión 5.01 para Windows). Para analizar los resultados referentes a los embarazos, se utilizó el test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Cuando $P < 0,5$ se consideró estadísticamente significativo. Se realizó la corre-

TABLA 1

Las características de las pacientes para el análisis de la expresión génica de las células del cúmulo asociadas con nacimientos vivos.

	Nacimientos vivos	Sin embarazo
No. de pacientes	12	26
Edad materna y IMC	32.9 ± 1.13 26.4 ± 0.93	33.6 ± 0.64 25.6 ± 0.9
% ICSI	91	73
No. de ciclos previos de FIV/ISCI	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2
No. de ovocitos recogidos	101.1 ± 1.3	11.2 ± 1
No. de ovocitos inseminados	8.5 ± 1.3	9.4 ± 0.9
No. de ovocitos fertilizados	5.8 ± 1	6.0 ± 0.7
Puntuación el día 2 de embriones transferidas	1.9 ± 0.6	2.0 ± 0.15
Diagnóstico de infertilidad, n Factor masculino	8	16
Endometriosis	—	1
Factor tubárico	—	2
Ovulación	1	1
Indeterminado	3	4
Combinación	—	2

Nota: Los datos son la media + SEM, cuando no especificado. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos.

lación por rangos de Spearman para examinar las relaciones entre el peso al nacer y el número de copias del gen.

RESULTADOS

Características demográficas de las pacientes

Las características demográficas de las pacientes se representan en la **tabla 1**. No existieron diferencias significativas entre las pacientes quienes lograron un nacimiento vivo y las en las cuales el embarazo no se estableció en lo que se refiere a la edad materna, el número de ciclos realizados anteriormente, las tasas de ICSI o de FIV, el número de ovocitos recogidos y la tasa de fertilización. Se practicó la transferencia de un solo embrión en cada uno de los casos, y el día de la transferencia se había determinado antes del inicio del tratamiento. Tanto en el grupo de embarazos, como en el sin, se realizó la transferencia en la mayoría de los casos los días 2/3 (día 2/3 = 30 transferencias, día 4/5 = 8 transferencias). No se detectó ninguna diferencia en la tasa de embarazos entre el grupo de transferencias los días 4/5 y el grupo de transferencias los días 2/3.

La correlación entre el perfil de la expresión génica de las células de cúmulo y la puntuación de la morfología embrionaria.

De nuestra cohorte inicial de pacientes (n=38), se seleccionó un subgrupo de 11 pacientes para poder examinar la posible correlación entre la expresión génica de las células de cúmulo y la puntuación de calidad de los embriones (**tabla 1 adicional**). Se seleccionaron a estas pacientes porque el día de la transferencia tenían más de un embrión de alta puntuación, junto con por lo menos un embrión de baja calidad. Los embriones utilizados en este análisis de comparación no fueron transferidos. Para cada una de la once pacientes se comparó la expresión génica en masas de células de cúmulo de los ovocitos que produjeron un embrión bien de alta calidad o bien de baja calidad, clasificados según la puntuación del día 2. En esta cohorte no se detectaron diferencias significativas en el número medio relativo de copias génicas para ninguno de los genes analizados en las células del cúmulo procedentes de ovocitos que habían producido embrións tanto de alta calidad como de baja calidad (**fig. 1 adicional**). Con el análisis con la correlación por rangos de Spearman, no se detectó ninguna relación entre la edad materna ni el índice de masa corporal (IMC) y la expresión génica (datos no mostrados).

