



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“EVALUACIÓN PVL EN CÉLULAS DE LA CÚMULA”**

**TESIS**

**QUE, PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**PAOLA OLVERA URIBE**

**ASESORES:**

**M. EN C. AZUCENA OCAMPO BÁRCENAS  
DRA. CARLA GARCÍA MORALES**

**REVISORES:**

**DRA. ESTHER LÓPEZ-BAYGHEN PATIÑO  
DR. ULISES AGUILERA REYES**



**TOLUCA MÉXICO 30 DE NOVIEMBRE DE 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS:**

Por darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad, por estar conmigo en cada una de mis andanzas y guiado mi camino en los momentos más difíciles.

### **A MIS PADRES:**

Lilia y Juan Manuel, por ser un excelente ejemplo de vida a seguir, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Gracias a los dos por ayudarme a crecer, por la paciencia que me han tenido al enseñarme, por todo el amor que me dan, por sus cuidados a lo largo de mi vida, por sus regaños que me merecía y por siempre estar pendiente de mí. Pero, sobre todo, gracias por enseñarme a perseguir mis sueños, alentarme a alcanzar mis metas y no desistir en mi camino. Los amo

### **A MIS HERMANOS:**

Fabiola Estefanía y Juan Emiliano, por ser parte importante de mi vida al motivarme a que sea el mejor ejemplo que ustedes pueden tener. Por darme su amor y su paciencia día a día, por preocuparse por su hermana mayor y depositar su confianza en mí. Pero, sobre todo, gracias por estar en este momento tan importante de mi vida. Los amo.

**A MIS TÍAS:**

Ma. Elena, Carmen, Maricela y Claudia, que han sido un apoyo importante durante mi formación, al estar siempre al pendiente de mí, por su apoyo y también constantes preocupaciones, por ser ejemplos a seguir de fortaleza y dedicación. ¡Muchas gracias tías! Las quiero mucho.

**A MI ABUELITA:**

Emma, gracias abue por tu preocupación, amor y cuidados que me has dado, durante todos estos años, en los momentos más difíciles por estar ahí conmigo.

**A MIS ABUELOS:**

Asunción y Antonio, gracias por estar al pendiente de mí y de mis hermanos, por compartir su sabiduría y apoyo durante toda mi vida.

**A MI PRIMA:**

Emma Azurim, gracias por estar para mí, por apoyarme, por tus consejos y por todos los lindos momentos que hemos compartido. Te adoro.

**A MI DIRECTORA DE TESIS:**

M. en C. Azucena Ocampo Bárcenas, por apoyo, dedicación y paciencia. Esta tesis es el resultado de tus enseñanzas, ya que siempre has sido una persona entregada a su trabajo y un gran líder para mí, gracias por confiar en mí y apoyarme más allá de lo que algunas veces era necesario.

**A MIS MAESTROS Y REVISORES:**

Dra. Carla García Morales, gracias por todas sus enseñanzas durante mi formación y todo el apoyo brindado durante la elaboración de este proyecto.

Dra. Esther López-Bayghen, gracias por permitirme ser parte de este proyecto, por su gran apoyo, por su tiempo, paciencia y útiles recomendaciones en la realización de este trabajo.

Dr. Ulises Aguilera Reyes, gracias por su tiempo y exhortaciones realizadas a mi proyecto.

**A LAS INTEGRANTES DEL LIDMOL:**

Elizabeth Schaeffer, Tania Rojas y Adina Neuman, gracias por su amistad y compartir sus conocimientos conmigo, por apoyarme y explicarme cuando lo requería.

**A JUANITA Y CATY:**

Por ayudarme y apoyarme, durante la tramitología realizada.

**A MIS AMIGAS:**

Ma. del Carmen Arista, gracias por todos los recuerdos y enseñanzas que hemos compartido, por el apoyo y tu amistad infinita.

Lizbeth Campos, gracias por todos los regaños que a veces merezco, por estar apoyándome y preocuparte por mí, por tu amistad incondicional, te adoro.

Estefanía Colín, gracias por todo el apoyo incondicional, por toda la comprensión que me has brindado durante este tiempo, gracias por tu amistad y tu tiempo compartido conmigo.

Gracias a las tres, por ser parte de mi formación, mi vida, mis sueños y mis más preciados recuerdos.

**A MIS MAESTROS:**

Dra. María Elena Estrada Zúñiga, David Pérez, Dra. Lilia González Palma, por sus enseñanzas, consejos y disposición incondicional durante toda mi formación.

Finalmente, gracias a todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto.

**Gracias a todos.**

**PAO**

***“Siempre que dudes de lo lejos que puedes llegar...***

***solo recuerda lo lejos que has llegado.***

***Recuerda todo lo que has enfrentado,***

***todas las batallas que has ganado***

***y todos los temores que has superado...***

***¡NO TE RINDAS!”***

***Anónimo -***

**“EVALUACIÓN PVL EN CÉLULAS DE LA CÚMULA”**

<b>ÍNDICE</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	2
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	10
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	11
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	18
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	20
1.1 Desarrollo folicular y maduración ovular.....	21
1.1.1 Folículo primordial.....	23
1.1.2 Folículo preantral.....	23
1.1.3 Folículo primordial.....	24
1.2 Células de la Cúmula.....	25
1.3 Adquisición de competencia.....	27
1.4 Perfil de Transcripcional de Células de la Cúmula.....	29
1.5 Evaluación embrionaria.....	31
1.6 Modelos de Predicción de Embarazo.....	32
1.7 Sistema de Evaluación vía PVL.....	35
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	38
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	39
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	39
4.1 General.....	39
4.2 Particulares.....	39
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	40
5.1 Obtención de Células de la Cúmula (CC).....	42
5.2 Procesamiento de CC y extracción de RNA total.....	42
5.3 qRT-PCR.....	43
5.4 Rango dinámico.....	45
5.5 Electroforesis Capilar.....	46
<b>VI. PRUEBAS ESTADÍSTICAS</b> .....	46
6.1 Estudios R&R.....	46
6.2 Cartas de control.....	48



6.3 Prueba U de Mann-Whitney .....	49
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
7.1 Validación del sistema PVL.....	51
7.2 Evaluación del uso del iniciador PTGS2-60 para la generación del perfil de expresión PVL en CC como alternativa del iniciador PTGS2-A (actual) .....	53
7.3 Manual de procedimientos y programa de capacitación del sistema de expresión PVL .....	65
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>68</b>
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>74</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>80</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas de la Foliculogénesis.....	22
Figura 2 Comunicación Células de la Cúmula (CC)-Ovocito.....	26
Figura 3. Carta de Control.....	49
Figura 4. Evaluación de reproducibilidad y repetibilidad entre operadores para 27 muestras.....	52
Figura 5. Características del amplicón PTGS2-A.....	55
Figura 6. Características del amplicón PTGS2-60 .....	56
Figura 7. Características del amplicón VCAN .....	57
Figura 8. Evaluación de reproducibilidad y repetibilidad para el índice de expresión PVL .....	63
Figura 9. Evaluación de reproducibilidad y repetibilidad entre Índice PVL de Ptgs2-A y Ptgs2-60 para 41 muestras .....	64
Figura 10. Manual de procedimientos para el análisis del perfil transcripcional de Células de la Cúmula (CC).....	65
Figura 11. Programa de capacitación para el nuevo personal .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de Selección de pacientes .....	40
Tabla 2. Parámetros para el diseño de oligonucleótidos .....	43
Tabla 3. Parámetros de aceptación de energía de disociación .....	44
Tabla 4. Criterios de Aceptación de Estudio R&R .....	48
Tabla 5. Características de la población para la validación del sistema PVL .....	51
Tabla 6. Análisis Mann Whitney .....	52
Tabla 7. Resultados Estudio R&R .....	52
Tabla 8. Resultados qRT-PCR de Ptgs2-A .....	55
Tabla 9. Resultados Electroforesis Capilar para Ptgs2-A.....	55
Tabla 10. Resultados de qRT-PCR de Ptgs2-60.....	56
Tabla 11. Resultados Electroforesis Capilar para Ptgs2-60 .....	56
Tabla 12. Resultados de qRT-PCR de VCAN .....	57
Tabla 13. Resultados Electroforesis Capilar para VCAN .....	57
Tabla 14. Ct obtenidos de qRT-PCR para construcción de Cartas de Control para el gen Ptgs2 .....	60
Tabla 15. Pureza de amplificaciones de los genes Ptgs2 y VCAN.....	61
Tabla 16. Demografía de la Población para la evaluación del Índice PVL .....	61
Tabla 17. Análisis Mann Whitney .....	63
Tabla 18. Resultados Estudio R&R .....	63
Tabla 19. Análisis Mann Whitney .....	64
Tabla 20. Resultados Estudio R&R .....	64

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Superposición de índice PVL entre Operadores .....	52
Gráfica 2. Disociación de Ptgs2-A.....	55
Gráfica 3. Amplificación de Ptgs2-A.....	55
Gráfica 4. Regresión Logística del rango dinámico de Ptgs2-A .....	55
Gráfica 5. Disociación de Ptgs2-60 .....	56
Gráfica 6. Amplificación de Ptgs2-60 .....	56
Gráfica 7. Regresión Logística del rango dinámico de Ptgs2-60.....	56
Gráfica 8. Disociación de VCAN.....	57
Gráfica 9. Amplificación de VCAN.....	57
Gráfica 10. Regresión Logística del rango dinámico de VCAN .....	57
Gráfica 11. Análisis de carta de control (inversa) para el gen PTGS2 .....	59
Gráfica 12. Cartas de control para el análisis de pureza de los productos de PCR. .	60
Gráfica 13. Superposición de Ct de oligonucleótidos para el gen Ptgs2 .....	63
Gráfica 14. Superposición de índice PVL entre oligonucleótidos para el gen Ptgs2 .	64

## ABREVIATURAS

**°C:** Grado Centígrado.

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**AREG:** Ampirregulina

**ARID1B:** Domino de interacción 1B rico en AT.

**ASRM:** *American Society for Reproductive Medicine*

**AZ:** Operador 1

**BMP:** *bone morphogenetic proteins*

**BMPR2:** receptor de *bone morphogenetic proteins 2*

**CALM1:** *calmodulina 1*

**CAMK1D:** Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo 1.

**cAMP:** AMP cíclico

**CC:** Células de la Cúmula.

**CCO:** complejo cumula ovocito

**Cdc25:** ciclo de división celular 25A

**CDC42:** homólogo 42 de la proteína de control de división celular

**Cdk1:** quinasa dependiente de cíclica 1

**cDNA:** ADN complementario

**CG:** Células de la granulosa

**cGMP:** guanosín monofosfato cíclico

**CGP:** células germinales primordiales

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono.

**COX2:** ciclooxigenasa 2 o ptgs2

**COX20:** Factor de ensamblaje del Citocromo C oxidasa.

**Ct:** Umbral del ciclo.

**Cx43:** conexina 43

**CYP19A1:** gen del citocromo P450

**D3:** día 3

**DEPC:** Pirocarbonato de Dietilo.

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico.

**DPP8:** dipeptidil peptidasa 8

**dUTP:** 2'-Desoxiuridina, 5'-Trifosfato.

**EFNB2:** Efrina B2.

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidermal.

