



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología.

Universidad de Valencia.

TESIS DOCTORAL

**PERFIL METABOLÓMICO DE LOS PREEMBRIONES HUMANOS COMO
POTENCIAL MARCADOR NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS**

Autora:

Inmaculada Sánchez Ribas

Licenciada en Medicina y Cirugía. Universidad Central de Barcelona.

Especialista en Obstetricia y Ginecología.

Directores:

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Dr. Agustín Ballesteros Boluda

Valencia 2012



Prof. Carlos Antonio Simón Vallés, Catedrático de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia y Director Científico del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“PERFIL METABOLÓMICO DE LOS PREEMBRIONES HUMANOS COMO POTENCIAL MARCADOR NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Inmaculada Sánchez Ribas bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 19 de junio de 2012.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Valles



Dr. Francisco Domínguez Hernández, Doctor en Biología e Investigador de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“PERFIL METABOLÓMICO DE LOS PREEMBRIONES HUMANOS COMO POTENCIAL MARCADOR NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Inmaculada Sánchez Ribas bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 19 de junio de 2012.

Fdo. Dr. Francisco Domínguez Hernández



Dr. Agustín Ballesteros Boluda, Doctor en Medicina y Director del Instituto Valenciano de Infertilidad en Barcelona (IVI Barcelona).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“PERFIL METABOLÓMICO DE LOS PREEMBRIONES HUMANOS COMO POTENCIAL MARCADOR NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Inmaculada Sánchez Ribas bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Barcelona a 19 de junio de 2012.

Fdo. Dr. Agustín Ballesteros Boluda

TESIS DOCTORAL

**PERFIL METABOLÓMICO DE LOS PREEMBRIONES HUMANOS COMO
POTENCIAL MARCADOR NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS**

Autora:

Inmaculada Sánchez Ribas

Licenciada en Medicina y Cirugía. Universidad Central de Barcelona.

Especialista en Obstetricia y Ginecología.

Suficiencia Investigadora en Escuela de Doctorado y de Formación
Continuada. Ciencias de la Salud. Doctorado en Pediatría, Obstetricia y
Ginecología. Universidad Autónoma de Barcelona.

Centro de defensa de la Tesis Doctoral:

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

2012

Directores de Tesis:

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Dr. Francisco Domínguez Hernández

Dr. Agustín Ballesteros Boluda

Cada uno trae su misión, su propósito
y su trabajo particular.

Mi primer trabajo consiste
en vaciar la mochila de mi alma.

Esto me permitirá cumplir con mi propósito
y con mi misión: ayudar a mi prójimo
a través de mi profesión.

Carta anónima

Agradecimientos:

Muchas, muchísimas gracias a mucha gente. Empezando por ti Paco. No haría justicia si así no fuera. Alma generosa, vives tu profesión, te encanta saber y buscar, te gusta enseñar y ayudar. Me has enseñado y ayudado mucho durante todos estos años. Me has acercado la investigación, me lo has hecho fácil, nos hemos preguntado muchas cosas, muchas más de las que hemos contestado. Nos hemos acompañado y me siento orgullosa y feliz de haber caminado a tu lado. Das luz Paco, con generosidad e incondicionalidad, cualidades poco frecuentes de encontrar. Te quiero bien.

Gracias Carlos, me escuchaste desde el principio y sin pestañear. Tienes el Don de la Sabiduría y el de la Visión. Quieres saber y ser práctico a la vez. He aprendido mucho, muchísimo contigo, y de ti. Me ha encantado compartir los momentos de despacho, de pensar, de decidir, hasta los de discutir..... Fuente de aprendizaje continuo, incansable, a veces rayas lo sobrehumano. Gracias por tu ayuda, por tu pasión, por tu visión.

Gracias Agustín, hombre comprometido con su trabajo. Gracias por tu confianza. Me diste la oportunidad de ser escuchada y te lo agradezco enormemente, mi voz fue escuchada. Has apoyado el proyecto, proyecto ya de todos, proyecto del IVI. Compromiso con la empresa, compromiso con la investigación, compromiso para y por los pacientes, compromiso con la mejora

constante y continua. Somos gente comprometida, a niveles distintos pero con un único fin: mejorar y ayudar.

Gracias IVI, a sus fundadores, Toni y Pepe, a su visión, misión y compromiso. Hacéis posible que muchos sueños se cumplan, tanto los externos como los internos. Habéis creado una gran máquina de Esperanza en mayúsculas, esperanza de vida, de vidas humanas y vidas profesionales. Por favor, no os olvidéis de vuestro propósito. El fruto de vuestro trabajo es admirado, reconocido y respetado desde dentro y desde fuera. Mil gracias.

Gràcies Mireia, va ser un goig a Montreal, on vàrem parir la tesi. Idees que flüien sense parar i que donaven aler a aquest projecte. Vaig gaudir moltíssim amb tu, ho recordo i ho porto amb mi. No me n'oblido. Treballar amb tu ha estat i és un plaer.

Gracias Gemma, por tu empuje, por estar ahí, por escuchar mis anhelos y des anhelos, por creer en mí y junto a mí, por tener fe, por valorar. Compañera de pupitre que hace lo posible y lo imposible, he aprendido de ti a superar mis propios límites, siempre se puede dar un paso más.

Y primero fue Marissa en Barcelona. Gracias Marissa, sin tu paciencia y ayuda las "gotitas" no se hubieran recogido. Has cogido muchísimas, doy fe. Ayuda inestimable y básica. Imposible investigar sin las manos de aquellos que

recogen las muestras. Y después, y paulatinamente fue Pablo en Sevilla, y Sandra en Madrid, y María en Vigo y Zalao en Bilbao. Gracias a todos chicos. Ha sido un placer colaborar con vosotros durante todos estos años.

Muchísimas gracias Carmen (Rubio). Siempre estás ahí cuando te necesitamos. Generosa de tu ciencia y de tu tiempo. Me has facilitado y mucho el camino en el mundo del DGP.

Gracias Leonor y Antonio, ayuda precisa y necesaria para entender la metabolómica, por vuestras explicaciones, las reuniones en el CIPF, vuestras correcciones, rapidísimas contestaciones y documentación que nos habéis facilitado. Nuestra incursión en el mundo de la metabolómica y de la RMN ha sido más interesante y entendedora.

Gracias Joseví, amor de mis amores. Hombre que cree en mí, que me acompaña, me cuida, me ayuda, me escucha y aconseja, hombre por el que me siento querida, muy querida. Mi vida es inmensamente más feliz a tu lado. Has vivido esta tesis junto a mí, desde otro lado, desde el lado de las emociones, de las subidas y bajadas, desde la ilusión y la desazón, las idas y venidas, congresos y escrituras... han sido 6 años de tesis, experiencia de vida.

Gracias papás, es un buen momento para agradeceros la vida, los años de enseñanza, los valores aprendidos, vuestra prioridad en nuestros estudios y la

importancia de éstos. Me veo en vosotros y os veo en mí. He aprendido de vosotros, y me siento feliz de teneros como padres. Sois, para mí, enseñanza de vida en mayúsculas, y acepto todo lo aprendido.

Gracias Montse, hermana de sangre y de alma, por tu preocupación y tus eternas preguntas sobre mi tesis, sin ti no hubiera sido igual. Acompañamiento constante, te sentías más feliz que yo con los resultados que íbamos obteniendo. Me haces reír y sentir, me cuestionas y me divierto contigo. Compañera de vida, te agradezco tu estar.

Gracias Tere por tu interés en mi quehacer. Siempre aportas confianza y sosiego.

Gracias finalmente a todos aquellos que se han preocupado, interesado y aportado entusiasmo y positivismo. Las palabras de aliento siempre son bienvenidas, son amor que nutre nuestro corazón y nuestro intelecto.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE LA SELECCIÓN EMBRIONARIA.....	1
1.2. CROMOSOMOPATIAS.....	2
1.2.1. Anomalías numéricas	
1.2.2. Anomalías estructurales	
1.2.3. Cromosoma 21	
Trisomía del cromosoma 21	
Monosomía del cromosoma 21	
1.3. DIAGNOSTICO PREIMPLANTACIONAL.....	11
1.3.1. Biopsia embrionaria	
1.3.2. Hibridación "in situ" fluorescente (FISH)	
1.3.3. Nuevas técnicas para el diagnóstico de aneuploidías: arrays de CGH	
1.4. NUEVAS TECNOLOGIAS.....	19
1.4.1. Introducción a las ómicas	
1.4.2. Metabolómica	
Plataformas de análisis	
▪ Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas (EM o MS)	
▪ Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	
Análisis estadístico multivariable	

Objetivos de la metabolómica

Identificación de metabolitos

1.4.3. Cambio en las estrategias de generación de hipótesis

1.4.4. Desarrollo de análisis no invasivo mediante ómicas

2. OBJETIVO..... 35

OBJETIVO PRINCIPAL..... 35

OBJETIVOS SECUNDARIOS..... 35

3. MATERIAL Y MÉTODOS..... 36

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO..... 36

3.1.1. Procedimiento de obtención y recogida de las muestras

- Biopsia embrionaria y medios de cultivo
- Protocolo de FISH para DPI
- Recogida de muestras

3.2. ANÁLISIS DE LOS DATOS..... 40

3.2.1. Base de datos

3.2.2. Plataformas metabolómicas para el análisis de los datos

3.2.2.1. Espectrometría de masas (EM o MS)

- Preparación de muestras para análisis metabolómico mediante EM
- Sistema LC-MS
- Análisis de los resultados obtenidos mediante EM

3.2.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

- Preparación de muestras para análisis metabolómico mediante RMN
- Adquisición de los espectros
- Análisis de los resultados obtenidos por RMN

4. RESULTADOS.....	49
4.1. PRIMER ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.....	49
4.2. SEGUNDO ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.....	54
4.3. TERCER ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.....	81
4.4. CUARTO ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.....	84
4.5. QUINTO ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.....	94
5. DISCUSIÓN.....	101
6. CONCLUSIONES.....	114
7. BIBLIOGRAFÍA.....	115
8. APÉNDICE DOCUMENTAL.....	123

Lista de símbolos, abreviaturas y siglas:

BACs: *Bacterial Artificial Chromosomes*

CBS: cystathionine b-synthase

CGH: Hibridación Genómica Comparada

CL: Cromatografía Líquida

Cr: Cromosoma

Dg: diagnóstico

DGP: Diagnóstico Preimplantatorio o Preimplantacional

DGP-AS: DGP para el screening de aneuploidías

EM o MS: Espectrometría de Masas

FISH: Hibridación In Situ Fluorescente

FIV: Fecundación In Vitro

M21: Monosomía del cromosoma 21

MC: Medio de cultivo

n: normal

PCA: Principal Component Analysis ó Análisis de Componentes Principales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PLS: Partial Least Squares ó Mínimos cuadrados parciales

PLS-DA: Partial Least Squares - Discriminant Analysis ó Análisis Discriminante de la

Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SA: Sulfato de Androsterona

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

T21: Trisomía del cromosoma 21

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE LA SELECCIÓN EMBRIONARIA

Uno de los mayores retos de la medicina reproductiva es la selección de los embriones más apropiados para ser transferidos. Hasta la fecha, la evaluación morfológica sigue siendo el único método de asesoramiento utilizado para escoger el mejor embrión o blastocisto, pero este método de selección es subjetivo y su poder predictivo, así como la variabilidad inter- e intra- observador limita su valor. Los límites en la evaluación morfológica de los embriones han provocado que distintos grupos de investigación persigan tecnologías que nos ayuden a mejorar nuestra capacidad diagnóstica del potencial implantatorio de un embrión (Scott R, 2008).

Sabemos que la incidencia de anormalidades cromosómicas en embriones humanos es extremadamente alta. La morfología embrionaria normal no excluye su alteración cromosómica (Baart, 2006). Se estima que el 70% de embriones morfológicamente normales son embriones aneuploides (Gutiérrez-Mateo, 2004). Se ha calculado, mediante el Diagnóstico Preimplantacional (DGP) por análisis de hibridación in situ fluorescente (FISH) de 10 sondas en embriones de día +3, que sólo el 36% de embriones de mujeres <38 años procedentes de ciclos de FIV son cromosómicamente normales (Baart, 2006). Las donantes de óvulos, mujeres presumiblemente fértiles,

presentan tasas elevadas de embriones anormales de hasta el 57% utilizando DGP mediante FISH de 8 sondas (Munné, 2006).

1.2. CROMOSOMOPATIAS

El origen del descubrimiento de las cromosomopatías se remonta a mediados del siglo XX cuando se descubre que una alteración en el cromosoma 21 es responsable del síndrome de Down (Lejeune, 1959). Desde entonces se sabe que son muchas las enfermedades que tienen como causa directa un defecto o exceso de alguno de los 23 pares de cromosomas que componen el genoma humano. Se sabe también que muchos de estos defectos cromosómicos conllevan defectos biológicos graves que son responsables de más de la mitad de los abortos producidos en el primer trimestre (Weatherall, 1991; Hook EB, 1992), de malformaciones congénitas e incluso de muchos de los fallos de gestación que hasta ahora no se han podido explicar (Pérez-Cano, 2005). Se estima que la incidencia global de anomalías cromosómicas en neonatos es del 0.7% (Staessen, 2003).

La alteración cromosómica o cromosomopatía es el proceso por el cual segmentos de un cromosoma, un cromosoma entero o incluso series enteras de cromosomas sufren variaciones, alterándose la dotación cromosómica normal de un individuo. Estas variaciones pueden dividirse en dos grupos, las anomalías numéricas y las anomalías estructurales.

1.2.1. Anomalías numéricas

Las anomalías numéricas implican un cambio en el número de cromosomas. Puede afectar a toda una serie cromosómica produciendo una variación en el número global de la dotación cromosómica, o puede afectar a partes de una serie cromosómica, produciendo una variación que implica cambios en el número de un solo cromosoma dentro de su dotación, lo que recibe el nombre de aneuploidía.

La aneuploidía autosómica es el tipo más frecuente y clínicamente significativo de trastornos cromosómicos humanos y ocurre al menos en el 3-4% de todos los embarazos reconocidos. Existen numerosos trastornos cromosómicamente raros con ganancia o pérdida de un cromosoma entero o de un segmento cromosómico, la mayoría de los embarazos con alguno de estos desequilibrios terminan en aborto entre las semanas 8 y 16 de gestación.

De ellos sólo hay tres desequilibrios cromosómicos bien definidos compatibles con supervivencia posnatal. En todos existe una trisomía para un cromosoma autosómico completo. Estos son el Síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), Síndrome de Patau (trisomía del cromosoma 13) y Síndrome de Edwards (trisomía del cromosoma 18).

Las anomalías de los cromosomas sexuales son los trastornos cromosómicos humanos compatibles con la vida más comunes. Se estima una frecuencia de alrededor de uno por cada 500 nacimientos. Existen cuatro aneuploidías cromosómicas sexuales bien definidas que son el Síndrome de Klinefelter (47,XXY), Síndrome XYY, Trisomía X y Síndrome de Turner (45,X).

1.2.2. Anomalías estructurales

Se trata de un cambio en la estructura del cromosoma. En general, el número de cromosomas permanece constante pero su material genético queda modificado por la pérdida, ganancia o reorganización de partes de un cromosoma.

Muchas de estas alteraciones producen anomalías en alguna función de la célula o del organismo, porque la variación en el número o posición de los genes implica a su vez la variación de su función y como consecuencia la repercusión en su viabilidad, más o menos grave según el tipo de alteración cromosómica producida.

Existen diversas anomalías estructurales pero las detectadas con mayor frecuencia son las translocaciones equilibradas recíprocas (1.3%), las robertsonianas (0.6%) y las inversiones (0.2%) (De Braekeleer M, 1990).

Las translocaciones implican una rotura e intercambio de fragmentos cromosómicos entre dos cromosomas, habitualmente de dos pares cromosómicos distintos. Se clasifican en translocaciones Robertsonianas y recíprocas. Las Robertsonianas se producen entre cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) e inducen a la formación de dos tipos de cromosomas derivados, generalmente con pérdida del número total de cromosomas. Las recíprocas son aquellas en las que el intercambio de fragmentos de cromosoma no produce una pérdida del número total de cromosomas durante la división celular.

Las inversiones implican una reorganización estructural intracromosómica, existe rotura en dos regiones de un mismo cromosoma y la reorganización e inversión del fragmento invertido, dentro del mismo cromosoma.

Los individuos portadores de anomalías estructurales equilibradas presentan un riesgo de aborto de hasta un 30% y de descendencia con malformaciones, ya que durante la meiosis se puede producir una segregación anómala de los cromosomas implicados, dando lugar a gametos con deficiencias o duplicaciones que implican estados de desequilibrio graves para el embrión (Rubio C, 2012).

1.2.3. Cromosoma 21

Trisomía del cromosoma 21 (Síndrome de Down)

El Síndrome de Down es el arquetipo de las alteraciones cromosómicas. Se trata de un trastorno metabólico y genético complejo que se deriva de la presencia de una copia extra del cromosoma 21 (Epstein, 1995). Descrito en 1959, fue el primer síndrome clínico al que se le dio origen genético, y ha sido el prototipo utilizado para investigaciones clínicas, citogenéticas y moleculares de las condiciones aneuploides humanas. Está considerada la causa más frecuente de discapacidad psíquica congénita y la alteración cromosómica más frecuente en el nacimiento. En nuestro país, afecta a 1 de cada 700 recién nacidos vivos (Cabero Roura, 1997), la prevalencia en E.E.U.U es similar, de ~1/700–800 recién nacidos (Krivchenia, 1993) y es además una conocida causa de aborto.

Se ha demostrado que el origen de esta copia extra del cromosoma 21 es materna en el 93% de los casos, en el 7% de los casos es debida a la falta de disyunciones paterna, y en una pequeña proporción de los casos se debe a la falta de disyunciones mitóticas postzigóticas (Hassold y Sherman, 2000).

La excesiva sobreexpresión de los múltiples genes presentes en el cromosoma 21 son los causantes del fenotipo del Síndrome de Down, así como

de las alteraciones bioquímicas, endocrinas, inmunológicas y neurológicas que le son características. Se ha descrito mayor vulnerabilidad en determinados sistemas orgánicos. Torfs y Christianson (1998) identificaron malformaciones características en un estudio poblacional de 3000 niños afectados, describiendo las malformaciones cardíacas e intestinales como las más frecuentes.

La secuenciación del cromosoma 21 se realizó en el año 2000 (Hattori, 2000), y se definieron las regiones del cromosoma que contribuían predominantemente al fenotipo de la trisomía 21. En la figura 1 se ilustra la región 21q22.13-q22.2 que es la que aparentemente tiene mayor influencia en las características físicas del Síndrome de Down (Gardner y Sutherland, 2004).

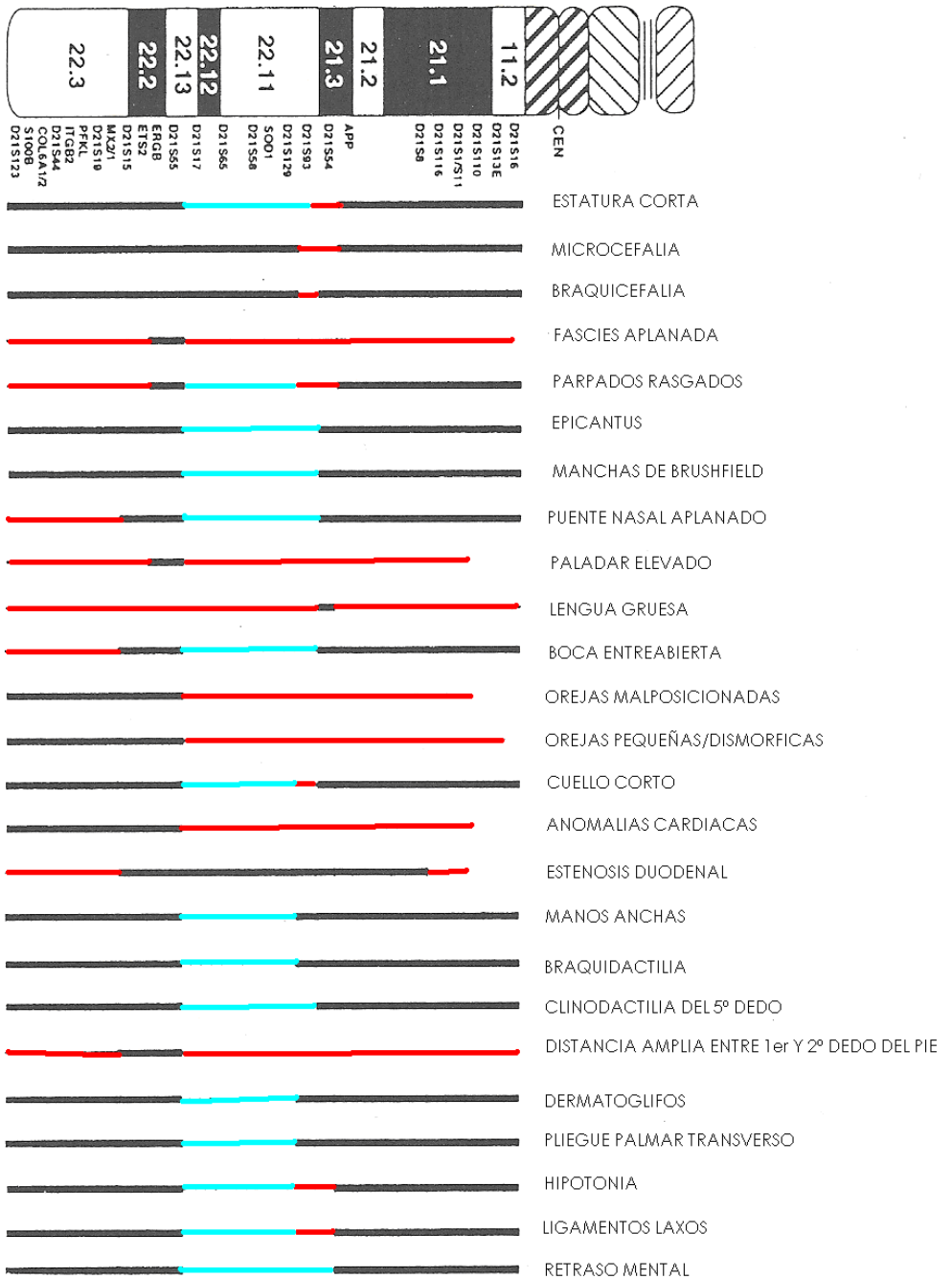


Figura 1. Mapa fenotípico del cromosoma 21. Líneas negras representan las regiones que producen rasgos característicos. Líneas rojas podrían contribuir a dichos rasgos. Líneas azules son regiones menos claras.

De entre los genes sobreexpresados del cromosoma 21, el gen de la cystathionine b-synthase (CBS) es uno de los mas estudiados en el Síndrome de Down. Se sabe que la alteración de esta enzima que participa en las rutas de síntesis de aminoácidos conlleva una serie de alteraciones que implican cambios fenotipicos específicos en el adulto. Los principales cambios de dosis génica de este gen se pueden visualizar en la figura 2.

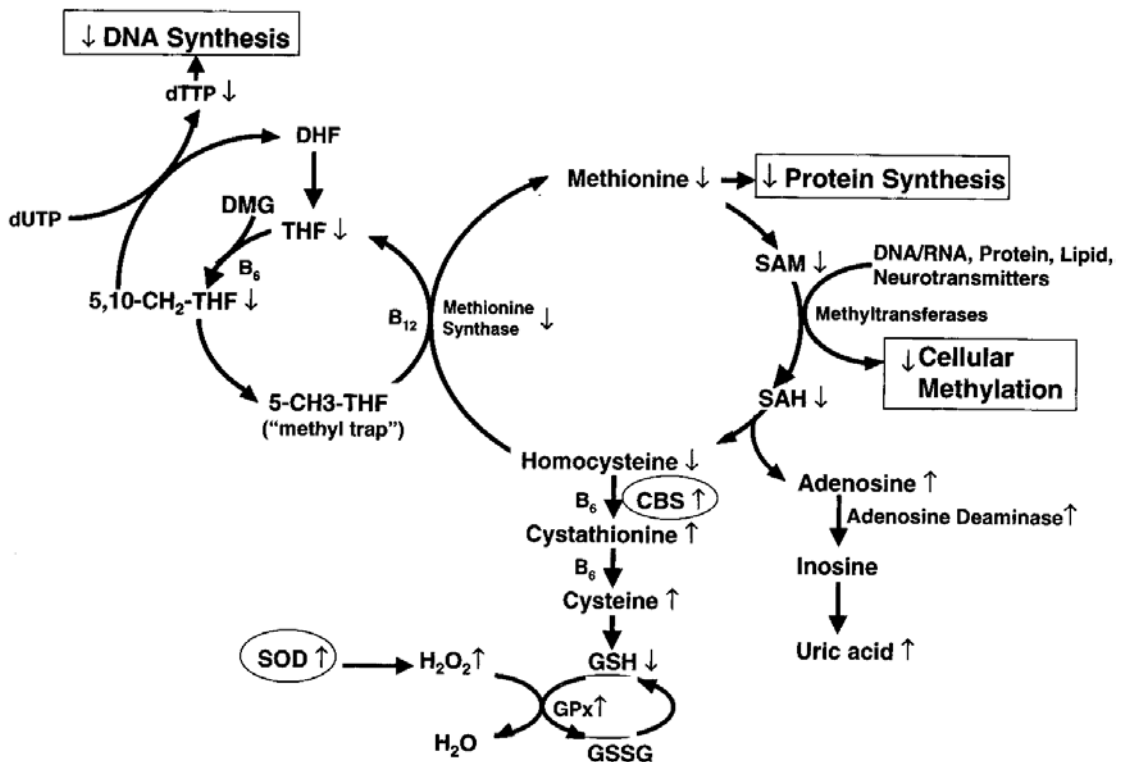


Figura 2. *La sobreexpresión del gen CBS y SOD presentes en el cromosoma 21 produce una cascada de alteraciones en multitud de compuestos como Metionina y Homocisteina (dos aminoácidos) que producen una disminución de la síntesis proteica y de la metilación celular, vía de la reducción de SAM y SAH, dos enzimas encargadas de la metilación celular. Por otro lado también se produce una disminución de la síntesis de DNA debido a la disminución de la metioninasintasa.*

Aunque se conoce que el incremento de la dosis génica del cromosoma 21 es responsable de muchos de los síntomas del síndrome de Down, también se han realizado estudios en donde se muestra que este incremento de dosis génica no es igual en todos los tejidos, y que el incremento de dosis génica no siempre es del 50% (Greber-Platzer, 1999; Tassone, 1999; Hattori, 2000).

