



PROYECTO DE ESTUDIO DEL PATRÓN PROTEICO DE EXOSOMAS
PRODUCIDOS POR EMBRIONES HUMANOS Y
SU CORRELACIÓN CON LA CALIDAD EMBRIONARIA EN TÉCNICAS
DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

PROJECT TO STUDY PROTEIN PATTERN OF EXOSOMES SECRETED
BY HUMAN EMBRYOS AND THEIR CORRELATION WITH EMBRYO
QUALITY IN ASSISTED REPRODUCTION TECHNIQUES

Trabajo de Fin de Grado
Olga Malena Gajate Arenas
Tutorizado por Julio Tomás Ávila Marrero y Rebeca González Fernández
Grado en Biología
Julio 2020

Índice

Resumen.....	1
Abstract	1
Introducción	3
Hipótesis.....	9
Objetivos	10
Metodología	11
Obtención de muestras.....	11
Aislamiento de exosomas.....	12
Purificación de miRNA y proteínas.....	12
Análisis de la expresión de miRNA	12
Análisis de la expresión de proteínas.....	13
Análisis de datos.....	13
Diseño experimental	15
Obtención de medios de cultivo	15
Obtención de exosomas purificados.....	15
Purificación de RNA y proteínas.....	15
Análisis de RNA.....	15
Análisis de proteínas	16
Análisis de datos.....	16
Resultados	17
Conclusiones.....	19
Conclusions.....	19
Bibliografía	20

Resumen

Actualmente el 15% de las parejas en edad reproductiva presentan problemas de esterilidad en Occidente, la principal causa es la tendencia a retrasar la maternidad. Esto, mezclado con las bajas tasas de éxito en las técnicas de reproducción asistida, provoca que muchas parejas presenten serias dificultades para tener hijos. Actualmente, la selección de embriones a implantar se realiza en base a parámetros morfológicos, que no siempre son un reflejo de su estado fisiológico. Aunque la tecnología time-lapse ha mejorado la selección morfológica, sigue sin poder identificar estados metabólicos o patologías. Además, en muchos casos, no permiten disminuir el número de embriones implantados y, con ello, el riesgo de embarazos múltiples. Por ello, surge la necesidad de seguir investigando en técnicas de reproducción asistida. Este proyecto se centra en la identificación de biomarcadores mediante el aislamiento de exosomas provenientes de medios de cultivo donde se han desarrollado embriones hasta el estadio de blastocito y el análisis de proteínas y miRNA contenidos en los mismos. La expresión de miRNA se analizará por PCR a tiempo real, mientras que el análisis de proteínas se lleva cabo mediante electroforesis bidimensional y posterior identificación por malditof. Como resultado, se espera que la expresión de miRNA y proteínas varíe entre los embriones de distinta calidad, obteniendo nuevos parámetros que, junto con la tecnología “time-lapse”, permitan mejorar la selección de embriones y así aumentar las tasas de éxito.

Abstract

At the present the 15% of couples on reproductive age have problems about sterility in Western world, the main cause is the trend to delay motherhood. This fact, mixing with low success rate on assisted reproductive technology, cause a lot of couples have serious difficulties on having children. Currently, embryo selection for implantation is base on morphological parameters, however, these parameters not always are a reflection of the physiological state. Although time-lapse technology has improved morphological selection, it is not able to identify metabolic states or pathologies. Moreover, in many cases, it is not possible to reduce the number of implanted embryo and the risk of multiple pregnancy. So it rises up the necessity to keep researching on assisted reproductive technology. This project is focus on biomarkers identification by exosome isolation from culture medium where embryos

have developed to blastocyst stage and miRNA and proteins analysis. The miRNA analysis carries out by real time PCR expression, while protein analysis carries out by two-dimensional electrophoresis and malditof identification. As a result, it hope miRNA and protein expression changes between embryos of different quality, getting new parameters that, together with time-lapse technology, affording to promote the embryo selection thus increasing success rates.

Introducción



Introducción

En los países occidentales la tendencia a retrasar la maternidad contribuye a que un mayor número de parejas tengan dificultades para concebir, el 15% de las parejas en edad reproductiva se ven afectadas por problemas de esterilidad (**Tabla 1**). Aunque el varón es el responsable de entre el 25-35% de los casos, la edad avanzada de la mujer puede considerarse como la principal causa del incremento de esterilidad debido a que inician su «edad reproductiva social» cuando ya han terminado su «edad reproductiva biológica», de hecho, la tasa de esterilidad en las mujeres se sitúa entre el 65-70% a los 40 años(1, 2).

Alteraciones en la producción de gametos	Alteraciones que impiden o dificultan la fecundación	Alteraciones en la implantación
<ul style="list-style-type: none"> ○ Anovulación (Síndrome del ovario poliquístico, fallo ovárico prematuro, etc.). 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Alteraciones vaginales que impiden o dificultan el coito. ○ Alteraciones del transporte espermático en el aparato genital femenino. ○ Alteraciones de la captación del ovocito por la trompa de Falopio. ○ Alteraciones de la fecundación. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Alteraciones en el transporte del embrión hasta la cavidad uterina. ○ Alteraciones de la implantación embrionaria.

Tabla 1. Alteraciones de la Fertilidad en la mujer. En la tabla se observan alteraciones de la fertilidad en distintos puntos del proceso: la producción de gametos, la fecundación y la implantación(1).