**EGF-like:** dominio del factor de crecimiento endotelial

**Ep2:** receptor de prostaglandina E2

**ERBB4:** receptor de la proteína tirosina quinasa erbB-4

**EVAR:** Envian Annual Reproduction

**FDX1:** ferridoxin 1

**FGF12:** Factor de crecimiento de Fibroblasto 12.

**FIV:** Fertilización *in vitro*.

**Foxl2:** *Forkhead Box L2*

**Foxo3a:** *Forkhead Box O3*

**FSH:** Hormona foliculoestimulante.

**FSHR:** Receptor de hormona Foliculoestimulante.

**FZD3:** receptor frizzled clase 3

**GDF-9:** Factor 9 de crecimiento diferencial

**GnRH:** Hormona liberadora de Gonadotropina.

**GPR137B:** Receptor acoplado a proteína G 137B.

**GPR3:** receptor acoplado a la proteína G3

**GPX3:** glutatión peroxidasa 3

**gr:** gravedad.

**GREM1:** gremlin 1

**GSTA3:** glutatión S-transferasa alfa 3

**GSTA4:** glutatión S-transferasa alfa 4

**GV:** Vesícula Germinal

**GVBD:** Degradación de la Vesícula Germinal

**h:** horas

**HAS2:** Hialuronano Sintasa 2.

**hCG:** Gonadotropina Coriónica Humana.

**HIST1H4C:** Cluster 1 de la histona 4

**hMG:** gonadotropina menopausica humana

**HPO:** eje hipotalámico-hipofisario-ovárico

**HSD3B:** *hidroxi-delta-5-esteroide deshidrogenasa, 3 beta y esteroides delta-isomerasa*

**ICSI:** *intracytoplasmic sperm injection*

**IMC:** Índice de Masa Corporal.

**IMO:** inhibidor de la maduración del ovocito

**Inh-MM:** moléculas inhibidoras

**kcal:** kilocalorias

**L19:** Proteína Ribosomal L19.

**LH:** Hormona Luteinizante.

**LHR:** receptor de hormona luteinizante

**LI:** límite inferior

**LS:** límite superior

**MGC:** células de la granulosa mural

**MI:** Metafase I

**MII:** Metafase II

**mL:** Mililitros.

**mm:** Milímetros.

**MPF:** factor promotor de la fase M

**mRNA:** RNA mensajero

**MTOCs:** centros organizadores de microtúbulos

**ng:** nanogramos

**NPR2:** receptor de guanilil ciclasa 2

**NR2F6:** Subfamilia del receptor nuclear 2, miembro del grupo F6.

**NRP1:** receptor de guanilil ciclasa 1

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**P/V/L:** por los genes PTGS2/VCAN/L19

**Pb:** pares de bases

**PB:** cuerpo polar

**PBI:** primer cuerpo polar

**PCNA:** antígeno nuclear de proliferacion

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PDE3A:** fosfodiesterasa 3A

**PGD:** Diagnóstico Genético Preimpantación

**PGR:** Receptor de Progesterona.

**PGRMC1 y 2:** componente de la membrana del receptor de progesterona

**PKA:** proteína quinasa A

**PO:** Operador 2

**PROK1:** Procineticina 1

**PSMD6:** proteosoma 26s no-ATPasa de la subunidad reguladora 6

**PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**PTGIS:** prostaglandina sintetasa I2

**PTGS1:** Prostaglandina sintetasa 1.

**PTGS2:** Prostaglandina sintetasa 2.

**PTX3:** pentatrixina 3

**qRT-PCR:** retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**R&R:** estudio de repetibilidad y reproducibilidad

**R:** receptor

**RA:** Reproducción Asistida.

**REDLARA:** Red Latinoamericana Reproducción Asistida

**RNA:** Ácido Ribonucleico.

**RT:** retrotranscripción

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**SCD5:** *Stearoyl-CoA Desaturase 5*

**SCDI:** *Stearoyl-CoA Desaturase I*

**SERPINE2:** Inhibidor de serina peptidasa, Clade E, miembro 2

**SET:** *Single Embryon Transfer*

**SLC2A9:** Soluto portador de la familia 2 miembro 9.

**STC2:** Stanniocalcin 2.

**T:** testosterona

**TE:** teca externa

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta



**TI:** teca interna

**TIC:** células intersticiales de teca

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TNFAIP6:** factor de necrosis tumoral inducible por el precursor de la proteína 6

**TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida

**Tsc-1 y 2:** supresor de tumor 1 y 2

**UBQLN1:** ubiquilina 1

**VCAN:** Versiscan

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana.

**ZNF132:** Proteína con dominios de zinc 132.

**ZP:** zona pelúcida

**μl:** Microlitros.

## RESUMEN

Los tratamientos de reproducción asistida (RA) son una alternativa confiable para aquellas parejas con infertilidad que buscan embarazarse, se sabe que existen diferentes factores que afectan la capacidad de una pareja para concebir. Aproximadamente en el 85% de los casos, las terapias hormonales o procedimientos quirúrgicos pueden abatir el problema (ASRM, 2010) pero un 15% de los pacientes con infertilidad presentan factores más complejos. Otra de las limitaciones que se presentan es el no contar con un sistema de evaluación y selección embrionaria confiable.

Hoy en día la evaluación morfológica del embrión es el criterio principal para su selección y transferencia en procedimientos FIV (Fertilización *In vitro*) e ICSI (Inyección intracitoplasmática del espermatozoide), teniendo tasas de embarazo de tan solo un 30%. (Assou et al 2010). Sin embargo, se ha demostrado que la morfología del embrión no siempre está relacionada con su calidad, además que la confiabilidad de la evaluación depende de la experiencia del observador.

Estas limitantes han promovido la innovación y desarrollo de nuevas tecnologías, cuyo objetivo es el mejoramiento en la evaluación y selección embrionaria. (Assou et al 2010). Diversos grupos de investigación, han identificado y generado sistemas de evaluación embrionaria basados en el perfil transcripcional de células de la cúmula (CC), pues en ellas se llevan a cabo eventos moleculares importantes como es la maduración del óvulo, además de proporcionar soporte nutricional y metabólico al ovocito. (Adriaenssens et al 2010)

En este trabajo se validó el sistema de selección embrionaria propuesto por Ocampo y colaboradores mediante un estudio de repetibilidad y reproducibilidad (R&R) de la metodología empleada. También se evaluaron los parámetros de operación con el uso de cartas de control y electroforesis capilar. Se determinó que el sistema de predicción tiene una variación y desviación estándar en su repetibilidad del 0% entre los

operadores (AZ y PO), la reproducibilidad del sistema presentó una variación del 21.64% debido a la procedencia de las muestras. En conclusión, este trabajo propone el uso del sistema de Ocampo y colaboradores como herramienta de selección embrionaria al mostrar un 92% de coincidencia entre el valor predictivo y el resultado de embarazo clínico.

**Palabras clave:** calidad embrionaria, evaluación morfológica, potencial de implantación, células de la cúmula, modelo de predicción, competencia del ovocito, PTGS-2, VCAN, L19

## I. INTRODUCCIÓN

La infertilidad se define como la incapacidad de lograr un embarazo después de un año de mantener relaciones sexuales sin protección (Cooper et al 2010, Olooto et al 2012, Practice Committee of American Society for Reproductive 2008, Weiss & Clapauch 2014). En 2016 a nivel mundial se reportaron 48.5 millones de parejas que experimentaron algún tipo de infertilidad, la cual según la OMS (Organización Mundial de la Salud) puede ser de origen femenino (37%), masculino (8%) o de ambos (35%). En el 2017 la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (*American Society for Reproductive Medicine; ASRM*) reportó que existen 6.7 millones de mujeres que presentan infertilidad (Center for Disease Control and Prevention, 2017), las etiologías más frecuentes son: trastornos ovulatorios (25%), endometriosis (15-35%), adherencias pélvicas (11%), obstrucción tubárica (11-35%), anomalías tubáricas (11%) e hiperprolactinemia (7%) (Reproductiva 2012, Unuane et al 2011, Weiss & Clapauch 2014). Como se puede apreciar existen diversos factores biológicos que han sido asociados a infertilidad femenina; hoy en día más mujeres deciden tener hijos en edad avanzada, lo que reduce la calidad ovular y endometrial, afectando considerablemente la fertilidad (Zegers-Hochschild et al 2009). Las diferentes técnicas de reproducción asistida (RA) como la Fertilización *in vitro* (FIV) representa la mejor oportunidad de éxito al buscar un embarazo y nacimiento de niño sano al ser una de las técnicas más efectiva para resolver este problema.

A pesar de los avances tecnológicos en medicina reproductiva, se siguen presentando algunas problemáticas como son: fallos de implantación en pacientes de buen pronóstico, insuficiencia ovárica, preservación de fertilidad en pacientes que han sido sometidas a tratamientos para el cáncer, así como el manejo de embarazos de alto riesgo. Otra limitante que se presentan en tratamientos de alta complejidad es el no contar con un sistema de evaluación y selección embrionaria confiable. Hasta el momento la evaluación morfológica del embrión en día 5 de desarrollo es el criterio principal para su selección y transferencia en procedimientos FIV e ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*), teniendo tasas de embarazo de tan solo un 30%

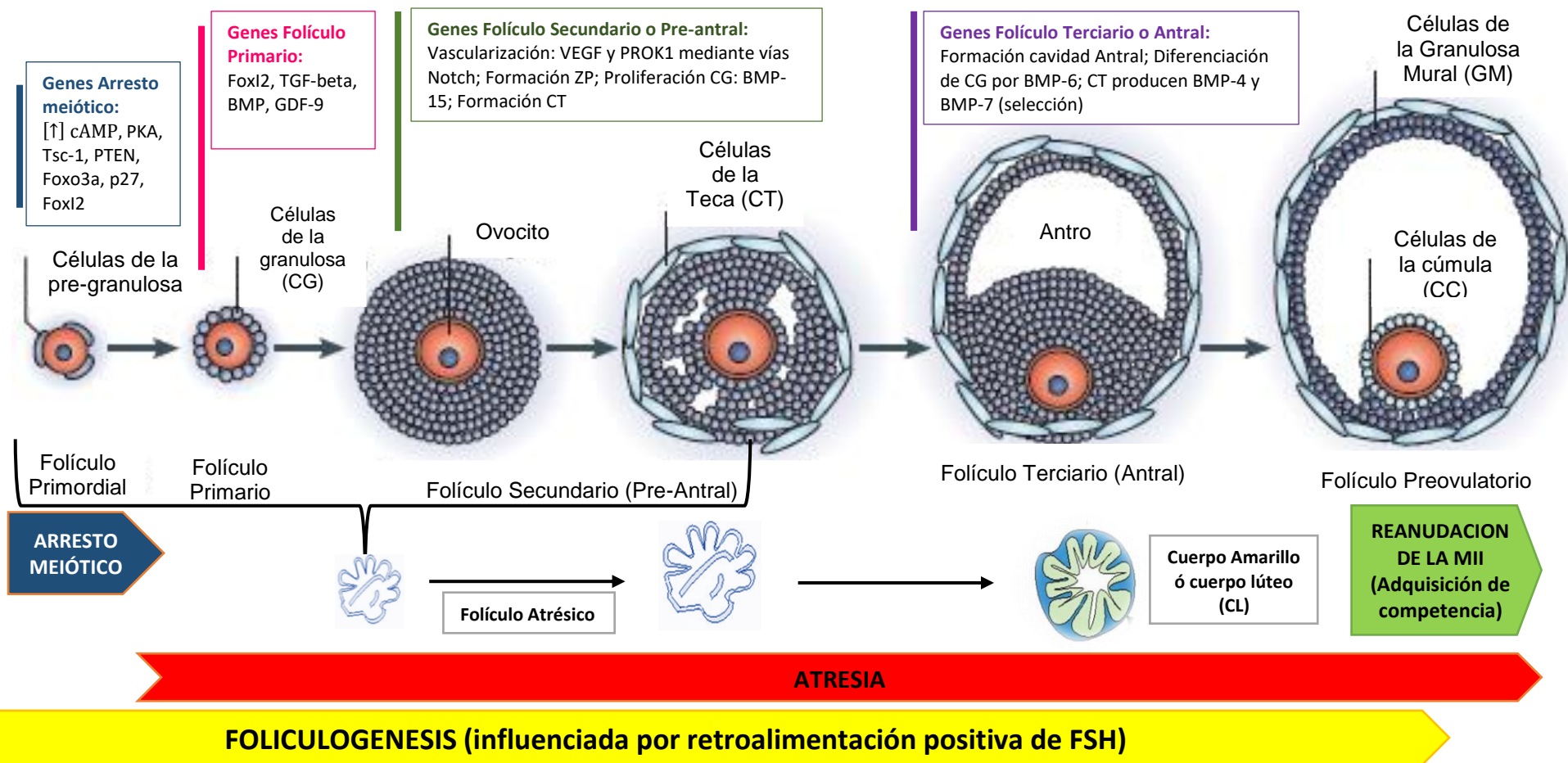
(Assou et al 2010). Con ello se ha demostrado que la morfología del embrión no siempre guarda relación con su calidad; además, la confiabilidad de la evaluación depende de la experiencia del observador. Con lo expuesto se ha promovido la innovación y desarrollo de nuevas tecnologías, cuyo objetivo es el mejoramiento en la evaluación y selección embrionaria (Assou et al 2010)

La búsqueda de nuevos métodos de evaluación embrionaria ha llevado a proponer el uso de modelos biológicos que ayuden a predecir calidad y competencia del ovocito, sin afectar la integridad del embrión. Varias de las aportaciones han surgido del estudio de modelos murinos que proponen el uso de células de la cúmula como predictores de competencia ovular, ya que en ellas se llevan importantes eventos moleculares como la maduración del óvulo.