A pesar de ello, muchos estudios demuestran que esta sobreexpresión produce alteraciones en el metabolismo del ácido fólico, la homocisteína y la metilación en el adulto (Obermann-Borst, 2010; Pogriban, 2001).

Monosomía del cromosoma 21.

La monosomía del cromosoma 21 (M21) es la falta de una de las dos copias de dicho cromosoma. Poco es sabido de la monosomía 21. Se presume que las monosomías autosómicas finalizan en bloqueos del crecimiento embrionario durante las primeras mitosis, desde el período previo a la

implantación embrionaria a estadios de aborto bioquímico (Clouston, 2002; Rubio, 2003; Gardner y Sutherland, 2004; Hook EB1992). Su existencia es conocida gracias al DGP excepto para la Monosomía 21, cuya existencia ha sido documentada por Phelan en 2002, y Chang en 2001. Los casos descritos de monosomía 21 en la literatura han finalizado en abortos, por tanto no hay ningún caso documentado en recién nacido vivo.

1.3. DIAGNOSTICO GENETICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

La selección embrionaria también se puede realizar mediante el análisis génico o cromosómico de los embriones que nos permite el diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Este método se considera invasivo debido a la biopsia y extracción de una blastómera a la que se ve sometido el embrión para poder ser estudiado y que lo convierte en un método de uso limitado.

El DGP se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico genético que hace posible el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero y por tanto antes de que se haya producido la implantación.

El DGP se ha desarrollado gracias a los avances producidos en dos campos específicos: las técnicas de reproducción asistida, en concreto la fecundación "in vitro" (FIV) y el desarrollo de las técnicas de biología molecular

como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación "in situ" fluorescente (FISH) que permiten la detección de anomalías génicas y cromosómicas en una única célula. De este modo, en un ciclo de FIV se obtienen varios embriones, en los cuales se analiza una o dos células o blastómeros obtenidos mediante biopsia, lo que permite la transferencia de aquellos embriones caracterizados como sanos.

El DGP ha resultado de gran utilidad en parejas con elevado riesgo de transmisión de enfermedades monogénicas a la descendencia, y para descartar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, evitando la aplicación de interrupciones voluntarias del embarazo. En los últimos años, esta tecnología se ha aplicado también como una herramienta adicional para la selección de embriones en varios grupos de pacientes, consideradas de "mal pronóstico". En estos casos se ha denominado DGP para el screening de aneuploidías (DGP-AS). El DGP-AS se ha indicado principalmente en mujeres de edad avanzada (≥ 38 años) (Schoolcraft, 2008) pero también se ha aplicado en casos de fallo repetido de implantación tras FIV (≥ 3 fallos previos), en parejas con aborto recurrente de causa desconocida (> 2 abortos previos), alteraciones del cariotipo de los progenitores, factor masculino grave y enfermedades ligadas a los cromosomas sexuales.

1.3.1. Biopsia embrionaria

La biopsia embrionaria es una técnica invasiva que permite la obtención de 1 ó 2 blastómeras de un embrión en división. Se puede realizar en el tercer día de desarrollo, aunque más recientemente muchos laboratorios están incorporando la biopsia de trofoectodermo en día 5 ó 6. Las muestras extraídas son procesadas para el estudio genético y los embriones se mantienen en cultivo hasta que se obtienen los resultados, momento en el cual se realiza la transferencia.

La biopsia embrionaria se realiza bajo microscopio invertido, utilizando como método para la perforación de la zona pelúcida un método químico (ácido Tyrode's) o mecánico (mediante fricción con dos pipetas o mediante la utilización de pulsos de láser). Últimamente muchos grupos han incorporado la biopsia con láser, en la que se practica un orificio en la zona pelúcida mediante fototermólisis de su matriz proteica. El láser permite controlar la amplitud del orificio con gran precisión. A continuación se extrae el blastómero, que posteriormente es colocado en un portaobjetos o en un tubo de PCR, dependiendo de la técnica de análisis genético que se vaya a utilizar posteriormente.

1.3.2. Hibridación "in situ" fluorescente (FISH)

La técnica de hibridación "in situ" fluorescente se ha utilizado ampliamente en el campo de la citogenética molecular y se puede aplicar tanto en metafases como en núcleos interfásicos. Esta técnica utiliza sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes que se unen específicamente a secuencias definidas de ácidos nucleicos de un cromosoma y permite enumerar el número de copias de un determinado cromosoma presente en el núcleo de una célula.

La hibridación simultánea con sondas centroméricas y específicas de locus para varios cromosomas permite descartar muchas de las aneuploidías humanas más importantes (Munné, 1993). Su aplicación fundamental es en DGP-AS en casos de mujeres de edad avanzada que realizan un ciclo de FIV, en parejas con aborto de repetición de causa desconocida, en el fallo repetido de implantación y también en casos de factor masculino severo. En estos casos se realiza un FISH secuencial, en un primer momento se realiza una ronda de hibridación para unos determinados cromosomas donde se interpretan y se registran las señales, y posteriormente se procede a una nueva hibridación utilizando sondas para otros cromosomas diferentes. Se recomienda analizar como mínimo los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y, que son los más relacionados con los abortos espontáneos y con cromosopatías.

En la figura 3 se representa un proceso de FISH secuencial sobre blastómera única.

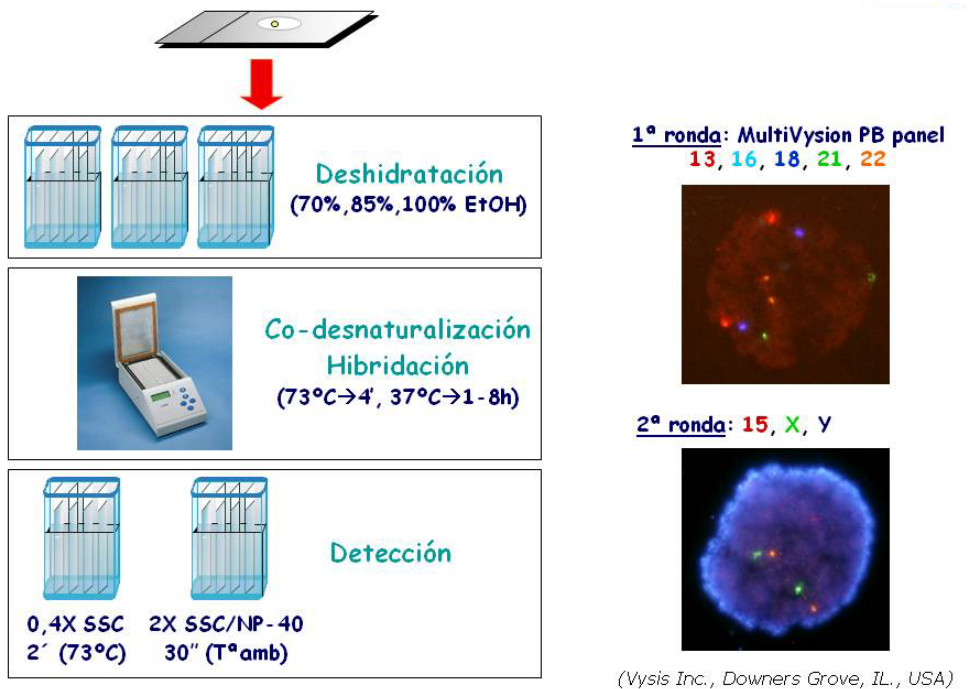


Figura 3: FISH secuencial sobre blastómera única.

El análisis de 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) permite la detección de aproximadamente el 83% de aneuploidías presentes en abortos espontáneos. La optimización de esta técnica para su aplicación al análisis de una única célula ha permitido un diagnóstico muy fiable con una elevada tasa de confirmación en día 5 de desarrollo embrionario.

1.3.3. Nuevas técnicas para el diagnóstico de aneuploidías: arrays de CGH

El FISH presenta ciertas limitaciones. Una de las más importantes es el número de cromosomas que pueden analizarse de forma simultánea.

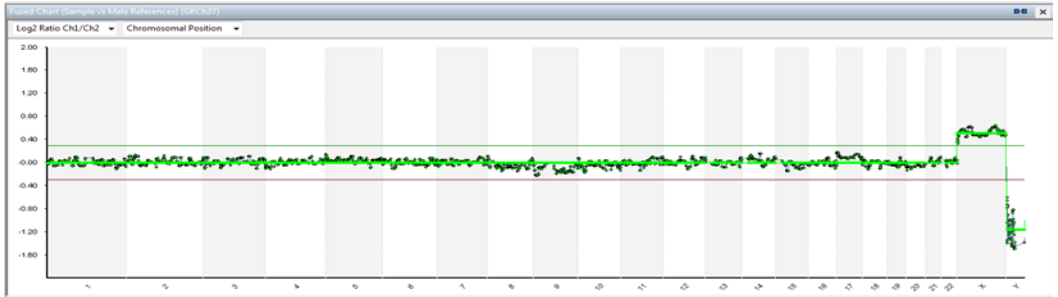
Para analizar simultáneamente los 23 pares de cromosomas humanos en DGP se ha aplicado la técnica de CGH (Hibridación Genómica Comparada). El tiempo de análisis mediante esta técnica varía entre 3 y 5 días generalmente, por lo que sería necesario crioconservar el embrión biopsiado en espera del diagnóstico. Más recientemente, los arrays de CGH ofrecen un método más sencillo y reproducible, con mayor resolución y protocolos más cortos (aproximadamente 24 horas). Se debe amplificar todo el genoma de la célula a estudiar, con el fin de obtener suficiente cantidad de ADN para realizar el análisis. Este ADN se marca con fluorescencia verde (Cy3) y se hibrida sobre el array simultáneamente con un ADN control euploide marcado en rojo (Cy5).

La plataforma del array está formada por puntos que contienen diferentes secuencias de ADN normal que en su conjunto representan todo el genoma. Según la procedencia de estos fragmentos, existen 3 tipos de plataformas de arrays de CGH: 1) arrays de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) en los cuales los puntos están compuestos por fragmentos extraídos de clones de BACs; 2) arrays de oligonucleótidos, compuestos por muchas copias de fragmentos sintéticos de ADN de menor tamaño; y 3) arrays de SNPs, cuyos

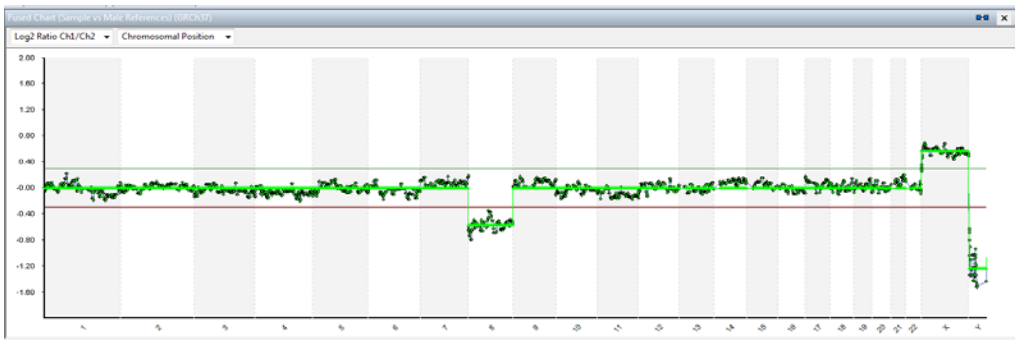
fragmentos están dirigidos a polimorfismos tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) a lo largo de todo el genoma.

Los primeros en usarse para la detección de variaciones numéricas de ADN fueron los arrayCGH de BACs y son los más utilizados en la actualidad para el screening de aneuploidías. Los últimos trabajos de arrayCGH publicados ofrecen resultados adecuados para el análisis simultáneo de todos los cromosomas a partir de una única célula con fiabilidad aceptable para diagnóstico clínico, presentando varias plataformas con una capacidad de diagnóstico de aneuploidías en torno al 95%, tanto en biopsias de corpúsculo polar, como de blastómero o de trofoectodermo. Por último es importante mencionar una de las limitaciones que nos ofrecen los arrays de CGH de BACs, y es que no permiten detectar alteraciones en la ploidía, es decir, que no se pueden detectar un tipo de anomalías que consisten en la presencia de 3 ó más copias para el total de cromosomas simultáneamente. En la figura 4 se muestran ejemplos de la aplicación de los arrays de CGH en blastómera única en el que se representa un embrión normal, y dos ejemplos de embriones con aneuploidías, con ganancia ó pérdida de algún cromosoma.

EMBRIÓN NORMAL, 46,XX



EMBRIÓN ANORMAL, 45,XX -8



EMBRIÓN ANORMAL, 47,XX +21

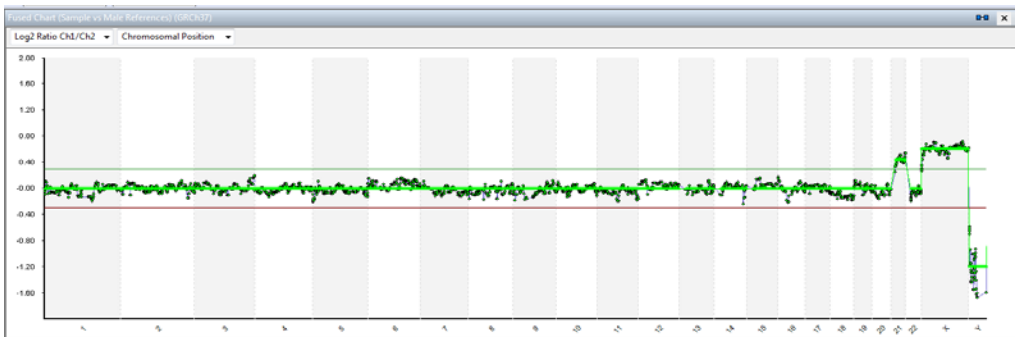


Figura 4: Ejemplos de arrays de CGH de BACs con resultado normal, con pérdida y con ganancia de algún cromosoma.

Los últimos trabajos de arrayCGH publicados ofrecen el análisis simultáneo de todos los cromosomas a partir de una única célula con fiabilidad aceptable para diagnóstico clínico, presentando varias plataformas con una capacidad de diagnóstico de aneuploidías en torno al 95%, tanto en biopsias de corpúsculo polar (Fishel, 2010), como de blastómero (Hellani, 2008; Mir, 2010b) o de trofoectodermo (Schoolcraft, 2011).

1.4. NUEVAS TECNOLOGIAS

1.4.1. Introducción a las ómicas

Las ómicas son disciplinas que estudian los eventos e interacciones de las estructuras celulares y sus procesos, desde el DNA hasta la función biológica, es decir desde los genes hasta los metabolitos. Todos los procesos que contribuyen en el fenotipo son analizados a través de este complejo sistema. La Genómica, Transcriptómica, Proteómica y Metabolómica intentan comprender los distintos eventos moleculares implicados (Figura 5).

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías ha cambiado la perspectiva del estudio de la biología molecular clásica pasando de analizar una o un pequeño grupo de moléculas a analizar de forma global todo un conjunto mediante las llamadas ciencias ómicas. Se analiza el DNA en su conjunto, es decir el genoma, la expresión de la génica global o

transcriptoma, el de las proteínas o proteoma, y el conjunto de metabolitos o metaboloma.

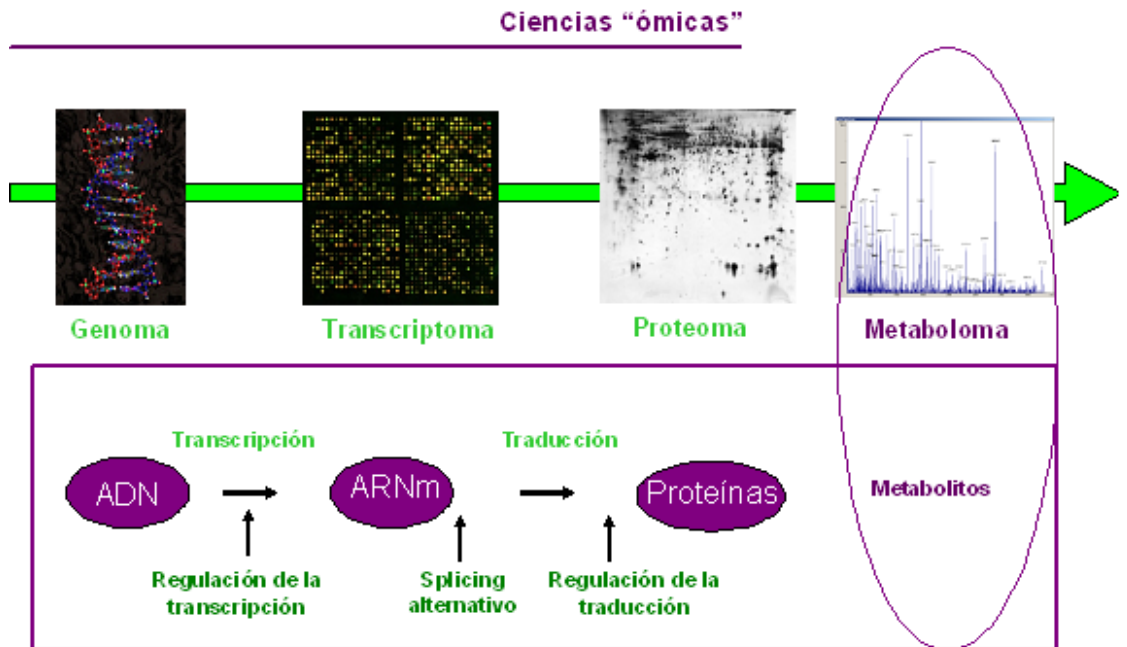


Figura 5. Ciencias ómicas. Nuevas herramientas de investigación de la biología molecular que analizan de forma global todo el conjunto de moléculas presentes en una muestra biológica desde el DNA, pasando por transcripción génica y traducción de proteínas hasta la función biológica llevada a cabo por los metabolitos.

Las últimas investigaciones mediante este tipo de técnicas están definiendo perfiles génicos, proteicos y metabolómicos embrionarios en busca de poder definir de forma objetiva el concepto de viabilidad embrionaria (Patricio, 2007; Brison, 2007; Seli, 2007; Katz-Jaffe, 2006).

Las tecnologías proteómica y metabolómica han desarrollado el análisis cualitativo/cuantitativo de proteínas y metabolitos respectivamente, en una célula, un organismo o una muestra bajo distintas condiciones, con la finalidad de obtener un perfil comprensible de todas las proteínas y metabolitos de esa célula, organismo o muestra (SilkeySchrader, 2011). Los metabolitos de bajo peso molecular representan el producto final de procesos de regulación celular, y por lo tanto revelan la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas, nutricionales y ambientales (Singh R., 2007).

1.4.2. Metabolómica

En términos generales, se entiende por metabolómica (Nicholson J.K, 1999) (Fiehn O, 2002) la obtención de una manera simultánea y global, de perfiles correspondientes a múltiples concentraciones de metabolitos y de sus fluctuaciones sistémicas y celulares en respuesta a fármacos, dieta, genética, estilo de vida, entorno y estímulos, de forma que sea posible caracterizar los efectos adversos y beneficiosos de esas interacciones.

La metabolómica persigue la descripción analítica de muestras biológicas complejas, e intenta caracterizar y cuantificar todas las moléculas pequeñas de ese tipo de muestras. Sin embargo, medir el metaboloma es un reto analítico considerable. Esto es debido a la naturaleza lábil de los metabolitos, el rango ampliamente dinámico y diverso de muchos de ellos, la

complejidad química y heterogénea de los mismos, la falta de técnicas analíticas automatizadas que puedan medir cuantitativamente un gran número de metabolitos de estructura desconocida, el rendimiento de las mediciones y la naturaleza elaborada de los protocolos de extracción (Singh R, 2007; Whitfield PD, 2004).

Aunque la metabolómica es obviamente complementaria a la genómica y proteómica, tiene ventajas especiales. La tabla 1 recoge las ventajas del estudio del metaboloma en comparación al transcriptoma y proteoma (Dunn W, 2005).

Tabla 1. Ventajas del análisis metabolómico
<ul style="list-style-type: none"> • La teoría del análisis de control metabólico (Kell D., 1999) y los trabajos experimentales han demostrado que aunque la concentración de una enzima y flujos metabólicos no cambien significativamente durante una reacción bioquímica, la concentración de metabolitos puede cambiar significativamente. • El metaboloma es el producto final de la expresión génica, por tanto refleja el nivel funcional de una célula más apropiadamente y se espera que cambios en el metaboloma sean amplificadas en comparación al proteoma o transcriptoma (Urbanczyk-Wochniak E., 2003). • La investigación está demostrando que los flujos metabólicos no sólo están regulados por la expresión génica sino que también están por el estrés ambiental y por lo tanto la medición de los productos finales (metabolitos) es más apropiada (Johnson HE., 2003).

Plataformas de análisis metabolómico

Todos estos desafíos deben ser abordados por la plataforma de análisis empleados. Las plataformas para las medidas del metaboloma deben ser imparciales, sensibles y con una gran capacidad de análisis de alto rendimiento

para discriminar un gran número de metabolitos. A pesar del gran éxito en el desarrollo de la tecnología metabolómica, aún no es posible analizar con una única plataforma analítica la diversidad de metabolitos complejos.

Las tecnologías más empleadas para el análisis metabolómico son la espectrometría de masas (EM) que generalmente incluye un paso de separación cromatográfica, y la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), dado que ambas plataformas proporcionan una amplia información estructural y conformacional sobre múltiples clases químicas en un procedimiento analítico único. Las dos técnicas poseen diferentes ventajas y desventajas desde el punto de vista técnico, y suelen ofrecer información complementaria (Lenz E.M., 2007). Ambos métodos proporcionan información sobre un amplio conjunto de metabolitos sin tener que preseleccionar qué analitos deben ser detectados. Esto nos permite diseñar experimentos basados en el razonamiento inductivo para generar nuevas hipótesis siendo una potencial vía de descubrimiento de conocimiento a través de holismo. Además, los dos métodos pueden emplearse para identificar las estructuras de los metabolitos, y para medir las concentraciones relativas y absolutas.

Entre las principales ventajas de la cromatografía de masas podemos encontrar su alta sensibilidad, y su mínimo requerimiento de muestra del orden de pocos microlitros. Por el contrario la EM es una técnica destructiva, por lo tanto no podemos recuperar la muestra analizada. Además, no todas las bases

de datos están completas y dependiendo del instrumento y protocolo utilizado los resultados pueden variar significativamente, restando reproducibilidad a la técnica.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica muy robusta y no destructiva, con lo que podemos recuperar la muestra posteriormente al análisis. Los datos provenientes de RMN son universales, es decir cualquier instrumento debería poder dar los mismos resultados si se analiza la misma muestra por tanto es una técnica mas reproducible que la EM, si bien la RMN es una técnica con menos sensibilidad que la espectrometría de masas y es necesaria más muestra de partida y mayores niveles de metabolitos para su detección.

Tanto la espectrometría de masas (EM) como la resonancia magnética nuclear (RMN) se emplean de forma rutinaria en los estudios metabolómicos.

La Figura 6 indica las distintas tecnologías para el análisis metabolómico de muestras, así como las características más relevantes de las mismas. El tipo de muestras que se analiza mediante estas técnicas son biofluidos como orina, plasma o suero previa precipitación de proteínas; metabolitos intracelulares de plantas, microbios y animales previa extracción mediante solventes polares y no polares; tejidos sin previa o mínima preparación y huellas metabólicas en

secreciones naturales de metabolitos intracelulares hacia el volumen extracelular.

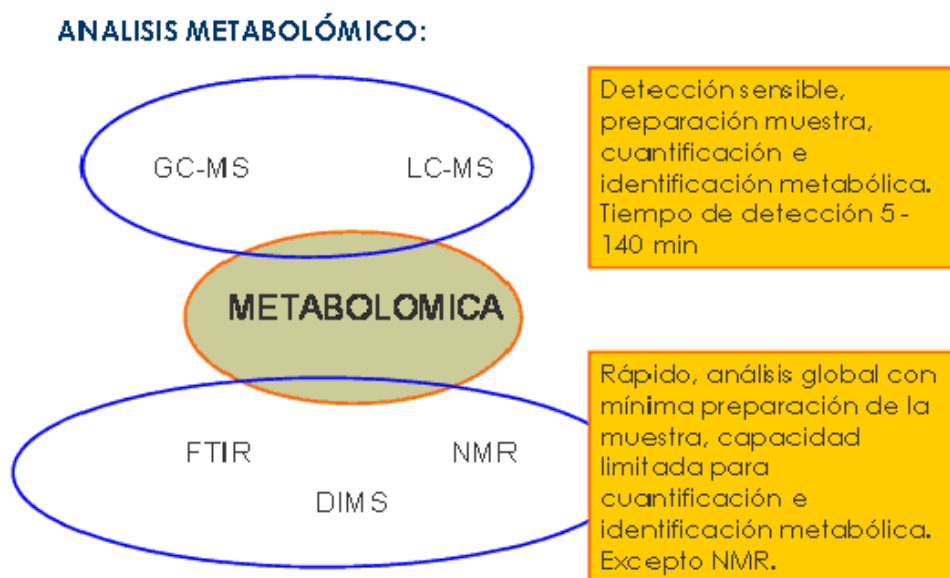


Figura 6. Plataformas de análisis metabolómico de muestras. Se distinguen dos grandes grupos según las características más relevantes de dichas plataformas. GC-MS: espectrometría de masas mediante cromatografía de gases; LC-MS: espectrometría de masas mediante cromatografía líquida; FTIR: espectrometría infrarroja transformada de Fourier; DIMS: Inyección directa en espectrometría de masas; NMR: resonancia magnética nuclear.

Cromatografía líquida (CL) y espectrometría de masas (EM o MS)

La EM es una herramienta de análisis metabolómico muy poderosa ya que provee sensibilidad, rapidez, calidad y análisis potencialmente cuantitativo de una gran cantidad de metabolitos. Puede ser usada sola o en combinación

con otras técnicas de cromatografía que nos ayudarán a la separación de metabolitos para facilitar así la identificación de los mismos mediante EM.

