

CODIFICACIÓ D'EMBRIONS DE RATOLÍ AMB MICRODISPOSITIUS DE POLISILICI

Sergi Novo,¹ Rodrigo Gómez,² Leonard Barrios,¹ Marta Duch,² Jaume Esteve,² Jose Antonio Plaza,² Josep Santaló,¹ Carme Nogués¹ i Elena Ibáñez¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. elena.ibanez@uab.cat.

²Centro Nacional de Microelectrónica.

Resum

L'alt nombre de pacients en les clíniques de reproducció assistida implica la simultaneïtat de cicles de reproducció independents, que indueixen possibles errors de traçabilitat del material reproductiu. Diverses societats científiques i empreses privades han desenvolupat mecanismes que minimitzen l'impacte d'aquest tipus d'errors, però que no l'aboleixen definitivament. En aquest treball es presenta un nou sistema per a la identificació directa del material reproductiu, basat en la introducció de micropartícules de polisilici codificades (microdispositius) en l'espai perivitellí d'embrions. S'ha comprovat que aquest sistema no afecta la capacitat de desenvolupament preimplantacional *in vitro* dels embrions de ratolí i que la introducció de quatre microdispositius per embrió permet la identificació correcta de més del 95 % dels embrions codificats.

Paraules clau: embrions de ratolí, microdispositius de polisilici.

Abstract

The increasingly high number of patients in assisted reproduction centers implies that independent reproductive cycles are performed simultaneously, leading to possible traceability problems of the reproductive samples. Scientific societies and private companies have developed several mechanisms that minimize the impact of traceability errors but do not abolish it completely. In this work we present a system for the direct identification of the reproductive samples, which is based on the introduction of encoded polysilicon microparticles (microdevices) in the perivitelline space of the embryos. This approach has been tested on mouse embryos and no impact on the *in vitro* preimplantation development has been found. Moreover, the introduction of 4 microdevices per embryo allows the correct identification of over 95% of the coded embryos.

Key words: murine embryo, polysilicon microparticles.

INTRODUCCIÓ

L'alt nombre de pacients que reben les clíniques de reproducció assistida (RA) fa impossible individualitzar totalment el procés i destinar un lloc de treball, emmagatzematge i incubació per a cada mostra. Això implica la simultaneïtat de cicles de reproducció independents, fet que indueix possibles errors en la correcta traçabilitat de les mostres. Aquests errors s'han mostrat, a causa del naixement de nens amb fenotip marcadament diferent al dels pares biològics (Bender, 2003). Probablement casos similars haurien passat desapercebuts en cas de no presentar aquesta evidència per ser detectats (Vince, 2002). Per evitar al màxim aquests errors, societats científiques com

l'European Society for Human Reproduction & Embryology (ESHRE) proposen, en les seves guies de bona pràctica, que tota acció realitzada durant un cas clínic sigui comprovada per una segona persona (Magli *et al.*, 2008). L'aplicació d'aquesta pràctica suposa un augment del personal i, en conseqüència, del cost del procés, però no evita totalment l'error, ja que el control el continua realitzant una altra persona.

Les tendències per solucionar aquest problema es dirigeixen envers l'automatització del procés de reconeixement i verificació de complementarietat de les mostres. Diverses empreses del Regne Unit (IMT Internacional Limited, Research Instruments) comercialitzen productes promoguts per la Human Fertil-

zation and Embryology Authority basats en l'etiquetatge i la identificació automàtica del material de laboratori emprat per a cada cas clínic. Aquestes eines, però, no eliminen el possible error, ja que el material reproductiu ha d'anar canviant de recipient durant el procés. Una possible solució seria idear un marcatge que viatgi amb l'embrió mateix durant tot l'itinerari.

En aquest treball es descriu un possible mètode d'identificació directa d'embrions, a través de la microinjecció de microdispositius de polisilici, material emprat comunament en microelectrònica (Lin *et al.*, 1989), en l'espai perivitellí de zigots de ratolí. Per tal de determinar la validesa d'aquesta aproximació com a sistema de codificació dels embrions, es van estudiar els següents paràmetres: *a*) efecte de la presència del microdispositiu en el potencial de desenvolupament *in vitro* dels embrions, *b*) retenció del microdispositiu en l'espai perivitellí dels embrions durant tot el desenvolupament preimplantacional, *c*) identificació correcta de l'embrió al microscopi mitjançant el codi del microdispositiu i *d*) alliberament del microdispositiu un cop l'embrió eclosiona i es desprèn de la zona pel·lúcida.