Una de las razones por las que aumenta la esterilidad en la mujer es por la disminución de la función ovárica. Esta se debe al deterioro folicular gradual por atresia/apoptosis, alteraciones en el metabolismo energético pueden incrementar la producción de metabolitos tóxicos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales están asociadas con baja calidad de los gametos y un desarrollo temprano anormal del embrión. A medida que avanza la edad se produce un aumento del estrés oxidativo y una disminución en la capacidad para neutralizar las ROS, provocando daños oxidativos en las células, generando oocitos de baja calidad, y, por tanto, una disminución en la fertilidad(3).

Debido, por tanto, a esta tendencia a retrasar la maternidad las técnicas de reproducción cobran una gran importancia. Existen diversas técnicas de reproducción asistida(4):

- **Inseminación artificial:** consiste en depositar los espermatozoides en el aparato genital de la mujer mediante el instrumental adecuado.
- **Fecundación In Vitro (FIV):** la fecundación y el desarrollo embrionario inicial (**Figura 1**) tienen lugar fuera de la mujer, para ello se ponen en contacto los espermatozoides con los ovocitos en condiciones idóneas.
- **Inyección intracitoplasmática (ICSI):** similar a la anterior pero el espermatozoide es introducido en el interior de cada ovocito.

Sin embargo, las tasas de éxito de las técnicas de reproducción asistida varían en función de la edad de la paciente, siendo de un 30% en mujeres menores de 35 años en su primer intento, pero disminuyendo a un 25% en mujeres de 35 a 37, a un 17% en mujeres de entre 38 a 40 años y sólo a un 5% en mujeres mayores de 40 años(5). Además, para incrementar las probabilidades de éxito se transfieren hasta 3 embriones, produciéndose el riesgo de embarazos múltiples con alta tasa de mortalidad asociada a ellos. A esto hay que añadirle que los embriones in vitro presentan menor calidad que los embriones in vivo. Por ello, es necesario seguir investigando en técnicas de reproducción asistida, y así aumentar las tasas de éxito. Por ejemplo, hay estudios que demuestran que los embriones se desarrollan mejor en cocultivos de células endometriales o en cocultivos de células epiteliales del oviducto(4, 6).

De las técnicas de reproducción asistida mencionadas anteriormente nos centraremos en las dos últimas, por ser aquellas en las que el embrión se desarrolla in vitro. En ambos casos, las pacientes reciben un tratamiento hormonal con gonadotropinas, para estimular el crecimiento de los folículos que, una vez maduros, son extraídos y fecundados. Tras ser fecundados, se mantienen en cultivo. Dos días después de la fecundación los embriones están formados por 2-4 células, en el tercer día, además de estar constituidos por 6-8 células, han comenzado a expresar sus propios genes y sus necesidades metabólicas cambian gradualmente. Cuatro días tras la fecundación el embrión se encuentra en el estadio de mórula, tras la tercera segmentación se origina una bola compacta de células que permanecen unidas por uniones herméticas, pero cuando se produce la compactación se distingue una masa celular interna que dará lugar a los tejidos del embrión y una masa celular externa que originará el trofoblasto(4, 5).

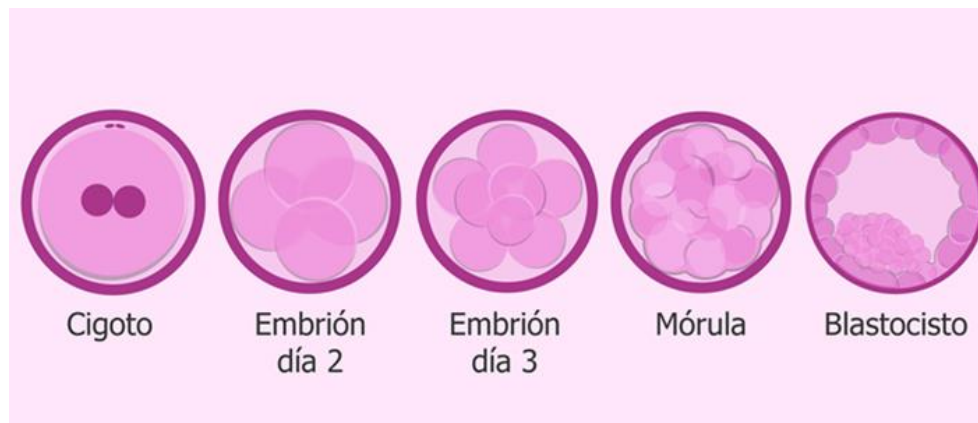


Figura 1. Desarrollo embrionario durante el cultivo in vitro. Tras la fecundación se origina el cigoto, en el cuarto día de desarrollo, tras sucesivas divisiones celulares, se forma la mórula, y entre el quinto y sexto día se forma el blastocito(4).