### **1.1 Desarrollo folicular y maduración ovular**

Los ovarios de mamíferos están constituidos por unidades funcionales básicas denominadas folículos. El folículo es la única estructura en la cual la célula germinal, el ovocito, está en íntima asociación con células somáticas especializadas. La dificultad de encontrar características que definen a un ovocito competente en mamíferos esta probablemente asociado al desarrollo del gameto femenino y puede explicarse por la complejidad de la interacción bidireccional entre ovocitos y células del folículo (Gilchrist et al 2008) así como por el número de vías de señalización y procesos de regulación que participan en la formación de un ovocito, el cual debe ser capaz de reanudar la meiosis, el cumplimiento de la fertilización y mantener el desarrollo.

Los folículos pasan por diferentes etapas de desarrollo, figura 1, clasificadas según su morfología, tipo y número de células que los componen a este proceso se le conoce como foliculogénesis. Esta se divide en: 1) transición de folículo primordial a primario, 2) transición de folículo primario a secundario o preantral y 3) folículo preantral a



**Figura 1 Etapas de la Foliculogénesis.** Fases y moléculas implicadas durante la foliculogénesis que van desde el desarrollo del ovocito (folículo primordial), crecimiento (folículo primario, secundario y terciario) y maduración (folículo preovulatorio). Los folículos que no alcanzan la etapa siguiente de desarrollo van muriendo por atresia

folículo antral clasificados a su vez en clases desde el 2 al 8, este último corresponde al folículo preovulatorio.(Eppig 2001)

### **1.1.1 Folículo primordial**

Los folículos primordiales se caracterizan por presentar una capa de células escamosas (pregranulosa) y por mantener al ovocito arrestado en profase I de la primera división meiótica (MI), este evento se debe a las altas concentraciones de cAMP, que es inducido por la proteína cinasa A (PKA) y por señales inhibitorias de activación folicular, otros genes involucrados en este proceso son: gen supresor tumoral de esclerosis tuberosa 1 (Tsc-1), fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN), Forkhead Box O3 (Foxo3a), p27 y Foxl2 (*Forkhead Box I2*).

Estudios en ratones genéticamente modificados, han demostrado pérdida en la funcionalidad de cualquiera de estas moléculas conduciendo a la activación prematura de los folículos primordiales (Adhikari et al 2010, Castrillon et al 2003, Raga et al 2011, Rajareddy et al 2007, Reddy et al 2008) provocando el agotamiento temprano de la reserva folicular.

La transición de un folículo primordial a uno primario se caracteriza por el aumento del diámetro de ovocito (60 mm) y la diferenciación de células de la Granulosa (CG). Estos cambios son promovidos por Foxl2 (Forkhead Box I2), TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante beta), varios miembros de BMP (Proteína morfogénica ósea) y GDF-9 (Factor de crecimiento y diferenciación 9) debido a que promueven el desarrollo folicular y posteriormente intervienen en la reanudación de la meiosis.

### **1.1.2 Folículo preantral**

Con la transición de las CG, los folículos primarios adquieren un revestimiento de varias capas de CG dando lugar al folículo pre-antral, este presenta un diámetro

aproximado de 120-150 mm, además se caracteriza por la formación de la zona pelúcida (ZP) y una capa de la célula de la teca. Es durante esta etapa que comienza a formarse la cavidad antral debido a la promoción de la vascularización necesaria para el funcionamiento, desarrollo y maduración del ovocito. La vascularización es promovida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Burnik Papler et al 2015) mediante las vías de señalización de Notch (Jovanovic et al 2013) y la prokineticina 1 (PROK1). Otro regulador positivo del crecimiento del folículo en etapas preantral y antral es BMP-15 (Proteína morfogénica ósea 15), estimulando la proliferación de células de la granulosa de una manera independiente de la FSH (Hormona Foliculoestimulante) (Otsuka et al 2000).

### **1.1.3 Folículo primordial**

La formación de la cavidad antral o antro, da lugar a la diferenciación de dos poblaciones de células de la granulosa originada por la actividad de BMP-6 (Proteína morfogénica ósea 6) que se pueden distinguir morfológicamente y bioquímicamente: las células murales asociadas a la pared folicular y las células del cúmulo.

En esta etapa, las células de la teca producen BMP-4 (Proteína morfogénica ósea 4) y BMP-7 (Proteína morfogénica ósea 7), estas moléculas son las encargadas de disminuir la producción de andrógenos dependientes de LH (Hormona Luteinizante) que afectara el crecimiento de algunos folículos dando paso a la supervivencia de la cohorte seleccionada. Posteriormente, la activina A suprime el crecimiento de folículos promoviendo la selección del folículo dominante induciendo la expresión de los receptores de LH en el ovocito y de FSH en CG.

La influencia de FSH induce a CG, a la síntesis de aromatasa la cual convierte los andrógenos procedentes de la teca en estrógenos (sobre todo  $17\beta$ -estradiol). El estradiol estimula la formación de receptores de LH en las células de la granulosa, gracias a esto, las células foliculares son capaces de responder al pico de LH que precede inmediatamente a la ovulación (Otsuka et al 2000).



En respuesta al pico de LH y tras la ovulación la expresión de PROK1 aumenta en el cuerpo lúteo (Alfaidy et al 2016) . Con la activación del receptor de PROCK 1 se lleva a cabo el reclutamiento de diferentes proteínas G (proteína Gi, Gq y Gs) conduciendo a la movilización de calcio, la estimulación del cambio de fosfoinosítidos, activación de las vías de señalización p44 / p42, así como la activación de la vía de las MAP cinasas (MAPK) (Traboulsi et al 2015). Durante la ovulación el factor de necrosis tumoral (TNF) causa la apoptosis del epitelio de la superficie ovárica y la ruptura de la matriz extracelular en la pared del folículo (Burnik Papler et al 2015) dando lugar a la liberación del ovocito.

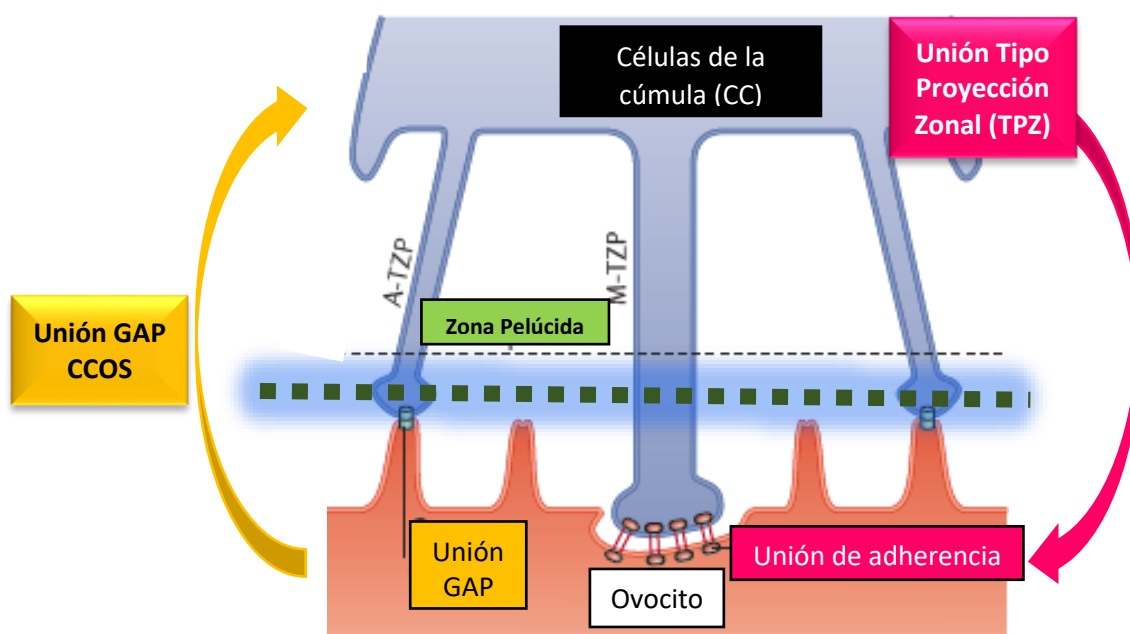
## **1.2 Células de la Cúmula**

Las células del Cúmula (CC) son una subpoblación de CG que rodean al ovocito y forman el complejo cúmula ovocito (CCO) (Kordus & LaVoie 2017), este tipo celular presenta una alta tasa de proliferación y participa en la expresión de las moléculas: LHR (receptor de la hormona luteinizante), Inhibina alfa, Inhibina beta A, GNRH1 (hormona 1 liberadora de gonadotropina) y el componente 1 y 2 del RP (receptor de progesterona). La expansión de las CC depende de la estimulación de factores de crecimiento epidérmico (EGF), inducido por el pico de LH que activa a la proteína cinasa A (PKA) en respuesta al aumento de los niveles de cAMP, con este estímulo se da inicio a la transcripción de genes como Hialuronano Sintasa-2 (HAS-2) que promueve la producción de ácido hialurónico, TNFAIP6 (Proteína 6 inducible por el Factor de necrosis tumoral alfa) y PTX3 (Pentraxin 3) que son regulados por prostaglandinas y están implicados en la estabilización del CCO durante el transporte del ovocito en los oviductos y la fertilización.

Las CC presentan importantes receptores para la supervivencia del ovocito como son: un receptor de BMP (BMPR2), el receptor para el factor de células madre (KIT), un miembro de la familia de receptores de EGF (ERBB4) y un receptor frizzled (FZD3) miembro de la vía WNT. Al expresar estos receptores sus ligandos están involucrados

en la transmisión de señales de supervivencia y maduración del ovocito.(Oktem & Urman 2010)

Por otro lado, la comunicación células de la cúmula/ovocito (figura 2) depende de proyecciones citoplásmicas que atraviesan la zona pelúcida formando uniones gap con el ovocito (Albertini et al 2001).



**Figura 2 Comunicación Células de la Cúmula (CC)-Ovocito.** Interacción de las CC con el ovocito mediante dos vías de unión: GAP y TPZ, que permite el intercambio de nutrientes (bidireccional), formando el complejo cúmula-ovocito (CCO). Modificado de: (Li & Albertini 2013)

Esta asociación permite a las CC cumplir con funciones vitales como son:

- Proveer de soporte nutrimental y metabólico al ovocito. Entre las vías metabólicas que se llevan a cabo se encuentran: glucólisis, ciclo de ácidos tricarboxílicos, ciclo de las pentosas que son importantes para la regulación meiótica del ovocito (Russell & Robker 2007, Sutton-McDowall et al 2010).
- Tienen un papel importante en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito al ser necesaria para la formación del pronúcleo y su subsecuente

capacidad de desarrollo (Buccione et al 1990, Eppig 2001, Sanchez & Smitz 2012).

- Durante el período preovulatorio, la expansión de la cúmula tiene varias funciones importantes como proteger al ovocito y promover el crecimiento del complejo ovocito cúmula (Evian Annual Reproduction Workshop et al 2011).

Dichos eventos están implicados en la reanudación de la meiosis, adquisición de competencia y embarazo (Assou et al 2008, Cillo et al 2007, Feuerstein et al 2007, Fragouli et al 2012, Gasca et al 2007, Hamel et al 2008, van Montfoort et al 2008).

### 1.3 Adquisición de competencia

La competencia ovular es definida como la capacidad que tiene un óvulo de finalizar su maduración, mediante la reanudación meiótica, lo cual da lugar a un gameto con el potencial de ser fertilizado y con la facultad de desarrollar un embrión, finalizando en un embarazo exitoso. Sin embargo, si se presenta algún defecto en el proceso de maduración nuclear hay una detención del desarrollo (Conti & Franciosi 2018).