MATERIAL I MÈTODES

Els protocols emprats en aquest estudi han estat revisats i aprovats per la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la UAB i pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya.

Fabricació i característiques dels microdispositius

La fabricació dels microdispositius es va dur a terme al Centro Nacional de Microelectrònica (CNM), combinant tècniques de microelectrònica i microfabricació. Es van utilitzar tres tipus de microdispositius, amb diferents formes, dimensions i sistemes de

codificació binària, amb 256 possibles combinacions cadascun: el microdispositiu de tipus *a*, cilíndric, amb 3 µm de diàmetre i 10 µm de longitud i una codificació de 8 bits basada en entrades i sortides; el microdispositiu de tipus *b*, rectangular, amb dimensions de 6 × 10 µm i una codificació de 8 bits basada en entrades i sortides, i el microdispositiu de tipus *c*, rectangular, amb dimensions de 6 × 10 µm i una codificació de 8 bits basada en orificis (vegeu la figura 1).

Obtenció dels embrions de ratolí

Es van utilitzar zigots de femelles de ratolí B6C-BAF1 (C57BL/C6JxCBA7J) superovulades, creuades i sacrificades 25 hores després de la inducció de l'ovulació. Els embrions alliberats de l'ampolla van ser decumulats amb medi de manipulació mKSOM-H (Biggers *et al.*, 2000) suplementat amb hialuronidasa (156 U/ml). Després de ser rentats amb mKSOM-H, es van mantenir en medi de cultiu KSOM (EmbryoMax, Millipore) a 37 °C i 5 % CO₂.

Microinjecció dels embrions

Per codificar els embrions, els microdispositius es van injectar a l'espai perivitellí dels zigots emprant tècniques de micromanipulació. En una primera sèrie d'experiments, es va microinjectar un sol tipus de microdispositiu per embrió. Un cop seleccionat el microdispositiu més òptim, es va dur a terme una segona sèrie microinjectant fins a quatre microdispositius per embrió.

Cultiu d'embrions i criteris de valoració del sistema de codificació

En cada experiment es va cultivar, en paral·lel als embrions microinjectats, un grup d'embrions no microinjectats com a control de desenvolupament. Ca-

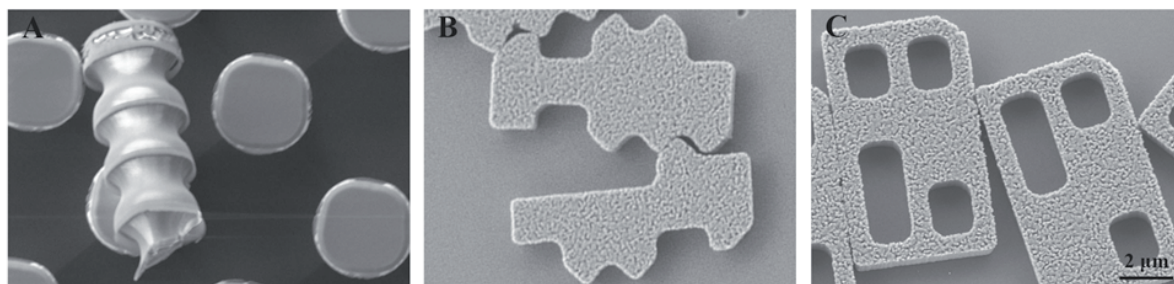


Figura 1. Microdispositius de polisilici visualitzats en el microscopi electrònic de rastreig. A) microdispositiu de tipus *a*; B) microdispositiu de tipus *b*; C) microdispositiu de tipus *c*.