Entre el quinto y sexto día alcanzan el estadio de blastocito, los embriones son transferidos en este periodo debido a que tienen muchas probabilidades de implantarse, aunque también pueden ser transferidos en el tercer día de desarrollo. El paso de mórula a blastocito se caracteriza por la formación de una cavidad denominada blastocele, que se origina por la penetración de líquido a través de la zona pelúcida en los espacios intercelulares de la masa celular interna. Sin embargo, el blastocito no es solo una cavidad rellena de líquido, en él se han identificado proteínas que participan en procesos de inmunomodulación, mecanismos de adhesión célula-célula, estrés oxidativo y control de la apoptosis, además de contener cfDNA, probablemente relacionado con la morfología del embrión, la ploidía y el potencial de implantación. Estas moléculas son sintetizadas por células del propio embrión y es posible que participen en procesos de comunicación entre las distintas células embrionarias, debido a que el desarrollo embrionario es un proceso coordinado. Esta coordinación se debe a varios factores. Primero, el citoplasma de oocito es heterogéneo y sus componentes no están distribuidos uniformemente, esto provoca que después de la fecundación y de las primeras divisiones celulares los núcleos de las células hijas se encuentren en microambientes distintos y expresan diferentes genes en función de estos microambientes. Además, los primeros productos génicos sintetizados por el genoma del cigoto alteran el citoplasma de cada célula y producen un ambiente celular distinto que también altera la activación de otros genes. Asimismo, las células no se encuentran aisladas unas de otras, a medida que aumenta el número de células en el embrión también se producen interacciones entre ellas, como uniones gap que permiten el transporte de pequeñas moléculas e iones. También hay comunicación entre embriones en condiciones in vitro, los embriones producen factores de

crecimiento, tanto autocrinos como paracrinos, que favorecen el desarrollo del resto de embriones presentes en el cultivo. Sin embargo, en los últimos años se han estado estudiando otras vías de comunicación, las vesículas extracelulares, debido a su abundancia, heterogeneidad y características moleculares que no solo reflejan la identidad y estado de las células progenitoras, también la diversidad de las rutas biogénicas. Estas vesículas participan tanto en la comunicación entre las células de la masa interna y el trofoblasto como en la comunicación entre embrión y las células endometriales o entre las células epiteliales del oviducto(4–9).

Hay diferentes clases de vesículas extracelulares, entre ellas se encuentran los exosomas. Se descubrieron en 1983, al observarse que los receptores de transferrina se asociaban a pequeñas vesículas de 50nm que eran expulsadas al espacio extracelular por reticulocitos maduros. Hoy en día se sabe que los exosomas son vesículas extracelulares, de origen endosomal, con un diámetro que oscila entre los 40 y 160nm, que pueden contener ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, aminoácidos y metabolitos, presentes en todos los fluidos biológicos como suero, líquido cefalorraquídeo u orina. A pesar de que en un principio se pensaba que simplemente transportaban desechos celulares, ahora se sabe que una de sus principales funciones es la comunicación intercelular, función que entraña una gran complejidad debido a los distintos mecanismos y rutas de absorción, a su vez estas rutas pueden cruzarse con rutas de secreción, y a su especificidad por determinados tipos celulares(10, 11).

Los exosomas participan en numerosos procesos fisiológicos (**Figura 2**). Pueden actuar presentando antígenos a las células T para así inducir su activación, aunque también hay virus que los usan como “caballo de Troya” aprovechando su ruta de biogénesis para su supervivencia. También, pueden presentar efectos protectores cardiovasculares, posiblemente limitando la apoptosis en cardiomiocitos, promoviendo la función mitocondrial y preservando la contractilidad cardíaca. En enfermedades neurodegenerativas la agregación de proteínas desplegadas o mal plegadas puede estar causada por los exosomas, además, en pacientes con Alzheimer o con Parkinson se han encontrado exosomas que contenían proteínas asociadas a estas enfermedades en líquido cefalorraquídeo. Como ya hemos mencionado, los exosomas participan en la comunicación celular. Los exosomas procedentes de células mamarias cancerosas contienen miR-200 y favorecen la metástasis, que de otra

forma sería más débil. Los exosomas de células pancreáticas cancerosas presentan adrenomodulina, induciendo la lipólisis en adipocitos e inhibe la secreción de insulina, lo que sugiere que los exosomas derivados de células cancerosas pueden cambiar el metabolismo de células no cancerosas(11).

En fluidos del sistema reproductivo tales como semen, líquido amniótico y leche materna se pueden encontrar exosomas relacionados con procesos como la maduración del espermatozoides, defensa frente a virus en la placenta y promover la salud y el crecimiento postnatal en la leche materna(11). Existen estudios que demuestran que durante el desarrollo embrionario temprano, tanto las células endometriales como las células epiteliales del oviducto, se comunican con el embrión mediante vesículas extracelulares. La adición de vesículas extracelulares al medio de cultivo altera la expresión de genes que participaban en el desarrollo embrionario, metabolismo y regulación epigenética, haciendo a los embriones in vitro más similares a los embriones in vivo(6, 8, 12).

Además, hay estudios que demuestran que hay genes de desarrollo embrionario que son dianas de miRNA contenidos en vesículas extracelulares, genes como Bcl2, Cdk6 y c-Myc. Por otro lado, los embriones de mamíferos son capaces de secretar exosomas que contienen mRNA de genes pluripotentes (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc y Nanog). Actualmente se está trabajando para tratar de determinar la expresión de miRNA en cultivos in vitro que podrían servir para desarrollar biomarcadores que ayudarían en la selección de embriones de mejor calidad y aumentar la tasa de embarazos exitosos(13, 14).