La reanudación meiótica se da de manera simultánea a la ovulación y se inicia con el aumento de LH, provocando (Sanchez & Smitz 2012) la neutralización de las moléculas inhibitoras de la activación folicular, debido a la desfosforilación del receptor del péptido natriurético 2 (NPR2), en consecuencia se reducen las concentraciones de cAMP y aumenta los niveles de calcio intracelular. En ovocitos de ratón, se encontró que la disminución de cAMP se debe a la inactivación de PKA, conduciendo a la desfosforilación de dos componentes clave en la regulación complejo ciclina dependiente de cinasa 1 (Cdk1) / ciclina que son los genes *Cdc25* (*cell división cycle 25A*) y *Wee2* (homólogo de *WEE1* quinasa del checkpoint G2) (Conti & Franciosi 2018). De forma sincrónica se da lugar a la expresión del receptor de progesterona (RP), prostaglandina endoperoxidasa 2 (PTGS2) así como varias proteasas entre ellas la metaloproteínasa de la matriz (MMP) y el antígeno nuclear de proliferación de células (PCNA).

La disolución de la envoltura nuclear de ovocitos, denominada descomposición de vesículas germinales (GVBD), es la primera manifestación morfológica de la reanudación de la meiosis, después del estímulo hormonal hasta la aparición del cuerpo polar (PB). Posteriormente a la descomposición de vesículas germinales, tiene lugar la maduración nuclear de ovocitos mediante la vía RAF-MEK1/2-MAP1/3 que es activada por MAPK 1/3 (anteriormente ERK1/2). La maduración se acompaña de una reorganización del citoplasma del ovocito, esto sucede durante la transición de metafase I (MI) a metafase II (MII) (Coticchio et al 2015, Li & Albertini 2013).

En anafase, los cromosomas homólogos se separan y un conjunto se elimina con el primer cuerpo polar (PBI) en la telofase. La segregación cromosómica depende de un huso bipolar que se une a cinetocoros homólogos (Jang et al 2007), mientras se previene la separación de las cromátidas hermanas al proteger la cohesión centromérica de los cinetocoros, que a su vez recluta una fosfatasa que impide la fosforilación de la cohesión.

Finalmente, da inicio la citocinesis para evitar la pérdida de citoplasma. El núcleo y el huso se localizan cerca de la superficie del (Coticchio et al 2015) ovocito, como consecuencia se da la eliminación de las células de la cúmula. Una vez que el cuerpo polar se elimina, el ovocito reorganiza sus cromosomas alineándolos en la placa ecuatorial en metafase II, para segregar las cromátidas hermanas con el segundo PB durante la fertilización.

Estudios recientes (Liu et al 2017) han confirmado la existencia de retículos citoplásmicos (Capco et al 1993) que funcionan como almacenamiento de ribosomas (Liu et al 2017). Varios estudios genéticos indican que la alteración de estas estructuras conduce a problemas en la capacidad de desarrollo embrionario. Esposito y colaboradores (2007) reportaron que en ratones, la deficiencia de la proteína peptidil arginina deiminasa 6 (PADI6), que se traduce en un bloqueo de desarrollo completo en la etapa de dos células (Esposito et al 2007, Yurttas et al 2008); también, en seres

humanos, se confirmó que la mutación en el gen PADI6 causa infertilidad femenina debido a un arresto en el desarrollo embrionario temprano (Xu et al 2016).

#### **1.4 Perfil de Transcripcional de Células de la Cúmula**

Actualmente diversos científicos han logrado elucidar el papel que juegan CC en la adquisición de competencia ovular, a su vez han caracterizado e identificado genes que son relevantes para este proceso a través de la generación y análisis del perfil transcripcional de CC (Gebhardt et al 2011).

Las CC generalmente se descartan durante la FIV e ICSI, al ser abundantes y de fácil acceso se convierten en un modelo ideal para evaluar la calidad del óvulo y el potencial de desarrollo embrionario. El análisis de la expresión génica proporciona de forma indirecta el estado del ovocito, ayudando al embriólogo a evaluar mejor la calidad del embrión.

Las técnicas moleculares que han sido empleadas en la evaluación de CC son: microarreglos de expresión, RT-PCR y qRT-PCR (Anderson et al 2009, Assou et al 2010, Assou et al 2008, Cillo et al 2007, Feuerstein et al 2007, McKenzie et al 2004, van Montfoort et al 2008). El análisis genético de CC consiste en medir el nivel de expresión de biomarcadores potenciales (indicadores de embarazo exitoso).

Assou y colaboradores en 2006, evaluaron la maduración de ovocitos mediante el análisis de genes implicados en la adquisición de competencia ovular y fertilización. Este estudio tomo como modelo al ovocito y a las CC. Gracias a esto se logró establecer el transcriptoma para cada una de las etapas de maduración del ovocito: GV, MI y MII. Se demostró que los perfiles de expresión génica de ovocitos y de CC eran completamente diferentes. Al analizar los genes en el ovocito se encontró la sobreexpresión de genes implicados en meiosis, como MPF, APC / C y los complejos de punto de control del huso y en CC se encontró la sobreexpresión de 2 600 genes

implicados con la membrana extracelular, vías de señalización de progesterona, y regulación de varios receptores hormonales.

Cillo y colaboradores en 2007 evaluaron el nivel de expresión de genes como de ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), pentraxina 3 (PTX3) y gremlin1 (GREM1), genes diana para GDF9 crítico para la función de CC. Se realizó un análisis semicuantitativo de RT-PCR en CC y no se observaron diferencias entre los niveles de PTX3 en CC aisladas de ovocitos de embriones de alta calidad y aquellos aislados de ovocitos que se desarrollaron en embriones de baja calidad o aquellos que no se pudieron fertilizar. Por el contrario, la expresión de HAS2 y GREM1 fue mayor en CC aisladas de ovocitos que se desarrollaron en embriones de alta calidad que en CC aisladas de ovocitos que se transformaron en embriones de baja calidad. Este estudio confirmó que el análisis semicuantitativo de genes expresados en CC puede reflejar la calidad del ovocito.

En ese mismo año, Feuerstein y colaboradores evaluaron la expresión de los genes STAR, COX2, CX43, AREG, SCD1 y SCD5 en CC, de acuerdo con las etapas de madurez del ovocito (madurez nuclear y competencia del desarrollo) para establecer si la competencia meiótica o de desarrollo del ovocito puede estar relacionada con un patrón de expresión genética. Se encontró que en D2 se observaron cambios leves y no significativos en los niveles de expresión de los seis genes diana cuando los embriones se clasificaron en función de sus características morfológicas, pero en D5 se encontró que los niveles de expresión eran bastante bajos.

Estos datos sugieren que el análisis de expresión génica en CC refleja la calidad e integridad de la maquinaria de señalización implícita en la maduración y competencia del ovocito. Por lo tanto, al ser descartadas durante la FIV se convierten en un modelo ideal para generar un sistema predictivo (Mackenzie et. al., 2008) para fortalecer la evaluación embrionaria tradicional.

## 1.5 Evaluación embrionaria

Aún con la implementación de mejoras tecnológicas a los procedimientos de Reproducción Asistida (RA), las tasas de embarazo que conducen a partos de nacidos vivos siguen siendo muy bajas (Kordus & LaVoie 2017). Información consultada en 2018 en el sitio web de la *Society for Assisted Reproductive Technology* ([www.sart.org](http://www.sart.org), 2018), indican que las tasas de nacidos vivos en Estados Unidos por métodos FIV en pacientes de 35 a 37 años utilizando embriones propios es de 43.9%. En 2014 la Red Latinoamericana Reproducción Asistida (LARA) registró que se realizan alrededor de 38,086 tratamientos FIV, de los cuales 4,862 son realizados en México con una tasa de éxito de 13.77% en pacientes de 34 años con transferencia de embrión único (*Single Embryon Transfer*, SET). En 2012, la red LARA reportó que el éxito de transferencia en día 3 era de 56.4% y en día 5 de 17.3% (Zegers-Hochschild F. et al 2017). Esta tasa de éxito subóptima podría ser una consecuencia directa de la selección de embriones en función de la morfología (Richard J et. al 2017).

La evaluación morfológica se realiza desde hace más de 30 años en función de características basadas en: puntuación del tamaño, número de blastómeras, porcentaje de fragmentación, multinucleación, morfología del citoplasma, aparición del cuerpo polar y grado de expansión de CC (Conti & Franciosi 2018). Esta evaluación no necesariamente refleja el estado fisiológico del embrión debido a que se basa en la experiencia y habilidad del observador (Munne et al 2007, Munne et al 2009) siendo una de las limitantes que ha impulsado la búsqueda de criterios más confiables (Conti & Franciosi 2018) para la selección embrionaria.

Ebner y colaboradores de acuerdo con su revisión en 2003, mencionan que independientemente del día de transferencia es crucial combinar las metodologías de evaluación tradicional con aquellas que reflejen el estado genético del embrión que va a ser transferido.

En 2007, Munne y colaboradores demostraron que la mayoría de los embriones morfológicamente normal pueden presentar aneuploidías. En un análisis de 6000

embriones producidos a partir de ovocitos de mujeres menores de 35 años, aproximadamente el 56% de los embriones con mejor morfología y tasa de desarrollo, fueron aneuploides (Munne et al., 2007). En un estudio posterior, Munne y colaboradores (2009) sugirieron que además de la evaluación tradicional se debe implementar una evaluación genética previa a la implantación, basada en una metodología no invasiva y reproducible para la transferencia embrionaria que garanticen un resultado exitoso en la gestación y nacido vivo.

## 1.6 Modelos de Predicción de Embarazo

En la búsqueda de implementar modelos de selección embrionaria con el objetivo de poder evaluar la calidad ovular y potencial de implantación, varios autores proponen el uso del perfil transcripcional de CC como un método de análisis no invasivo en la tecnología de RA (Feuerstein et al 2007, McKenzie et al 2004, Wathlet et al 2011)

El primer estudio retrospectivo con el objetivo de determinar la expresión génica de genes que funcionaran como indicadores de embarazo en CC fue el de Assou y colaboradores (2008). En este estudio se analizaron un total de 50 muestras de CC provenientes de óvulos individuales (5 no fertilizaron, 11 no se transfirieron, 16 no embarazo y 18 embarazo), pertenecientes a mujeres de entre 30-35 años de edad en donde la infertilidad de la pareja era de origen masculino. El análisis para la identificación de genes se realizó por microarreglos en una matriz que contenía más de 30 000 genes humanos. Se identificó la expresión de 2605 genes en muestras de CC que no fertilizaron y 630 genes que resultaron en embarazo, entre ellos se identificaron la sobreexpresión de interleucinas, quimiciocinas, proteínas adaptadoras y quinasas. Como parte de un análisis más detallado, se analizaron únicamente las CC que originaron embriones que terminaron en un embarazo exitoso, teniendo a *BCL211* (proteína 11 del facilitador de apoptosis BCL-2), *PCK1* (Fosfofenol piuvato carboxiquinasa1) y *NFIB* (Factor nuclear IB) como marcadores de potencial de embarazo.



Assou et al. (2010) identificaron 45 genes como biomarcadores en CC asociados con embarazo. Este grupo llevo a cabo un estudio prospectivo en pacientes menores de 36 años, sometidas a Fertilización *in vitro* con inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI). El estudio se dividió en dos grupos. Grupo 1, embriones seleccionados a partir de su perfil de expresión, Grupo 2, embriones seleccionados por evaluación morfológica. Para el primer grupo, se analizaron 267 CC individuales provenientes de 30 pacientes. La tasa de embarazo para el grupo 1 fue del 70% comparado con un 47% del grupo 2.

Wathlet y colaboradores en el 2011, analizaron variables que podrían influir en la expresión génica, tal es el caso de aquellas pacientes que presentan como etiología desbalances hormonales o patologías concretas como endometriosis y síndrome de ovario poliquístico (SOP). Además consideraron hallazgos de otros grupos donde se relaciona la morfología del embrión (desarrollo nuclear, grado de fertilización, fragmentación, velocidad de desarrollo, puntuación del embrión en D3 y D5) y parámetros relacionados con el tratamiento de estimulación como posible causa del fallo de implantación, en este estudio se analizaron ocho genes: VCAN, SDC4, ALCAM, GREM1, PTGS2, ITPKS, CALM2 y TRPM7, el análisis del perfil transcripcional muestra que óvulos maduros e inmaduros presentan diferentes patrones de expresión para ITPKA, CALM2 y TRPM7. Por otro lado, el análisis de CC, de óvulos maduros muestran un aumento de PTGS2 y una disminución de la expresión de VCAN. Otro hallazgo importante fue el encontrar diferencias en el perfil de expresión de óvulos maduros, de una misma paciente. Este hallazgo ha sido relacionado con las características morfológicas observadas durante el día 3 y 5 de desarrollo embrionario. Además de VCAN, todos los genes demostraron una correlación positiva con embriones día 3 y 5. En general, el protocolo de estimulación de las pacientes no influyó en el patrón de expresión entre CC de ovocitos inmaduros o maduros. Por último, en CC de ovocitos MII maduros, se obtuvieron modelos específicos para cada protocolo de estimulación, este modelo se basó en la expresión TRPM7 e ITPKA, y la predicción de embarazo se basó en la expresión de SDC4 y VCAN. Los modelos de regresión multivariado desarrollados para la predicción de

embarazo tuvieron una sensibilidad de 70% y una especificidad de 90% en el conjunto de datos actual.

