

Genómica funcional en embriones y ovocitos humanos individuales

Raúl Eduardo Piña-Aguilar*

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yuc., México

RESUMEN

Durante tres décadas, el análisis de embriones y ovocitos humanos ha consistido principalmente, en su evaluación morfológica o citogenética; paulatinamente se han incorporado técnicas moleculares como FISH y PCR. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos de amplificación de RNA, usando células individuales, ha permitido analizar la expresión génica en ovocitos, complejos címulo-ovocito y embriones de preimplantación. Estas técnicas revolucionarán el estudio de la biología reproductiva humana y la reproducción asistida, permitiendo un análisis objetivo y poderoso de los complejos procesos e interacciones del inicio de la vida, explicando las causas de la infertilidad humana y generando nuevas terapéuticas para ésta.

Palabras clave:

Embrión humano, expresión génica, genómica funcional, ovocito, RNA, transcriptoma

SUMMARY

During three decades human embryo and oocyte analyses have been performed based on morphological or cytogenetical evaluations; molecular techniques, like FISH and PCR, have been gradually incorporated. However, the development of new techniques of individual cell RNA amplification has allowed the analysis of gene expression in oocytes, cumulus-oocyte complex and preimplantation embryos. These techniques will change radically the study of human reproductive biology and assisted reproduction, allowing a powerful and objective analysis of the complex processes and the interactions that may explain the causes of infertility and generate new therapeutics.

Keywords:

Functional genomics, gene expression, human embryo, oocyte, RNA, transcriptome

Introducción

Desde el desarrollo de la fertilización *in vitro* en la década de los setentas y el nacimiento del primer niño por fertilización *in vitro* en 1978, la reproducción asistida ha requerido la clasificación de los embriones; ésta se ha dado principalmente a nivel morfológico y hoy en día sigue siendo la más utilizada. No obstante, se ha requerido la incorporación de otras técnicas que permitan acceder al estatus fisiológico y la capacidad de desarrollo e implantación del embrión. Con este fin se han incorporado técnicas moleculares como hibridación fluorescente *in situ* (FISH) e hibridación genómica comparativa (CGH), y otras basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (RT-PCR y PCR en tiempo real). Recientemente se ha incorporado el uso de microarreglos de cDNA u oligonucleótidos y el análisis serial de expresión génica (SAGE).

Sin embargo, el análisis de expresión génica a gran escala en pocas células o células individuales, como embriones y ovocitos representa una dificultad técnica difícil de sortear. Esto se debe a que la cantidad de RNA necesario para hibridizar los

microarreglos, es generalmente de 50-200 mg y una célula contiene aproximadamente 10-30 pg; con esta consideración, el número necesario de células requerido para ser usada en microarreglos sin amplificación de RNA es 1.6×10^6 a 2×10^7 ; haciendo necesario pasos previos de amplificación a la hibridación. Por lo tanto, es hasta tres décadas después del inicio de la fertilización *in vitro* que hemos podido comenzar a estudiar los programas de expresión génica de embriones y gametos humanos a nivel individual.

Expresión génica en ovocitos y embriones

Aunque existen informes desde la década de los noventas de la expresión génica en embriones humanos, sólo se estudiaron en ellos los genes individuales y se requirió hacer grupos de embriones y ovocitos para su análisis. Para utilizar células individuales, trabajos pioneros construyeron bibliotecas de cDNA de ovocitos y embriones humanos individuales¹ utilizando la tecnología SMART® para la amplificación de mRNAs. Esta técnica consiste en la síntesis de cDNA y en la

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Raúl Eduardo Piña-Aguilar. Apartado postal 2-1225, Av. Itzáes 498, 19700 Mérida, Yuc., México, Tel.: (52 999) 924 0554, Fax: (52 999) 923 3297. Correo electrónico: rpina@finedicina.uady.mx, rpina.a@hotmail.com.

amplificación en un solo tubo evitando la pérdida de material, con lo cual permitió su combinación con otras técnicas como el SAGE para estudiar la expresión génica de ovocitos en diferentes etapas de maduración.²

Bermúdez et al.³ informaron en el año 2002 el primer estudio de expresión génica en ovocitos individuales y pool de estos a gran escala, utilizando microarreglos de 8,500 Expressed Sequence Tags (EST) y amplificación lineal de RNA previa a la hibridación.³ Encontraron 1361 transcritos constantes en todos los ovocitos de los cuales 406 habían sido confirmados de manera independiente con otros métodos. Adicionalmente, validaron la expresión en ovocitos individuales contra grupos de ovocitos, encontrándola relativamente igual. Sin embargo, los ovocitos usados en este trabajo fueron descartados de un programa de fertilización *in vitro* por fallas en la fertilización, lo cual podría no reflejar el programa de desarrollo normal.

Dobson et al.⁴ utilizando un microarreglo de cDNA de aproximadamente 29,778 genes independientes, columnas de purificación y amplificación lineal de RNA, realizaron un seguimiento completo del desarrollo humano preimplantación utilizando ovocitos inmaduros, maduros y embriones de 1 día (2 células), de 2 días (3 y 4 células) y de 3 días (8 células);⁴ informaron 1,896 genes con expresión diferencial. Demostraron que, a diferencia de lo que se creía, la mayoría de los genes durante el desarrollo embrionario están regulados a la baja y que gran parte de los genes con expresión diferencial son de función desconocida.