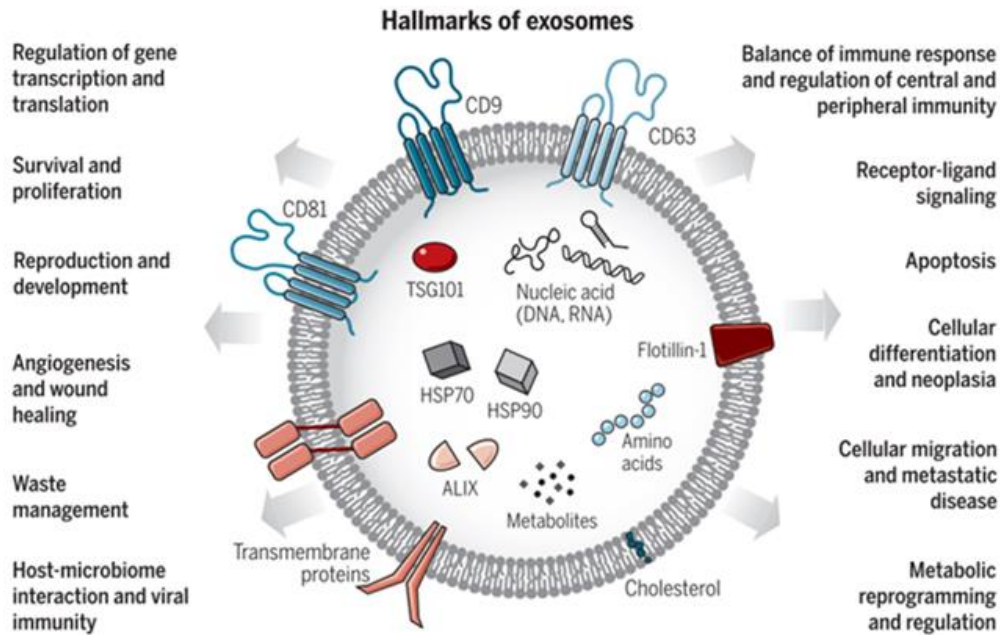


Figura 2. Funciones de los exosomas. Entre sus diversas funciones se encuentran: regulación en la transcripción y traducción de genes, supervivencia y proliferación, reproducción y desarrollo, angiogénesis y cicatrización, gestión de residuos, interacción hospedador-microbioma e inmunidad viral, balance de la respuesta inmune y regulación de la inmunidad periférica y central, señalización receptor-ligando, apoptosis, diferenciación celular y neoplasia, migración celular y metástasis, y reprogramación y regulación celular(11).

Por este motivo, se han empezado a estudiar los exosomas excretados por los embriones, existen suficientes evidencias que indican que estas vesículas ofrecen un gran potencial terapéutico en el diagnóstico de diferentes patologías, participan en procesos claves en el desarrollo embrionario temprano como la implantación o la regulación epigenética(6, 11, 15), y sin lugar a duda, nos aportarán información crucial acerca del estado de los embriones. Como ya se mencionó anteriormente, los procesos de reproducción asistida tienen unos porcentajes de éxito bajos, especialmente en mujeres de edad avanzada. En estos casos, la determinación del embrión de mayor calidad para ser implantado podría permitir aumentar la probabilidad de éxito de las técnicas de reproducción asistida. El estudio del contenido de los exosomas liberados por los embriones mantenidos en cultivo en técnicas de reproducción asistida permitiría conocer mejor el estado fisiológico y metabólico de estos embriones y, de esta manera, tener una información más fiable a la hora de seleccionar el embrión de mayor calidad y, en última instancia, obtener un incremento en las tasas de éxito de la técnica.

Hipótesis



Hipótesis

En la actualidad el número de personas que recurren a las técnicas de reproducción asistida para poder tener hijos va en aumento. Las tasas de éxito de las técnicas, no superan el 40% con óvulos propios y disminuyen considerablemente a medida que aumenta la edad de las mujeres. Además, suponen un gran coste económico y psicológico para sus usuarios, que se ve incrementado con la necesidad de repetir ciclos en el caso de no conseguir el éxito en el primero. Con el fin de intentar mitigar estos efectos se comenzó a implantar los embriones en estadio de blastocisto, para que el desarrollo en cultivo durante un tiempo mayor permitiese mejorar la selección de aquellos de mejor calidad para ser implantados. De esta forma también se permitía disminuir el número de embriones a implantar y, con ello, el riesgo asociado a embarazos múltiples, especialmente en mujeres de edad avanzada. Aun así, las técnicas morfológicas actuales para la selección de embriones siguen sin poder asegurar la selección de aquel de mejor calidad. Los estudios recientes sobre la comunicación celular a través de exosomas y su presencia en el medio de cultivo de embriones en tratamientos de fertilidad abren una puerta hacia su uso en el estudio del estado metabólico y fisiológico de embrión. Creemos que la determinación de este estado, así como un mayor conocimiento del desarrollo embrionario y la comunicación entre las células embrionarias nos permitiría establecer de manera más fiable la calidad embrionaria y, de esta manera, incrementar las tasas de éxito de las técnicas de reproducción asistida.

Objetivos



Objetivos

De manera general, el objetivo de este trabajo es estudiar el contenido de los exosomas, aislados del medio de cultivo de embriones de distinta calidad (óptimos y no óptimos), de pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida, para establecer parámetros de expresión asociados a su viabilidad y mejorar los métodos de selección actuales.