En el 2012 Wathlet y colaboradores publica un estudio de seguimiento. En el analizaron el perfil transcripcional de en 99 muestras de CC provenientes de 33 pacientes. La población estaba conformada por pacientes con problemas de factor masculino en un 55%, factor femenino de un 9% (endometriosis, trastorno de ovulación y miomatosis), factor masculino y femenino 12% (tubal y PCO) y 24% de infertilidad idiopática. Ellos sugieren que el mejor modelo de predicción de nacido vivo se da cuando se evalúa a los genes CAMK1D (proteína cinasa D dependiente de calmodulina EFNB2 y STC2 (estanniocalcina 2). El modelo predictivo completo para el nacimiento vivo contenía los mismos genes y los días de estimulación. Aunque VCAN se evaluó de nuevo en este estudio, su expresión génica no difirió entre las pacientes embarazadas y las no embarazadas. Esto puede deberse al hecho de que los diagnósticos de infertilidad del paciente difieren entre los dos estudios con respecto a la proporción de cada tipo de infertilidad como PCOS y se ha demostrado que la endometriosis altera el transcriptoma. Teniendo como base estudios anteriores, se realizó un tercer estudio para validar el modelo CAMK1D, EFNB2 y STC2 y evaluar 9 genes candidatos adicionales (Wathlet et al., 2013). También por primera vez, se examinó un modelo intrapaciente en relación con embriones congelados / descongelados del mismo paciente. Se analizaron CC de 47 pacientes sometidos a transferencia de embrión único en día 3 o 5 y estimulados con protocolos de antagonistas de GnRH. Utilizando solo CAMK1D, EFNB2 y STC2 en el modelo, se obtuvo una precisión del 72%. Cinco de los 12 genes dieron el mejor modelo predictivo e incluyeron EFNB2, glutatión peroxidasa 3 (GPX3), glutatión S-transferasa alfa 3 (GSTA3), glutatión S-transferasa alfa 4 (GSTA4) y receptor de progesterona (PGR). El modelo arrojó un valor predictivo positivo del 78%, un valor predictivo negativo del 83% y una precisión del 81%. Al agregar los días de estimulación, el estradiol sérico relativo y la edad al modelo, los tres puntos finales modelo aumentaron al 93%.

Ekart y colaboradores (2013), genero un sistema de clasificación, para selección de ovocitos maduros en una población caucásica, el estudio se basó en el análisis

transcripcional de los genes HAS2, FSHR, VCAN y PGR mediante la validación de la qRT-PCR como método de análisis cuantitativo. Este grupo sugirió que un blastocito que presenta una alta expresión de los genes antes mencionados tiene una probabilidad de implantación del 76%; sin embargo, los autores mencionan que el método aún debe ser validado en una población mayor.

Los estudios anteriores demuestran que el uso de un panel de genes puede generar un modelo de predicción certero, a su vez es evidente la necesidad de validar y de enriquecer el sistema mediante la adición de diferentes factores que pudieran hacer más robusta la prueba y así descartar variables que puedan ser silenciadas y no tengan significancia estadística en el análisis que pudiera influir en el nivel de expresión del transcriptoma de CC.

### **1.7 Sistema de Evaluación vía PVL**

En México, Ocampo y colaboradores analizaron distintos genes involucrados en calidad y desarrollo embrionario con el fin de obtener un panel de genes que puedan ser utilizados en selección de embriones. Los genes que muestran relación con embarazo y desarrollo embrionario fueron PTGS2 y VCAN, como control endógeno utilizaron al gen L19.

La prostaglandina sintetasa 2 (PTGS2) también conocido como COX2, es una enzima clave en la biosíntesis de prostanoídes (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. Se ha descrito que PTGS2 aumenta su expresión un par de horas antes de la ovulación; sin embargo, la cascada de ovulación depende fuertemente de la regulación autocrina en las CC. En este proceso se ven involucrados miembros de las familias *EGF-like*, así como la familia de prostaglandinas. Ptgs 2 es una enzima que limita la producción de prostaglandina E y del receptor de prostaglandinas Ep2 en ratones nulos a Ep2, se ha demostrado que la falta de este gen es esencial para la expansión de las CC; con esto, se concluye que la expresión de esta prostaglandina es crucial para la expansión de CC que se ve

reflejada en la competencia del óvulo (Acosta *et. al.*, 2009; Envian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group *et. al.*, 2010; Feuerstein *et. al.*, 2007; Gerbhardt *et. al.*, 2011; McKenzie *et. al.*, 2004; Russell *et. al.*, 2007; Sirois *et. al.*, 2004) y es capaz de generar la expansión de la cúmula (Feurestein *et. al.*, 2007).

Versican (VCAN) es un componente importante del complejo ovocito cúmula (COC), ubicado en la matriz extracelular, y su expresión se ha informado como uno de los marcadores de calidad de ovocitos más prometedores, debido a que en ratones, VCAN aumentó un paso crucial en el desarrollo embrionario, la expansión de cúmulos y promovió la expresión de PTGS; en los cerdos, la estimulación con FSH aumentó la expresión de VCAN en CC, promoviendo la madurez de los ovocitos y en humanos, la calidad de los ovocitos se ha asociado positivamente con la expresión aumentada de VCAN. Por último, el aumento de la expresión de VCAN en la etapa de ovocitos dio lugar a una mayor probabilidad de embarazo y de nacidos vivos (Ocampo et al 2018).

Una vez identificados los genes que tienen correlación con embarazo su siguiente paso fue generar un índice al cual llamaron P/V/L por los genes PTGS2/VCAN/L19. El índice permite hacer una predicción del potencial de implantación del embrión, así como la probabilidad que tiene de terminar en embarazo clínico. Con el índice PVL, se logró definir un valor de cohorte (>58) que correlaciona con embarazo clínico, ellos también sugieren que la transferencia de embriones genéticamente normales no asegura éxito de embarazo clínico en tratamientos de RA ya que pueden presentar índices inferiores a 58. Este nuevo sistema de evaluación de calidad y desarrollo embrionario puede contribuir significativamente en la toma de decisión al momento de seleccionar a los embriones candidatos a transferencia. Es importante mencionar que el número de embriones transferidos en clínicas de reproducción asistida es un promedio de 3 pues lo que se busca es aumentar las posibilidades de embarazo, con el uso de PVL como sistema de selección de embriones se busca hacer transferencias únicas, ya que este sistema presenta una exactitud del 0.87 con un IC del 95%, el porcentaje de fertilización de los embriones fue de 59.89%.

Entre las bondades del sistema se encuentran:

- No requiere biopsia.
- Células de la cúmula obtenidas por dispersión mecánica.
- Material biológico mínimo (20,000 células de la cúmula).
- No se afecta la integridad del óvulo.
- Diagnóstico de óvulos individuales.
- Diagnóstico en 8 horas a partir de la obtención de la muestra.
- Probabilidad de implantación del embrión/cohorte embrionaria a transferir.
- Asertividad de éxito del 90% en la selección de embriones.
- Permite dar valor agregado a la paciente al fundamentar y reportar, mediante biología molecular, un índice matemático que califica al embrión.

Mediante el uso combinado de criterios de selección embrionaria y el análisis del índice transcripcional PVL en células de cúmula, Ocampo y colaboradores lograron establecer un valor predictivo para calificar el potencial de implantación y así poder pronosticar un embarazo clínico con éxito. Esto se logró mediante el modelado matemático de los resultados obtenidos del perfil transcripcional de los genes candidatos en un estudio prospectivo en 10 pacientes, combinado con factores etiológicos de cada una. Con estos criterios se logró generar una herramienta diagnóstica, personalizada y no invasiva, con resultados certeros y confiables. Dicho sistema presenta un nivel de sensibilidad de 80% y especificidad de 90%.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

El sistema de evaluación embrionaria vía PVL, es una herramienta molecular basada en el análisis transcripcional de células de la cúmula. Este permite seleccionar embriones candidatos a transferencia, aportando al FIV y al médico tratante elementos adicionales sobre el potencial de implantación del embrión y manejo de la paciente. Expuestas las bondades de la prueba, el próximo paso para su uso es incrementar la eficiencia y poder predictivo, a través de la generación de mejoras metodológicas para establecer y desarrollar un plan logístico que permita implementar este sistema de selección embrionaria a nivel clínico.

### **III. HIPÓTESIS**

Las mejoras en el sistema de selección embrionaria vía PVL incrementaran la eficiencia de selección de embriones con potencial de implantación y desarrollo

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

Evaluar la generación de mejoras metodológicas al sistema de análisis del perfil transcripcional en células de la cúmula para determinar calidad embrionaria (PVL)

#### **4.2 Particulares**

- Validar la reproducibilidad del sistema PVL
- Evaluar el uso del iniciador PTGS2-60 para la generación del perfil de expresión PVL en CC como alternativa del primer PTGS2-ACTUAL
- Elaboración de manual de procedimientos y programa de capacitación del sistema de expresión PVL

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

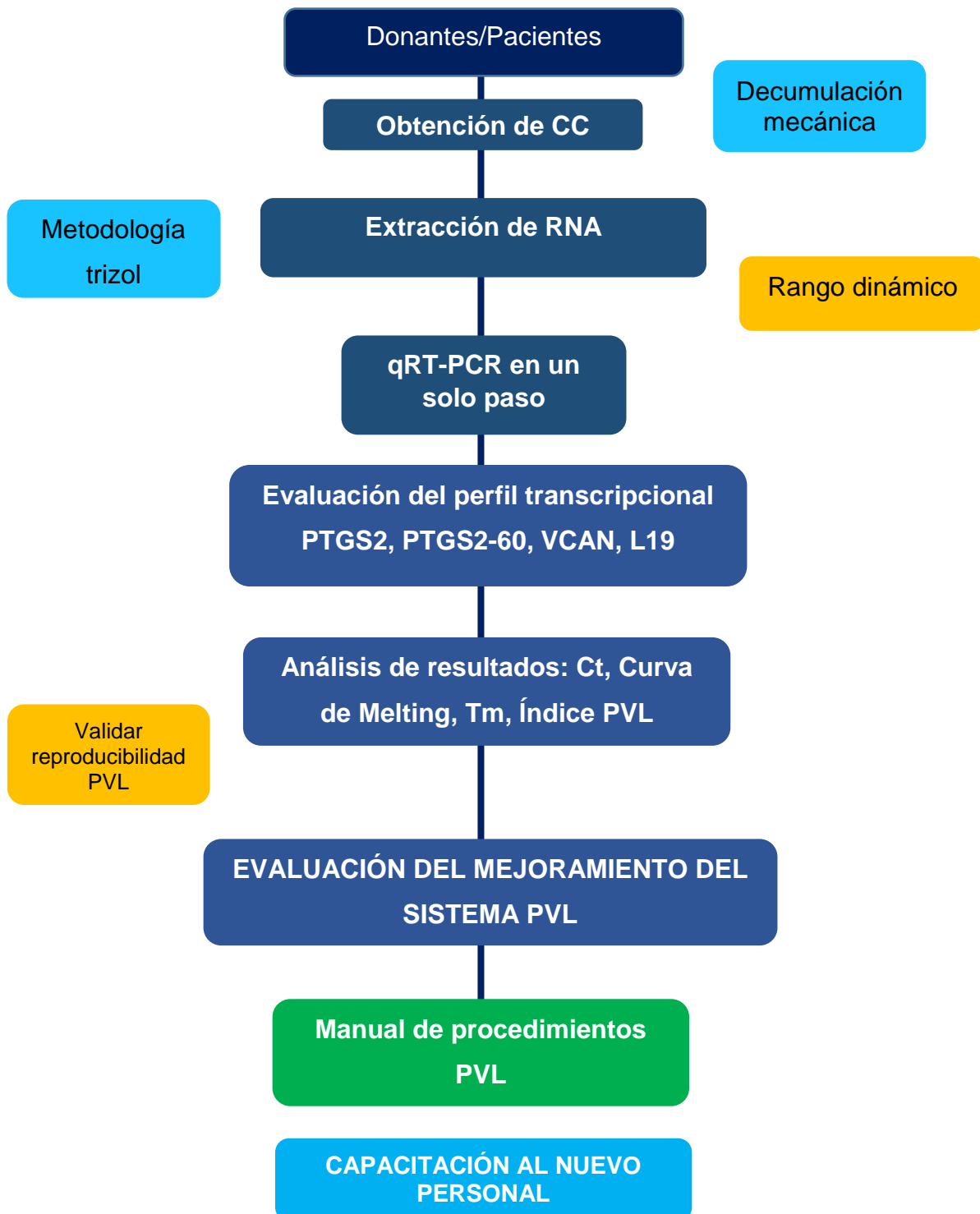
Se realizó un estudio de tipo prospectivo en el Instituto INGENES, en el participaron pacientes con consentimiento informado, que fueron sometidas a procedimientos de alta complejidad. Las pacientes fueron sometidas a estimulación ovárica controlada, cuya respuesta fue evaluada midiendo los niveles de estradiol en suero, así como monitoreo del desarrollo folicular mediante foliculometría por ultrasonido transvaginal. Los criterios de selección de las pacientes se muestran en la tabla 1 y se eligieron con base en investigaciones previas en las cuales se buscaba identificar una correlación entre las variables que fueran significantes en él y nivel de expresión del transcriptoma en CC de diversos paneles de genes que se evaluaron.