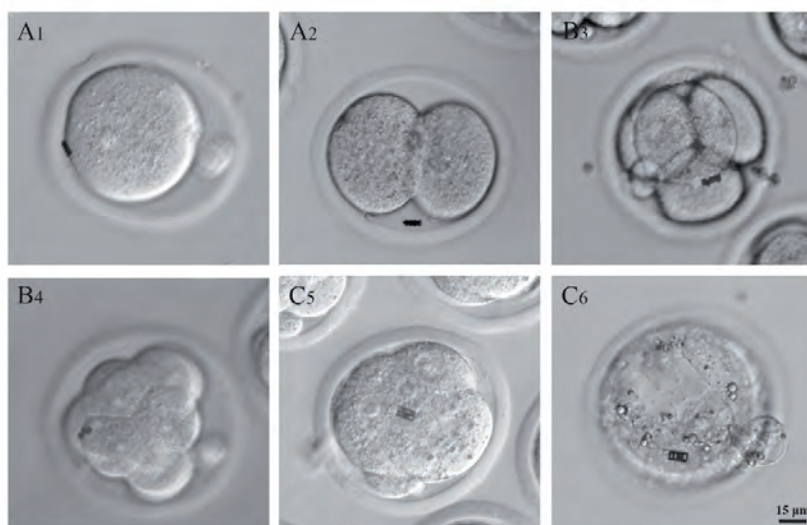


Figura 2. Desenvolupament embrionari en presència de microdispositius de polisilici a l'espai perivitellí. A) embrions en estadi d'una cèl·lula (A1) i de 2 cèl·lules (A2) amb un microdispositiu de tipus *a*; B) embrions en estadi de 4 cèl·lules (B3) i de 8 cèl·lules (B4) amb un microdispositiu de tipus *b*; C) embrions en estadi de mórula (C5) i de blastocist (C6) amb un microdispositiu *c*.

da 24 hores es va valorar l'estadi de desenvolupament de cada grup i, en els cas dels embrions microinjectats, es va valorar també la presència del microdispositiu a l'espai perivitellí (taxa de retenció) i la identificabilitat del codi del microdispositiu (lectura òptica d'almenys un dels microdispositius per embrió). En el cas dels embrions microinjectats amb més d'un dispositiu, es va valorar també l'alliberament dels microdispositius en els blastocists eclosionats (taxa d'alliberament). Tenint en compte que no

tots els embrions cultivats *in vitro* aconseguixen eclosionar, per tal d'augmentar la mida de la mostra es va digerir amb pronasa (35 U/ml) la zona pellúcida dels embrions que no eren capaços de desprendre's en la seva totalitat de la zona en el moment de l'eclosió.

Anàlisi estadística dels resultats

Es van realitzar tres rèpliques per cada grup. Els re-

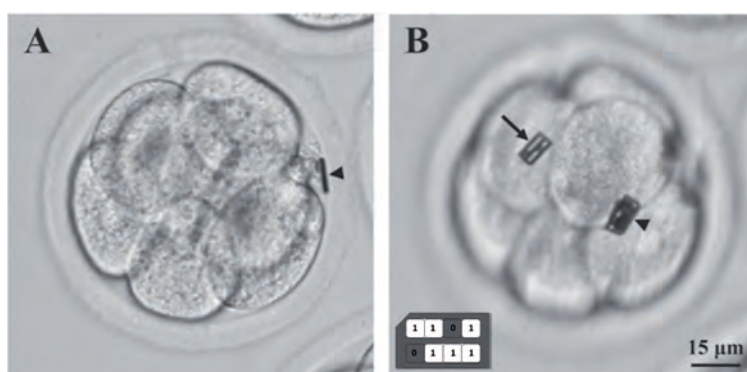


Figura 3. Mecanisme d'identificabilitat embrionària. Embrió en estadi de 8 cèl·lules amb 4 microdispositius de tipus *c* i identificació positiva. A) Enfocament en el pla mitjà de l'embrió, on es pot observar un microdispositiu amb orientació perpendicular al pla d'enfocament (cap de fletxa). B) Pla focal on s'observen dos microdispositius superposats (cap de fletxa) i un microdispositiu llegible correctament (fletxa). En l'*insert* es mostra una representació gràfica del codi del microdispositiu llegible.