De forma específica se plantean los siguientes objetivos:

- Mediante electroforesis bidimensional se comparará el patrón de expresión de distintas proteínas aisladas a partir de medios de cultivo de embriones de distinta calidad. Aquellas proteínas cuya expresión difiera entre los embriones de calidad óptima y los embriones de mala calidad se identificarán mediante malditof, de esta forma se determinarán proteínas cuya expresión se relacione con un desarrollo embrionario adecuado.
- Análisis de la expresión de miRNA mediante PCR a tiempo real, estos miRNA se encuentran asociados a procesos celulares importantes en el desarrollo embrionario tales como miR-191, miR-372, y miR-645, cuya expresión aumenta en fecundaciones in vitro fallidas o miR-25, miR-302c, miR-196a2 y miR-181a cuya expresión es mayor en embriones degenerados que en blastocitos.
- Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el laboratorio. Para observar cómo influyen las proteínas y los miRNA en el correcto desarrollo del embrión se llevará a cabo el test estadístico ANOVA, mientras, para crear grupos homogéneos entre las distintas proteínas o miRNA utilizaremos un análisis cluster no jerárquico.
- Mediante el software QIAGEN Ingenuity Pathway se analizan las diferentes rutas de señalización donde interviene la proteína o miRNA de interés, así como con qué genes o proteínas interactúa, predecir los efectos corriente abajo, identificar nuevas dianas o biomarcadores candidatos, etc. Además, ayuda a realizar un análisis e interpretación de los datos mejorando la comprensión de los resultados en el contexto de varios sistemas biológicos.

Metodología



Metodología

Para la realización de este proyecto se combinarán Técnicas de Fecundación, Biología Celular y Biología Molecular.

Obtención de muestras

Por un lado, en una primera fase, se obtendrán embriones de mujeres sometidas a tratamientos de fertilidad o programas de ovodonación, mediante protocolos estandarizados en el centro de Fecundación in Vitro colaborador, que incluyen recolección de ovocitos mediante punción guiada por ecografía, fecundación in vitro mediante ICSI y posterior cultivo de los embriones hasta su transferencia o conservación mediante vitrificación.

Durante el proceso de cultivo los embriones serán monitorizados en todo momento mediante tecnología “time-lapse” (GERITM). Este nuevo proceso de cultivo disminuye la manipulación del embrión e incluye una cámara que permite su observación a tiempo real (**Figura 3**), aportando mayor información sobre el desarrollo del mismo. Tras la retirada de los embriones, posteriormente a la clasificación de los mismos en función de su calidad por el laboratorio de embriología del Centro clínico, los medios de cultivo serán conservados para su análisis mediante herramientas de Biología Molecular. Entre estas podemos incluir el aislamiento de exosomas purificados y el análisis de RNA y proteínas contenidos en los mismos.

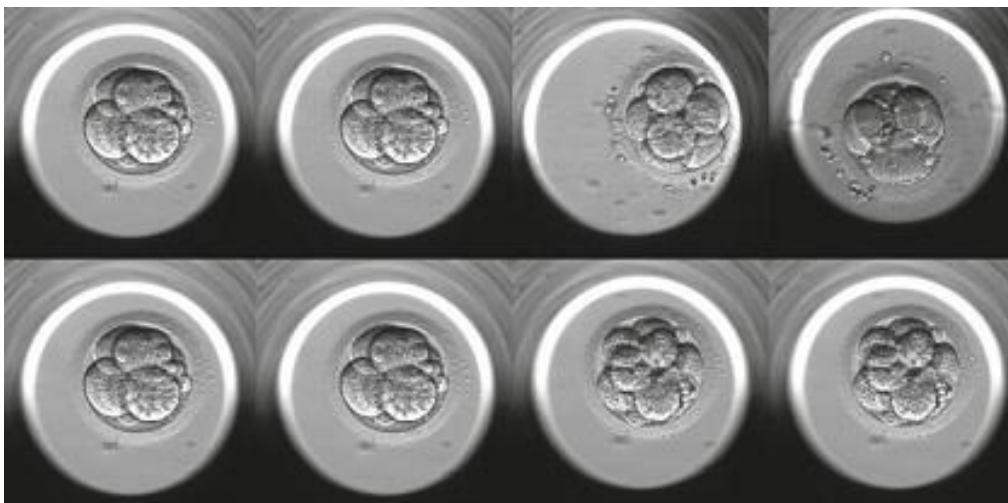


Figura 3. Imágenes de cultivos in vitro de embriones en diferentes etapas del desarrollo temprano, obtenidas mediante tecnología time-lapse(16).

Aislamiento de exosomas

El aislamiento de exosomas se basa en concentrar exosomas intactos a partir de medios de cultivos celulares gracias a que el reactivo separa los componentes menos solubles (como los exosomas), permitiendo recolectar estos compuestos después de centrifugar a baja velocidad. Cabe destacar que el Suero fetal bovino (FBS) presenta altos niveles de exosomas, para asegurarse que los exosomas que aislamos provienen de nuestras células cultivadas se utiliza FBS cuyo contenido en exosomas ha sido eliminado, evitando la contaminación de las muestras.

Purificación de miRNA y proteínas

Para la purificación de miRNA y proteínas se utiliza TRIzol, una solución monofásica compuesta de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que facilitan la purificación, además, mantiene la integridad del ARN debido a que inhibe la actividad RNasa. Este reactivo actúa provocando la precipitación secuencial de RNA, DNA y proteínas en la misma muestra. Después de homogenizar la muestra con TRIzol se añade cloroformo, produciéndose tres fases: una fase superior acuosa una interfase y una fase inferior orgánica de color rojo (**Figura 4**). El RNA lo purificamos a partir de la fase acuosa y las proteínas a partir de la fase orgánica compuesta de fenol-etanol, en ambos se provoca la precipitación por la adición de isopropanol.