*Tabla 1. Criterios de Selección de pacientes*

<b>Inclusión</b>	Pacientes con IMC entre 19 y 25 Pacientes sin factor masculino como causa de infertilidad Pacientes normorespondedoras con recuento folicular de 10 a 15 Pacientes con edades entre los 25 y los 37 años que realicen un FIV convencional Pacientes entre 37 a 41 años, quienes decidan hacer Diagnóstico Genético Preimpantación Pacientes con transferencia embrionaria producto de ovodonación entre los 25 y los 40 años
<b>No inclusión</b>	Pacientes con Diabetes mellitus (tipo I y II), insuficiencia renal, hipertensión (enfermedades crónicas preexistentes)
<b>Exclusión</b>	Pacientes con baja respuesta ovárica Pacientes con Miomatosis uterina de grandes elementos Pacientes con factor masculino severo como causa de infertilidad Pacientes que no presenten una evolución adecuada en los niveles de estradiol durante el seguimiento folicular Pacientes con hidrosálpinx. Pacientes con antecedentes de enfermedad pélvica inflamatoria Pacientes con VIH Pacientes con antecedentes de tratamientos con radiación pélvica o quimioterapia



El procesamiento y análisis de las muestras tuvo el esquema siguiente:



### **5.1 Obtención de Células de la Cúmula (CC)**

Las pacientes fueron sometidas a estimulación ovárica controlada con un agonista de la GnRH (Hormona liberadora de Gonadotropina), seguida de hiperestimulación ovárica con inyecciones diarias de FSH (Hormona Foliculoestimulante). Los protocolos de estimulación empleados fueron diseñados de acuerdo a los criterios del médico tratante. Se utilizaron niveles séricos de estradiol y ecografía transvaginal para monitorizar la respuesta ovárica. Después de la administración de hCG (Gonadotropina Coriónica Humana) para la maduración folicular final.

La punción folicular para la recolección ovular se realizó bajo anestesia general al concluir el ciclo de estimulación hormonal (que osciló entre de 10 a 14 días). Primero, se inició localizando los folículos antrales mediante ultrasonografía abdominal, posteriormente se introdujo una guía vía vaginal que lleva una aguja conectada a un sistema de aspiración para puncionar los folículos maduros (18 mm) y aspirar de 3 a 5 ml del líquido folicular que contiene a los ovocitos. Esta muestra se remitió al laboratorio FIV en un tiempo menor a 5 minutos para localizar los óvulos rápidamente bajo la lente de un microscopio estereoscópico. Los óvulos se mantuvieron en incubación en medio global total y GTL a 37.5°C en una atmósfera al 8.3% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de la fertilización. Se registró el número y la calidad de acuerdo a los criterios de la Tabla II. únicamente de óvulos recuperados (variable, de 10-25 óvulos por paciente). Una vez que se tuvieron los óvulos, y antes de la fertilización, se hizo el aislamiento de las CC mediante dispersión mecánica; éstas se depositaron en una gota de 20 µl de medio de cultivo Global Total.

### **5.2 Procesamiento de CC y extracción de RNA total**

Las muestras de Cúmula individual se recolectaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL añadiendo 100 µl de agua DEPC y 70 µl de Trizol<sup>®</sup> Reagent. Posteriormente se adicionó 70 µl de Cloroformo y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 15000 g durante 15 minutos en una

Centrifuga Sorvall Legend Micro 17, refrigerada. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 600  $\mu\text{l}$  con 150  $\mu\text{l}$  de Isopropanol, se mezcló por inversión durante 1 minutos y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 15000  $g$  durante 20 minutos decantando el sobrenadante. Para realizar los lavados del RNA se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de Etanol Absoluto seguido de una centrifugación a 13000  $g$  durante 5 minutos. Para finalizar el lavado del RNA se decantó el etanol y evaporó durante 10 minutos. Finalmente se hidrató el pellet con 12  $\mu\text{l}$  de agua DEPC durante 15 minutos. A continuación, se cuantificó el RNA en espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

### 5.3 qRT-PCR

Se diseñaron oligonucleótidos sintéticos de DNA para amplificar productos específicos de los genes PTGS 2, VCAN y L19; el diseño se realizó usando el programa Primer 3 plus, la confirmación de nuestros oligonucleótidos se hizo a través del programa Perl Primer, basándonos en los criterios de la tabla 2. Además, se consideraron otros parámetros como es la formación de dímeros, en dado caso que se presentaran estas estructuras se consideró que la energía de disociación del oligonucleótido debería ser menor a  $>-3$  kcal/mol, tabla 3.

*Tabla 2. Parámetros para el diseño de oligonucleótidos*

CRITERIO	PARÁMETROS ACEPTABLES
<b>Tamaño</b>	20-24 nucleótidos
<b>Similaridad</b>	Debe tener al menos 90% (%PC) (MFE primer)
<b>Formación de más productos</b>	Si los oligonucleótidos producen más de 1 producto, este debe ser $>1000$ para evitar su acumulación durante la amplificación (MFE iniciador)
<b>Autocomplementaridad</b>	Los dímeros extensibles son INACEPTABLES

**Tabla 3. Parámetros de aceptación de energía de disociación**

<b>Energía de disociación (Kcal/mol)</b>	<b>Aceptación</b>
0	<b>BUENO</b>
1	
1.5	
2	<b>ACEPTABLE</b>
3	<b>POCO ACEPTABLE</b>
4	<b>INACEPTABLE</b>

Las secuencias obtenidas fueron:

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
PTGS2	5'-CTGAAGCCCTATGAATCATTT-3'	5'-CATTACCCATAAGTCCTTTCAA-3'
VCAN	5'-TCAGCAAAGGACAATTCAATA-3'	5'-TTTAAAATGTTTGGGAGCA-3'
L19	5'-TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC-3'	5'-ATCAGCCCATCCTTGATCAGC-3'

(Ocampo A et al 2018)

El perfil transcripcional de cada muestra se obtuvo mediante la técnica de qRT-PCR en un solo paso, en el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) mediante el método de  $\Delta$ Ct comparativo. Para la preparación de la mezcla maestra se usó el kit Kappa Biosystems High Performance Reagents, con las especificaciones siguientes por reacción: 5.0  $\mu$ l de Sybr Green (Sybr®Fast), 0.2  $\mu$ l ROX High Reference Dye, 0.2  $\mu$ l de dUTP y 0.2  $\mu$ l RT Mix, 0.2  $\mu$ l del oligonucleótido sentido, 0.2  $\mu$ l del oligonucleótido antisentido.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador de tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems), con los siguientes programas:

Ciclos de Amplificación (40 ciclos)

- 42 °C → 5 minutos
- 95 °C → 5 minutos
- 95 °C → 15 segundos
- 56 y 61 °C → 30 segundos
- 72 °C → 1 minuto (Lectura)

Curva de disociación

- 95 °C → 15 segundos
- 60 °C → 1 minuto
- 95 °C → 15 segundos (Lectura)

#### 5.4 Rango dinámico

Como parte de las mejoras metodológicas se hicieron curvas de rango dinámico con ellas se evaluaron cambios cuantitativos de cada gen. Para el análisis cuantitativo se validó a cada uno de los genes blanco, esto para asegurar que el gen en cuestión como el endógeno presentara eficiencias de amplificación similares. La validación se hizo a partir de una curva estándar que cumplió los siguientes criterios:

- El análisis incluyo 5 logaritmos de la cantidad de RNA inicial
- Se hicieron diluciones seriadas para las concentraciones: 25, 20, 15, 10 y 5 ng para los genes PTGS2 y VCAN

Los valores de  $C_T$  obtenidos se graficaron para hacer un análisis de regresión semi logarítmica contra el logaritmo de las cantidades usadas para la construcción de la curva estándar.

Se generaron gráficas de regresión logística para cada uno de los genes, calculando el valor de la pendiente e Índice de correlación ( $R^2$ )

La ecuación para el coeficiente de correlación es:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x - \bar{x})^2)(\sum(y - \bar{y})^2)}}$$

Donde:

$x = \text{promedio de la variable } x$

$$y = \text{promedio de la variable } y$$

## 5.5 Electroforesis Capilar

Con los productos de PCR generados por el rango dinámico de cada gen, se realizó una dilución 1:1 para evaluar el peso molecular, concentración del fragmento y pureza de los amplicones generados mediante electroforesis capilar en el equipo LabchipGX bioanalyzer de Caliper LifeSciences de acuerdo a las especificaciones del fabricante utilizando el chip DNA 5K/RNA/CZE LabChip

## VI. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

### 6.1 Estudios R&R

Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad (R&R) determinan que parte de la variación observada en el proceso se debe al sistema de medición usado (Portuondo Y, *et. al.*, 2010).

La repetibilidad se refiere a la precisión o variabilidad de las mediciones cuando se tienen varias observaciones del mismo objeto en condiciones similares (mismo operador); mientras que la reproducibilidad es la precisión o variabilidad de las mediciones del mismo objeto en condiciones variables (diferentes operadores) (Gutiérrez H, 2013)

Las fuentes de variabilidad que se pueden evaluar en un estudio R&R son: variabilidad del producto, del instrumento y de los operadores, la cual puede expresarse:

$$\sigma^2_{total} = \sigma^2_{prod} + \sigma^2_{oper} + \sigma^2_{instr}$$

Donde:

$$\sigma^2_{total} = \text{variabilidad total observada}$$

$$\sigma^2_{prod} = \text{varianza atribuible al producto (partes o piezas)}$$

$$\sigma^2_{oper} = \text{variabilidad o error del instrumento de medición}$$

$$\sigma^2_{instr} = \text{variabilidad o error debido a operadores}$$

Por lo tanto, el error o variabilidad de las mediciones debido a la repetibilidad y reproducibilidad se obtiene:

$$\sigma^2_{R\&R} = \sigma^2_{repeti} + \sigma^2_{reprod}$$

Donde:

$$\sigma^2_{R\&R} = \text{variabilidad del estudio R\&R}$$

$$\sigma^2_{repeti} = \text{variabilidad atribuible a la repetibilidad}$$

$$\sigma^2_{reprod} = \text{variabilidad atribuible a la reproducibilidad}$$

Los métodos para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones están basados en la evaluación estadística de las dispersiones de los resultados, ya sea en forma de rango, varianza o desviación estándar. Los métodos que se utilizan son: análisis de medias, promedio y rango, y ANOVA (Análisis de Varianza) (Llamosa L *et. al.*, 2007)

Según las recomendaciones del manual del grupo Automotive Industry Action Group (AIAG), si la variación del sistema de medición es inferior a 10% de la variación del proceso, entonces es aceptable. Para evaluar la variación del proceso, se comparó la contribución del R&R total del sistema de medición en la columna %Var. del estudio (%Tolerancia, %Proceso) indicada en la salida con los valores de la tabla 4.