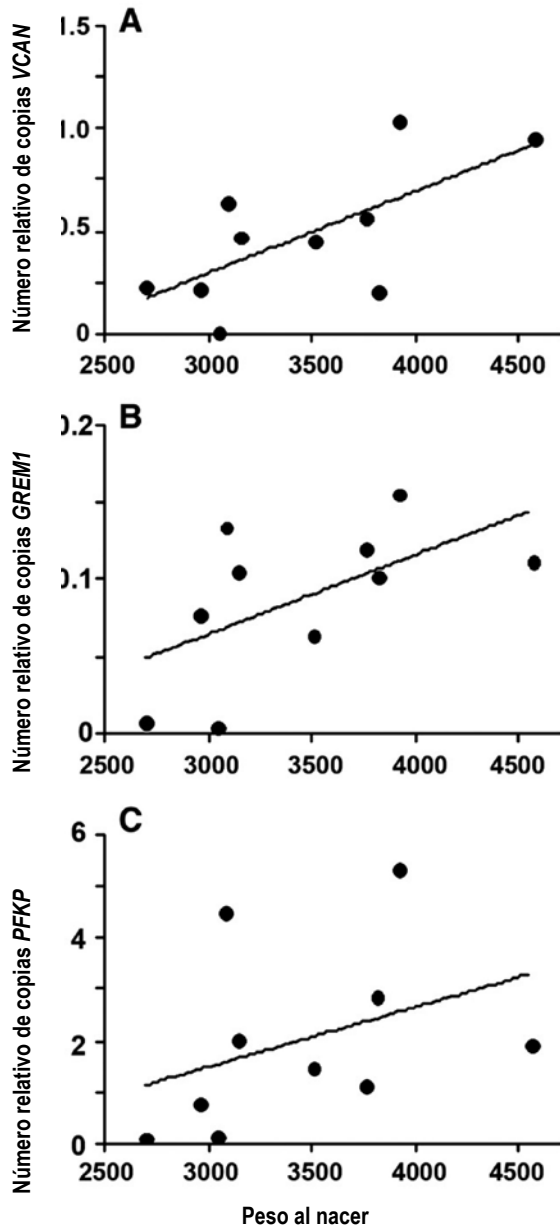
La Expresión génica de las células de cúmulo como biomarcador de nacimientos vivos

Se realizaron análisis génicos a un total de 38 masas de células del cúmulo recortadas en ovocitos que derivaron en los embriones transferidos a las 38 pacientes (embarazos, n=12; no embarazos, n=26) para elucidar las correlación entre las células del cúmulo y nacimientos vivos. Todas las pacientes con implantaciones exitosas a las 6 semanas llegaron a término con nacimientos vivos. La expresión del VCAN y la PTGS2 era significativamente más alta (P<,02) en las células del cúmulo de los ovocitos que produjeron nacimientos a término comparados con aquellos que no resultaron en embarazos exitosos (**fig. 1A y B**). La PTX3 mostró una tendencia que no llegó a ser significativa (P<,066), hacia un número relativo de copias que era superior en las células del cúmulo de los ovocitos que resultaron en nacimientos vivos (**fig. 1C**). Cuando se compararon las células del cúmulo de los ovocitos que resultaron en nacimientos vivos, con las que no consiguieron el embarazo, el número medio de las copias obtenidas de VCAN era 3,2 veces superior (0,46 vs. 0,6), de la PTGS2 era 3,1 veces superior (0,34 vs. 0,11), y de la PTX3 era 2,1 veces superior (2,08 vs. 1,01).

Otros genes analizados incluyeron las enzimas reguladoras de la velocidad de la vía glucolítica, la ALDOA, la PFKP, la LDHA y la PKM2 (**fig. 2A**), los mediadores de la señalización celular, la STS, el GREM1 y el AHR (**fig. 2B**) y los genes de la matriz, la HAS2 y la TNFAIP6 (**fig. 2C**); ninguno

FIGURA 3

La expresión génica de las células del cúmulo con correlación con el peso al nacer. Correlación por rangos de Spearman de peso al nacer (gramos) y la abundancia en ARNm (número de copias relativo al GAPDH) de (A) VCAN, (B) GREM y (C) PFKP en células del cúmulo de ovocitos que produjeron embarazo después de la TES. VCAN y GREM mostraron una tendencia hacia diferencias significativas ($P < .08$), mientras que la expresión de PFKP mostró una correlación significativa ($P < .05$) con el peso al nacer.



de ellos mostró diferencia significativa cuando se compararon en pacientes que lograron embarazos y las que no.