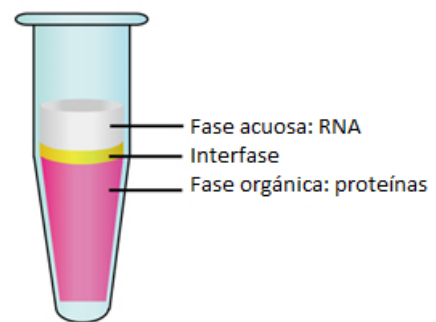


Figura 4. Tras la aplicación de TRIzol y cloroformo se observan tres fases: fase acuosa, interfase y fase orgánica (20).

Análisis de la expresión de miRNA

Para el análisis de miRNA se realizará una PCR en tiempo real. Primero se convierte el RNA a DNA mediante retrotranscripción, después se lleva a cabo una preamplificación para aumentar la cantidad de cDNA y se procede a la PCR en tiempo real. Este proceso permite, además de generar una gran cantidad de copias de un mismo fragmento de ADN, recopilar los datos durante el proceso debido a que se registra un aumento de la fluorescencia, este aumento de fluorescencia se debe a que utilizamos como colorante SYBR Green. Este colorante se une a ADN bicatenario, cuanto más moléculas de ADN bicatenario se formen más colorante se unirá a estas moléculas y más fluorescencia se verá registrada, es decir, se produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto de PCR producido(17).

Identificación de proteínas

La técnica que usaremos para analizar proteínas será una electroforesis bidimensional, esta técnica separa las proteínas en función de dos criterios. En primer lugar se produce la separación por el punto isoeléctrico de las moléculas (isoelectroenfoque), para ello debe haber un gradiente de pH en el gel, de tal forma que en presencia de un campo eléctrico las moléculas se desplazan hasta que encuentran el valor de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. En segundo lugar se realiza un SDS-PAGE, las tiras resultantes del isoelectroenfoque se incuban con agentes reductores y SDS provocando la desnaturalización de las proteínas, y se colocan sobre un gel de poliacrilamida con tampón de cámara, en presencia de un campo eléctrico. En este proceso las proteínas quedan rodeadas de cargas negativas, por lo que se separan exclusivamente en función de su tamaño.

Para identificar las proteínas utilizamos un espectrómetro de masas Maldi-Tof (Matriz assisted laser desorption ionization – Time of flight). Maldi es un sistema de ionización de muestras, sobre la placa se encuentra una matriz formada por compuestos capaces de ceder protones a la muestra, esta matriz se cristaliza y se hace incidir un láser, provocando que los compuestos de la matriz cedan electrones a los compuestos de la muestra, quedando ionizadas. Tof es un sistema de análisis de masas, los compuestos de la muestra vibran debido a la presencia de un campo eléctrico, como los compuestos se encuentran ionizados, su vibración depende exclusivamente de su tamaño. Además, los espectrómetros de masa presentan un sistema de detección mediante huella peptídica (Peptide Mass Fingerprinting), esta huella es específica de cada proteína pues depende de su secuencia de aminoácidos, es decir, las distintas secuencias dan lugar distintas dianas para proteasas, formándose péptidos de distintos tamaños.

Análisis de datos

Tras la obtención de los datos en el laboratorio se procederá a su análisis estadístico. Se llevaran a cabo dos test: un análisis de la varianza (ANOVA), nos permite saber si hay efecto de los factores sobre la variable, y un análisis cluster no jerárquico, donde los casos se organizan en grupos homogéneos, de tal manera que los casos que son similares son asignados a un mismo clúster, mientras que los casos diferentes se localizan en clusters distintos. Para ambos test se pueden utilizar software estadísticos como R o SPSS. Además, para saber en qué rutas de señalización participan las proteínas y miRNA identificados, así

como su interacción con otras moléculas, efecto corriente abajo, etc., se utilizará el software QIAGEN Ingenuity Pathway (Qiagen IPA).

Diseño experimental



Diseño experimental

Obtención de medios de cultivo

El medio de cultivo de embriones a analizar en este proyecto se obtendrá en la clínica de Fecundación in Vitro que colabora con nuestro grupo de investigación, a partir de embriones de pacientes que se sometan a tratamientos de fertilidad o que participen en programas de donación de ovocitos y previa firma de un consentimiento informado por parte de las mismas. Tras la recuperación del medio en el que se han mantenido en cultivo los embriones durante, al menos, 5 días, el mismo se conservará a -80°C , debidamente codificado, hasta el momento de su uso. Esta codificación permitirá la recuperación de cualquier dato sobre el proceso de cultivo y posterior destino del embrión, pero no la identificación de la paciente de origen, con el fin de mantener la privacidad de la misma. En el momento de la recolección, se realizará una clasificación de los medios de cultivo en función de la calidad del embrión cultivado en los mismos. Se estima la recolección de un mínimo de 25 muestras independientes.

Obtención de exosomas purificados

El aislamiento de los exosomas presentes en los medios de cultivo de embriones obtenidos de la clínica de fertilidad se realizará mediante el kit Total Exosome Isolation Reagent, from cell culture media (Invitrogen). Este se basa en la adición de un reactivo que, tras la incubación a 4°C durante toda la noche, permite la precipitación de las vesículas lipídicas de pequeño tamaño a velocidades de centrifugación bajas, de $10000g$.

Purificación de RNA y proteínas

Para la obtención de miRNA y proteínas purificadas se utilizará el reactivo TRIzol (Invitrogen) junto con cloroformo, como ya se mencionó en el apartado de metodología, este reactivo permite el aislamiento de miRNA y proteínas a partir de una misma muestra. Después se extraen la fase orgánica y la fase acuosa, tanto para la purificación de proteínas como para RNA se utilizará etanol e isopropanol. Una vez obtenido el miRNA y las proteínas se procederá a su análisis. Para que los resultados sean significativos, tanto para el análisis de la expresión de miRNA como de proteínas, se analizarán, al menos, 25 muestras de cada condición.