Con particular importancia para la infertilidad y los programas de fertilización *in vitro*, encontraron que el programa transcripcional está bien establecido en el día 3, incluso en embriones con arresto prematuro, probando que un fallo en la activación del genoma no está relacionado con pérdida embrionaria temprana. Los datos encontrados en este estudio son de particular relevancia por provenir de ovocitos y embriones sin fallos previos en ciclos de reproducción asistida (enfermedad tubárica, factor masculino o ovocitos de programas de donación), probablemente reflejando un programa transcripcional del embrión y ovocito "fisiológico".

Li et al.⁵ con un microarreglo casero de 9,600 cDNA y una estrategia de amplificación diferente, basada en PCR, reportaron la presencia de 184, 29 y 65 genes en ovocitos, embriones de 4 y 8 células respectivamente.⁵ Encontraron genes como la isoenzima B (cardiaca) de la lactato deshidrogenasa y proteínas SUMO (small ubiquitin like modifiers) en todos los ovocitos y embriones, expresión validada por RT-PCR.

Assou y cols.⁶ a pesar de no haber usado células individuales, han conseguido ampliar nuestro conocimiento, informando los programas transcripcionales involucrados en la maduración ovocitaria (producida con hormonas FSH y LH humanas recombinantes), con el estudio de grupos de ovocitos inmaduros, maduros y las células de cúmulos independientes, utilizando por primera vez un microarreglo de oligonucleótidos con cobertura del genoma completo (Affymetrix[®]), ya que contiene aproximadamente 39,000 genes probados o predichos. Obtuvieron una expresión de 10,869 genes en vesícula germinal, 9,682 en metafase I, 5,633 en metafase II y 10,610 en células del cúmulo. Entre estos se encuentran genes específicos de células germinales femeninas de mamíferos como DAZL, VASA o STELLA, además de genes relacionados con la meiosis,

como MPF, ciclinas y "checkpoints" del huso, confirmando los resultados anteriores de expresión génica con otras metodologías. De manera interesante se encontró que genes expresados en células germinales masculinas también se encuentran en ovocitos en todas las etapas de maduración como son AURKC, SOX30 y SPAG16. También se encontró sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores (IL-4, FGF9, FG14, APRIL), factores antiapoptóticos (BCL2L10, BNIP1 y survivina), factores de transcripción (SOX15, OTX2 y FOXR1) y el transportador de glucosa (SLC5A11).

Kocabas et al.⁷ utilizando microarreglos de genoma completo (Affymetrix[®]) y una combinación de amplificación con tecnología SMART II[®] basada en PCR y promotores T7, estudiaron el transcriptoma de ovocitos de pacientes jóvenes, reproductivamente sanas con ciclos ovulatorios regulares y con factor masculino como causa de la infertilidad, tratando de generar con ello datos basales de la expresión en ovocitos. Encontraron 5,331 transcritos regulados al alza y 7,074 a la baja comparados con células somáticas; es interesante su hallazgo de más 1,430 genes regulados al alza con función desconocida y la existencia de un gran número de genes comunes entre ovocitos y células embrionarias humanas, sugiriendo que éstas últimas son capaces de diferenciarse en ovocitos.⁷

Perspectivas

Considerando el contexto actual donde gran parte de los esfuerzos en reproducción están involucrados con la transferencia somática nuclear terapéutica en humanos, con todas las implicaciones éticas y sociales que conlleva; es necesario volver a tratar de dilucidar el desarrollo humano preimplantación normal y de entender cuales son los procesos que lo componen y como se interrelacionan. En este contexto, los estudios de la expresión génica nos han permitido (con resultados propios) encontrar un nuevo papel del espermatozoide en el desarrollo del embrión humano,⁸ desempeñando un papel más allá del genoma paterno y siendo una posible explicación en casos de infertilidad idiopática masculina.

La promesa futura de la reproducción asistida de "transferir un embrión único" que se desarrolle normalmente, solo podrá llegar encontrando los biomarcadores del potencial de desarrollo que permitan correlacionar morfología con expresión génica en el embrión normal y anormal, descubrir y modificar los genes necesarios para la implantación e involucrar los demás actores del desarrollo embrionario humano como son el proteoma, el metaboloma y los microRNAs.

Referencias

1. Adjaye J, Bolton V, Monk M. Developmental expression of specific genes detected in high-quality cDNA libraries from single human preimplantation embryos. *Gene* 1999;237:373-383.
2. Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF ID, 3 rd, Stanton JA, et al. Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics* 2000;63:13-24.
3. Bermudez MG, Wells D, Malter H, Munne S, Cohen J, Steuerwald NM. Expression profiles of individual human oocytes using microarray technology.

- Reprod Biomed Online 2004;8:325-337.
4. **Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq CT, et al.** The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum Mol Genet* 2004;13:1461-1470.
 5. **Li SST, Liu YH, Tseng CN, Singh S.** Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:48-53.
 6. **Assou S, Anahory T, Pantesco V, Carroué TL, Pellestor F, Klein B, et al.** The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 2006;21:1705-1719.
 7. **Kocabas AM, Crosby J, Ross PJ, Otu HH, Beyhan Z, Can H, et al.** The transcriptome of human oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1427-1432.
 8. **Piña-Aguilar RE, López-Saucedo J, Dumonteil E.** Contribución del espermatozoide al transcriptoma del embrión humano preimplantación. Memorias ID Congreso Regional de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste. 5MBB. Mérida, Yucatán 20-22 Sep, 2006.