La Expresión génica de las células del cúmulo en correlación con el peso al nacer

El peso al nacer se comunicó por el tocólogo para 10 de las 12 pacientes quienes consiguieron un parto a término. La correlación por rangos de Spearman mostró que el número relativo de copias de ARNm de la célula del cúmulo VCAN y del GREM1 mostraban una tendencia hacia una correlación positiva con el peso al nacer ($P < .08$) (fig. 3A) y ($P < .6$) (fig. 3B) respectivamente, mientras que el número relativo de copias de la PFKP mostró una correlación positiva con el peso al nacer ($P < .05$) (fig. 3C). Ninguno de los otros genes analizados mostró correlación entre el número de copias de las células del cúmulo y el peso al nacer (datos no mostrados). La edad gestacional de los nacimientos vivos osciló entre 35.6 y 41 semanas; no obstante no hubo correlación entre los niveles de expresión génica y el tiempo de gestación.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados ponen de manifiesto que las células del cúmulo de ovocitos individuales se pueden cosechar y someter a múltiples análisis genéticos cuyos resultados proporcionan un indicio de la competencia para desarrollo del ovocito. Los ovocitos que muestran mayor competencia para el desarrollo son aquellos que son mejor preparados para la fertilización e implantación, y son los que en mayor probabilidad poseen mayor capacidad para el crecimiento y desarrollo posimplantacional. La adquisición de la competencia para el desarrollo del ovocito depende de la función de las células del cúmulo. Nuestro grupo seleccionó genes conocidos por ser regulados por señales del ovocito, y por sus importantes funciones en la expansión del cúmulo y el metabolismo. Dos de estos genes presentaron una expresión significativamente superior en las células del cúmulo obtenidas en los ovocitos que resultaron en nacimientos vivos: la PTGS2 y el VCAN. También se detectó que los niveles de expresión del VCAN mostraron una tendencia, aunque no una diferencia significativa, hacia una correlación con un peso al nacer superior. Este dato apoya la noción de la asociación de este gen con ovocitos con mayor competencia para el desarrollo.

Algunos de los genes que modulan la función de la matriz del cúmulo también reflejaban la competencia para el desarrollo de los ovocitos. Esto sugiere que la enigmática matriz del cúmulo también desempeña un papel en la adquisición de dicha competencia. El VCAN mostró por una parte una asociación positiva con el éxito en el embarazo, y por otra con una tendencia hacia mayor peso al nacer, aunque esta última no llegó a ser estadísticamente significativa. Estos datos apo-

yan perfiles genómicos anteriores que han determinado que la expresión del VCAN era mayor en los cúmulos asociados con embriones que dividen más temprano (15). La proteína del VCAN es un proteoglicano de la matriz extracelular que se une al hialuronan en la matriz del cúmulo expandido (16). El VCAN estabiliza el hialuronan en las matrices pericelulares (17), mientras la división del VCAN por las proteasas ADAMTS libera fragmentos bioactivos que son fuertes señales morfogénicas (16, 18, 19). El VCAN tiene mayor expresión en las células del cúmulo que en las células murales de la granulosa en el ovario humano. No obstante, los complejos de cúmulos de ovocitos de ratón madurados in vitro (MIV) carecen de VCAN, y es posible que esto contribuya al desarrollo perturbado de los embriones después de la MIV (20). Estos datos, junto con los nuestros sugieren que la presencia del VCAN tiene una influencia directa en la adquisición de la competencia para el desarrollo por parte de los ovocitos.

La expresión de PTX3 tendía a estar asociado con el establecimiento de un embarazo. El producto del gen PTX3 es otra proteína de la matriz extracelular que interactúa con el hialuronan en la matriz expandida del cúmulo (21-23). Estudios anteriores han postulado que existe una relación significativa entre la expresión de PTX3 en el cúmulo y la fertilización del ovocito (11), mientras que otros no han encontrado esta asociación entre este gen y las tasas de fertilización o la morfología embrionaria (9, 10). Nuestros resultados apuntan hacia la existencia de una relación entre la expresión de PTX3 en las células del cúmulo y la adquisición de la competencia para el desarrollo por parte del ovocito.