La cromatografía líquida es una técnica de separación que nos permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. Por otro lado, la espectrometría de masas es una técnica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

La plataforma metabolómica utilizada está compuesta de un sistema de cromatografía líquida ultra pura de alta presión acoplada a un espectrómetro de masas TOF. El sistema de cromatografía líquida de alta presión está diseñado para operar con pequeñas partículas para conseguir patrones de alta resolución. Por tanto este sistema es óptimo para muestras de alta complejidad debido a su alto poder separador de metabolitos y de resolución de picos de masas, como son los medios condicionados de embriones preimplantatorios.

El sistema lleva acoplado un espectrómetro de masas TOF, ideal para fragmentar muestras complejas, lo cual permite medidas exactas de masas de forma automática con una resolución de mas de 10.000 FWHM, una velocidad de 20 espectros/segundo y una precisión de menos de 3 ppm RMS.

Los análisis de EM requieren una preparación exhaustiva de la muestra y una extracción de la misma utilizando solventes orgánicos que pueden provocar la pérdida de algunos compuestos.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN es una técnica no destructiva que no modifica el equilibrio biológico, y proporciona una información detallada sobre las estructuras moleculares en solución. Además, la espectroscopia de RMN es una técnica muy fiable para las aplicaciones metabolómicas que requieren un alto grado de reproducibilidad. Entre las principales ventajas que presenta la RMN frente a otras tecnologías utilizadas en este tipo de estudios destacan las siguientes:

No invasiva. El análisis por RMN permite el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en el análisis de biofluidos (plasma, suero, orina, saliva, líquido amniótico, etc.) y/o tejidos biológicos. Ello supone una ventaja considerable sobre otros procedimientos diagnósticos actuales.

Reproducible. Es una técnica no destructiva, permite la reutilización de la muestra para otros análisis. La preparación de la muestra es muy simple, por lo que es una técnica fácilmente reproducible.

Rápida. Los experimentos pueden realizarse en una escala de tiempo de minutos y cada uno de ellos contiene una gran cantidad de información. En una sola medida se pueden analizar todos los metabolitos presentes en la muestra.

Versátil. La misma instrumentación/tecnología puede adecuarse a problemas muy diferentes.

Fiable. El diagnóstico de las patologías se basa en la identificación de un conjunto de metabolitos correlacionados, lo cual refuerza la fiabilidad del método en sus aplicaciones clínicas.

Ambas técnicas permiten la detección simultánea de un amplio rango de metabolitos estructuralmente diversos y la detección en bajas concentraciones de los mismos.

Es importante tener en cuenta que sea cual sea el origen de las muestras, deben evitarse fuentes potenciales de artefactos durante el proceso de recogida de las muestras biológicas con el fin de obtener resultados que posean una buena calidad y fiabilidad.

Análisis estadístico multivariable

Los métodos de análisis estadístico multivariable proporcionan un medio de optimizar la extracción de la información contenida en los espectros de EM y RMN de mezclas complejas. Una vez realizados todos los pasos anteriores, lo que se tiene es una serie (uno por muestra) de perfiles multivariados que representan un punto en un espacio K-dimensional, y cuya posición (coordenadas) depende de los valores de cada uno de los descriptores (o metabolitos) que describen el sistema (la muestra). Cuando se trata de analizar una serie de perfiles, resulta muy útil la aplicación de lo que se denominan métodos basados en la proyección. Los métodos de proyección convierten tablas de datos multidimensionales en modelos de dimensionalidad. Esto permite detectar además agrupaciones y tendencias, ya que puntos que se encuentran cercanos corresponden a perfiles multivariados relativamente similares. De forma opuesta, puntos que se encuentran alejados unos de otros presentan descriptores muy diferentes.

Un ejemplo de lo explicado podemos verlo en la Figura 7 donde puede apreciarse, la utilidad de esta herramienta para comprender los patrones que subyacen bajo la gran cantidad de información generada en los estudios metabolómicos. Quedan patentes las relaciones entre las distintas muestras pudiendo describir agrupamientos, tendencias e influencias.

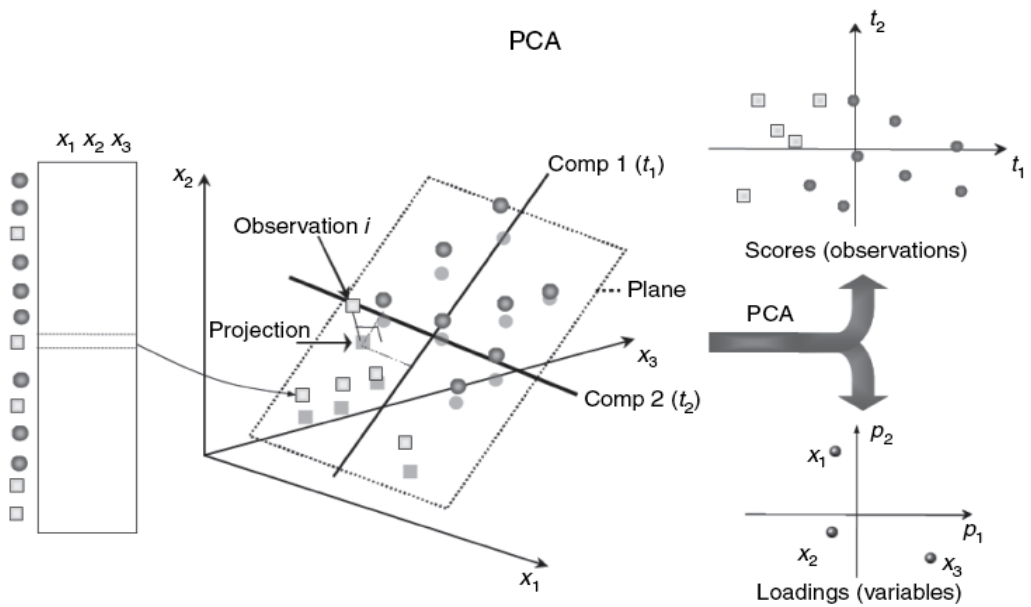


Figura 7. Sistema de análisis PCA (Principal Component Analysis). Ayuda a entender las relaciones entre las distintas muestras pudiendo describir distintos grupos si existen diferencias entre ellos.

Aunque los métodos de proyección descritos forman la base de los estudios metabolómicos, los análisis estadísticos dependen del tipo de estudio que se esté desarrollando. Existen una gran variedad de métodos que pueden emplearse en el análisis de datos metabolómicos. La principal diferencia entre todos ellos es si se dispone o no de información previa sobre la clasificación de muestras en clases distintas, o si se sospecha la existencia de nuevas clases. Sin duda alguna, los métodos más empleados de análisis multivariable son los denominados PCA (Principal Component Analysis en inglés ó análisis de componentes principales, Holmes E., 1998) y PLS (Partial Least Squares ó mínimos cuadrados parciales, Wold S., 1984). El PCA es un método no supervisado que

se emplea para revelar la estructura interna de un conjunto de datos sin que medie ningún tipo de conocimiento previo del sistema. PLS, sin embargo, es un método supervisado para regresión. En este caso, el objetivo es predecir las respuestas en un conjunto de datos. Empleando una barrera de corte, PLS puede emplearse también para análisis basados en la clasificación y discriminación (PLS-DA, "Partial Least Squares-Discriminant Analysis").

Objetivos de la metabolómica

Todos los estudios metabolómicos dan lugar a un conjunto de resultados complejo que requiere un software específico para su visualización y métodos quimiométricos y bioinformáticos para su interpretación. El objetivo de estos experimentos es generalmente el de obtener huellas bioquímicas que puedan ser útiles desde un punto de vista diagnóstico o de clasificación, y en un segundo lugar, identificar las sustancias que contribuyen a dicho diagnóstico o clasificación, ya que éstas conforman un conjunto complejo de biomarcadores que puede ayudar a definir el contexto biológico o clínico y explicar los mecanismos bioquímicos relacionados con los cambios observados, y así ampliar el conocimiento existente.

Identificación de metabolitos

Dependiendo del tipo de análisis que se esté desarrollando, los estudios metabolómicos pueden requerir la identificación de los metabolitos presentes en las muestras biológicas analizadas. Este objetivo puede alcanzarse mediante la comparación entre los desplazamientos químicos obtenidos en los espectros de EM o RMN y aquellos disponibles en bases de datos como la MMCD ("Madison Metabolomics Consortium Database", Cui Q. y cols., 2008) o la HMDB ("Human Metabolome DataBase", Wishart D.S. y cols., 2007). Alternativamente, existen programas (p.ej., "Analysis of MIXtures", AMIX, BrukerBioSpin) que permiten realizar todas las etapas descritas anteriormente (selección de regiones de interés, segmentación del espectro, normalización, análisis estadístico) y que contienen módulos (B-BioRef-Code, BrukerBioSpin) que permiten la identificación y asignación de metabolitos presentes en mezclas complejas. Hay que tener en cuenta que las bibliotecas metabolómicas no son completas y que no todos los metabolitos hallados tienen posibilidad de identificación.

1.4.3. Cambio en las estrategias de generación de hipótesis

Las ómicas están transformando el método de investigación. En el ciclo del conocimiento tradicional, el conocimiento previo se utilizaba para construir una hipótesis para ser testada experimentalmente. El experimento producía

datos que daban consistencia o no a la hipótesis inicial. Es decir, la hipótesis era el punto de partida. El acercamiento, por tanto, era hipotético-deductivo.

Sin embargo, con las ómicas tenemos una situación de acercamiento inductivo donde no hay una hipótesis real y la estrategia es generar esta hipótesis desde los datos obtenidos, provocando un descubrimiento del conocimiento y pudiendo a posteriori testar estas nuevas hipótesis de la forma tradicional. El diseño experimental es muy importante en el acercamiento inductivo porque determinará qué experimentos nos van a dar la información que estamos buscando. La estrategia en la que un algoritmo elige qué experimentos hacer es conocida como "aprendizaje activo" y es la estrategia de elección. Para ello debemos contar con sistemas informáticos de alta complejidad (Goodacre R., 2004; Waidyanathan S., 2003).

1.4.4. Desarrollo de análisis no invasivo mediante ómicas

Pensamos que seleccionar el mejor embrión a transferir, no sólo significa escoger el embrión que nos va a dar más posibilidades de embarazo, sino que también es crucial escoger aquel embrión que nos va a aumentar la tasa de recién nacido vivo en casa, por lo que el hecho de poder desarrollar un nuevo método **no invasivo** para determinar embriones sanos y anómalos, complementario a los parámetros morfológicos y contrastado con el análisis cromosómico debería aumentar las probabilidades a la hora de escoger el

embrión con mayor poder implantatorio. Y a su vez, al ser un método no invasivo, generalizaría su uso en todas las parejas de FIV, para mejorar nuestros resultados actuales.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Desarrollar un método no invasivo para detección de aneuploidias en embriones procedentes de FIV mediante el análisis metabolómico de los medios de cultivo (MC) antes de la transferencia embrionaria.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Analizar de forma global el metaboloma del embrión en día 3 y en día 5 de desarrollo.
- Identificación de biomarcadores asociados a normalidad/anormalidad cromosómica.
- Búsqueda de biomarcadores metabolómicos correspondientes a embriones con alteraciones del cromosoma 21 mediante UPLC-MS.
- Búsqueda de biomarcadores metabolómicos correspondientes a embriones con alteraciones del cromosoma 21 mediante RMN.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio son los medios condicionados (MC) donde se han desarrollado los embriones de pacientes con indicación de DGP mediante FISH de 9 sondas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) para el Screening de Aneuploidías.

Criterios de inclusión de la población de estudio:

- DGP por edad materna.
- DGP por factor masculino.
- DGP por abortos de repetición.
- DGP por fallo de implantación.

Criterios de exclusión de la población de estudio:

- DGP por presencia de translocaciones en los progenitores.

3.1.1. Procedimiento de obtención y recogida de las muestras

Biopsia embrionaria y medios de cultivo

Tras la recuperación ovocitaria, se procede al proceso de fecundación mediante ICSI. La fertilización de los embriones se comprobó tras 17-20 horas post inseminación o microinyección y el número de células se comprobó cada 24 horas. La biopsia embrionaria se realizó en el día 3 de desarrollo embrionario. Los embriones se depositaron en microgotas de medio de cultivo libres de Ca^{2+} y Mg^{2+} (PGD Biopsy Medium, LifeGlobal®) y se perforó la zona pelúcida usando un láser OCTAX (Hebron, Alemania). Sólo los embriones con igual o más de 6 blastómeras nucleadas y menos o igual al 20% de fragmentación fueron biopsiados, aspirando una blastómera de cada uno de los embriones. Las blastómeras se fijaron en portas de cristal bajo un microscopio invertido, usando el protocolo modificado de Tarkowski (Tarkowski, 1966). Tras la biopsia, los embriones se colocaron en nuevas placas de cultivo hasta día 5 de desarrollo o hasta su posterior transferencia.

Protocolo de FISH para DGP

Se analizaron los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y por FISH en dos rondas consecutivas. En la primera ronda de hibridación se utilizaron sondas para los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22, analizando dichas sondas mediante el

sistema MultiVysion PB panel probe (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA). La co-denaturalización del DNA nuclear y de las sondas se realizó en una termoplaca durante 4 minutos a 73°C, seguida por 3 horas a 42°C. Los núcleos con señales dudosas (overlapping, o señales divididas) o en ausencia de señal para cualquiera de las sondas cromosómicas empleadas, fueron reanalizados usando sondas subteloméricas como ya se describió anteriormente (Mir, 2010). El embrión se definió como normal cuando la blastómera biopsiada mostró dos señales claras y bien separadas para cada uno de los autosomas analizados, y una o dos señales para los cromosomas sexuales X e Y. Un embrión se consideró anormal cuando la blastómera biopsiada mostró un número diferente de señales. Los portos se analizaron usando un microscopio de epifluorescencia Olympus AX-70 (Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) equipado con un filtro tribanda para DAPI/Texas Red/FITC y filtros individuales para FITC, Texas Red, Gold, Aqua-Blue and Blue.

Recogida de muestras

Tras la biopsia embrionaria, las placas de cultivo donde los embriones se han estado desarrollando desde el día 1 al día 3 se mantienen en el incubador hasta la recogida de las muestras. Se recogen en tubos Eppendorf (Eppendorf®, Oldenburg, Germany) previamente identificados, 50µl del medio de cultivo de cada uno de los embriones que han sido biopsiados. Se centrifugan 2 minutos a 10.000 rpm y el sobrenadante se pasa a otro tubo

rotulado de la misma manera para no perder la identificación. Las muestras son congeladas a -20°C / -80°C . Se recogen los medios de cultivo control siguiendo el mismo procedimiento.

Tras la transferencia embrionaria, se mantienen en el incubadoras placas de cultivo dónde los embriones se han estado desarrollando desde el día 3 al día 5, hasta la recogida de las muestras que se realiza en tubos Eppendorf (Eppendorf®, Oldenburg, Germany) previamente identificados. Se recogen $50\mu\text{l}$ del medio de cultivo de cada uno de los embriones que han sido biopsiados. Se centrifugan 2 minutos a 10.000 rpm y el sobrenadante se pasa a otro tubo rotulado de la misma manera para no perder la identificación. Las muestras son congeladas a -20°C / -80°C . Se recogen los medios de cultivo de control siguiendo el mismo procedimiento (Figura 8).

Los medios de cultivo de control son gotas de medio de cultivo que están en las mismas condiciones que las muestras recogidas y sujetas a los mismos cambios ambientales pero que no han contenido en ningún momento embrión.

Una vez realizado este procedimiento se apuntan los datos en el listado de pacientes de estudio.

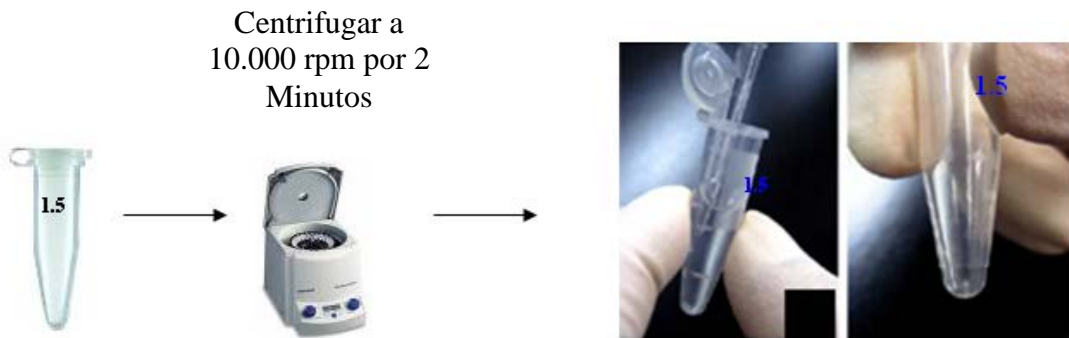


Figura 8: *Procesado de los medios de cultivo previo a su congelación.*

3.2. ANÁLISIS DE LOS DATOS

3.2.1. Base de datos clínicos

Para el análisis de los datos se ha construido una base de datos que contiene los siguientes parámetros.

1. Número de historia clínica
2. Número de paciente
3. Edad de la paciente (o donante si es el caso).
4. Indicación de DGP
5. Nombre dado al embrión: este nombre sale de la combinación del número de la paciente-número de embrión dado en la serie.
6. número de cromosomas 13
7. número de cromosomas 15

8. número de cromosomas 16
9. número de cromosomas 17
10. número de cromosomas 18
11. número de cromosomas 21
12. número de cromosomas 22
13. número de cromosomas X
14. número de cromosomas Y
15. Normalidad / Anormalidad

La base de datos nos permite identificar los embriones normales y embriones con alteración cromosómica pura, o combinada, y poder de esta forma hacer diseños de estudio con el objetivo que nos hemos planteado.

3.2.2. Plataformas metabolómicas para el análisis de los datos

Las plataformas metabolómicas utilizadas para la obtención de los resultados han sido la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN).

3.2.2.1. Espectrometría de masas

La plataforma metabolómica está compuesta de un sistema de cromatografía líquida ultrapura de alta presión (Waters ACQUITY™ UPLC system)

acoplada a un espectrómetro de masas TOF (Waters LCT Premier™ Time of Flight Mass Spectrometer). El sistema de cromatografía líquida de alta presión está diseñado para operar con pequeñas partículas (1.7mm) para conseguir patrones de alta resolución. Por tanto este sistema es óptimo para muestras de alta complejidad debido a su alto poder separador de metabolitos y de resolución de picos de masas, como son los medios condicionados de embriones preimplantatorios.

El sistema lleva acoplado un espectrómetro de masas TOF, ideal para fragmentar muestras complejas, lo cual permite medidas exactas de masas de forma automática con una resolución de mas de 10.000 FWHM, una velocidad de 20 espectros/segundo y una precisión de menos de 3 ppm RMS.

Preparación de muestras para análisis metabolómico mediante EM

El primer paso es la precipitación proteica de los analitos de las muestras. La precipitación de los analitos se llevó a cabo añadiendo a cada muestra (40 µl del medio de cultivo del embrión) tres volúmenes de acetonitrilo, de manera que cada volumen se añadió con un intervalo de 90 minutos. Tras 18 horas en agitación a 4° C, se centrifugó la muestra a 13000 r.p.m. y 4 °C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante en viales de HPLC, inyectándose en el sistema CL-MS.

Sistema CL-MS

El sistema CL-MS se compone de un espectrómetro de masas - Waters LCT Premier (día 3), Waters Q-TOF Premier (día 5) – acoplado a un sistema UPLC Waters *Acquity*. Las condiciones cromatográficas usadas están descritas en la Tabla 2. El espectrómetro de masas, equipado con una fuente de electrospray (ESI), fue calibrado usando clústeres iónicos de formiato sódico empleando una corrección polinómica de quinto orden. Se utilizó el producto Leucina encefalina como referencia para corregir el desplazamiento de masa del instrumento, pudiéndose mantener 5 ppm de precisión de masa durante todos los experimentos. Se utilizó una disolución de control al principio, en el medio y al final de la secuencia de muestras analizadas con el fin de comprobar la estabilidad en los tiempos de retención, la exactitud de las masas y la sensibilidad del sistema CL-MS a lo largo del experimento.

<u>Variable</u>	<u>Día 3</u>	<u>Día 5</u>
Flujo	0.14 mL/min.	0.60 mL/min.
Porcentaje de Split	No split.	Split 3:1
Disolvente A	H ₂ O + 0.05% Ácido Fórmico.	H ₂ O + 0.1% Ácido Fórmico.
Disolvente B	ACN + 0.05% Ácido Fórmico.	ACN + 0.1% Ácido Fórmico.
Columna	UPLC BEH C18, 1.0 x 100 mm, 1.7 μ m.	UPLC BEH C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m.
Temperatura	30 °C	50 °C

columna		
Volumen inyectado	3 μ l	5 μ l
(%B), t	0%, 0 min	1%, 0 min
(%B), t	100%, 10 min	1%, 1min
(%B), t	100%, 16 min	100%, 10 min
(%B), t	-	100%, 17 min

Tabla 2: Condiciones cromatográficas utilizadas mediante el sistema CL-MS.

Análisis de los resultados obtenidos mediante EM

Los datos obtenidos por estos instrumentos se analizan con herramientas de análisis estadístico como el Análisis de componentes principales o PCA, que permite que los complejos datos obtenidos sean analizados globalmente de manera gráfica y sencilla. El PCA da resultados en scores (eje de coordenadas) y plots (manchas). La puntuación de la mancha en el eje de coordenadas (score-plot) describe las relaciones de la muestra entre sí, visualizándose las similitudes y diferencias entre muestras. Además, los datos han sido analizados utilizando el PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) del software SIMCA. Este método de supervisión es complementario al PCA para confirmar marcadores potenciales e identificar nuevos. Todas las muestras se han inyectado por duplicado con el fin de comprobar la reproducibilidad del método de análisis. Todas las inyecciones, incluidas las réplicas, se han realizado de forma aleatoria. Se ha utilizado el programa Markerlynx (Waters Mass Lynx

versión 4.1) para procesar los datos adquiridos, obteniéndose un listado de la relación masa / carga (m/z), tiempos de retención (R_t) e intensidades para todos los picos cromatográficos importantes encontrados. Como primer paso para buscar estructura en los datos, se ha utilizado el PCA (Jolliffe I., 2002) (Análisis de los Componentes Principales, *Principal Components Analysis*) que no tiene en cuenta la pertenencia de las muestras a ningún grupo. Al PCA le ha seguido el Análisis Discriminante de la Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA (Trygg J, 2002), *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) que apunta direcciones en el espacio multidimensional en las que la separación de las muestras es máxima, en función del grupo al que pertenecen.

Con este software, por tanto, obtenemos 2 tipos de resultados:

1.- Score plot: eje de coordenadas donde se sitúan las muestras en base a la cantidad de metabolitos que la conforman.

2.- Marcadores potenciales sobre o sub expresados en las distintas muestras.

Con este sistema podemos discriminar entre distintos tipos de muestras, en nuestro caso normales frente a anormales, a través de su metaboloma.

3.2.2.2. Resonancia magnética nuclear

Una de las plataformas tecnológicas más empleadas para la búsqueda de biomarcadores en el campo de la metabolómica es la Resonancia magnética nuclear (RMN).

Preparación de muestras para análisis metabolómico mediante RMN

Las muestras de MC se descongelaron a temperatura ambiente. Se añadió, a cada muestra de 45 μL , 4.5 μL de D_2O . Tras la centrifugación, 49 μL de la mezcla fueron transferidos a un tubo capilar de 1.7 mm para el análisis por RMN.

Adquisición de los espectros

Las muestras se midieron en un espectrómetro BrukerUltrashield Plus 600 MHz equipado con una criosonda TCI de 5 mm. Para todas las muestras se obtuvieron dos espectros de ^1H -RMN principales: I) un 1D-NOESY que da lugar a un espectro sin editar con una supresión de agua óptima (Nicholson, 1995), y II) un experimento 1D-CPMG (secuencia de pulso espin-eco, Carr-Purcell-Meiboom-Gill, 1958) que genera espectros editados por tiempos de relajación T_2 , y que posee una serie de características bien definidas. Entre ellas cabe destacar la reducción en las señales correspondientes a especies de alto peso

molecular, lo que resulta en la simplificación de los espectros debido al ensanchamiento de macromoléculas (proteínas, etc.), y una mejora en la resolución de las resonancias correspondientes a metabolitos de bajo peso molecular.

Los espectros se obtuvieron a una temperatura constante de 298 K. Se adquirieron 256 acumulaciones para cada muestra con 64K puntos para una ventana espectral de 20 ppm. Se empleó un intervalo de relajación de 3 s entre las distintas acumulaciones durante el cual se llevó a cabo una presaturación de la señal del agua con una atenuación de 35 Hz. Adicionalmente, se adquirieron espectros 2D ^1H - ^1H Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) para muestras seleccionadas.

Análisis de los resultados obtenidos por RMN

Para el procesamiento de los espectros se utilizó un factor de apodización exponencial de 1 Hz. La corrección de la fase y línea base se realizó con el software TopSpin (v 2.1, BrukerBiospin, Rheinstetten, Alemania).

Los espectros se calibraron internamente a la señal del grupo metilo del lactato, con un desplazamiento químico de 1.32 ppm. Las asignaciones correspondientes a cada metabolito se efectuaron por comparación de picos equivalentes a los metabolitos asignados en la literatura y en las bases de datos

disponibles. De esta forma se asignaron las señales de los componentes del medio de cultivo utilizado: glucosa, triptófano, isoleucina, leucina, metionina, tirosina, etc.

El análisis y la cuantificación de los datos se efectuó utilizando el software MestReNova (Mestrelab Research). La estadística aplicada para la comparación de picos fue un test t para medias independientes.

4. RESULTADOS.

Los diseños y resultados de los distintos estudios realizados se exponen por orden cronológico debido a que el diseño de los mismos queda sujeto a los resultados obtenidos en el estudio que le precede excepto para el primero. De esta forma intentamos exponer, la línea argumental que ha dirigido nuestra investigación.

4.1. PRIMER ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.

El objetivo del primer diseño era ser capaces de discriminar diferencias metabólicas entre embriones normales y embriones con mínimas alteraciones cromosómicas mediante el análisis del metaboloma global del medio de cultivo por UPLC-MS.