Taula 1. Desenvolupament preimplantacional *in vitro* i taxa de retenció en embrions microinjectats amb diferents models de microdispositius

Grups d'embrions	Tipus de microdispositiu	Nre. embrions microinjectats	Nre. blastocists (%)	Taxa de retenció*
Control	–	76	64 (84,2 %)	–
Injectats	<i>a</i>	80	68 (85,0 %)	63 (92,6 %)
	<i>b</i>	80	63 (78,8 %)	59 (93,7 %)
	<i>c</i>	80	66 (82,5 %)	66 (100 %)

* Nombre de blastocists que mantenen el microdispositiu microinjectat

Taula 2. Desenvolupament preimplantacional *in vitro*, taxa de retenció i taxa d'alliberament en embrions microinjectats amb diferent nombre de microdispositius de tipus *c* per embrió

Grups d'embrions	Nre. de microdispositius	Nre. d'embrions microinjectats	Nre. de blastocists (%)	Taxa de retenció*	Taxa d'alliberament**
Control	–	125	108 (86,4 %)	–	–
Injectats	1	80	66 (82,5 %)	66 (100 %) ^a	–
	2	80	70 (87,5 %)	58 (82,5 %) ^b	44 (75,9 %) ^a
	3	80	68 (85,0 %)	57 (83,8 %) ^b	31 (54,4 %) ^b
	4	80	76 (95,0 %)	63 (82,9 %) ^b	11 (17,5 %) ^c

*Nombre de blastocists que mantenen tots els microdispositius microinjectats.

**Nombre de blastocists eclusionats lliures del total de microdispositius microinjectats.

^{a, b, c}Diferents superíndexs indiquen diferències significatives entre les diverses files de la mateixa columna ($p \leq 0,05$)

sultats van ser analitzats mitjançant el test χ^2 , considerant significatius els valors de $p \leq 0,05$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Selecció del tipus de microdispositiu òptim per a la codificació d'embrions

Per seleccionar el millor tipus de microdispositiu per al desenvolupament del sistema de codificació d'embrions plantejat, es van tenir en compte diferents aspectes. Un dels factors imprescindibles a valorar va ser la viabilitat embrionària, i en comparar els grups d'embrions microinjectats amb diferents tipus de microdispositius amb el grup d'embrions control no es van observar diferències significatives en el seu desenvolupament fins a blastocist (vegeu la taula 1 i la figura 2). Per tant, aquests resultats indiquen que ni el procés de microinjecció ni el microdispositiu mateix de polisilici present a l'espai perivitellí afecten la capacitat de desenvolupament preimplantacional *in vitro* dels embrions.

Un altre dels paràmetres avaluats va ser la retenció del microdispositiu a l'espai perivitellí de l'embrió durant tot el període de cultiu *in vitro*, i no es van detectar diferències significatives entre els diferents models de microdispositius (vegeu la taula 1).

Finalment, i pel que fa a la identificabilitat embrionària, tampoc no es van trobar diferències significatives entre els embrions microinjectats amb els diferents tipus de microdispositius (*a*: 55,6%; *b*: 44,8%; *c*: 45,8%), fet que indica que la forma i el model de codificació dels microdispositius no influeix en la taxa d'identificació embrionària. És important destacar que la identificació del codi dels microdispositius es va dur a terme sense la manipulació dels embrions i modificant el pla focal per simular una hipotètica lectura ràpida mitjançant un sistema automatitzat (vegeu la figura 3). Segurament, si els embrions haguessin estat manipulats per obtenir la correcta orientació del microdispositiu, les taxes d'identificació embrionària haurien arribat al 100 %.

Malgrat que no es van trobar diferències significatives entre els diferents tipus de microdispositius per a cap dels paràmetres analitzats, es va optar per seleccionar el microdispositiu de tipus *c* per continuar amb el desenvolupament d'aquest sistema de codificació, a causa de la seva fàcil lectura.