El gen de la PTGS2 codifica la enzima COX2 que sintetiza la prostaglandina. Algunos estudios en bovinos y simios sugieren que la expresión de la PTGS2 en los COCs puede tener que ver con el tiempo de la maduración (24, 25) y la calidad del ovocito (26). También se ha encontrado que la PTGS2 está asociada con la puntuación de la morfología embrionaria (9). En el ratón, la PTGS2 y la prostaglandina E2 (PGE2) resultante facilitan la expansión del cúmulo mediante la inducción de los genes de la matriz del cúmulo (27), y resultan importantes para la supervivencia de las células del cúmulo en este animal (28). Por estos factores, la correlación que hemos observado entre la expresión de la PTGS2 y el embarazo apoya la noción del papel de la PTGS2 en la promoción de la expansión del cúmulo y en la competencia del ovocito para el desarrollo.

En cuanto a la PFKP, mostró una correlación significativa con el peso al nacer ($P < .05$), aunque no con el embarazo. El GREM1 asimismo mostró una tendencia hacia una co-

relación con el peso al nacer ($P < .06$). Para validar estos resultados será necesario trabajar con una cohorte más grande. Otros estudios han sugerido que el GREM1 está asociado con la puntuación embrionaria (9, 10, 12, 29) y si es así, merecería analizar en mayor profundidad el papel que puedan desempeñar estos genes como biomarcadores de la competencia del ovocito. El peso al nacer naturalmente depende de muchas variables, las más importantes siendo factores asociados con el estilo de vida de la madre y la duración de la gestación. En este estudio, la duración de la gestación fue similar en todas las pacientes. Se está realizando un estudio más amplio en la actualidad (para establecer para elucidar) si los genes que se estudian aquí se podrían utilizar como predictores fiables del peso al nacer. Se ha publicado reiteradamente que el uso de las TRAs a menudo desemboca en un peso al nacer bajo comparado con la concepción natural (30-32). Nuestros resultados indican que podrían existir biomarcadores capaces de identificar los gametos con mayor potencial para el desarrollo, y por ende con mejores posibilidades de resultar en nacimientos vivos.

El aspecto morfológico constituye una medición clínica importante de la calidad del embrión, pero este parámetro proporciona poca información sobre la competencia para el desarrollo del ovocito (33-35). De acuerdo con esta constatación, en este estudio la evaluación de la expresión génica de las células del cúmulo en los embriones con alta y baja calidad en las mismas pacientes mostró una expresión variable, sin que encontráramos correlaciones significativas. Cuando establecimos perfiles metabólicos utilizando el medio de cultivo embrionario gastado tampoco encontramos ninguna asociación entre el perfil metabólico de un embrión y su morfología. No obstante, sí pudimos identificar asociaciones significativas entre las mediciones metabólicas y el éxito del embarazo (36-38).

En este estudio la expresión promedio del VCAN y la PTGS2 era tres veces más alta en las células del cúmulo de los ovocitos que resultaron en embarazos. Aquí, no obstante, no comparamos la competencia celular en las mismas pacientes. Para evaluar la relación entre la expresión génica alta o baja y el embarazo sería necesario estudiar a pacientes que requieren varios ciclos de transferencias y para ello nuestra investigación futura se realizará con una muestra grande e independiente. A la luz de los resultados de este estudio, proponemos que cuando se utilizan conjuntamente con la evaluación morfológica del embrión, la expresión del VCAN y la PTGS2, y posiblemente de la PTX2, el GREM1 y la PFKP proporcionan biomarcadores fáciles de medir para la selección de los embriones óptimos para la transferencia embrionaria simple.

FIGURA 1 ADICIONAL

No se detectó correlación entre la expresión génica de las células del cúmulo y la puntuación de la morfología embrionaria, la expresión en ARNm (número de copias relativo al GAPDH) en pares emparejada (n=11 parejas) de células del cúmulo humanas de ovocitos que desarrollaron hasta convertirse en embriones de alta versus baja calidad. (A) PTGS2, (B) VCAN, (C) PTX3, (D) TNFAIP6, (E) GREM1, (G) PFKP y (H) LDHA. No se observaron diferencias significativas.