En este primer estudio se utilizaron 37 MC de embriones de día 3, procedentes de 21 embriones normales y 16 embriones con alteración cromosómica de un solo cromosoma: monosomías 16, 21 y 22, así como 12 MC control, procedentes de un único laboratorio de FIV, distribuidos como se muestra a continuación:

- 21 MC de embriones normales
- 6 MC de embriones con monosomía 16

- 5 MC de embriones con monosomía 21
- 5 MC de embriones con monosomía 22

Estudio de los mismos 37 MC de embriones de día 5 de evolución embrionaria con su respectivo control.

Para cada MC de embrión anormal seleccionado, se han escogido MC de embrión normal y su correspondiente control de la misma cohorte embrionaria con la finalidad de homogeneizar al máximo las muestras seleccionadas.

El análisis mediante PCA de los medios de cultivo de embriones en día 3 nos da el siguiente score Plot (Figura 9). Los iconos representan cada uno de los MC estudiados: círculos verde claro representan MC de embriones cromosómicamente normales, cuadrados rosas representan MC de embriones con monosomía del cromosoma 16, triángulos rojos representan MC de embriones con monosomía del cromosoma 21 y círculos azul claro representan MC de embriones con monosomía del cromosoma 22. Los círculos verde oscuro corresponden a los MC control.

Anomalias Cromosomicas (+ESI) All Samples – Day 3

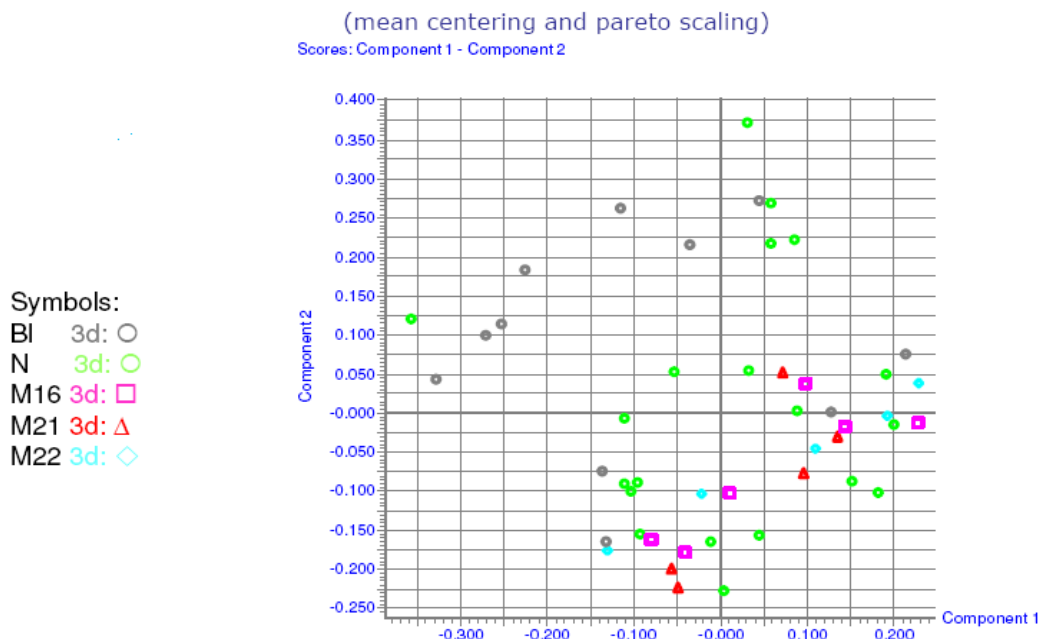


Figura 9: Score Plot de Análisis de Componentes Principales de Medios de Cultivo de día 3. Mediante este eje de coordenadas podemos apreciar la distribución de las distintas muestras, y por tanto la relación que existe entre ellas.

Se observa una tendencia de distribución similar entre la mayoría de las muestras normales y los controles, localizándose en la zona superior del eje de coordenadas, en comparación con las muestras anormales y algunas de las normales que las encontramos en la zona inferior del eje de coordenadas.

El análisis mediante PCA de los Medios de Cultivo de embriones en día 5 nos da el siguiente score Plot (Figura 10). Los iconos representan cada uno de los MC estudiados: círculos verde claro representan MC de embriones cromosómicamente normales, cuadrados lilas representan MC de embriones con monosomía del cromosoma 16, triángulos marrones representan MC de embriones con monosomía del cromosoma 21 y rombos azul oscuro representan MC de embriones con monosomía del cromosoma 22. Los círculos verde oscuro corresponden a los MC control.

Anomalías Cromosómicas (+ESI) All Samples – Day 5

(mean centering and pareto scaling)

Scores: Component 1 - Component 2

Symbols:
 BI 5d: ○
 N 5d: ○
 M16 5d: □
 M21 5d: △
 M22 5d: ◇

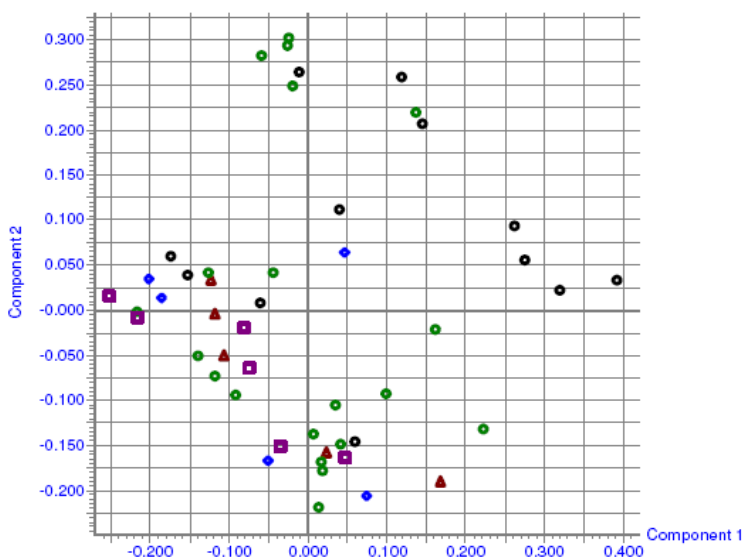


Figura 10: *Score Plot de Análisis de Componentes Principales de Medios de Cultivo de día 5..*
Mediante este eje de coordenadas podemos apreciar la distribución de las distintas muestras, y por tanto la relación que existe entre ellas.

Se observa una tendencia de distribución similar entre la mayoría de las muestras normales y los controles, localizándose en la zona superior del eje de coordenadas, en comparación con las muestras anormales y algunas de las normales que las encontramos en la zona inferior del eje de coordenadas.

4.2. SEGUNDO ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.

Tras los resultados obtenidos en el primer estudio dónde parece existir discriminación metabolómica entre embriones con alteraciones cromosómicas únicas y embriones normales, intentamos diferenciar patrones metabolómicos de embriones con múltiples anomalías cromosómicas frente a embriones normales, comparando patrones cromosómicos de anormalidad parecidos, mediante UPLC-MS.

Estudiamos 97 medios de cultivo (MC) de día 3 de evolución embrionaria procedentes de 18 embriones normales y 79 embriones con alteraciones cromosómicas distribuidos en los 4 siguientes grupos:

- 19 MC de embriones con una única monosomía (monosomía 13, 15, 16, 21 o 22).
- 19 MC de embriones con una única trisomía (trisomía 13, 21 o 22).
- 19 MC de embriones afectados de 2 alteraciones cromosómicas (afectos de dos monosomías, o afectos de 1 monosomía y una trisomía).
- 22 MC de embriones afectados de más de 3 alteraciones cromosómicas (afectos de más de tres monosomías, o afectos de más de tres polisomías).

Estudio de los mismos MC en día 5 de evolución embrionaria. Todos los MC estudiados proceden de un único laboratorio de FIV.

El análisis mediante PLS-DA de los medios de cultivo de embriones en día 3 nos da el score Plot que se muestra en la Figura 11. Los iconos rojos representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos negros representan MC de embriones con alteraciones cromosómicas.

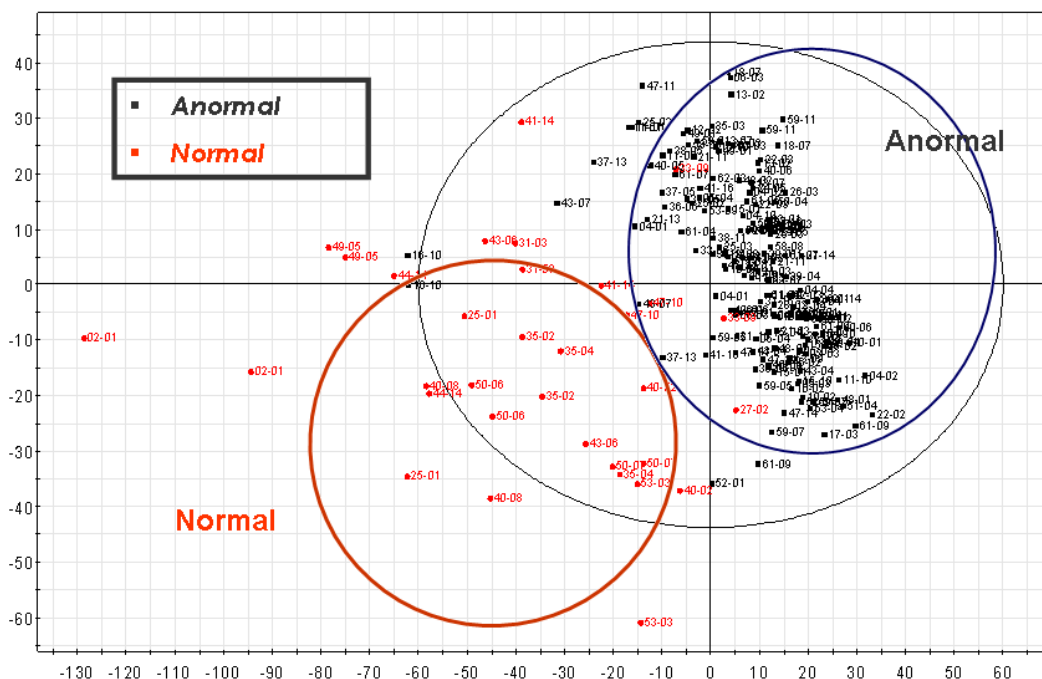


Figura 11: Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de día 3. Mediante esta representación gráfica podemos apreciar la distribución de las distintas muestras en un eje de coordenadas, y por tanto ver la relación que existe entre dichas muestras.

Podemos observar que la distribución de las muestras en el eje de coordenadas es similar a los resultados obtenidos en el primer estudio. Vemos agrupación de muestras normales frente a las anormales en dos grupos bien diferenciados.

El análisis mediante PLS-DA de los medios de cultivo de embriones en día 5 nos da el siguiente score Plot (Figura 12). Los iconos negros representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos rojos representan MC de embriones con alteraciones cromosómicas.

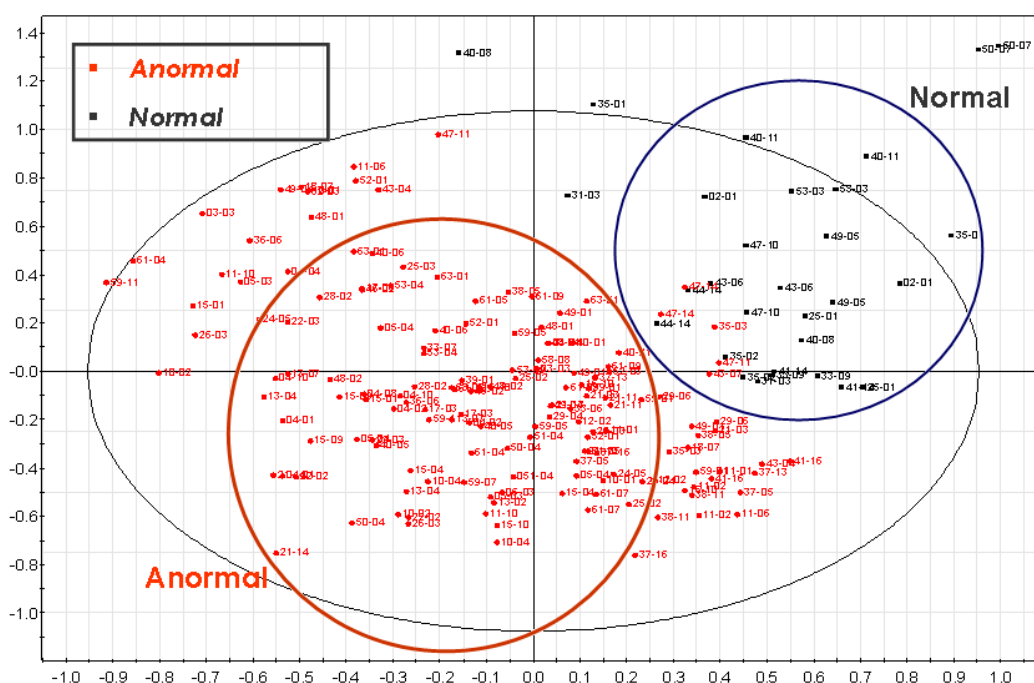


Figura 12: *Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de día 5. Mediante esta representación gráfica podemos apreciar la distribución de las distintas muestras en un eje de coordenadas, y por tanto ver la relación que existe entre dichas muestras.*

La distribución de las muestras en día 5 sigue mostrando patrones de agrupación similares a los observados en día 3, aunque observamos en el grupo de los medios de cultivo de embriones normales muestras que corresponden a embriones anormales. Este resultado focaliza nuestra atención en los medios de cultivo de día 3 dónde la diferenciación de normalidad se da sin interferencias, objetivo primordial en el uso clínico de cualquier diagnóstico.

Seguidamente mostramos con más detalle el análisis mediante PLS-DA de los medios de cultivo de embriones en día 3 entre las muestras normales y los distintos grupos de anormalidad anteriormente explicados representados en los sucesivos scores Plot.

El análisis de medios de cultivo de embriones normales frente a medios de cultivo de embriones con una única monosomía está representado en el score Plot de la Figura número 13. Los iconos negros representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos rojos representan MC de embriones con una única monosomía.

Las monosomías que conforman este grupo son monosomía del cromosoma 13, del cromosoma 15, del cromosoma 16, del cromosoma 21 y del cromosoma 22.

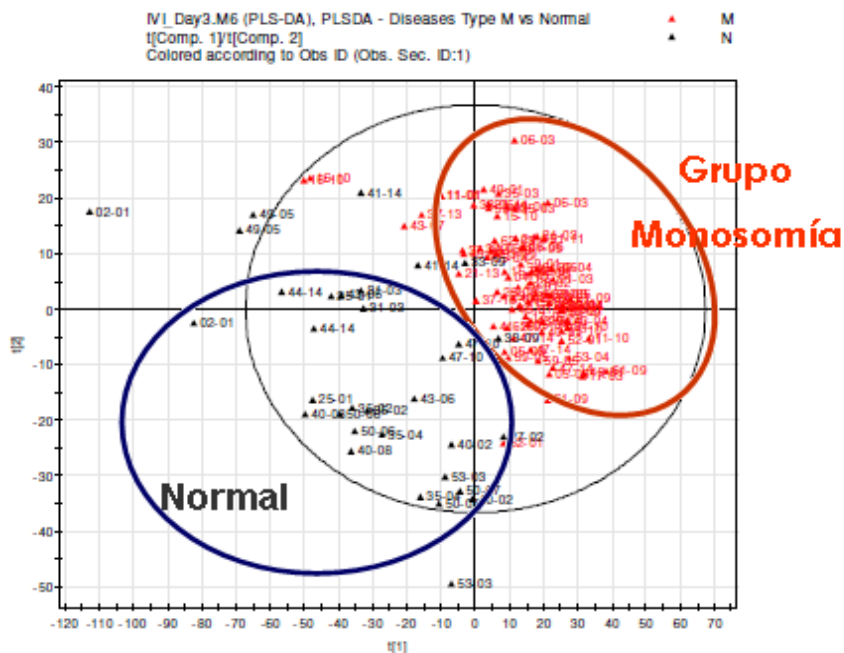


Figura 13: Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de embriones normales frente a embriones con una única monosomía de día 3.

El análisis de medios de cultivo de embriones normales frente a medios de cultivo de embriones con una única trisomía está representado en el score Plot de la Figura número 14. Los iconos negros representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos rojos representan MC de embriones con una única trisomía.

Las trisomías que conforman este grupo son trisomía del cromosoma 13, del cromosoma 21 y del cromosoma 22.

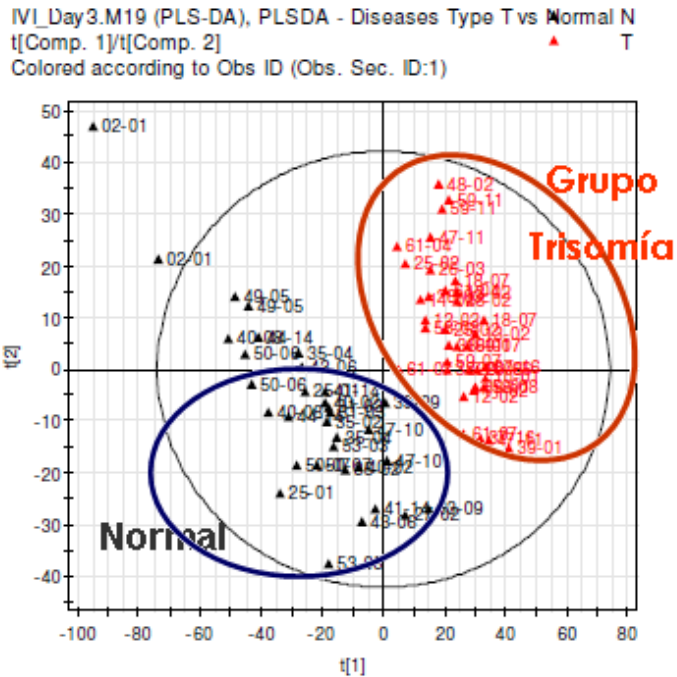


Figura 14: *Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de embriones normales frente a embriones con una única trisomía de día 3.*

El análisis de medios de cultivo de embriones normales frente a medios de cultivo de embriones afectados de 2 alteraciones cromosómicas está representado en el score Plot de la Figura número 15. Los iconos negros representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos rojos representan MC de embriones con 2 alteraciones cromosómicas.

Las 2 alteraciones cromosómicas que conforman este grupo son la combinación de dos monosomías y la combinación de una monosomía con una trisomía.

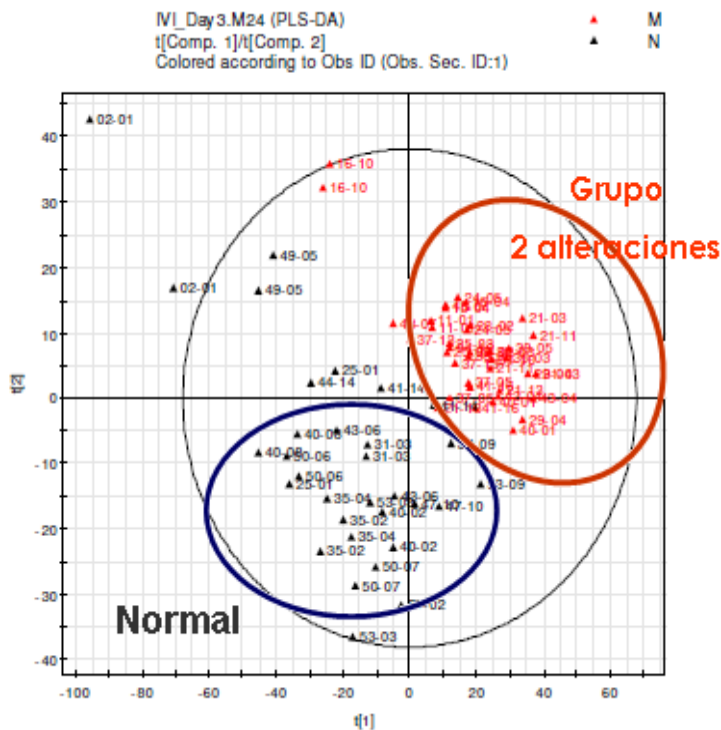


Figura 15: Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de embriones normales frente a embriones con 2 alteraciones cromosómicas de día 3.

El análisis de medios de cultivo de embriones normales frente a medios de cultivo de embriones afectados de más de 3 alteraciones cromosómicas está representado en el score Plot de la Figura número 16. Los iconos negros

representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos rojos representan MC de embriones con más de 3 alteraciones cromosómicas.

Las alteraciones cromosómicas que conforman este grupo son la combinación de más de tres monosomías y la combinación de más de tres polisomías.

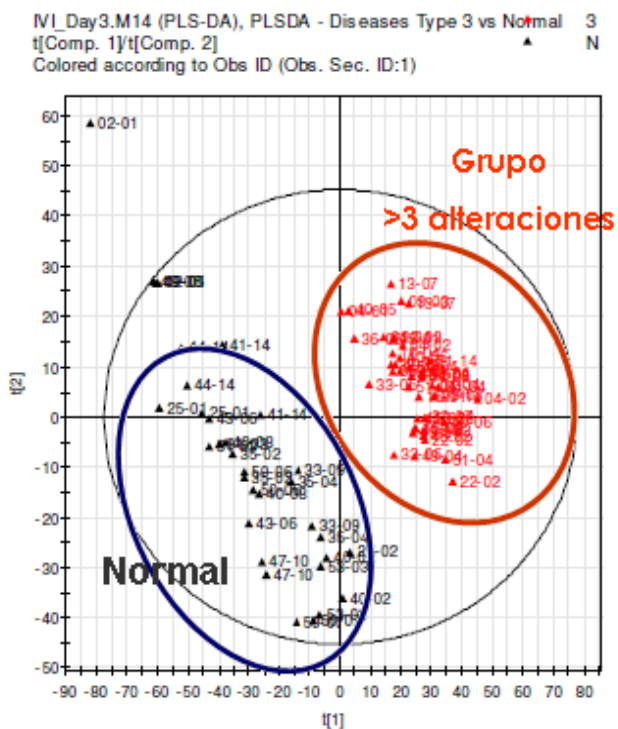


Figura 16: Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de embriones normales frente a embriones con más de 3 alteraciones cromosómicas de día 3.

En los score Plot realizados por grupos de alteraciones podemos observar que cuanto mayor es el grado de anormalidad cromosómica, mayor es la separación de las muestras normales respecto a las afectas.

Para valorar que metabolitos marcan las diferencias observadas mediante el PLS-DA entre ambos grupos, se ha utilizado como herramienta estadística metabolómica el OPLS (Trygg, 2002) (Regresión Ortogonal en Mínimos Cuadrados Parciales, *Orthogonal Partial Least Squares*). Mediante este análisis es posible comparar dos clases de muestras y extraer los marcadores estadísticamente importantes que marcan las diferencias, en nuestro caso entre el grupo normales y el grupo anormales. Estos marcadores se escogen en base al Gráfico-S-plot del análisis OPLS mostrado en la Figura 17 para las muestras normales frente a muestras con anomalías. Se seleccionan los marcadores que quedan fuera del grupo central, ya que son los que marcan las diferencias entre ambos grupos.

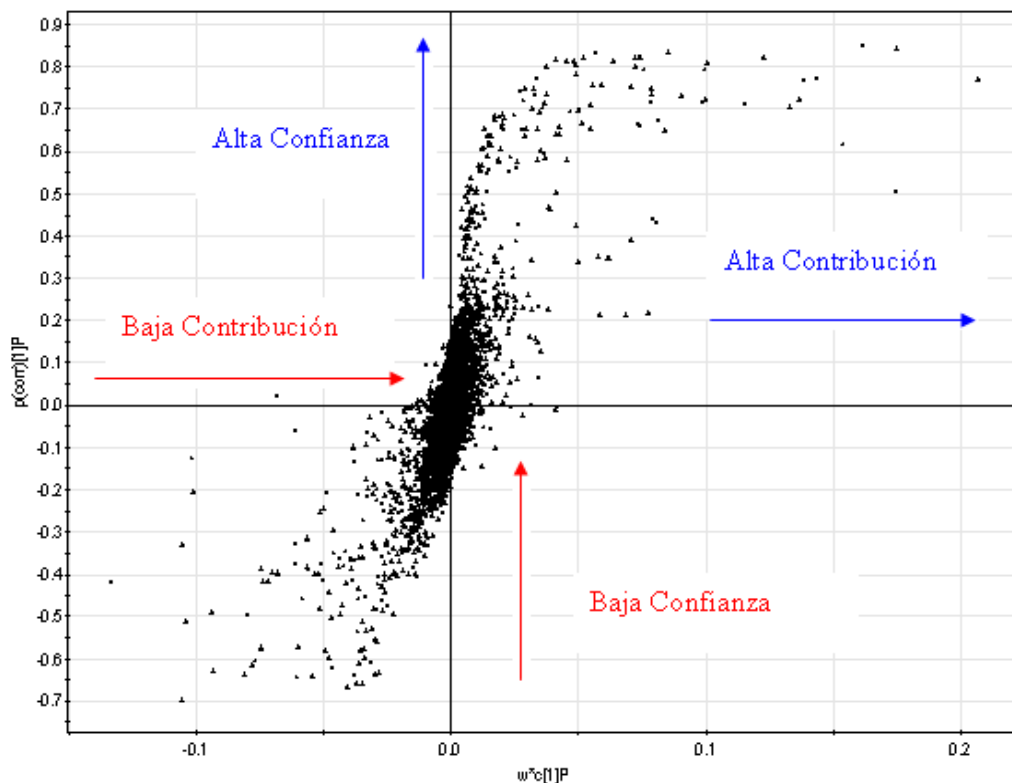


Figura 17. Gráfico-S-plot del análisis OPLS para las muestras normales vs. muestras con anomalías de día 3. Este tipo de análisis nos ayuda a extraer los marcadores estadísticamente importantes que marcan las diferencias entre los grupos de muestra estudiados. Los marcadores relevantes son los que quedan en la zona de alta confianza y alta contribución.

Ejemplo de marcadores extraídos utilizando este sistema son los que se exponen a continuación. Son marcadores que contraponen las muestras normales de la totalidad de las anormales como si éstas últimas formaran un único gran grupo, sin tener en cuenta la variabilidad que puede existir entre un grupo tan heterogéneo.