Millora de les taxes d'identificabilitat embrionària

Un cop identificat el tipus de microdispositiu òptim per a la codificació dels embrions, es va dur a terme una segona sèrie d'experiments per intentar millorar la taxa d'identificabilitat embrionària, partint de la

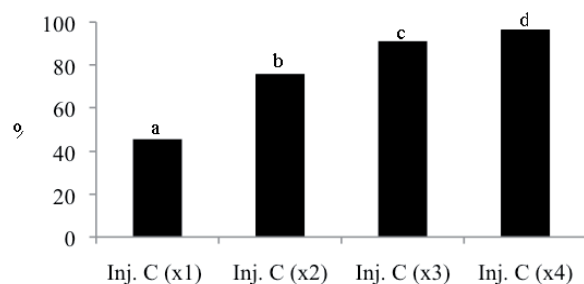


Figura 4. Taxa d'identificabilitat embrionària. Freqüència d'identificabilitat positiva del total d'embrions analitzats en diferents estadis de desenvolupament embrionari, per als embrions marcats amb diferent nombre de microdispositius de tipus *c*. Els diferents superíndexs sobre les columnes (a, b, c, d) indiquen diferències significatives ($p < 0,05$).

suposició que l'augment del nombre de microdispositius per embrió augmentaria significativament aquesta taxa. Així, per assolir l'objectiu d'una identificabilitat embrionària pràcticament total, es van plantejar grups d'embrions microinjectats fins amb quatre microdispositius del tipus *c* per embrió.

L'increment de fins a quatre microdispositius en l'espai perivitellí no va afectar el desenvolupament preimplantacional *in vitro* dels embrions portadors. Pel que fa a la retenció del microdispositiu en l'espai perivitellí, es va detectar que a partir de la introducció de dos microdispositius per embrió, la taxa disminueix significativament fins aproximadament el 83 % i es mantenia al voltant d'aquest valor en augmentar el nombre de microdispositius per embrió (vegeu la taula 2).

Pel que fa a la identificabilitat embrionària, es va comprovar que augmentava significativament en incrementar el nombre de microdispositius per embrió. Es va aconseguir una taxa d'identificabilitat quasi total, amb un 96,5 % d'identificació positiva, amb quatre microdispositius de tipus *c* per embrió (vegeu la figura 4). Així, l'augment del nombre de microdispositius presents a l'espai perivitellí incrementa significativament la probabilitat que almenys un quedi col·locat en una orientació determinada que permeti la seva lectura correcta i, conseqüentment, la bona identificació de l'embrió, sense haver de manipular-lo.

Finalment, es va valorar un factor considerat important amb vista a la possible aplicació d'aquest sistema de codificació en embrions humans: l'alliberament dels microdispositius en els embrions eclosionats. La importància d'aquesta valoració està determinada perquè l'objectiu del sistema de traçabilitat plantejat en aquest estudi és el de mantenir identificat l'embrió durant el seu cultiu *in vitro*, i que un cop sigui transferit a la pacient quedi lliure dels microdispositius. Es va observar que a mesura que augmentava el nombre de microdispositius en l'espai perivitellí dels embrions, major era el nombre d'embrions incapaços de desprendre's de la totalitat dels microdispositius introduïts (vegeu la taula 2).

Així, podem concloure que el sistema de codificació embrionària plantejat demostra la seva validesa, basant-nos en la taxa d'identificació assolida. No obstant això, actualment presenta dos punts febles, com són la baixa taxa d'alliberament dels microdispositius després de l'eclosió, i el fet que el mecanisme de marcatge per micromanipulació suposa un tractament embrionari individualitzat i laboriós. En aquests moments estem treballant en la solució d'aquests aspectes i en el desenvolupament d'altres aproximacions tecnològiques.

BIBLIOGRAFIA

- BENDER, L. (2003). «Genes, parents, and assisted reproductive technologies: ARTs, mistakes, sex, race, and law». *Columbia J. Gen. Law*, 12: 1-76.
- BIGGERS, J. D.; MCGINNIS, L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium». *Biol. Reprod.*, 63: 281-293.
- LIN, W.; BENSON, K. E. (1989). *Microelectronic materials and processes*. Boston: Kluwer Academic, 1-2.
- MAGLI, M. C.; ABBEEL, E. VAN DER; LUNDIN, K.; ROYERE, D.; ELST, J. VAN DER; GIANAROLI, L.; COMMITTEE OF THE SPECIAL INTEREST GROUP ON EMBRYOLOGY (2008). «Revised guidelines for good practice in IVF laboratories». *Hum. Reprod.*, 23: 1253-1262.
- VINCE, G. (2002). «White IVF couple have twins». *New Scientist* (7 agost).