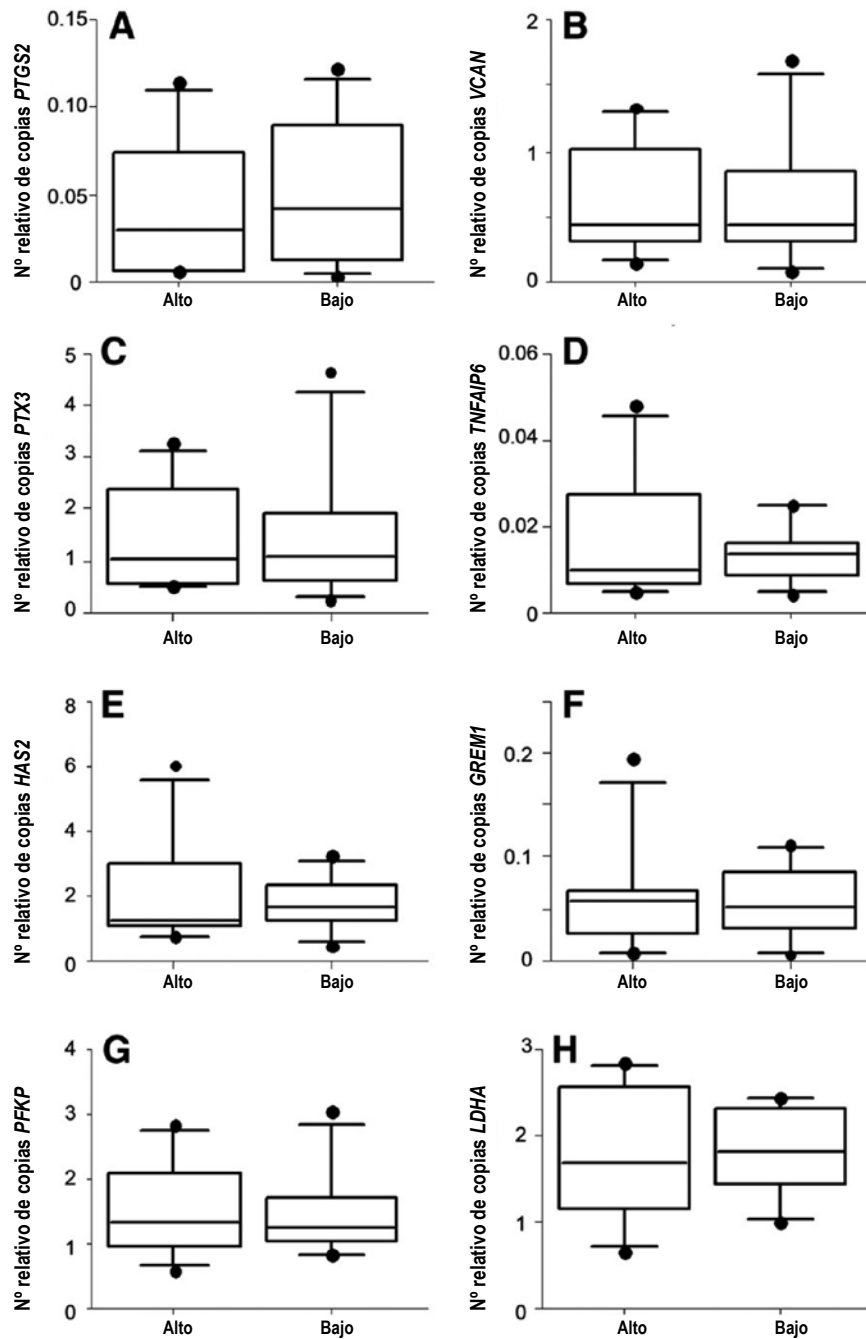


TABLA 1 ADICIONAL

Las características de las pacientes para el análisis de la expresión génica de las células del cúmulo en asociación con la puntuación del embrión.

No. de pacientes	11
Edad materna y IMC	34,7 ± 0.5
% ICSI	91
No. de ciclos previos de FIV/ISCI	0.9 ± 0.4
No. de ovocitos recogidos	12 ± 1.0
No. de ovocitos inseminados	10.2 ± 0.7
No. de ovocitos fertilizados	7.3 ± 0.6
Diagnóstico de infertilidad, n	
Factor masculino	8
Ovulación	1
Indeterminado	2

Nota: Los datos se expresan con media ± SEM, cuando no especificado.