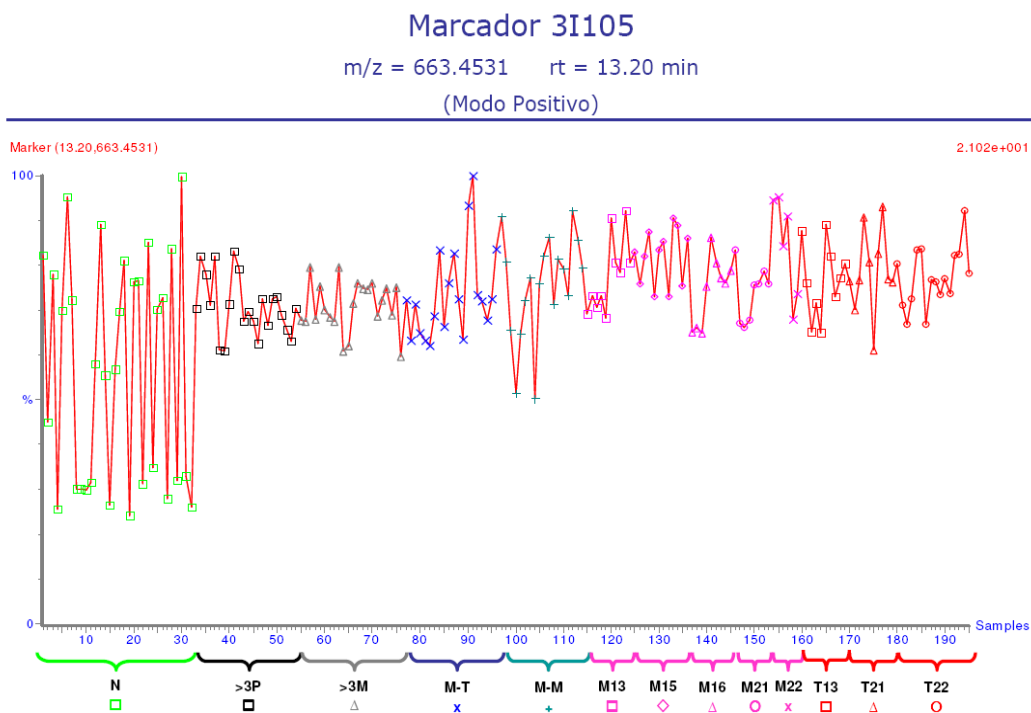


Figura 18: Marcador 3I105

3I105: En la mitad de los normales está elevado y en la otra mitad disminuido. En los anormales está aumentado.

Marcador 3I104

m/z = 934.6407 rt = 10.45 min

(Modo Positivo)

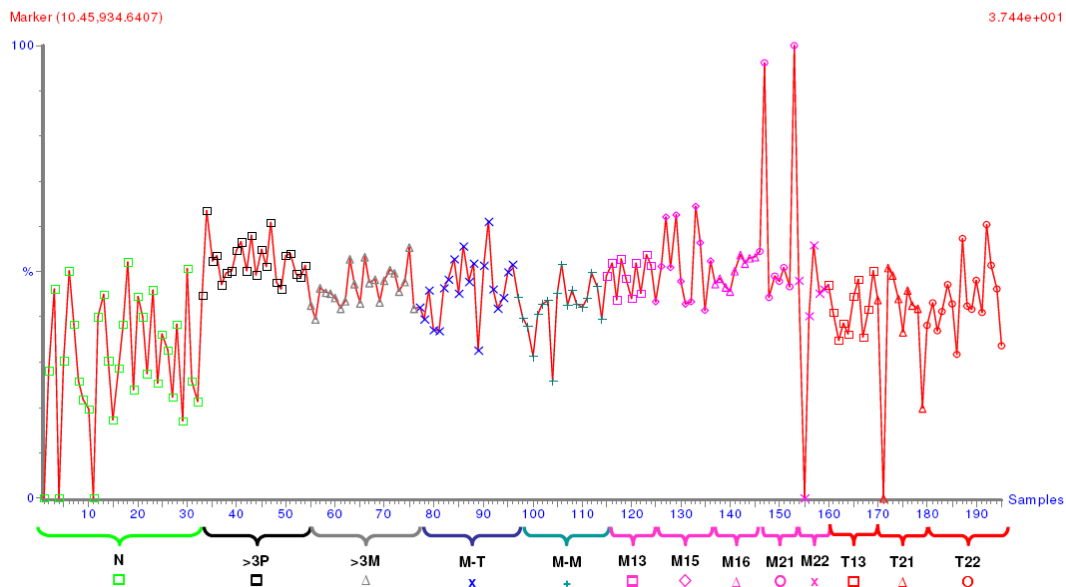


Figura 19: Marcador 3I104

3I104: En la mitad de los normales está elevado y en la otra mitad disminuido. En los anormales está aumentado. Sirve para todos los anormales excepto M-M, T21 y M22.

Marcador 31106

m/z = 536.3243 rt = 10.29 min

(Modo Positivo)

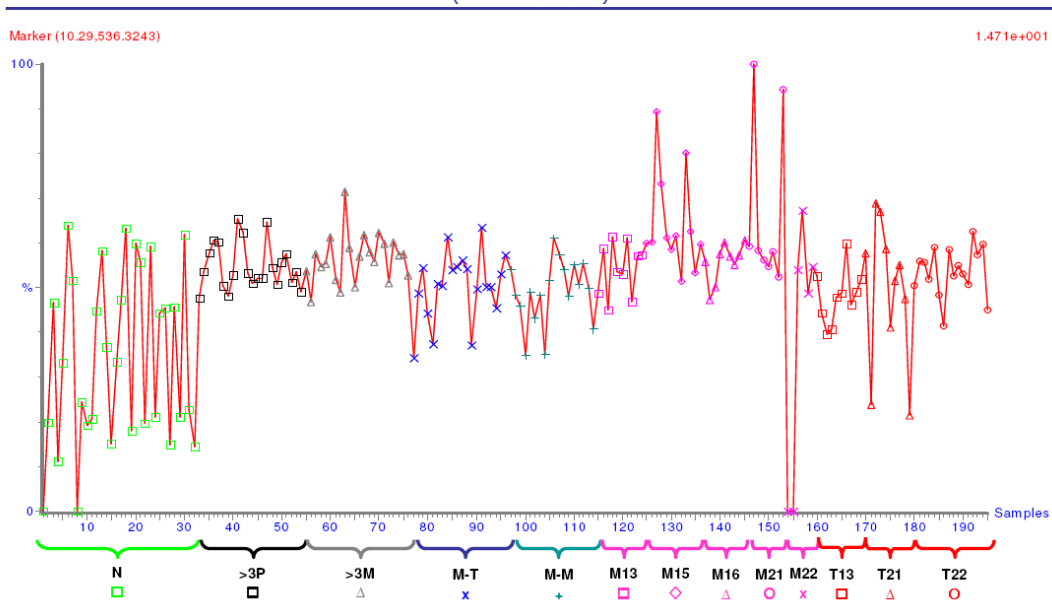


Figura 20: Marcador 31106

31106: En la mitad de los normales está elevado y en la otra mitad disminuido. En los anormales está aumentado. Sirve para todos los anormales excepto T21 y M22.

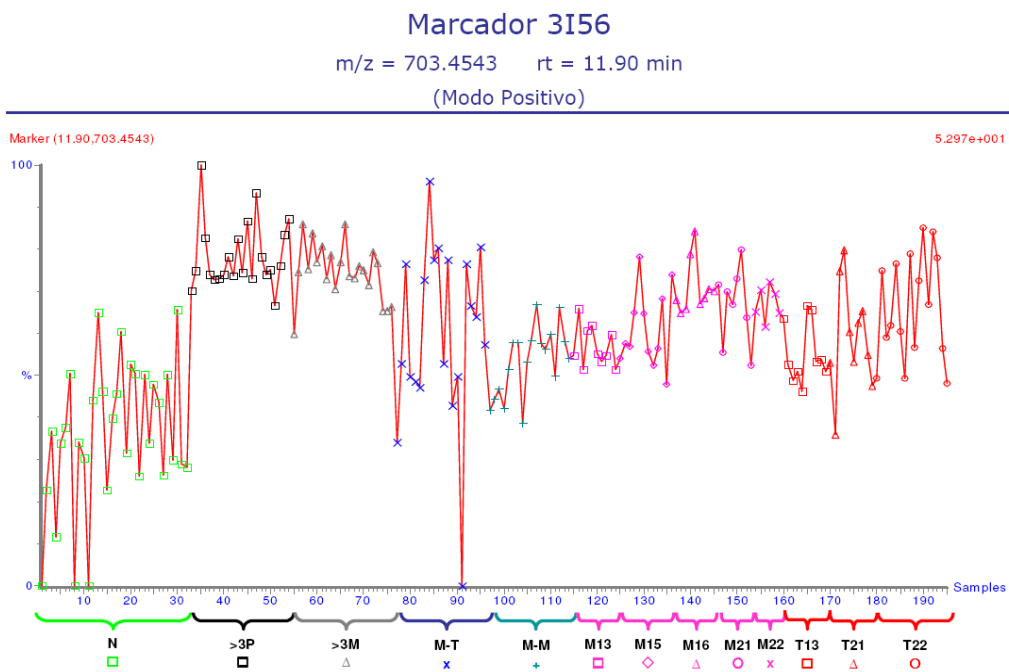


Figura 21: Marcador 3156

3156: En el 60% de los normales está disminuido. Aumentado en todos los grupos excepto en el grupo de 2 alteraciones Monosomía-Trisomía.

Marcador 3I61

m/z = 537.1468 rt = 9.11 min

(Modo Positivo)

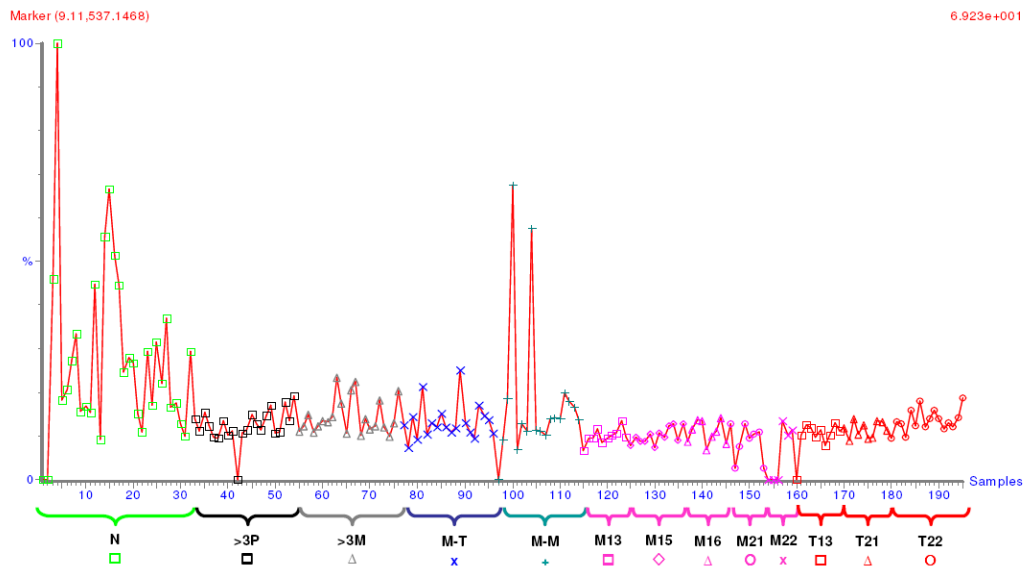


Figura 22: Marcador 3I61

3I61: En la mitad de los normales está elevado. Disminuido para todos los anormales excepto en el grupo de 2 alteraciones Monosomía-Monosomía.

Marcador 319

m/z = 776.2322 rt = 11.28 min

(Modo Positivo)

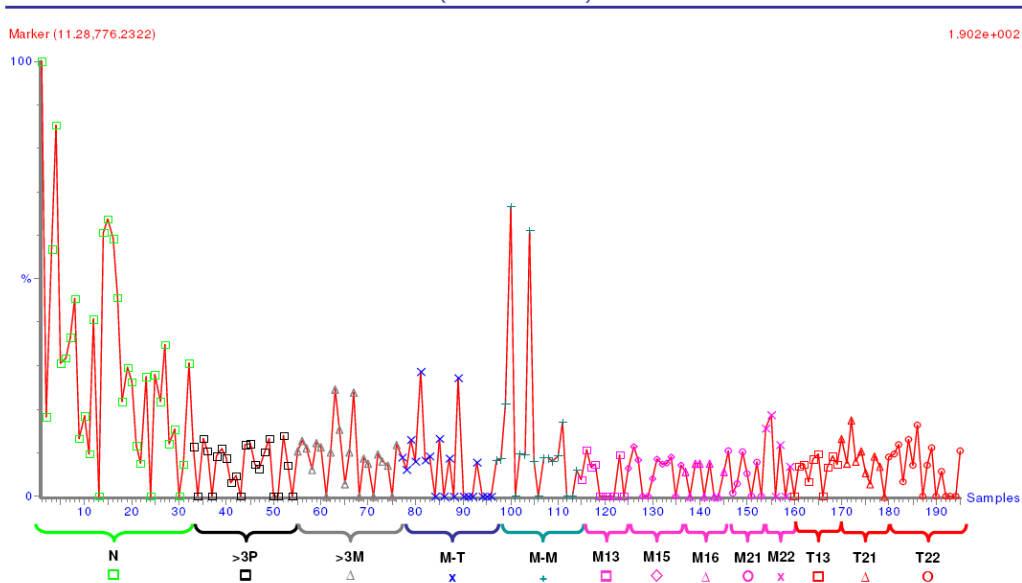


Figura 23: Marcador 319

319: En la mitad de los normales está elevado. Disminuido para todos los anormales excepto en el grupo de 2 alteraciones Monosomía-Monosomía.

Marcador 3138

m/z = 702.2138 rt = 10.65 min

(Modo Positivo)

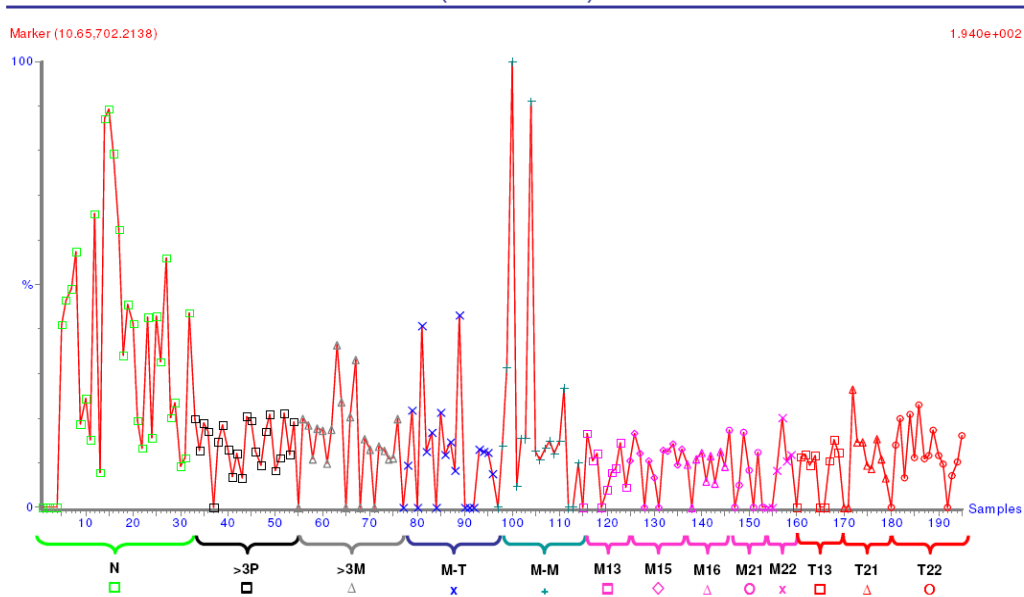


Figura 24: Marcador 3138

3138: En el 70% de los normales aumentado. Disminuido en todos los anormales excepto en el grupo de 3 alteraciones con más de 3 Monosomías y grupo de 2 alteraciones Monosomía-Monosomía y Monosomía-Trisomía.

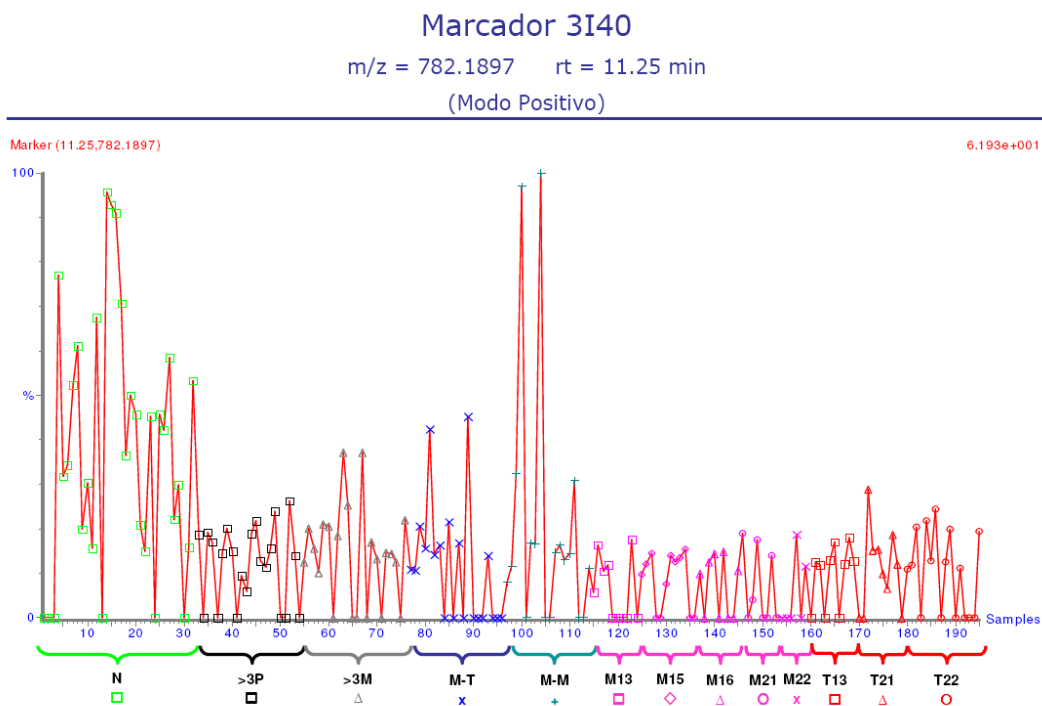


Figura 25: Marcador 3140

3140: Marcador muy parecido al anterior. En el 60% de los normales está aumentado. Disminuido en todos los anormales excepto en el grupo de 3 alteraciones con más de 3 Monosomías y grupo de 2 alteraciones Monosomía-Monosomía y Monosomía-Trisomía.

De los marcadores extraídos, hay alguno de ellos muy específicos para cromosopatías en concreto. Son marcadores que diferencian muy bien entre muestras normales y muestras con su alteración cromosómica, pero son

marcadores que no distinguen entre muestras normales y el resto de alteraciones cromosómicas.

Ejemplo de este tipo de marcadores, son los descritos a continuación.

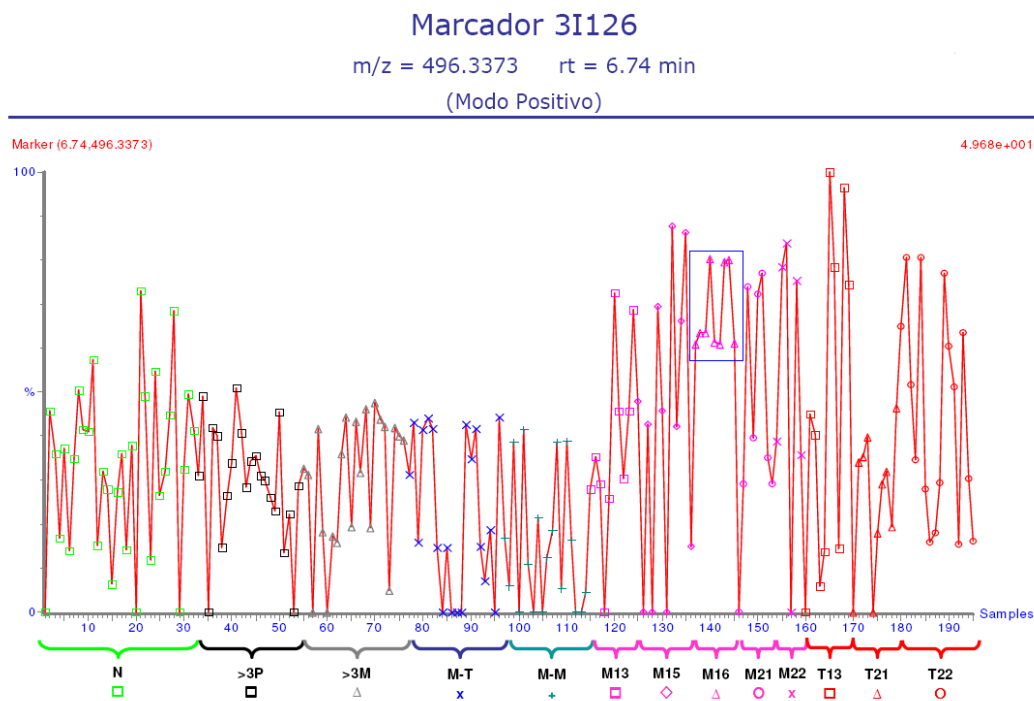


Figura 26: Marcador 3I126

3I126: Todas las muestras con Monosomía 16 presentan este marcador aumentado y en 2/3 de los normales está disminuido.

Marcador 3I107

m/z = 615.1432 rt = 12.88 min

(Modo Positivo)

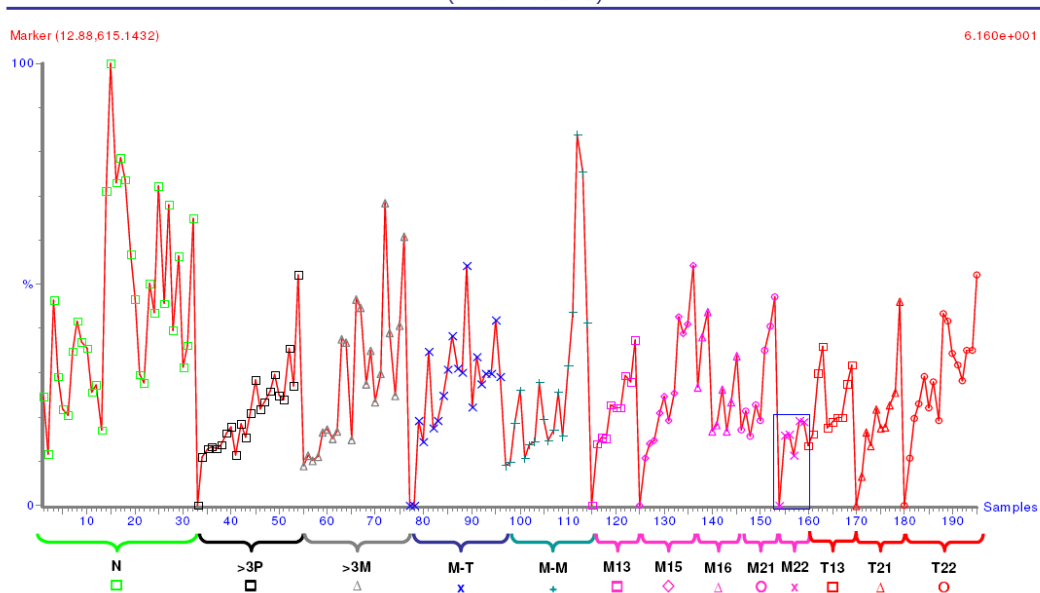


Figura 27: Marcador 3I107

3I107: Todas las muestras con Monosomía 22 presentan este marcador disminuido y en 2/3 de los normales está aumentado.

Marcador 3I63

m/z = 299.1483 rt = 3.48 min

(Modo Positivo)

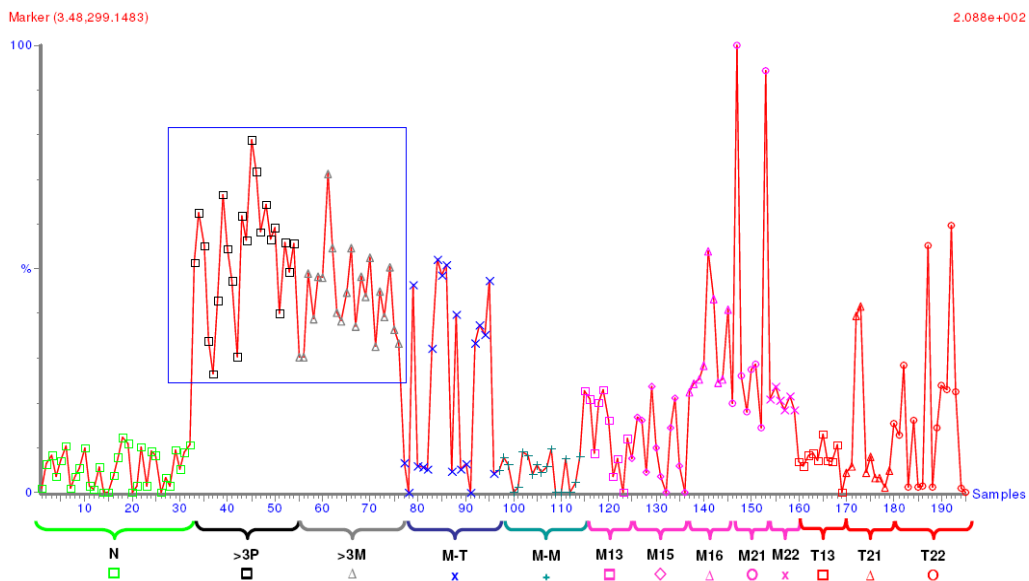


Figura 28: Marcador 3I63

3163: Todas las muestras con más de 3 alteraciones presentan este marcador aumentado y en todos los normales está disminuido.