Análisis de miRNA

A partir del miRNA purificado se analizará la expresión de los genes de estudio. Este análisis comienza con la síntesis de cDNA a partir de RNA mediante el kit miScript II RT (Qiagen),

después se realizará una preamplificación utilizando el kit miScript PreAMP PCR (Qiagen), de este modo se aumenta la cantidad de cDNA. Para la PCR a tiempo real se utilizará el kit miScript SYBR Green junto con miScript miRNA PCR Arrays (Qiagen).

Análisis de proteínas

Para el análisis del patrón de expresión de las proteínas purificadas se procederá a realizar una electroforesis bidimensional. Primero se realizará el isoelectroenfoque, las tiras se rehidratan junto con las muestras durante 12 horas y después se procederá al enfoque, que durará entre 6 y 8 horas. Una vez terminado el isoelectroenfoque las tiras se incuban en presencia de DTT, yodoacetamida y SDS, y se procede a realizar una electroforesis SDS-PAGE. Los geles obtenidos se teñirán con azul de Coomassie, aquellas bandas que muestren diferencias entre las distintas muestras serán examinadas con un espectrómetro de masas mediante malditof, de esta forma se identificarán las proteínas de interés como biomarcador.

Análisis de datos

Una vez obtenidos los datos de laboratorio, tanto de proteínas como de miRNA, se realizarán dos análisis estadísticos mediante el software R. Uno de ellos es el análisis de la varianza o ANOVA, con esta herramienta se puede observar si los factores influyen en la variable respuesta, por ejemplo, si las proteínas y miRNAs identificados influyen sobre la calidad de los embriones. Otro tipo de análisis es el clúster, mediante el algoritmo de las k-medias. En este caso se busca formar grupos homogéneos pero bien diferenciados entre sí, de tal forma que aquellas muestras con características más similares quedarán en un mismo clúster.

Por otra parte, para ver las distintas rutas metabólicas donde intervienen las proteínas y los RNA identificados, así como identificar posibles biomarcadores, se utilizará software QIAGEN Ingenuity Pathway (Qiagen IPA).

Resultados



Resultados

La coordinación entre las células del embrión es fundamental para su viabilidad, una de las vías que utilizan las células para comunicarse son las vesículas extracelulares. En el blastocele se ha de detectado la presencia de estas vesículas, mayoritariamente exosomas, y probablemente permitan la comunicación entre las células de la masa interna y el trofoblasto. Entre las moléculas que portaban se encontraban los miRNAs, capaces de actuar como reguladores en el desarrollo embrionario temprano. Algunos de estos miRNA también se encuentran presentes en los medios de cultivo de embriones (**Figura 5**), siendo de especial interés para el desarrollo de biomarcadores(18, 19).

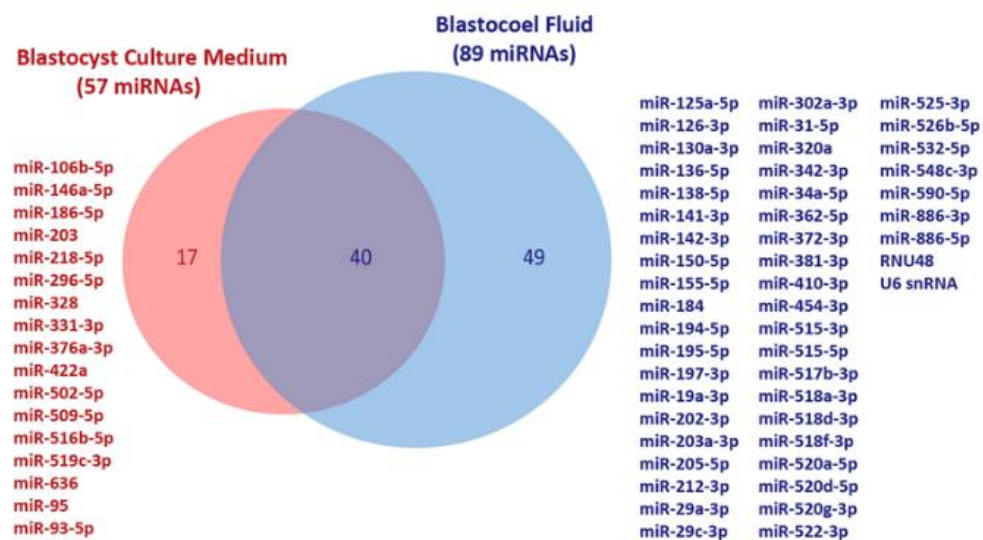


Figura 5. Diagrama de Venn sobre la comparación de la expresión de miRNA entre el fluido del blastocele y el medio de cultivo. Se han identificado 57 miRNA en los medios de cultivo, 89 en el fluido del blastocele y 40 miRNA en común(19).

A partir del análisis de los datos obtenidos en el laboratorio cabría esperar que aquellos embriones de mayor calidad expresen genes distintos de los que son de menor calidad. Los exosomas participan en la comunicación entre las células endometriales y el embrión, jugando un papel clave durante el proceso de implantación, por ello, aquellos embriones de mayor calidad expresarán miRNA y proteínas relacionados con procesos de reconocimiento celular, adhesión célula-célula, diferenciación celular, etc., pudiendo tener una mayor probabilidad de implantarse. Además, la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo y apoptosis podría relacionarse con embriones de menor calidad.