BIBLIOGRAFÍA

- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Puchner M, Wiesinger R, Tews G.** Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod* 2003;18:1294–8.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G.** Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003;9:251–62.
- Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G.** Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:427–30.
- Krisher RL.** The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004;82(E-Suppl):E14–23.
- Paz G, Amit A, Yavetz H.** Case report: pregnancy outcome following ICSI of oocytes with abnormal cytoplasm and zona pellucida. *Hum Reprod* 2004;19:586–9.
- Wang Q, Sun QY.** Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:1–12.
- Russell DL, Robker RL.** Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 2007;13:289–312.
- Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ.** Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med* 2009;27:32–42.
- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, et al.** Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869–74.
- Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F.** Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 2007;134:645–50.
- Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR.** Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril* 2005;83(Suppl 1):1169–79.
- Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, de Sousa PA, et al.** Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction* 2009;138:629–37.
- Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, et al.** A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 2008;14:711–9.
- Grondahl ML, Borup R, Lee YB, Myrholm V, Meinertz H, Sorensen S.** Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 2009;91:1820–30.
- van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL, Ayoubi TA.** Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod* 2008;14:157–68.
- Russell DL, Ochsner SA, Hsieh M, Mulders S, Richards JS.** Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* 2003;144:1020–31.
- Evanko SP, Potter-Perigo S, Johnson PY, Wight TN.** Organization of hyaluronan and versican in the extracellular matrix of human fibroblasts treated with the viral mimetic poly I:C. *J Histochem Cytochem* 2009;57:1041–60.

-
18. **Enomoto H, Nelson CM, Somerville RP, Mielke K, Dixon LJ, Powell K, et al.** Cooperation of two ADAMTS metalloproteases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. *Development* 2010;137:4029–38.
19. **McCulloch DR, Nelson CM, Dixon LJ, Silver DL, Wylie JD, Lindner V, et al.** ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Dev Cell* 2009;17:687–98.
20. **Dunning KR, Lane M, Brown HM, Yeo C, Robker RL, Russell DL.** Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. *Hum Reprod* 2007;22:2842–50.
21. **Russell DL, Salustri A.** Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med* 2006;24:217–27.
22. **Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B, et al.** PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* 2004;131:1577–86.
23. **Varani S, Elvin JA, Yan C, DeMayo J, DeMayo FJ, Horton HF, et al.** Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol* 2002;16:1154–67.
24. **Duffy DM, Dozier BL, Seachord CL.** Prostaglandin dehydrogenase and prostaglandin levels in periovulatory follicles: implications for control of primate ovulation by prostaglandin E2. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1021–7.
25. **Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Dore M.** Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Hum Reprod Update* 2004;10:373–85.
26. **Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ.** Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol Reprod* 2001;65: 135–40.
27. **Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, et al.** Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997;91:197–208.
28. **Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK.** Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 2006;281:37117–29.
29. **Anderson RA, Bayne RA, Gardner J, De Sousa PA.** Brain-derived neurotrophic factor is a regulator of human oocyte maturation and early embryo development. *Fertil Steril* 2010;93:1394–406.
30. **Hourvitz A, Pri-Paz S, Dor J, Seidman DS.** Neonatal and obstetric outcome of pregnancies conceived by ICSI or IVF. *Reprod Biomed Online* 2005;11:469–75.
31. **Katagiri Y, Aoki C, Tamaki-Ishihara Y, Fukuda Y, Kitamura M, Matsue Y, et al.** Effects of assisted reproduction technology on placental imprinted gene expression. *Obstet Gynecol Int* 2010;2010:Article ID 437528.
32. **Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Squires J, Moy F, Rosenwaks Z.** Genetic and epigenetic characteristics of ICSI children. *Reprod Biomed Online* 2008;17:820–33.
33. **Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R, Tucker MJ.** Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril* 2000;74:495–7.
34. **Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al.** Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* 2007;22:1973–81.
35. **Rijnders PM, Jansen CA.** The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:2869–73.
36. **Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, et al.** Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod* 2004;19: 2319–24.
37. **Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB.** Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001;76:1175–80.
38. **Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, et al.** Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010;94:535–42.
-