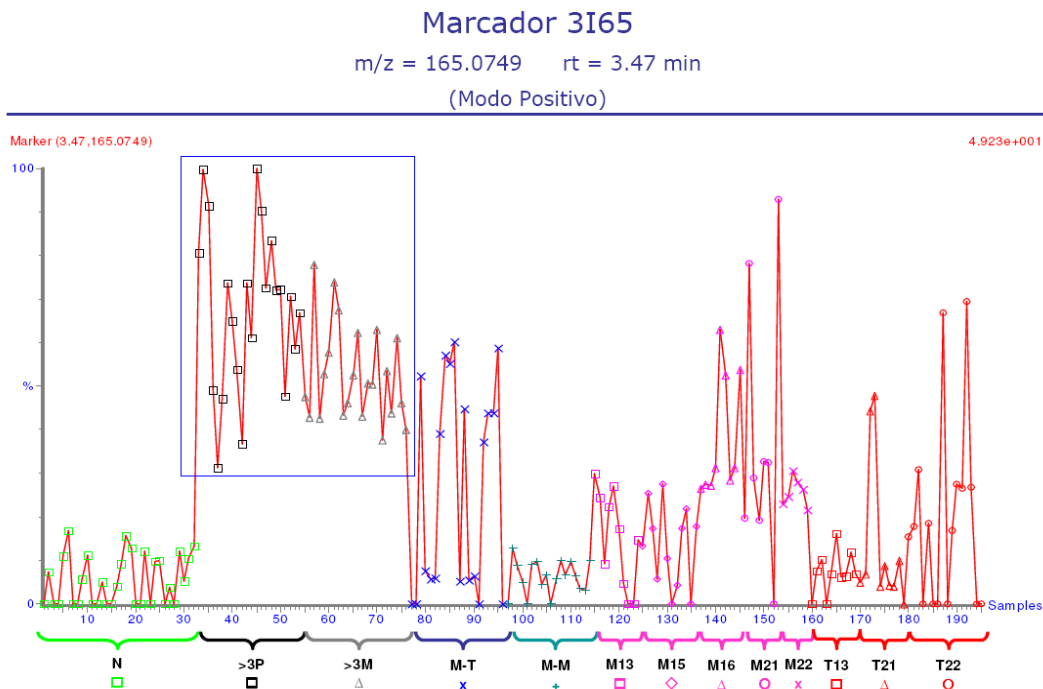


Figura 29: Marcador 3165

3165: Todas las muestras con más de 3 alteraciones presentan este marcador aumentado y en todos los normales está disminuido.

Marcador 3153

m/z = 404.2989 rt = 8.59 min

(Modo Positivo)

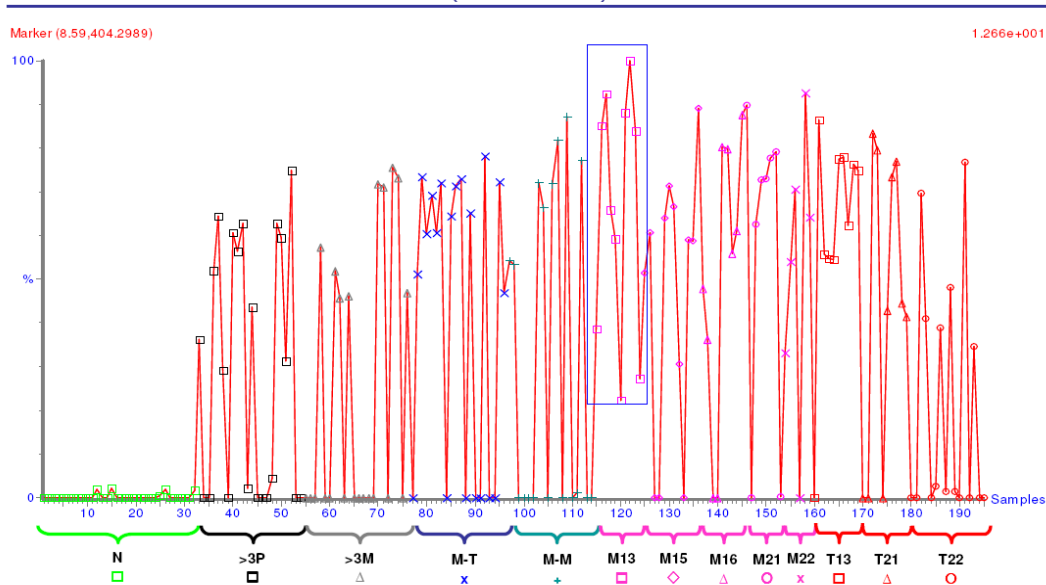


Figura 30: Marcador 3153

3153: Todas las muestras con monosomía del cromosoma 13 presentan este marcador aumentado y en todos los normales el valor es cercano al cero.

Marcador 3I1

m/z = 376.2670 rt = 8.60 min

(Modo Positivo)

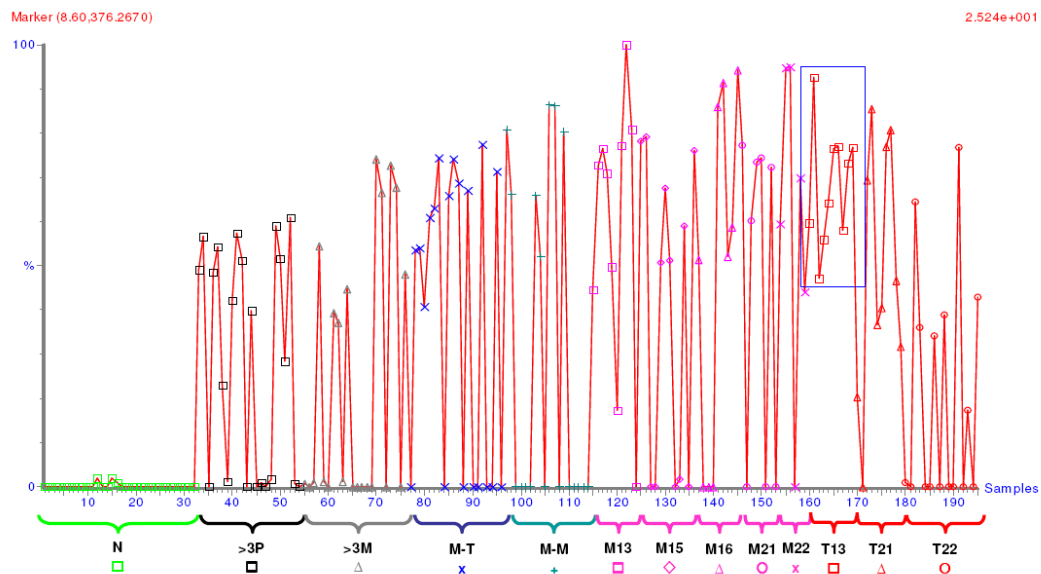


Figura 31: Marcador 3I1

3I1: Todas las muestras con trisomía del cromosoma 13 presentan este marcador aumentado y en todos los normales el valor es cercano al cero.

Marcador 315

m/z = 830.5431 rt = 5.59 min

(Modo Positivo)

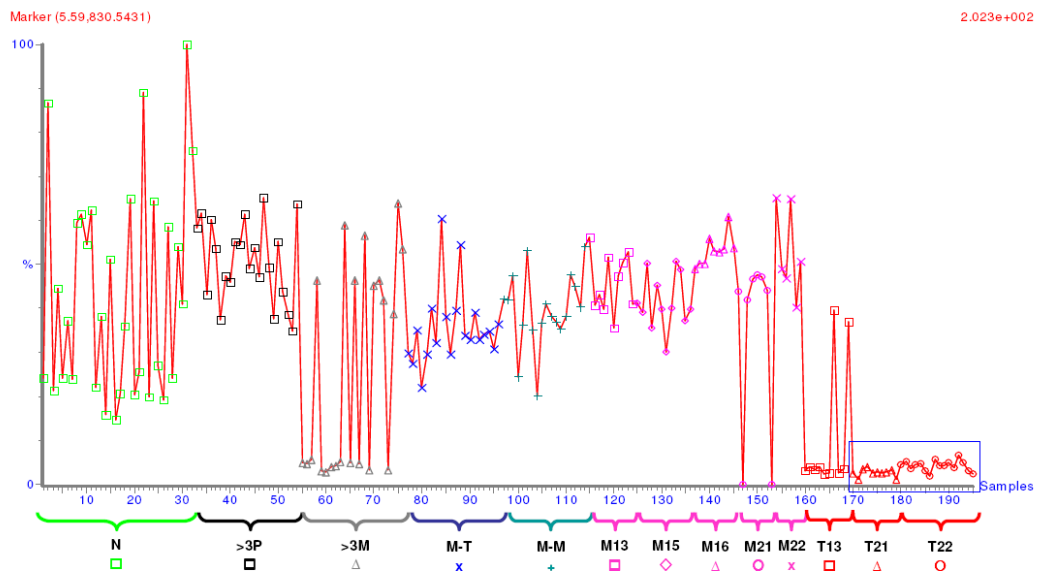


Figura 32: Marcador 315

315: Todas las muestras con trisomía del cromosoma 21 y 22 presentan valores cercanos al cero y en todos los normales el marcador está aumentado.

Marcador 318

m/z = 310.2753 rt = 5.38 min

(Modo Positivo)

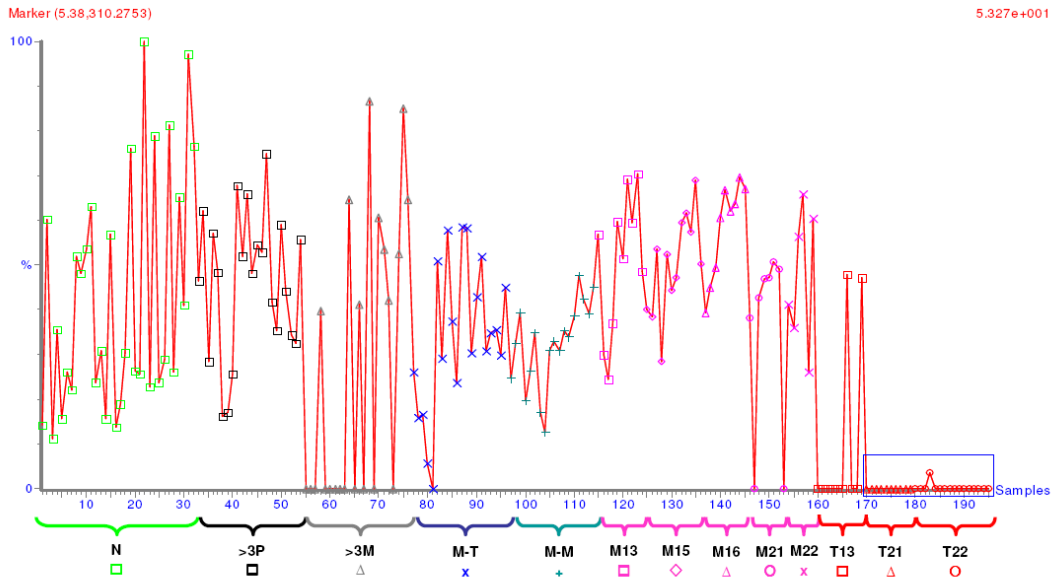


Figura 33: Marcador 318

318: Todas las muestras con trisomía del cromosoma 21 y 22 presentan valores cercanos al cero y en todos los normales el marcador está aumentado.

Marcador 3I36

m/z = 597.5516 rt = 5.38 min

(Modo Positivo)

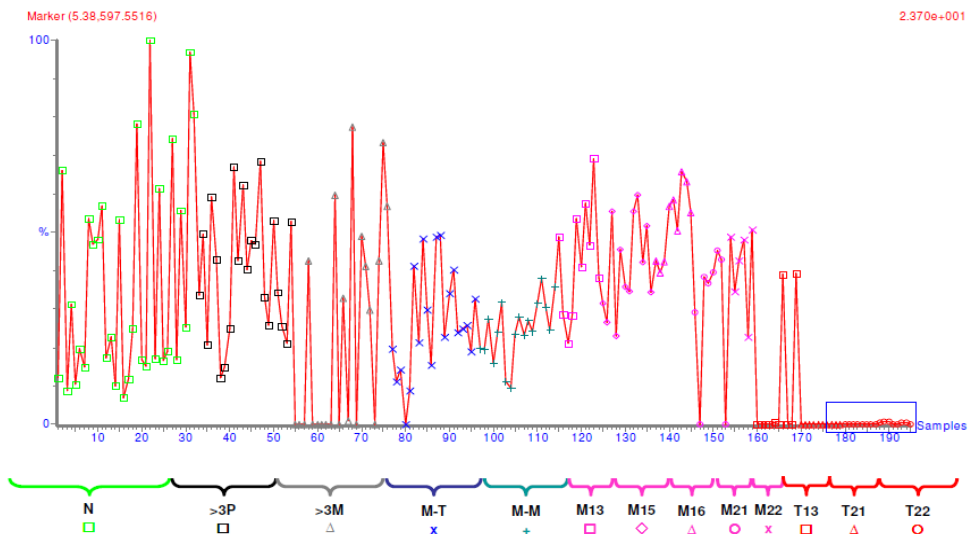


Figura 34: Marcador 3I36

3I36: Todas las muestras con trisomía del cromosoma 21 y 22 presentan valores cercanos al cero y en todos los normales el marcador está aumentado.

4.3. TERCER ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los dos primeros estudios proceden de medios de cultivo de embriones generados en un único laboratorio de Fecundación In Vitro. En el diseño del tercer estudio nos planteamos el estudio de embriones procedentes de distintos laboratorios para ver la reproducibilidad de los resultados.

Estudiamos 127 MC de día 3 de evolución embrionaria de 55 embriones normales y 72 embriones con alteraciones cromosómicas procedentes de tres laboratorios de FIV.

Los embriones anormales son un grupo heterogéneo con alteraciones que van desde una única monosomía o trisomía, a embriones con 2, 3 ó más de 3 alteraciones cromosómicas por embrión.

Los resultados del análisis global del metaboloma mediante UPLC-MS, utilizando la misma plataforma metabolómica de análisis del primer y segundo estudio, son los siguientes. El primer paso realizado para buscar estructura en los datos ha sido el PCA (Jolliffe I., 2002) (Análisis de los Componentes Principales, *Principal Components Analysis*) seguido del Análisis Discriminante de la Regresión en Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA (Trygg J, 2002), *Partial Least Square sDiscriminant Analysis*) que apunta direcciones en el espacio

multidimensional en las que la separación de las muestras es máxima, en función del grupo al que pertenecen. El análisis mediante PLS-DA de los medios de cultivo de embriones en día 3 nos da el score Plot que se muestra en la Figura 35. Los iconos negros representan MC de embriones cromosómicamente normales y los iconos rojos representan MC de embriones con alteraciones cromosómicas.

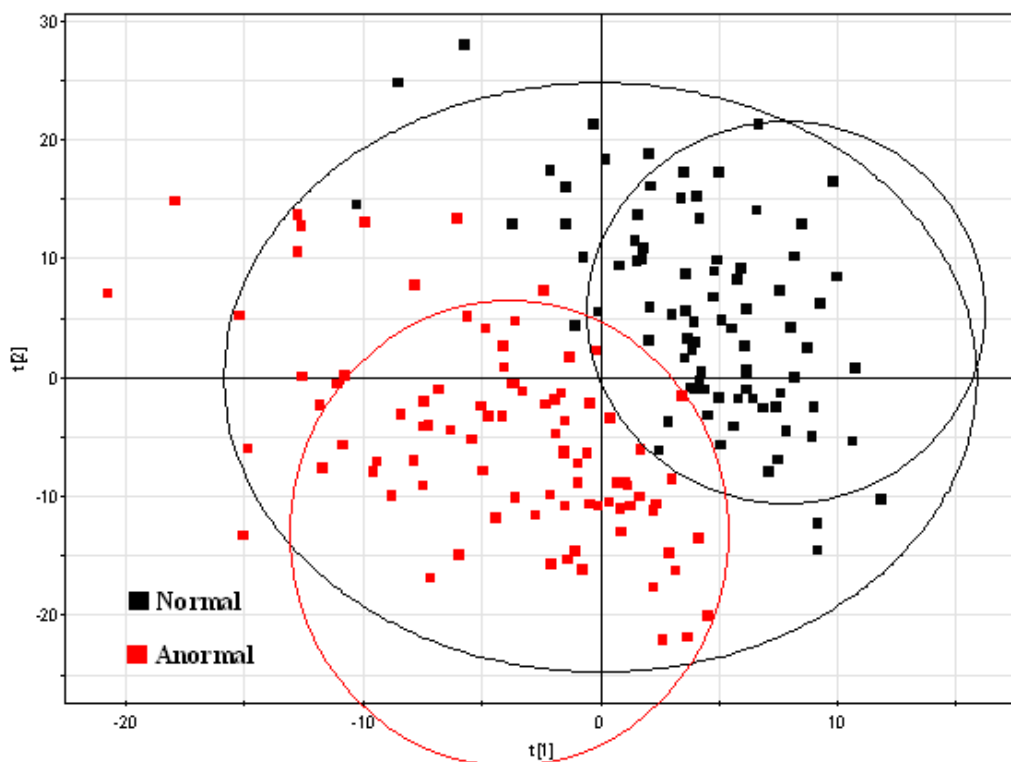


Figura 35: Score Plot de PLS-DA de medios de cultivo de día 3, de embriones normales frente a embriones con alteraciones cromosómicas procedentes de distintos laboratorios de FIV.

Podemos observar que la distribución de las muestras en el eje de coordenadas, aun procediendo de laboratorios de Fecundación In Vitro distintos, es similar a los resultados obtenidos en los estudios anteriores. Vemos agrupación de muestras normales frente a las anormales en dos grupos bien diferenciados.

Podemos, por tanto, ampliar nuestras muestras de estudio a varios laboratorios de FIV del mismo grupo puesto que los resultados obtenidos son reproducibles.

4.4. CUARTO ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el segundo estudio, orientaron el diseño de este cuarto estudio. La no coincidencia de los marcadores obtenidos en los distintos grupos de alteraciones cromosómicas, nos hicieron focalizar en alteraciones cromosómicas específicas, iniciando el estudio del cromosoma 21. En el cuarto estudio se ha analizado el status metabólico de los medios de cultivo de embriones afectados de Trisomía 21 en comparación con embriones normales mediante UPLC-MS.

Estudiamos 44 medios de cultivo (MC) de día 3 de evolución embrionaria procedentes de 14 pacientes incluidas en nuestro programa de DGP. De los 44 MC, 15 corresponden a embriones normales, 15 corresponden a embriones con Trisomía 21(T21) y 14 MC corresponden al grupo control. Para reducir la variabilidad en nuestro estudio, decidimos seleccionar de la misma paciente, un embrión normal y un embrión con T21, con su correspondiente control. La tabla 3 refleja el status cromosómico y procedencia de los embriones analizados. En el grupo T21, 8 de los embriones estudiados presentaban la Trisomía 21 de forma única, mientras que los 9 restantes contenían aneuploidías adicionales (ver tabla 3).

Paciente	edad	embrión	cr 13	cr 15	cr 16	cr 17	cr 18	cr 21	cr 22	cr X	cr Y
1	37	1.1	2	3	2	2	2	3	2	2	0
		1.2	2	4	2	2	3	3	2	1	1
		1.3	2	2	2	2	2	2	2	2	0
		1.4	2	2	2	2	2	2	2	2	0
2	39	2.1	2	2	2	2	2	3	2	2	0
		2.2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
3	38	3.1	2	2	2	2	2	3	2	1	1
		3.2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
4	39	4.1	3	ni	3	3	3	3	3	2	1
		4.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
5	41	5.1	2	1	ni	2	2	3	2	1	0
		5.2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
6	37	6.1	2	1	2	2	2	3	2	1	1
		6.2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
7	41	7.1	2	ni	2	2	2	3	2	2	0
		7.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
8	39	8.1	2	2	2	2	3	3	3	2	1
		8.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
9	42	9.1	2	2	2	2	2	3	1	1	1
		9.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
10	36	10.1	2	2	1	2	2	3	2	2	0
		10.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
11	38	11.1	2	2	2	2	2	3	2	2	0
		11.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
12	39	12.1	3	3	ni	2	2	3	2	2	0
		12.2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
13	41	13.1	2	ni	ni	ni	2	3	2	ni	ni
		13.2	2	2	2	2	2	2	2	2	0
14	40	14.1	2	3	2	2	2	3	2	2	0
		14.2	2	2	2	2	2	2	2	1	1

Tabla 3. Status cromosómico de los embriones analizados. Los embriones han sido clasificados como "normal" o "Trisomía 21" según los resultados obtenidos mediante el Diagnóstico Preimplantacional realizado de los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y por FISH. El número de cromosomas está indicado en cada uno de los embriones analizados. Las alteraciones numéricas se muestran en negrita. La edad de las pacientes también está incluida. No Informativo está descrito como ni.

La plataforma metabolómica utilizada para el análisis combina tres plataformas independientes: (UHPLC/MS/MS) optimizada para especies básicas, UHPLC/MS/MS optimizada para especies ácidas y GC/MS. Los metabolitos se identificaron mediante las bibliotecas de referencia creadas a partir de los estándares de metabolitos. Los iones no cubiertos en estos estándares se buscaron en bibliotecas adicionales basadas únicamente en la firma iónica. Los detalles de esta plataforma han sido descritas previamente por Evans y cols. 2009, y Shay cols. 2010. El análisis estadístico utilizado fue un test t pareado. Las comparaciones con el test t se calcularon usando el programa "R" de la Free Software Foundation.

Mediante este sistema, 92 metabolitos fueron identificados, cuantificados y estadísticamente analizados para buscar diferencias entre los grupos normal y T21 (Tabla 4). De estos, 4 presentaban niveles estadísticamente diferenciales entre ambos grupos ($p < 0.05$) (Figura 36).

Super pathway	Metabolite	Fold change T vs N	p-value
Amino acid	glycine	1.01	0.9774
	serine	0.98	0.6815
	threonine	1.04	0.1749
	alanine	1.05	0.2176
	aspartate	0.99	0.9135
	asparagine	1.07	0.3589
	glutamate	0.98	0.5551
	histidine	1.01	0.8788
	lysine	0.98	0.7816
	phenylalanine	1.02	0.6055
	p-cresol sulfate	1.02	0.1236
	tyrosine	1.04	0.3005
	phenol sulfate	1.08	0.1697
	tryptophan	1.03	0.4866
	N-acetyltryptophan	1.01	0.2513
	isoleucine	1.03	0.2654
	leucine	1.01	0.5915
	valine	1.03	0.4029
	cysteine	1.03	0.7958
	methionine sulfoxide	1.01	0.7487
methionine	1.02	0.6035	
arginine	1.05	0.5300	
ornithine	1.00	0.7286	
proline	1.03	0.0710	
Peptide	glycylglutamine	1.01	0.2668
	sucrose	1.67	0.6042
Carbohydrate	glucose	1.31	0.5945
	pyruvate	0.96	0.9970
	lactate	1.01	0.3787
Energy	citrate	0.76	0.5763
Lipid	linolenate [alpha or gamma; (18:3n3 or 6)]	0.95	0.7597
	caproate (6:0)	1.14	0.0382
	heptanoate (7:0)	0.99	0.8784
	caprylate (8:0)	1.02	0.1597
	pelargonate (9:0)	0.98	0.8312
	caprate (10:0)	0.95	0.8317
	laurate (12:0)	1.04	0.4924
	myristate (14:0)	0.92	0.0672
	myristoleate (14:1n5)	1.05	0.8060
	oleate (18:1n9)	0.93	0.1038
	linoleate (18:2n6)	0.92	0.0609
	dihomo-linoleate (20:2n6)	0.93	0.1673
	arachidonate (20:4n6)	0.93	0.2915
	choline	1.01	0.6761
	glycerophosphorylcholine	1.01	0.5283
	dehydroisoandrosterone sulfate (DHEA-)	1.02	0.7595
	epiandrosterone sulfate	1.00	0.5858
	androsterone sulfate	1.06	0.0229
	4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate 1	1.01	0.4111
	4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate 2	1.05	0.2181
	pregnen-diol disulfate	1.01	0.8393
	pregn steroid monosulfate	0.97	0.2769

Super pathway	Metabolite	Fold change T vs N	p-value
Xenobiotics	HEPES	1.14	0.8016
	phenol red	1.00	0.8891
	X - 02249	0.95	0.2263
	X - 10503	0.99	0.9327
	X - 10506	0.91	0.4603
	X - 11299	1.03	0.7440
	X - 11372	0.98	0.9042
	X - 11533	0.96	0.3520
	X - 11542	0.95	0.1723
	X - 11661	1.01	0.4820
	X - 11662	1.02	0.6529
	X - 11880	1.02	0.8760
	X - 11930	0.92	0.1442
	X - 12100	1.01	0.9481
	X - 12199	1.01	0.7646
	X - 12770	1.23	0.5306
	X - 12776	1.01	0.7282
	X - 12786	0.98	0.5629
	X - 13072	0.92	0.3416
	Unnamed	X - 13110	0.97
X - 13199		1.01	0.6138
X - 13201		0.92	0.5386
X - 13206		1.00	0.4139
X - 13212		1.06	0.8809
X - 13326		1.01	0.7716
X - 13342		1.02	0.5345
X - 13365		0.98	0.4746
X - 13368		1.03	0.4817
X - 13377		1.05	0.7140
X - 14603		1.03	0.3935
X - 14808		1.25	0.0095
X - 15558		1.54	0.3659
X - 15559		2.15	0.6068
X - 15562		3.18	0.2698
X - 15563		1.60	0.4511
X - 15618		0.97	0.3554
X - 15622		1.11	0.0459
X - 15623	0.96	0.7977	
X - 4357	1.02	0.6997	
X - 6267	1.05	0.6926	

Tabla 4. Lista de los 92 metabolitos encontrados en los MC de embriones de día 3. Para identificar marcadores con niveles relativos distintos entre ambos grupos de uso el análisis estadístico test t pareado. Se encontraron 4 metabolitos estadísticamente significativos, marcados en negrita ($p < 0.05$). También se muestra en la tabla el “pathway” o categoría de dichos metabolitos.

Las diferencias bioquímicas observadas en los medios de embriones T21 y embriones normales están representadas en el gráfico Z-score (Figura 37). Este gráfico nos da una idea de cómo un metabolito está por encima o por debajo de la media respecto al grupo control, y en nuestro caso nos indica que las dos condiciones, normales y T21 son muy similares. Un bajo número de metabolitos difieren entre ambos grupos. Dos metabolitos conocidos, caproato y sulfato de androsterona, se identificaron como potenciales marcadores para distinguir embriones T21 de embriones normales. Además, dos metabolitos desconocidos, X-15622 y X-14808, estaban significativamente alterados entre ambos grupos. Todos ellos estaban elevados entre 1.06-1.25 veces en el grupo T21 respecto al grupo normal (Figura 36 y 38). Mediante validaciones adicionales, estos metabolitos podrían ser marcadores potenciales de embriones con T21.