*Tabla 4. Criterios de Aceptación de Estudio R&R*

Porcentaje de variación del proceso	Aceptabilidad
<b>Menos de 10%</b>	El sistema de medición es aceptable
<b>Entre el 10% y 30%</b>	El sistema de medición es aceptable dependiendo de la aplicación, el costo del dispositivo de medición, el costo de la reparación u otros factores.
<b>Más del 30%</b>	El sistema de medición no es aceptable y debe ser mejorado

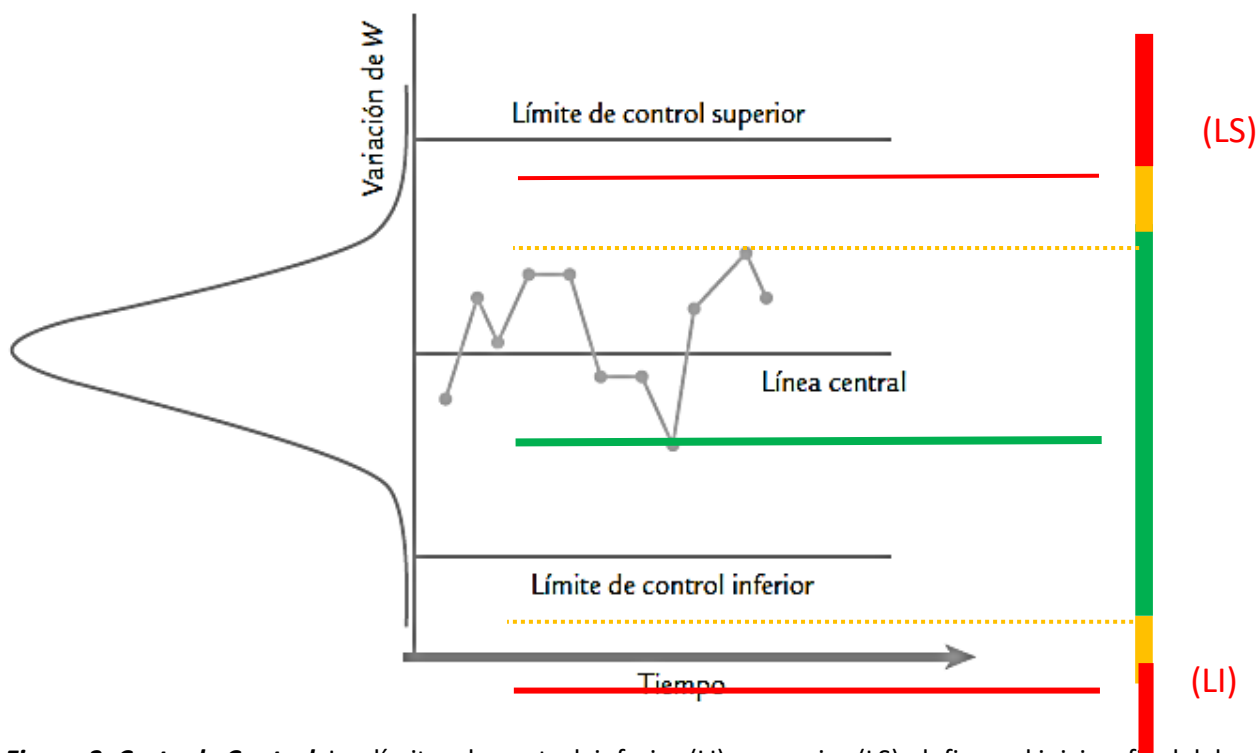
## 6.2 Cartas de control

El objetivo de una carta de control es observar y analizar el comportamiento de un proceso a través del tiempo. Las cartas de control pueden aplicarse para analizar la variabilidad de variables de entrada o de control del mismo proceso. En una carta de control, figura 4, el objetivo es analizar de donde a donde las observaciones (mediciones) presentan variación (ver campana) y como varia el estadístico de la carta de control a través del tiempo.

Las cartas de control para variables se aplican a características de calidad de tipo continuo, que requieren de un instrumento de medición. En este tipo de cartas, las variables más comunes a analizar son:  $\bar{X}$  (de medias),  $R$  (de rangos),  $S$  (de desviaciones estándar) y  $X$  (de medidas individuales).



Se consideró el uso de cartas de control, para evaluar las concentraciones propuestas en el rango dinámico: se estableció como LS y LI los valores de operatividad utilizados con la concentración actual.



**Figura 3. Carta de Control.** Los límites de control, inferior (LI) y superior (LS), definen el inicio y final del rango de variación del estadístico, de forma que, cuando el proceso está en control estadístico existe una alta probabilidad de que los valores de W caigan dentro de los límites. Pero, si se observa un punto fuera de los límites de control, es señal de que existe variación que puede influir en el proceso de calidad.

### 6.3 Prueba U de Mann-Whitney

La prueba de U de Mann-Whitney es una alternativa a la prueba “t” sobre diferencias de medias cuando: 1) no se cumplen los supuestos en los que se basa la prueba de t (normalidad y homocedasticidad), o 2) no es apropiado utilizar la prueba de t porque el nivel de medidas de los datos es ordinal (Rivas-Ruiz et al. 2013)

Consideremos dos muestras independientes:  $Y_1$  de tamaño  $n_1$ , e  $Y_2$ , de tamaño  $n_2$ , extraídas de la misma población o de dos poblaciones idénticas. Si mezclamos las  $n_1 + n_2 = n$  observaciones y, como si se trataran de una sola muestra, asignamos rangos  $R_i$  a las  $n$  puntuaciones (un 1 a la más pequeña, un 2 a la más pequeña de las restantes, un  $n$  a la más grande; resolviendo los empates asignando el rango promedio), tendremos  $n_1$  rangos  $R_{i1}$  (los  $n_1$  rangos correspondientes a las observaciones de las muestras  $Y_1$ ) y  $n_2$  rangos  $R_{i2}$  (los  $n_2$  rangos correspondientes a las observaciones de las muestras  $Y_2$ ).

Consideremos ahora los estadísticos  $S_1 =$  “suma de los rangos asignados a la muestra 1” y  $S_2 =$  “suma de los rangos asignados a la muestra 2”. El estadístico  $U$  adopta la siguiente forma en cada grupo:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - S_1 \quad \text{y} \quad U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - S_2$$

Puesto que suponemos que las dos muestras se han extraído de dos poblaciones idénticas, cabe esperar que  $U_1$  y  $U_2$  sean aproximadamente iguales (excepto en la cantidad atribuible a las fluctuaciones propias del azar muestral). Si  $U_1$  y  $U_2$  son muy distintos, existirá cierta evidencia de que las muestras proceden de poblaciones distintas. Por tanto, la hipótesis nula de que ambos promedios poblacionales son iguales podría rechazarse si  $U_1$  o ( $U_2$ ) es demasiado grande o demasiado pequeño. Para determinar esto último, podemos basar nuestra decisión en la probabilidad concreta asociada al estadístico  $U$ :

$$U = U_1 \quad \text{si } U_1 < n_1 n_2 / 2$$

$$U = U_2 \quad \text{si } U_1 > n_1 n_2 / 2$$

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Validación del sistema PVL

Se llevó a cabo la validación del sistema de selección embrionaria y predicción de embarazo, denominado PVL en pacientes que se someten a procedimientos de alta complejidad. Antes de que una prueba diagnóstica aparezca en el mercado es necesario generar y validar los protocolos que serán empleados durante su operación, por ello se debe establecer un estricto control de evaluación de la prueba en cuestión control, que inicia desde el procesamiento de muestras hasta la obtención de un resultado.

La primera fase de este proyecto consistió en validar el sistema de selección de embriones, para ello participaron un total 11 pacientes, con una edad promedio de 37.45 años y un promedio de IMC de 24.01 (tabla 5).

**Tabla 5. Características de la población para la validación del sistema PVL**

	<b>Prom.</b>	<b>DE</b>	<b>Rango</b>
<b>Edad</b>	37,45	4,12	30-43
<b>IMC</b>	24,01	3,216	19,23-29,64
<b>%FERTILIZACIÓN</b>	72,5	21,64	30,77-100

La evaluación del sistema consistió en reproducir cada uno de los pasos del protocolo de selección embrionaria, que incluyó la recolección y procesamiento de células de la CC individuales por paciente, para la extracción de ARNm. Posteriormente se generó y analizó el perfil transcripcional de CC por paciente. Cabe mencionar, que la generación del análisis genético de cada óvulo fue obtenida por duplicado vía qRT-PCR tiempo real, por dos operadores distintos, (AZ o PO). Una vez que el equipo arroja los datos de CT (*Cycle Threshold*) de cada una de las muestras, se realiza la normalización de la expresión de cada gen con el control endógeno L19, como resultado se generó el índice de expresión PVL.

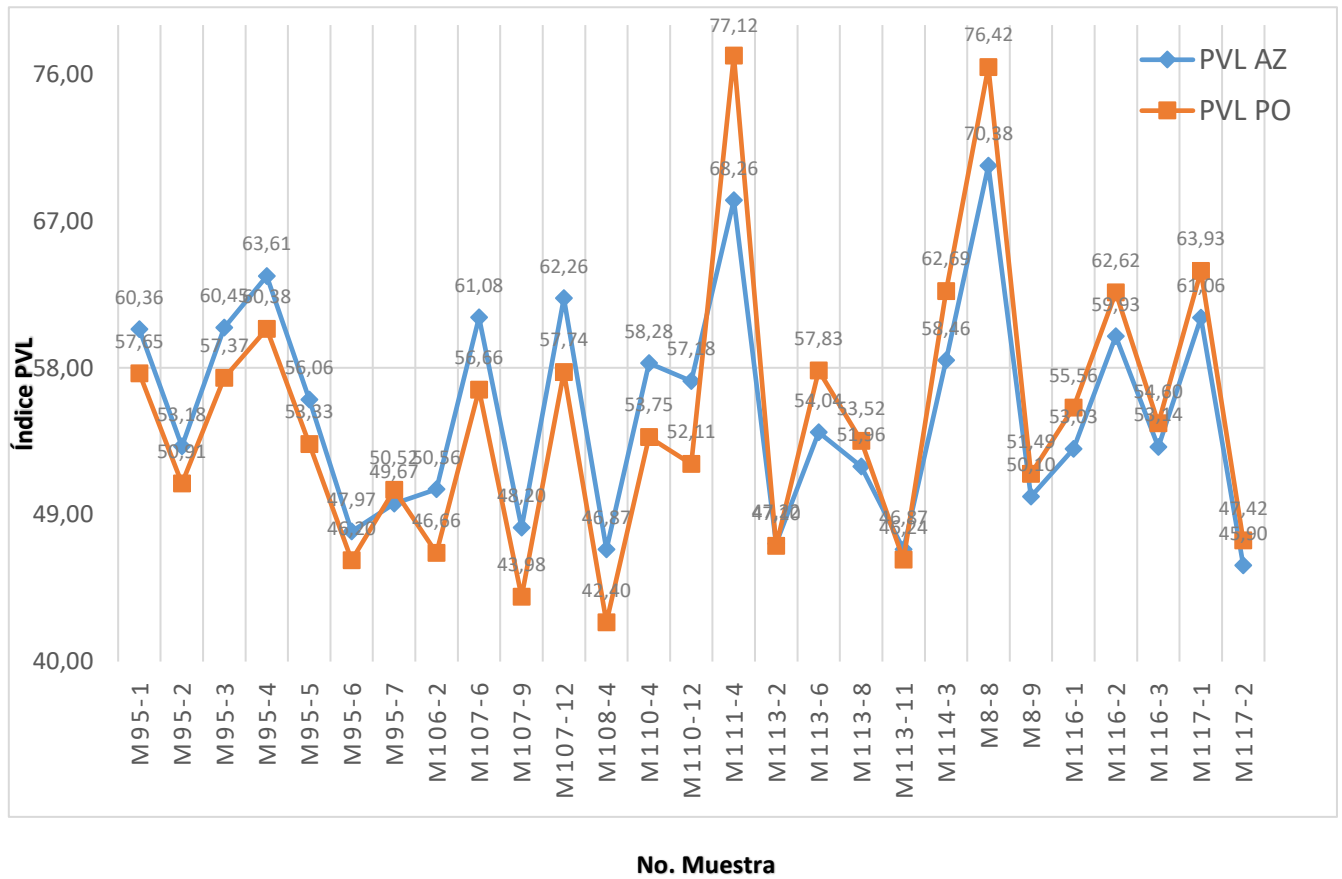
a) **Tabla 6. Análisis Mann Whitney**

Mann-Whitney		
Muestra	N	Mediana
PVL AZ	27	54.0393
PVL PO	27	53.7500

b) **Tabla 7. Resultados Estudio R&R**

Estudio R&R	
Diferencia	0.8058
IC para la diferencia	(-3.520; 4.889)
Confianza	95.14%
Valor de P	0.665
Desv. Estándar Repetibilidad	0.000
Desv. Estándar Reproducibilidad	0.000

c) **Gráfica 1. Superposición de índice PVL entre Operadores**



**Figura 4. Evaluación de reproducibilidad y repetibilidad entre operadores para 27 muestras. a) Prueba de Mann-Whitney, b) Estudio R&R y c) Superposición de índice PVL**

Con la obtención del índice PVL de cada una de las muestras, se inició con el análisis de datos, la prueba estadística que se utilizó para evaluar la reproducibilidad del sistema fue Mann-Whitney, con ella se valoró la diferencia entre las medias de los operadores AZ y PO esto se logró al generar una gráfica de superposición para evaluar las mediciones del índice PVL de cada operador.