Analizando la expresión de genes y proteínas, junto con el estudio de la morfología de los blastocitos mediante tecnología time-lapse, se pueden establecer nuevos criterios para la selección de embriones en técnicas de reproducción asistida. El estudio de la morfología del embrión es el método más aceptado en clínica, sin embargo, no siempre los embriones con una “buena” morfología garantizan el éxito del embarazo, pues no todas las patologías se ven reflejadas en la morfología. Complementar la tecnología time-lapse con el análisis de biomarcadores podría mejorar la selección de embriones y así incrementar la tasa de éxito.

Conclusiones



Conclusiones

Se espera que los resultados que se obtengan de este proyecto puedan constituir la base de las siguientes posibles conclusiones:

1. A partir de los exosomas aislados en medios de cultivo se observen diferencias tanto en la expresión de proteínas como de miRNAs en función de la calidad los embriones.
2. Dichas diferencias podrían constituir nuevos biomarcadores que reflejen características del embrión que no son visibles mediante time-lapse, como el estado metabólico o patologías.
3. La identificación de nuevos biomarcadores, junto con el uso de la tecnología time-lapse, podría mejorar la selección de embriones y aumentar las tasas de éxito en técnicas de reproducción asistida.

Conclusions

It is expected that the results obtained from this Project can form the basis of the following possible conclusions:

1. From isolated exosomes in culture mediums, differences on protein and miRNA expression can be observed according to embryo quality.
2. These differences could be new biomarkers that reflects embryos characteristics not visible by time-lapse, as metabolic state or pathologies.
3. The identification of new biomarkers, together with time-lapse technology, may be promoting embryo selection and increasing success rates on assisted reproductive technology.

Bibliografía



Bibliografía

1. **Baccino, G., Gómez Palomares, J. L., Tur, R., Pérez Milán, Federico y Ranucci, C.** 2012. Saber más sobre: FERTILIDAD Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA. *Sociedad Española de Fertilidad*. Disponible en: https://www.sefertilidad.net/docs/pacientes/spr_sef_fertilidad.pdf
2. **Rosas, M. R.** 2008. Infertilidad femenina. Un problema multifactorial. *Offarm: farmacia y sociedad*, **27** (8), 90-97.
3. **Ávila, J., González-Fernández, R., Rotoli, D., Hernández, J. y Palumbo, A.** 2016. Oxidative Stress in Granulosa-Lutein Cells From In Vitro Fertilization Patients. *Reproductive Sciences* (Thousand Oaks, Calif.), **23**(12), 1656–1661.
4. <https://www.reproduccionasistida.org/cultivo-de-embriones/>.
5. **SADLER, T. W.** 2016. *Lagman Embrilogía Médica*. 13ª ed. Wolters Kluwer, Barcelona.
6. **Fu, B., Ma, H. y Liu, D.** 2020. Extracellular Vesicles Function as Bioactive Molecular Transmitters in the Mammalian Oviduct: An Inspiration for Optimizing in Vitro Culture Systems and Improving Delivery of Exogenous Nucleic Acids during Preimplantation Embryonic Development. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(6), 2189.
7. **Klug, W. S., Cummings, M. R. y Spencer, C. A.** 2006. *Conceptos de Genética*. 8ª ed. Pearson, Madrid.
8. **Bauersachs, S., Mermillod, P. y Almiñana, C.** 2020. The Oviductal Extracellular Vesicles' RNA Cargo Regulates the Bovine Embryonic Transcriptome. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(4), 1303.
9. [sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/desarrolloEmbrionario.pdf](https://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/desarrolloEmbrionario.pdf)
10. **Harding, C. V., Heuser, J. E. y Stahl, P. D.** 2013. Exosomes: looking back three decades and into the future. *The Journal of Cell Biology*, **200**(4), 367–371.
11. **Kalluri, R. y LeBleu, V. S.** 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, **367**(6478), eaau6977.
12. **Bridi, A., Perecin, F. y Silveira, J.** 2020. Extracellular Vesicles Mediated Early Embryo-Maternal Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(3), 1163.
13. **Andronico, F., Battaglia, R., Ragusa, M., Barbagallo, D., Purrello, M., et al.** 2019. Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(9), 2162.
14. **Saadeldin, I. M., Oh, H. J. y Lee, B. C.** 2015. Embryonic-maternal cross-talk via exosomes: potential implications. *Stem cells and cloning: advances and applications*,

- 8, 103–107.
15. **Machtinger, R., Laurent, L. C. y Baccarelli, A. A.** 2016. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 22(2), 182–193.
 16. <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/TLT>
 17. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
 18. **Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Cimadomo, D., Noli, L., Khalaf, Y., Farcomeni, A., et al.** 2016. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertility and Sterility*, 105(1), 225–35.e353.
 19. **Battaglia, R., Palini, S., Vento, M. E., La Ferlita, A., Lo Faro, M. J., et al.** 2019. Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. *Scientific reports*, 9(1), 84.
 20. <https://www.creative-diagnostics.com/total-protein-extraction-by-trizol.htm>

Imagen portada: <https://www.etsy.com/es/listing/386576574/impresion-de-arte-embryo-de-5-dias?ref=related-3>

Imagen capítulos:

https://www.bioscience.co.uk/userfiles/pdf/Cell_Guidance_Systems_Exosomes.pdf