Metabolite	Fold change T vs N	p-value
caproate (6:0)	1.14	0.0382
androsterone sulfate	1.06	0.0229
X - 14808	1.25	0.0095
X - 15622	1.11	0.0459

Figura 36. Lista de los metabolitos diferencialmente significativos ($p < 0.05$) entre el grupo normal y el grupo T21. Los cuatro compuestos están elevados en el grupo T21.

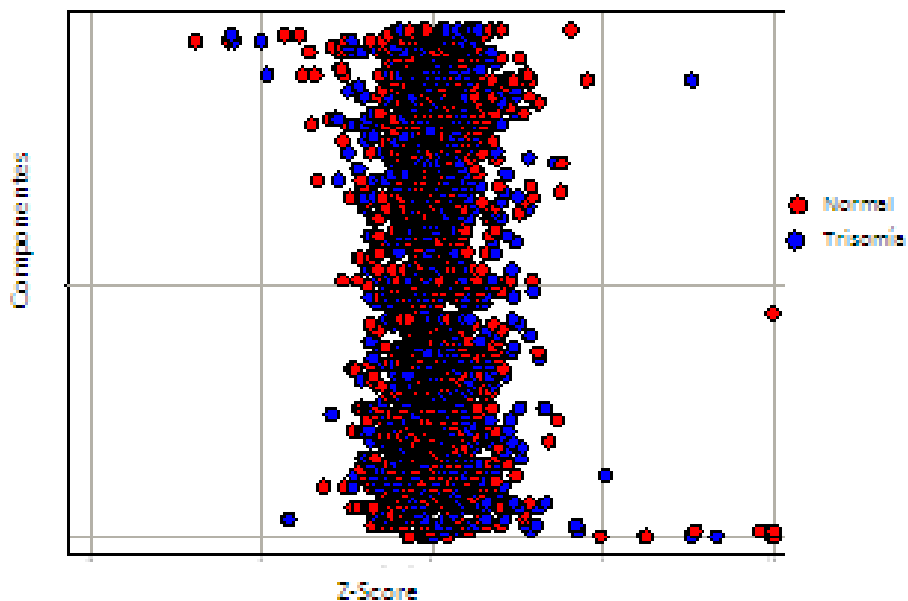


Figura 37. Z-score. Observamos las diferencias bioquímicas entre Medios de Cultivo de embriones normales representados por iconos rojos, y Medios de Cultivo de embriones T21 representados por iconos azules. El punto 0 del eje X representa la media del grupo control y el eje Y representa cada uno de los metabolitos. Cada línea horizontal es el mismo metabolito para cada una de las muestras analizadas.

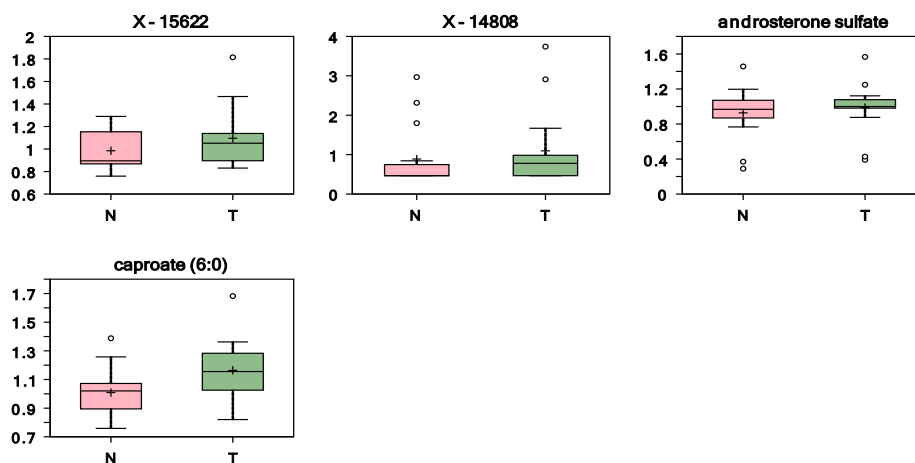


Figura 38. Visualización de los resultados obtenidos mediante formato box-plot. Los dos grupos son MC de embriones normales representados por cajón rosa y MC de embriones T21 representados por cajón verde. La barra sólida que atraviesa el cajón representa el valor de la mediana, mientras que la cruz representa el valor de la media.

Con la intención de revelar las propiedades bioquímicas de los componentes desconocidos, se realizó una fragmentación MS/MS para aclarar sus estructuras. Para X-15622, la masa exacta estimada fue 381.196 ± 0.00076 (rango estimado de la masa con un error de ± 2 partes por millón ppm). Sin embargo, para X-15622 no se pudo determinar. La búsqueda de estos datos se basó en la base de datos ChemSpider (Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK).

Otras diferencias biológicas encontradas entre ambos grupos, fueron los niveles de aminoácidos. Aún sin ser significativas, muchos de los aminoácidos

encontrados tenían niveles inferiores en los MC de embriones normales respecto a embriones T21 (Figura 39). También estaban elevados algunos esteroides en el grupo T21, incluido el sulfato de androsterona ya mencionado. Todos estos esteroides presentaban grupos sulfato.

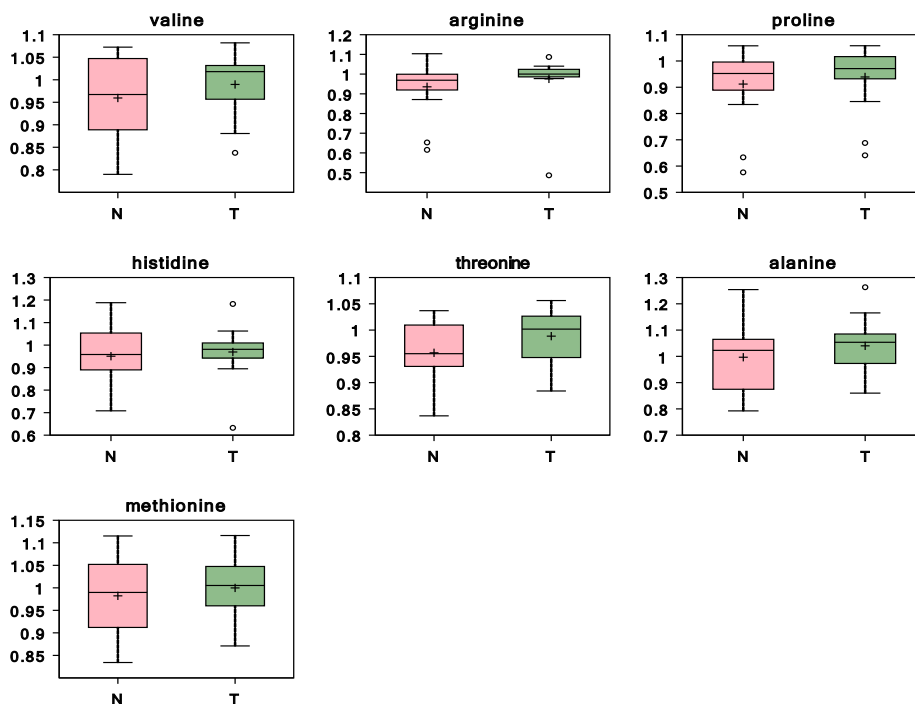


Figura 39. Box plot de aminoácidos. Los dos grupos son MC de embriones normales representados por cajón rosa y MC de embriones T21 representados por cajón verde. La barra sólida que atraviesa el cajón representa el valor de la mediana, mientras que la cruz representa el valor de la media.

En el 4º estudio hemos encontrado marcadores metabólicos de trisomía 21 que nos permiten discriminar entre embriones normales y embriones

con Síndrome de Down utilizando el medio de cultivo dónde dichos embriones se han desarrollado. Por tanto, este estudio sugiere que el análisis de los medios de cultivo podrían ser útiles en la detección de aneuploidías previo al transfer.

4.5. QUINTO ESTUDIO. DISEÑO Y RESULTADOS.

Tras los resultados obtenidos en el cuarto estudio decidimos valorar la reproducibilidad de los marcadores obtenidos mediante otra plataforma metabolómica, la espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN). En este quinto estudio pretendimos identificar biomarcadores característicos de alteraciones en el cromosoma 21 mediante el análisis por RMN.

Fueron seleccionados para este estudio 98 embriones procedentes del programa de DGP. Estudiamos un total de 127 medios de cultivo (MC) de día 3 de evolución embrionaria, 39 MC provenían de embriones considerados normales, 35 de embriones afectados de Trisomía 21, 24 de embriones afectados de Monosomía 21 y 29 MC control. La tabla 5 refleja el status cromosómico y procedencia de los embriones analizados. El análisis metabolómico se realizó mediante espectroscopía de RMN de alta resolución.

paciente	Edad	embrión	cr 13	cr 15	cr 16	cr 17	cr 18	cr 21	cr 22	cr X	cr Y	Dg
1	42	1M	2	2	2	na	2	1	2	1	1	m21
2	39	2M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
3	40	3M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
4	35	4M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
5	35	5M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
6	42	6M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
7	35	7M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
8	30	8M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
9	41	9M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
10	41	10M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
11	43	11M	2	2	2	2	2	1	2	1	0	m21
12	42	12M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21

13	43	13M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
14	35	14M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
15	31	15M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
16	41	16M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
17	45	17M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
18	36	18M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
19	39	19M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
20	37	20M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
21	39	21M	2	2	2	2	2	1	2	2	0	m21
22	44	22M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
23	35	23M	2	2	2	2	2	1	2	1	1	m21
24	41	24M	2	2	2	2	2	1	2	1	0	m21
25	41	1T	2	2	2	2	2	3	2	2	0	t21
26	43	2T	2	2	2	2	2	3	2	1	1	t21
26	43	3T	2	1	1	2	3	3	1	1	1	t21
27	37	4T	2	2	2	na	2	3	2	2	0	t21
28	38	5T	2	2	2	na	2	3	2	1	1	t21
29	40	6T	2	2	1	2	2	3	2	2	0	t21
30	40	7T	ni	2	1	ni	1	3	ni	2	0	t21
31	44	8T	3	3	2	2	3	3	3	1	1	t21
32	48	9T	3	3	3	3	3	3	3	2	1	t21
33	41	10T	2	2	2	2	2	3	2	2	0	t21
34	40	11T	2	2	2	2	2	3	1	1	1	t21
34	40	12T	3	2	2	1	3	3	2	1	1	t21
35	45	13T	2	1	2	2	2	3	1	2	0	t21
36	42	14T	2	2	2	2	2	3	2	1	1	t21
37	41	15T	2	2	2	2	3	3	2	1	1	t21
38	40	16T	2	3	ni		2	3	2	2	0	t21
13	43	17T	2	2	2	2	1	3	3	1	1	t21
39	42	18T	2	1	ni	2	2	3	2	2	0	t21
40	42	19T	2	2	1	2	2	3	2	1	1	t21
41	40	20T	2	2	1	2	2	3	2	1	2	t21
42	41	21T	2	3	3	3	2	3	2	2	0	t21
43	43	22T	2	2	2	2	2	3	2	1	1	t21
44	42	23T	2	2	2	2	2	3	2	1	1	t21
45	46	24T	4	3	4	2	1	3	4	2	0	t21
46	37	25T	2	2	3	2	2	3	2	1	1	t21
47	46	26T	2	2	2	2	2	3	1	2	0	t21
48	45	27T	2	2	2	2	2	3	2	1	1	t21
49	39	28T	2	2	2	2	2	3	1	2	0	t21
49	39	29T	2	2	2	3	3	3	3	3	0	t21
50	32	30T	2	2	2	2	2	3	2	1	2	t21

51	36	31T	2	ni	2	2	2	3	3	2	0	t21
24	41	32T	2	2	2	2	2	3	2	2	0	t21
52	43	33T	2	2	2	2	2	3	2	2	0	t21
53	40	34T	2	2	2	2	3	2	2	0	IC	t21
54	44	35T	2	2	2	2	3	2	2	0	IC	t21
55	41	1N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
56	35	2N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
57	38	3N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
58	35	4N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
59	42	5N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
60	34	6N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
61	30	7N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
61	30	8N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
62	39	9N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
62	39	10N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
63	36	11N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
64	36	12N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
65	37	13N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
66	39	14N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
67	41	15N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
68	39	16N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
69	41	17N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
70	36	18N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
71	37	19N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
72	34	20N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
73	27	21N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
74	41	22N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
75	44	23N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
76	41	24N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
16	41	25N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
77	26	26N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
78	43	27N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
79	43	28N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
80	30	29N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
80	30	30N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
81	34	31N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
19	39	32N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
19	39	33N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
82	32	34N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
83	26	35N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
84	31	36N	2	2	2	2	2	2	2	1	1	n
85	36	37N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n

51	36	38N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n
24	41	39N	2	2	2	2	2	2	2	2	0	n

Tabla 5. Status cromosómico de los embriones analizados. Los embriones han sido clasificados como "normal", "Trisomía 21" o "Monosomía 21" según los resultados obtenidos mediante el Diagnóstico Preimplantacional realizado de los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y por FISH. El número de cromosomas está indicado en cada uno de los embriones analizados. Las alteraciones numéricas se muestran en negrita. La edad de las pacientes también está incluida. No Informativo está descrito como ni.

A partir de los perfiles obtenidos, se identificaron todos los componentes presentes en los medios. En la Figura 40 podemos observar un ejemplo del espectro obtenido del análisis de una muestra de medio de cultivo.

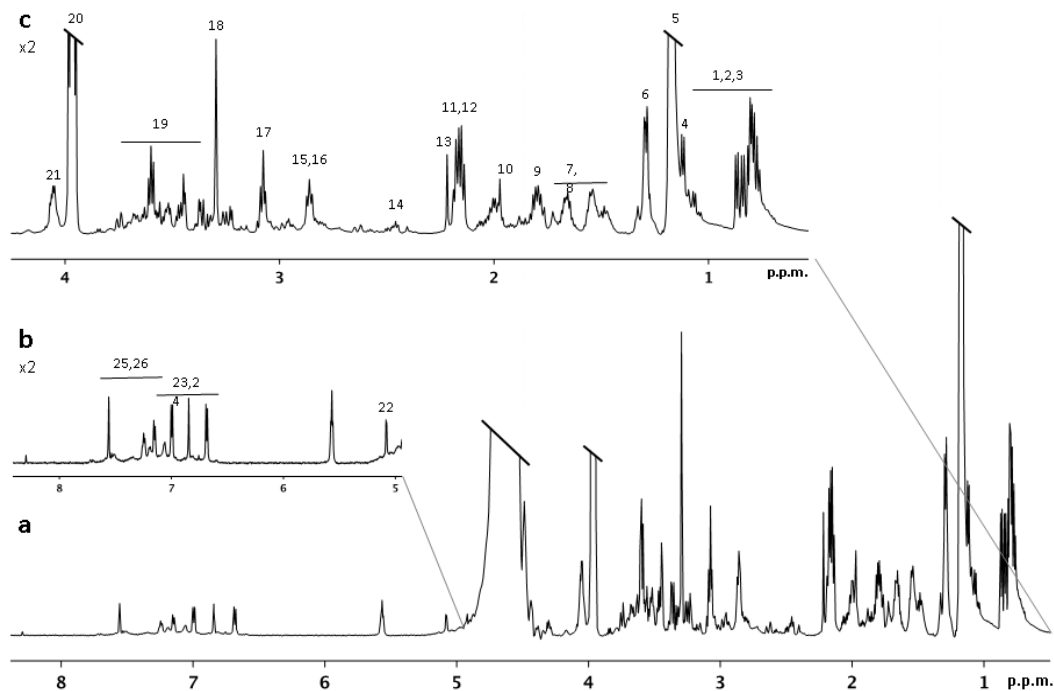


Figura 40. Espectro 1D-CPMG representativo de una muestra de MC control, medido a 298 K. a) Espectro completo ($\delta=0.50-8.50$ ppm), b) ampliación de la región aromática del espectro ($\delta=8.50-5.00$ ppm), y c) región alifática ($\delta=0.50-4.25$ ppm). Asignación de los picos: 1, Valina; 2, Isoleucina; 3, Leucina; 4, Treonina; 5, Lactato; 6, Alanina; 7, Lisina; 8, Arginina; 9, Prolina; 10, Metionina; 11, Ácido Glutámico; 12, Valina; 13, Piruvato; 14, Metionina; 15, Cistina; 16, Lisina; 17, Arginina; 18, EDTA; 19, Glucosa; 20, Lactato; 21, Treonina; 22, Glucosa; 23, Tirosina; 24, Histidina; 25, Fenilalanina; 26, Triptófano.

Aunque se encontraron diferencias en distintas regiones del espectro, las únicas diferencias significativas fueron encontradas en la región correspondiente al grupo de la Leucina/Isoleucina. En la Figura 41 podemos observar la comparación entre muestras de esta región del espectro.

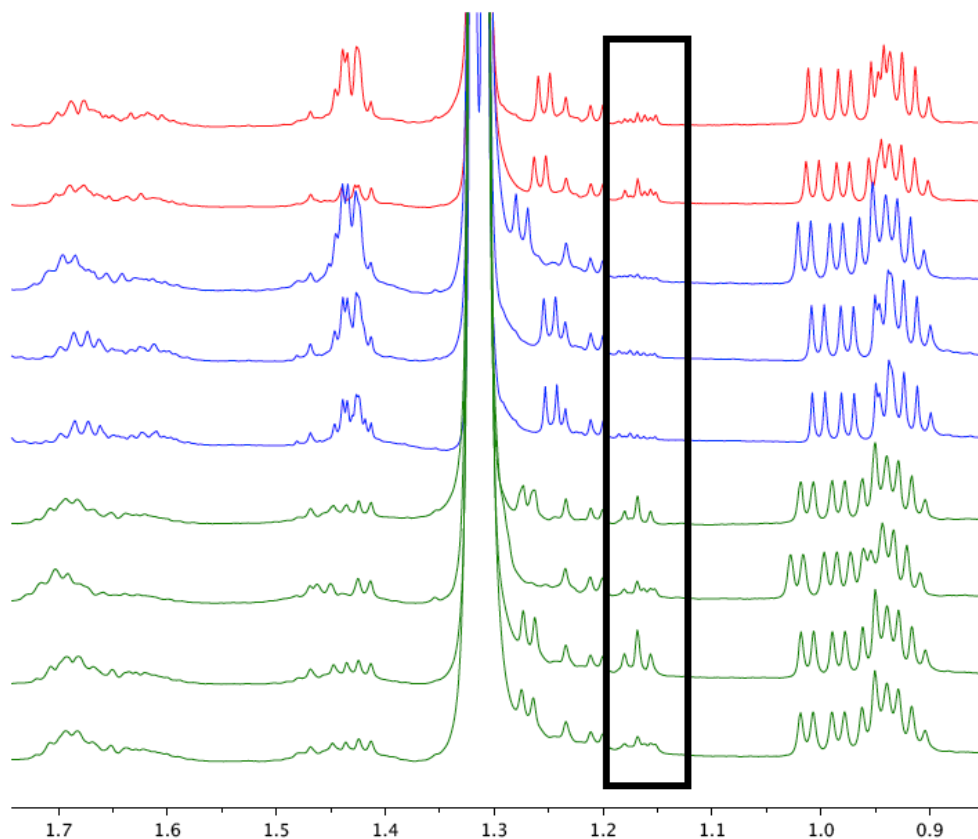


Figura 41. Comparación de la región Leucina/Isoleucina entre espectros correspondientes a embriones normales (rojo), embriones afectados de Trisomía 21 (azul) y embriones con Monosomía 21 (verde). Se observaron diferencias en la intensidad de las señales de esta región entre los distintos grupos de muestras.

La comparación de los espectros entre los distintos grupos revela diferencias en las regiones donde resuenan grupos correspondientes a Leucina/Isoleucina. Según estos resultados y mediante la comparación de medias de los picos entre los distintos grupos analizados, los embriones con Trisomía 21 tienen un 40% menos en los niveles de Leucina/Isoleucina en comparación con las muestras que corresponden a embriones afectados de

Monosomía 21, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) cuando se aplicó un test t para comparar las medias entre ambos grupos.

Con este estudio podemos comprobar que la RMN encuentra diferencias metabólicas entre embriones afectados de trisomía 21 y embriones afectados de monosomía 21 en la región del espectro compatible con este grupo de aminoácidos.

5. DISCUSIÓN

Encontrar la forma de selección de los mejores embriones a transferir permitiría mejorar tasa de embarazo, pues se trataría de embriones con mayor poder de implantación y por tanto mayor posibilidad de éxito; disminuiría tasa de gestación múltiple porque nos permitiría realizar transferencia de un solo embrión con más frecuencia a la actual; y disminuiría la tasa de aborto al reducir la transferencia de embriones morfológicamente adecuados pero cromosómicamente anormales. De esta forma, aumentaríamos la tasa de recién nacido en casa, objetivo de nuestros tratamientos.

Esta es la intención de la investigación llevada a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad con el apoyo de la Fundación IVI. En esta tesis proponemos el uso de la metabolómica como herramienta de investigación en el desarrollo de un método no invasivo de diagnóstico preimplantacional. Con la ayuda de estas nuevas tecnologías pretendemos encontrar cambios metabolómicos en los medios de cultivo embrionarios que nos permitan discriminar los embriones normales de los embriones aneuploides. La selección morfológica con la incorporación de la selección no invasiva de normalidad cromosómica permitiría la transferencia de embriones con un potencial de implantación mayor y una tasa de pérdida gestacional menor.

En los últimos años muchas investigaciones se han concentrado en desarrollar marcadores metabólicos no invasivos asociados a la capacidad de desarrollo del embrión. Se ha investigado con especial interés el consumo de oxígeno, reacciones REDOX, el consumo energético a través de Na⁺, K⁺ y ATPasas o el "turnover" de aminoácidos (Houghton F, 2004; Thompson JG, 1996; Trimarchi JR, 2000; Manes C, 1995; Gardner, 1996).

Las últimas investigaciones están definiendo perfiles génicos, proteicos y metabolómicos para intentar detectar cuál es el ovocito o embrión viable, entendiendo como tal su capacidad para implantar (Katz-Jaffe M., 2006; Patricio P., 2007; Brison D.R., 2007).

En el campo de la proteómica humana, ya se han publicado trabajos que muestran perfiles proteicos específicos que diferencian fetos cromosómicamente normales de fetos cromosómicamente anormales mediante el análisis de líquido amniótico (Wang TH, 2005). Recientemente, se ha conseguido diferenciar fetos cromosómicamente normales de aquellos afectados de trisomía 21 mediante el estudio del proteoma en líquido amniótico encontrando diferencias significativas entre ambos grupos (Tsangaris GT, 2006).

Seli y colaboradores publicaron en 2007 el primer estudio con un enfoque metabolómico para estudiar la viabilidad del embrión humano. Ellos utilizaron como plataforma de análisis la espectroscopia near-infrared y Raman para

analizar y comparar el perfil metabolómico utilizando medios condicionados provenientes de embriones que implantaron frente a los que no implantaron. Aunque no encontraron marcadores específicos si obtuvieron distintos espectros entre ambos grupos, siendo posible diferenciar fácilmente ambas poblaciones (Seli, 2007). El mismo grupo en 2008, publica la identificación de marcadores de viabilidad utilizando un análisis metabolómico mediante Resonancia Magnética Nuclear en un estudio retrospectivo realizado en 34 pacientes. Concluyen encontrar diferencias significativas en concentraciones de glutamato entre embriones viables procedentes de embarazos y/o partos, y aquellos procedentes de fallo de implantación (Seli, 2008).

La incidencia de anomalías cromosómicas en embriones humanos es extremadamente alta. Se estima que un 10% de los espermatozoides y un 20% de los ovocitos son aneuploides, lo que provocará a su vez la generación de embriones aneuploides (Zenzes MT, 1992; Munné S, 1994; Rubio C 2007). De hecho, entre el 23 y el 41% de los embriones generados en un tratamiento de FIV presentan aneuploidias cromosómicas (Boué J, 1985). La transferencia de embriones con estos desequilibrios genéticos finalizarán en fallos de implantación o abortos (Edwards RG, 1986) o recién nacidos portadores de cromosopatías. Conforme a la Ley 14/2006 sobre Reproducción Asistida, sólo en casos de edad materna avanzada, abortos de repetición, fallo de implantación, alteraciones del cariotipo en los progenitores y factor masculino muy severo podemos realizar un DGP para el screening de aneuploidias,

técnica invasiva que requiere de la biopsia del embrión para poder ser analizado, lo que limita su uso en la práctica clínica habitual. En nuestro estudio hemos utilizado los embriones sometidos a este tipo de técnica pues es la única vía de la que disponemos para tener la información cromosómica embrionaria requerida.

Somos conscientes que las mismas limitaciones que arrastra el DGP mediante sondas de inmunofluorescencia (Pehlivan T, 2003), estarían presentes también en nuestro estudio. Dichas limitaciones son por un lado el número de cromosomas analizados simultáneamente (Gutiérrez-Mateo, 2004), lo que podría provocar que algunos de los embriones considerados "normales" estuvieran afectados de anomalías no detectadas con las sondas utilizadas. Hemos estimado que dicha discordancia es de aproximadamente un 15% en los casos de edad materna avanzada y de un 20-25% en los casos de fallo de implantación y factor masculino severo. Por otro lado tenemos los casos de mosaicismo (Lora K, 2006) en los que la célula analizada por DPI puede no representar el contenido genómico del resto del embrión. La incidencia de mosaicismo estimada es de un 15%. Su repercusión ha sido muy discutida, el potencial de implantación de este tipo de embriones así como su capacidad de establecer una gestación viable no está aclarada todavía (Bielanska M., 2006).

En los cuatro primeros estudios realizados en esta tesis la instrumentación de análisis metabolómico que estamos utilizando es la espectrometría de masas asociada a UPLC. El sistema de UPLC ha sido diseñado para detectar partículas pequeñas y encontrar así perfiles de alta resolución. Por lo tanto este sistema es óptimo para el análisis de muestras de alta complejidad, como nuestros medios de cultivo, debido al alto poder de separación metabólica y resolución de picos.

El primer estudio se diseñó intentando ser muy restrictivos. Si se cumplía la discriminación entre embriones con alteraciones cromosómicas únicas y embriones normales, empezaríamos a creer en la posibilidad de nuestro método. La desventaja de este diseño fue el tiempo necesitado para recoger las muestras, pues la presencia de una única alteración cromosómica (Monosomía 16, 21 y 22) en embriones de forma aislada es muy poco frecuente. La gran mayoría de embriones diagnosticados por DGP presentan más de una alteración cromosómica, por lo que utilizar inicialmente estos embriones podía facilitar los resultados que buscábamos, pues cuantas más alteraciones cromosómicas presenta un embrión, a priori, más diferente debe ser respecto a embriones normales.

Los resultados obtenidos en este estudio (figura 9 y 10) muestran una tendencia de distribución distinta entre las muestras clasificadas como normales y las muestras anormales. En los score-plot obtenidos visualizamos la mayoría de

las muestras normales y los controles en la zona superior del eje de coordenadas, y las muestras anormales y algunas de las normales las encontramos en la zona inferior del eje.

En los tres primeros estudios observamos que el perfil metabólico de los medios de cultivo parece discriminar entre embriones cromosómicamente normales y anormales, Los score-plot, dónde cada punto representa un medio de cultivo embrionario, nos permite apreciar la relación que hay entre las muestras. La tendencia observada es que muestras procedentes de embriones diagnosticados normales mediante diagnóstico preimplantacional para screening de aneuploidías (DGP-AS) se concentran en un área del diagrama de coordenadas y muestras procedentes de embriones con diagnóstico de aneuploidías se concentran en un área distinta.

En el segundo estudio, dónde se hicieron grupos de alteraciones cromosómicas distintas, apreciamos que cuanto mayor es la alteración cromosómica embrionaria, mayor es la distancia y diferenciación metabólica entre embriones normales anormales. En el grupo de anormales con más de 3 alteraciones cromosómicas las diferencias observadas en los score-plot son más claras que en el grupo que presentan sólo monosomías. Esto puede significar que la suma de todos los metabolitos presentes en cada una de las muestras de uno y otro grupo tiene pesos similares, lo que provoca una distribución similar en el espacio.

También pudimos apreciar las limitaciones de nuestro diseño. Primero por la baja concentración de cada uno de los metabolitos presentes en las muestras, lo que nos hizo ser conscientes de la dificultad de diferenciar normalidad/anormalidad en base a diferencias que pudiendo ser significativas, estarían supeditadas a niveles cuantitativos de detección muy bajos. Esto dificulta a su vez, el poder encontrar una herramienta diagnóstica eficaz de detección en la que fuera posible trabajar en mínimas cantidades diferenciales. No estamos frente a la ausencia/presencia de un biomarcador determinado que nos diagnostica normalidad/anormalidad, sino ante la presencia de niveles distintos de un mismo biomarcador, con la dificultad sobreañadida de trabajar en mínimas concentraciones.

Esta limitación la podemos apreciar claramente, en el marcador 31105 (figura 18), que aparece elevado en todos los embriones anormales, en la mitad de los normales está elevado y en la otra mitad disminuido. Además, los niveles de un marcador considerado diferencial no aparecen de forma homogénea en la totalidad de las muestras normales. Ninguno de los marcadores individuales encontrados se presenta de la misma forma en todos los embriones considerados normales cuando los comparamos con la totalidad del grupo anormal; este hecho nos orientó hacia la necesidad de obtener una combinación de varios marcadores que hicieran posible la diferenciación de embriones anormales.

La segunda limitación era la ausencia de biomarcadores comunes entre los distintos grupos de anomalías cromosómicas, siendo en la mayoría de los casos muy específicos de una alteración concreta. Así observamos marcadores aumentados o disminuidos de forma homogénea respecto al grupo normal, como el marcador 31126 (figura 26) que se encuentra incrementado en todas las muestras con monosomía¹⁶ y disminuido en 2/3 de los normales; el marcador 31107 (figura 27) disminuido en todas las muestras con monosomía²² y aumentado en 2/3 de los normales; el marcador 3153 (figura 30), aumentado en todas las muestras con monosomía del cromosoma 13 y en todos los normales el valor es cercano al cero; el marcador 311 (figura 31), aumentado en todas las muestras con trisomía del cromosoma 13 y con valores cercanos al cero en todos los normales; o el marcador 315 (figura 32) con valores cercanos al cero en todas las muestras con trisomía del cromosoma 21 y 22, y aumentado en todos los normales. Estos resultados nos orientaron hacia la necesidad de crear grupos definidos de anormalidades, pues la contradicción de encontrar un mismo marcador contraponiendo dos alteraciones cromosómicas distintas nos hizo recapacitar sobre la complejidad metabólica a la que nos enfrentábamos, al mismo tiempo de la potencialidad y capacidad resolutive del método usado, y a la necesidad de correspondencia entre una alteración cromosómica determinada con los metabolitos que ese cromosoma en particular podía alterar.

Queremos matizar que todo el listado de marcadores obtenidos están identificados según su masa/carga y tiempos de retención pero no podemos saber a que analito corresponden, debido a la falta de datos en las bibliotecas metabolómicas y a que los distintos protocolos utilizados para la preparación de las muestras en los 3 primeros estudios realizados no contempló la identificación de los picos detectados.

El diseño del 4º estudio fue una consecuencia de lo anteriormente explicado. Decidimos iniciar la búsqueda de marcadores metabolómicos para una alteración cromosómica bien establecida y conocida como es la trisomía 21. El caproato es uno de los metabolitos encontrados elevados de forma significativa en embriones con trisomía 21. También conocido como ácido hexanoico, es un ácido graso que se encuentra de forma natural en las grasas vegetales y animales. Aunque poco es sabido del papel que juegan los ácidos grasos en el metabolismo de los preembriones, algunos estudios han demostrado que los embriones de ratón utilizan la betaoxidación para obtener energía (Dunning, 2010), y que los embriones humanos preimplantacionales utilizan activamente ácidos grasos en diferentes proporciones dependiendo de su estadio de desarrollo (Hagarty, 2006). Además se han detectado niveles elevados de 5-hidroxicaproato (caproatohidroxilado) en el líquido amniótico de fetos con Síndrome de Down de forma significativa, en comparación con los niveles en líquido amniótico de fetos normales (Baggot, 2008) provocados por un déficit de riboflavina. Por todo ello, podríamos sugerir que niveles elevados

de este ácido graso de cadena corta en los medios de cultivo de embriones humanos podría ser utilizado como uno de los posibles biomarcadores metabolómicos no invasivos de Trisomía 21, si futuras investigaciones correlacionan la presencia elevada de este ácido graso en embriones humanos preimplantacionales afectados de Síndrome de Down.

Otro de los metabolitos encontrados elevados de forma significativa en embriones con trisomía 21 es el sulfato de androsterona (SA). El SA ha sido descrito como uno de los metabolitos predominantes en suero materno y fetal, siendo incluso utilizado como marcador de progresión de gestación (Donaldson, 1991), pero este compuesto no ha sido relacionado previamente con el desarrollo inicial de embriones humanos. También conocido como sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), el SA es un esteroide sexual producido endógenamente relacionado con anterioridad con el Síndrome de Down. Algunos estudios muestran que los niveles de SA se encontraban disminuidos en el líquido amniótico de gestaciones con Síndrome de Down (Cuckle, 1991) y en suero materno de dichas gestaciones (Newby, 2000). El perfil transcripcional de los embriones procedentes de FIV en ganado vacuno ha identificado genes candidatos del metabolismo de los esteroides implicados en el desarrollo degenerativo (Huang, 2010). Además, el nivel de distintas hormonas esteroidales en los fluidos foliculares se han relacionado con distintas tasas de fertilización (Enien, 1995; Morgan, 1990; Vanluchene, 1991). Aunque existen distintas relaciones de los esteroides con la reproducción y gestación, el

papel de este esteroide en relación con la Trisomía 21 precisa de una mayor investigación.

Cabe destacar que varios aminoácidos, como prolina, treonina, alanina, metionina, valina y arginina, fueron encontrados de forma más abundante en los medios de cultivo de embriones con trisomía 21. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, este hecho sugiere que estos aminoácidos fueran usados más eficientemente por los embriones sanos, o bien para la biosíntesis de proteínas y/o para el metabolismo energético. Asimismo, en nuestro estudio metabolómico mediante NMR, los niveles de isoleucina/leucina estaban prácticamente ausentes en las muestras con trisomía 21 comparándolas con las muestras normales y con monosomía 21. Varios autores han señalado este hecho en los niveles de plasma de adultos con Síndrome de Down (Coppus 2007, 2010). También hay concordancia con la información publicada sobre los niveles discordantes de los componentes del metabolismo de los aminoácidos en niños con Síndrome de Down. Componentes como la metionina adenosyl sulfato (Obermann-Borst, 2010), la metionina (Pogribna, 2001) y otros, se hallaron alterados en niños con Síndrome de Down debido a la sobreexpresión de la enzima cistación Beta-sintasa (CBS), localizada en el cromosoma 21.

Varios autores han señalado la posible asociación entre el sexo y diferencias en el metabolismo embrionario (Gardner, 2010). Para asegurarnos

que el sexo de los embriones no había producido sesgos en nuestro estudio, realizamos adicionalmente una estadística comparativa entre los embriones XX y XY en nuestro cuarto estudio. Sólo la histidina fue estadísticamente distinta entre sexos de los embriones analizados. Es interesante conocer que el perfil de los aminoácidos de los embriones preimplantacionales bovinos también es distinto entre sexos (Sturmey, 2010).

La no coincidencia metabolómica entre el cuarto y el quinto estudio se explica, o por la distinta sensibilidad de ambos métodos para la detección de metabolitos, o por la gran heterogeneidad y variabilidad de metabolitos existente. Sabemos que aún no es posible analizar con una única plataforma analítica la diversidad de metabolitos complejos, sabemos de la complejidad de la metabolómica respecto a las demás ómicas, tanto por la gran cantidad de datos extraídos, superior a las otras ómicas, como a la complejidad química de los metabolitos, las relaciones y correlaciones entre ellos, y sabemos de la necesidad de análisis de los datos mediante dispositivos basados en un proceso de aprendizaje. Todos los estudios realizados hasta la fecha nos permiten concluir que es necesario tener un conocimiento más amplio de los metabolitos encontrados para poder obtener una herramienta diagnóstica eficaz y fiable, con una suficiente plausibilidad biológica que de fuerza a nuestros hallazgos. Crear conocimiento, es pues imprescindible para dar uso a los biomarcadores hallados, y confianza en el uso clínico de un diagnóstico no

invasivo que nos permita aumentar nuestro rendimiento en la práctica clínica diaria.

6. CONCLUSIONES

Tras los distintos estudios realizados podemos concluir que:

1. El perfil metabolómico global de embriones cromosómicamente normales es distinto al de embriones anormales, siendo estas diferencias más claras en embriones de día 3 que en día 5 de desarrollo, y más evidente aún en aquellos caóticos con mayor cantidad de anomalías cromosómicas.
2. No hemos podido encontrar la presencia de biomarcadores metabolómicos entre ambos grupos que nos diferencien embriones sanos y afectados, sino solo diferencias cuantitativas de determinados biomarcadores.
3. Mediante UPLC-MS, hemos encontrado biomarcadores metabolómicos estadísticamente diferenciales entre embriones normales y aquellos con trisomía 21. Dos de ellos son metabolitos conocidos como el caproato y sulfato de androsterona, los otros dos metabolitos son desconocidos, el X-15622 y el X-14808.
4. Mediante RMN, hemos descubierto biomarcadores metabolómicos diferenciales entre embriones afectados de trisomía 21 y embriones afectados de monosomía 21. La comparación de los espectros entre los distintos grupos revela diferencias en las regiones correspondientes a Leucina/Isoleucina.

7. BIBLIOGRAFÍA

Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, Van Opstal D. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2006 Jan; 21(1):223-33

Baggot PJ, Eliseo AJ Y, DeNicola N G, Kalamarides J A, Shoemaker J D. Organic Acid Concentrations in Amniotic Fluid Found in Normal and down Syndrome Pregnancies. *FetalDiagnTher* 2008; 23:245-248.

Bielanska M, Lin Tan S, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002;17(2):413-9.

Boué J, BouéA, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Ann Rev Genet* 1985, 14: 1-57.

Brison D.R., Hollywood K., Arnesen R., Goodacre R. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive análisis of the secretome using metabolomics footprinting. *ReproductiveBioMedicine Online* 2007; 15. 296-302.

Cabero Roura. Manual del Residente de Obstetricia y Ginecología. Tomo 1, Capítulo 113. 1ª Edición.1997.

Chang L., Chen P., Kuo P. and Chang L. Prenatal diagnosis of a fetus with megacystis and monosomy 21. *Prenat. Diagn.* 2001. 21,512-513.

Clouston H.J., Herbert M., Fenwick J., Murdoch A.P. and Wolstenholmr J. Cytogenetic analysis of human blastocysts. *Prenat. Diagn.* 2002. 22,1143-1152.

Coppus AM, Fekkes D, Verhoeven WM, Tuinier S, van Duijn CM. Plasma levels of nitric oxide related amino acids in demented subjects with Down syndrome are related to neopterinconcentrations.*Amino Acids.* 2010 ;38(3):923-8.

Coppus AW, Fekkes D, Verhoeven WM, Tuinier S, Egger JI, van Duijn CM. Plasma amino acids and neopterin in healthy persons with Down's syndrome.*J Neural Transm.* 2007;114(8):1041-5.

Cuckle HS, Wald NJ, Densem JW, Canick J, Abell KB.Br J ObstetGynaecol. Second trimester amniotic fluid oestriol, dehydroepiandrosteronesulphate, and human chorionic gonadotrophin levels in Down's syndrome. 1991;98:1160-2.

Cui Q., et al. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26. 162-164.

De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod.* 1990 Jul;5(5):519-28.

Donaldson A, Nicolini U, Symes EK, Rodeck CH, Tannirandorn Y. Changes in concentrations of cortisol, dehydroepiandrosteronesulphate and progesterone in fetal and maternal serum during pregnancy. *Clin Endocrinol* 1991;35:447-51.

Dunn W., Ellis D. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in analytical chemistry*, 2005; 24. 285-294.

Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biol Reprod.* 2010

Edwards RG. Causes of early embryonic loss in human pregnancy. *Hum Reprod* 1986; 1:185-189.

Enien WM, el Sahwy S, Harris CP, Seif MW, Elstein M. Human chorionic gonadotrophin and steroid concentrations in follicular fluid: the relationship to oocyte maturity and fertilization rates in stimulated and natural in-vitro fertilization cycles. *Hum Reprod* 1995;10:2840-4.

Epstein CJ. Down syndrome (trisomy 21). In: Stansbury JB, Wyngarden JB, Fredrickson DS (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 3d ed. McGraw-Hill, New York. 1995: 749–795.

Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal Chem* 2009;81: 6656-67

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol* 2002; 48. 155-71.

Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, Thornton S, Jenner L, Cater E, Brown A, Garcia-Bernardo J. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF?. *Fertil Steril.* 2010 Feb; 93(3):1006.e7-1006.e10.

- Gardner DK, Lane M. Alleviation of the 2 cell block and development to the blastocyst of CF1 mouse embryo: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reprod* 1996;11:2703-12.
- Gardner DK, Larman MG, Thouas GA. Sex-related physiology of the preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:539-47.
- Gardner et Sutherland. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling*. Third Edition. Oxford Monographs on Medical Genetics nº. 46. 2004.
- Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W., Harrigan G. and Kell D. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* 2004; 22. 245-252.
- Greber-Platzer S, Schatzmann-Turhani D, Wollenek G, Lubec G. Evidence against the current hypothesis of "gene dosage effects" of trisomy 21: ets-2, encoded on chromosome 21 is not overexpressed in hearts of patients with Down syndrome. *Biochem.Biophys. Res.Commun*. 1999. 254: 395-399.
- Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, Egozcue J, Munné S, Navarro J. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. *Hum Reprod*. 2004 Sep; 19(9):2118-25.
- Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, Hamilton M, Bhattacharya S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2006;21:766-73.
- Hassold T, Sherman S. Down syndrome: genetic recombination and origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet*. 2000 Feb; 57(2):95-100.
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000. 405:311-319.
- Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J and El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reprod Biomed Online* 2008;17:841-847.
- Hook EB. Chromosomes abnormalities: Prevalence, risk and recurrence. *Prenatal diagnosis and screening*. DJH Brock, CH Rodeck, MA Ferguson-Smith (eds.). Churchill Livingstone, Edinburg, 1992; 351:392.
- Houghton F, Leese H. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J ObstGynReprod Bio* 2004;115S; S92-S96.

Huang W, Yandell BS, Khatib H. Transcriptomic profiling of bovine IVF embryos revealed candidate genes and pathways involved in early embryonic development. *BMC Genomics*. 2010;11:23.

Holmes E., Nicholson J., Nicholls A., Lindon J., Connor S., Polley S., Connelly J. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1998; 44. 245-255.

Johnson H.E., Broadhurst D., Goodacre R., Smith A.R. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry* 2003; 62. 919-28.

Jolliffe, I. T. *Principle Component Análisis*, 2nd ed. ; Springer : New York, 2002.

Katz-Jaffe M., Gardner D., Schoolcraft W. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *FertilSteril*. 2006 Jan; 85(1):101-7

Kell DB. Revolutionary ideas come round again. *Nature*. 1999 , 25:397(6721):644

Krivchenia E, Hether CA, Edmonds LD, May DS, Guckenberger S. Comparative epidemiology of Down syndrome in two United States populations. *Am J Epidemiol* 1993; 137:815–828.

Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull AcadNatl Med*. 1959 Apr 7-14;143(11-12):256-65.

Lenz E.M., Wilson I.D. Analytical Strategies in Metabonomics. *J. Proteome Res*. 2007; 6. 443-458.

Lora K. Shahine, MD, and Marcelle I. Cedars, MD. Preimplantation genetic diagnosis does not increase pregnancy rates in patients at risk for aneuploidy. *Fertility and Sterility*, vol 85, n°1, January 2006.

Manes C, Lai NC. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J ReprodFertil* 1995, 104:69-75.

Meioboom, S. & Gill, D. *Rev. Sci. Instrum*. 1958, 20: 688.

Mir P, Rodrigo L, Cervero A et al. Validation of arrayCGH on day-4 single blastomeres from day-3 embryos diagnosed as abnormal by FISH. *Human Reproduction*, June 2010b, Abstracts book.

Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, Milán M, Mercader A, Buendía P, Delgado A, Pellicer A, Remohí J, Rubio C. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010;25:1812-1817.

Morgan PM, Boatman DE, Bavister BD. Relationships between follicular fluid steroid hormone concentrations, oocyte maturity, in vitro fertilization and embryonic development in the rhesus monkey. *Mol Reprod Dev* 1990;27:145-51.

Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993;8: 2185-2191.

Munné S, Grifo J, Cohen J *et al.* Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 1994; 55:150-159.

Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, Cinioglu C, Ary B, Cohen J. Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online*. 2006 Mar; 12(3):340-6

Newby D, Aitken DA, Howatson AG, Connor JM. Placental synthesis of oestriol in Down's syndrome pregnancies. *Placenta*. 2000;21:263-7.

Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29. 1181-9.

Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz 1H and 1H-13C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* 1995, 67: 793-811.

Obermann-Borst SA, Van Driel LM, Helbing WA, De Jonge R, Wildhagen MF, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Congenital heart defects and biomarkers of methylation in children: a case-control study. *Eur J Clin Invest*. 2011 Feb; 41(2):143-50.

Patricio P., Fragouli E., Bianchi V., Borini A., Wells D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15. 346-353.

Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10:315-22.

Pérez-Cano I, Martín J, Garda A L, Méndez C, Martínez C, Landeras J y Rubio C. Capítulo 17. Manual de esterilidad y Reproducción Humana. 2ª edición. McGraw Hill/Interamericana, Madrid, 2005.

Phelan M. Additional studies warranted to confirm monosomy 21. *Prenat. Diagn* 2002. 22,160-161.

Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P, James SJ. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *Am J HumGenet*. 2001 Jul; 69(1):88-95

Rubio C, Martín J.L., Rodrigo L., Cervero A., Milan M., Pérez I., Florensa M., Bronet F., Martínez M.C., Bellver J., Remohí J. Capítulo 33. Diagnóstico Genético Preimplantacional. Manual práctico de esterilidad y Reproducción Humana. 4ª edición. Editorial médica panamericana, Madrid, 2012.

Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, Viloría T, De los Santos MJ, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Impact of chromosomal abnormalities on Preimplantation embryo development. *PrenatDiagn*. 2007 27:748-56.

Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum. Reprod*. 2003;18,182-188.

Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, et al. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *FertilSteril* 2008; Aug 8.

Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT Jr. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *FertilSteril*. 2011 Sep;96(3):638-40

Scott R., Seli E., Miller K., Sakkas D., Scott K., Burns D. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *FertilSteril* 2008; 90. 77-83.

Seli E., Sacas D., Scott C., Kwok S., Rosendahl S., Burns D. Non invasive metabolomics profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *FertylSteril* 2007; 88. 1350-7.

Seli E., Botros L., Sakkas D., and Burns D.H. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *FertylSteril* 2008; 90. 2183-89.

Sha W, da Costa KA, Fischer LM, Milburn MV, Lawton KA, Berger A, Jia W, Zeisel SH. Metabolomic profiling can predict which humans will develop liver dysfunction when deprived of dietary choline. *Faseb J* 2010; 24: 2962-75.

Silke and Schrader. Mass spectrometry in proteomics and metabolomics. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*. 2011; Vol 22, supl 1.

Singh R, Sinclair KD. Metabolomics: approach to assessing oocyte and embryo quality, *Theriogenology*. 2007 Sep 1; 68 Suppl 1:S56-62.

Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, Michiels A, Van Landuyt L, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod Update*. 2003 Jul-Aug; 9(4):319-30

Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *MolReprod Dev*. 2010;77:285-96.

Tarkowski AK. An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966; 5:394-400.

Tassone F, Lucas R, Slavov D, Kavsan V, Crnic L, Gardiner K. Gene expression relevant to Down syndrome: problems and approaches. *J. Neural. Transm.* 1999. 57:179-195.

Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox I, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J ReprodFertil* 1996;106:299-306.

Torfs C.P. and Christianson R.E. Anomalies in Down Syndrome Individuals in a large population-based registry. *Am. J. Med. Genet.* 1998, 77, 431-438.

Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJS, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *BiolReprod* 2000;62:1866-74.

Trygg, J. O2-PLS for qualitative and quantitative analysis in multivariate calibration. *J. Chemom.* 2002, 16, 283-293.

Trygg, J; Wold, S. Orthogonal Projections to Latent Structures. *JChemom* 2002, 16 (3): 119-128.

Tsangaris GT, Karamessinis P, Kolialexi A, Garbis SD, Antsaklis A, Mavrou A, Fountoulakis M. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics* 2006.

Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig, Roessner-Tunali U, Willmitzer L, Fernie A.R. Parallel analysis of transcript and metabolic profile. *EMBO Rep.* 2003; 4. 989-992.

Vanluchene E, Hinting A, Dhont M, De Sutter P, Van Maele G, Vandekerckhove D. Follicular fluid steroid levels in relation to oocyte maturity and in vitro fertilization. *J SteroidBiochemMolBiol* 1991;38(1):83-7.

Waidyanathan S. et al. Explanatory optimisation of protein mass spectrometry via genetic search. *Anal.Chem.* 2003; 75.

Wang TH, Chang YL, Peng HH, Wang ST, Lu HW, Teng SH, Chang SD, Wang HS. Rapid detection of fetal aneuploidy using proteomics approaches on amniotic fluid supernatant. *PrenatDiagn* 2005.

WeatherallDJ. The new genetics and clinical practice. Third edition. Oxford: Oxford University Press, 1991.

Whitfield P.D., German A. and Noble P. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. *British Journal of Nutrition.* 2004; 92. 549-555.

Wishart D.S., et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35. D521-D526.

Wold S., et al. The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses. *J. Sci. Stat. Comput.* 1984; 5. 735-743.

Zenzes MT, Casper RF. Cytogenetic of human oocyte, zygotes and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet* 1992; 88:367-375.

8. APÉNDICE DOCUMENTAL

Artículo: Differential Metabolic Profiling of non pure Trisomy 21 Human Preimplantation Embryos.

Immaculada Sánchez-Ribas M.D^{1,2}, Marissa Riqueros B.Sc¹, Pablo Vime Ph.D⁴, Leonor Puchades-Carrasco B.Sc³, Thomas Jönsson Ph.D⁵, Antonio Pineda-Lucena Ph.D³, Agustín Ballesteros M.D¹, Francisco Domínguez Ph.D^{2*} and Carlos Simón M.D^{2*}.

*These authors contributed equally.

1IVI Barcelona, Barcelona Spain; 2Fundación IVI-Instituto Universitario IVI-University of Valencia, INCLIVA, Valencia, Spain; 3CIPF, Valencia, Spain.4 IVI Sevilla, Sevilla Spain. 5Metabolon Inc.

Premio ICIRA 2009: Primer premio en la categoría "Innovación en el tratamiento de Reproducción Asistida".

Título del trabajo: Perfil Metabolómico en Preembriones Humanos como potencial marcador no invasivo de aneuploidías en Diagnóstico Preimplantacional Humano.

Póster: Nuclear Magnetic Resonance analysis of embryo spent culture media from human trisomy 21, monosomy 21 and normal day 3 embryos reveal differences in their early metabolism.

SGI 59th Annual Scientific Meeting, San Diego 2012.

Póster: Metabolic profiling of human trisomy 21 and normal day 3 IVF embryos reveal differences in their early metabolism.

SGI 58th Annual Scientific Meeting, Miami 2011.

Conferencia: Non-invasive assesment of embryos: Metabolomics.

III INTERNATIONAL IVI CONGRESS, Madrid 2009.

Conferencia: Metabolomic profile of culture media from human embryos.

Could be a novel diagnostic tool for the screening of aneuploidies?

11th Congress on Controversies in Obstetrics, Gynaecology & Infertility (COGI).

Paris 2008.

Presentación oral: Metabolomic Profile as a Novel Non-Invasive Tool for Human Embryo Aneuploidy Assessment.

64rd annual meeting ASRM. San Francisco 2008.