El análisis de la prueba de Mann-Whitney (panel a, figura 5) y la gráfica de superposición (panel b, figura 5). La prueba de Mann-Whitney encontró una diferencia de 0.2893 entre la media del índice PVL del operador AZ y PO. Como parte del análisis de reproducibilidad y repetitividad incluimos los resultados generados a partir del estudio R&R (panel c, figura 5). Esta prueba arroja una desviación estándar para repetitividad de 0.000 y para reproducibilidad del sistema es de 0.0000, con una confianza de 95.14% para el estudio R&R y un p valor de 0.665 siendo no significativo. Por lo tanto, al presentar una variación menor al 10% nuestro sistema cumple con los rangos de aceptabilidad para el análisis R&R.

## **7.2 Evaluación del uso del iniciador PTGS2-60 para la generación del perfil de expresión PVL en CC como alternativa del iniciador PTGS2-A (actual)**

Como parte de las mejoras al sistema se generaron nuevos iniciadores para el gen PTGS2, con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad del sistema de selección. Las secuencias de los iniciadores no son mostradas debido a que son propiedad del Instituto Ingenes.

El nuevo iniciador de PTGS2, fue llamado ptgs2-60 por su temperatura de alineamiento a 60°C., su diseño, se efectuó de acuerdo a los parámetros de la tabla 2 y 3, para la secuencia de mRNA del gen ptgs2.

La caracterización de los amplicones para los iniciadores PTGS2-A, PTGS2-60 y VCAN se muestran en las figuras 6, 7 y 8 respectivamente. En el panel a de todos los casos, se presentan las curvas de disociación de cada uno de los amplicones, este

análisis se basó en evaluar la  $T_m$  (temperatura de melting) de cada iniciador, la  $T_m$  es definida como la temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula esta desnaturalizado. En el panel b, se observa un aumento en la fluorescencia que es directamente proporcional al aumento en el número de ciclos en la reacción, lo que indica que hubo amplificación. Cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica, que depende de su longitud y composición, con este análisis demostramos que en todos los casos sólo existe un producto y éste presenta  $T_m$  esperada de 81 para PTGS2-A y VCAN y de 80 para PTGS2-60. Tras la amplificación de los mensajeros, el siguiente paso fue generar una curva de rango dinámico para los iniciadores (PTGS2, PTGS2-60, VCAN) (panel c). Como parte de la evaluación de marcadores se hizo el corrimiento electroforético (electroforesis capilar) de los productos de PCR provenientes del rango dinámico de PTGS2 y VCAN (panel d).

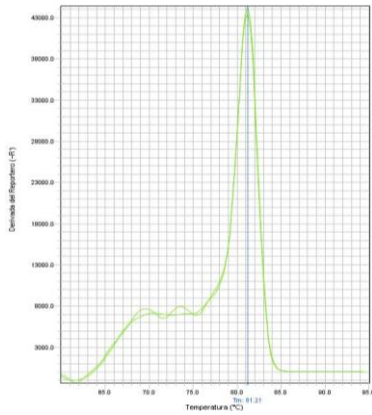
La evaluación de la eficiencia de amplificación, de los iniciadores PTGS2-A, PTGS2-60 y VCAN fue basada en la capacidad que tienen los oligonucleótidos de duplicar la cantidad de ADNc molde disponible en cada ciclo, es decir cuando se tiene un 100% de amplificación significa, que en cada ciclo se copió todo el ADNc del ciclo anterior. La eficiencia de amplificación de cada iniciador se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$E = [(10^{-1/k}) - 1] \times 100\%,$$

en dónde:

*k* = valor de la pendiente de la recta

a)  
**Gráfica 2. Disociación de Ptgs2-A**

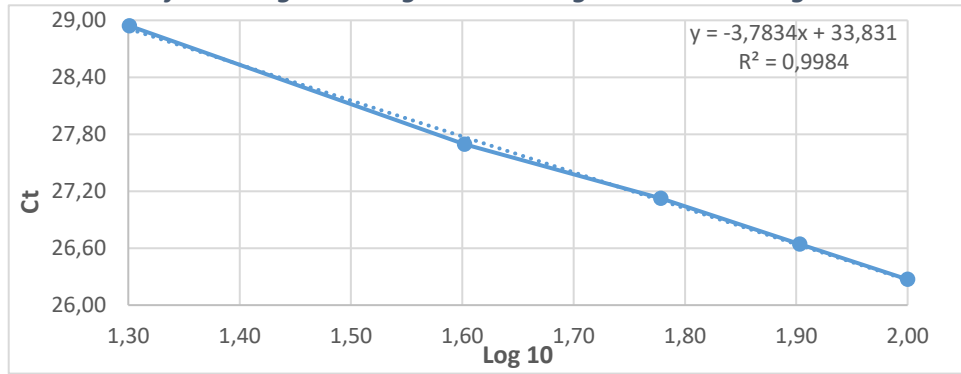


b)  
**Gráfica 3. Amplificación de Ptgs2-A**



c)

**Gráfica 4. Regresión Logística del rango dinámico de Ptgs2-A**



**Tabla 8. Resultados qRT-PCR de Ptgs2-A**

	Concentración de RNA				
	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng
<b>Ct</b>	26.27	26.70	27.12	27.70	28.94
<b>Melting</b>	81.27	81.19	81.12	80.97	80.98

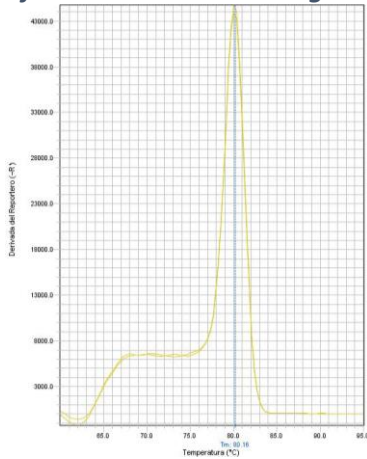
d)

**Tabla 9. Resultados Electroforesis Capilar para Ptgs2-A**

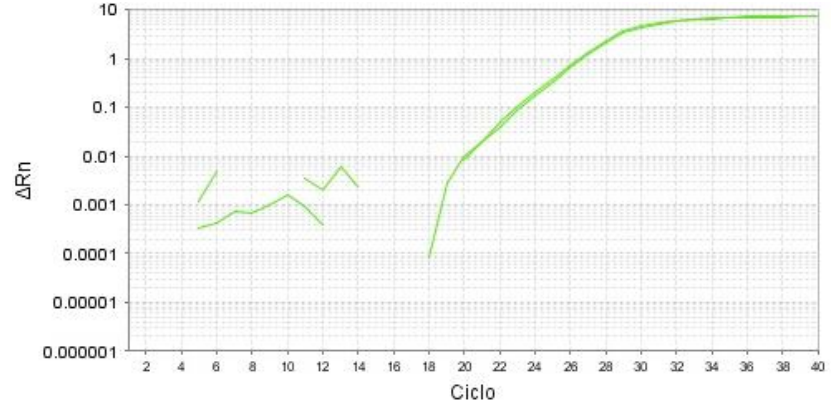
Concentración RNA	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng	Marcador
<b>Gel</b>						= 700 = 500 = 300 ← 199 pb = 100
<b>Pureza</b>	95,98	94,89	93,23	91,41	90,86	<b>Ptgs2-A</b>
<b>Concentración</b>	78,08	75,27	72,38	70,25	63,12	

**Figura 5. Características del amplicón PTGS2-A.** Gráfica de amplificación (a). Curva de disociación (b). Rango dinámico de PTGS2, muestra la gráfica resultante de concentraciones que van de 20 a 100 ng de RNA molde en diluciones seriadas (c). Corrimiento electroforético de los productos de PCR provenientes del rango dinámico.

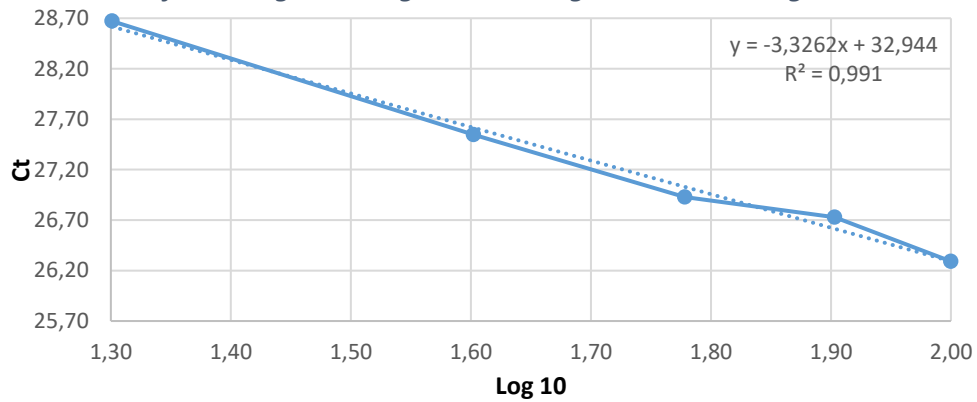
a) **Gráfica 5. Disociación de Ptgs2-60**



b) **Gráfica 6. Amplificación de Ptgs2-60**



c) **Gráfica 7. Regresión Logística del rango dinámico de Ptgs2-60**



**Tabla 10. Resultados de qRT-PCR de Ptgs2-60**

	Concentración de RNA				
	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng
<b>Ct</b>	26.34	26.73	26.88	27.64	28.68
<b>Melting</b>	80.08	80.08	80.08	80.00	80.00

d) **Tabla 11. Resultados Electroforesis Capilar para Ptgs2-60**

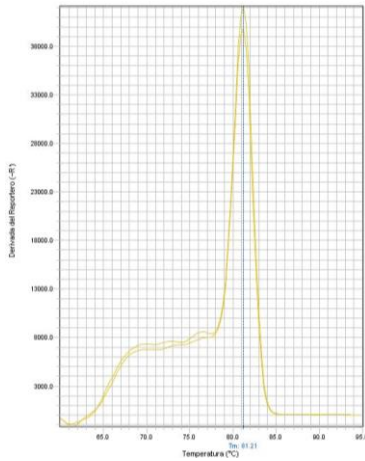
Concentración RNA	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng	Marcador
<b>Gel</b>						
<b>Pureza</b>	81.88	81.72	79.88	70.10	67.78	<b>Ptgs2-60</b>
<b>Concentración</b>	69.57	67.05	61.53	55.64	50.32	

**Figura 6. Características del amplicón PTGS2-60.** Gráfica de amplificación (a). Curva de disociación (b). Rango dinámico de PTGS2, muestra la gráfica resultante de concentraciones que van de 20 a 100 ng de RNA molde en diluciones seriadas (c). Corrimiento electroforético de los productos de PCR provenientes del rango dinámico.



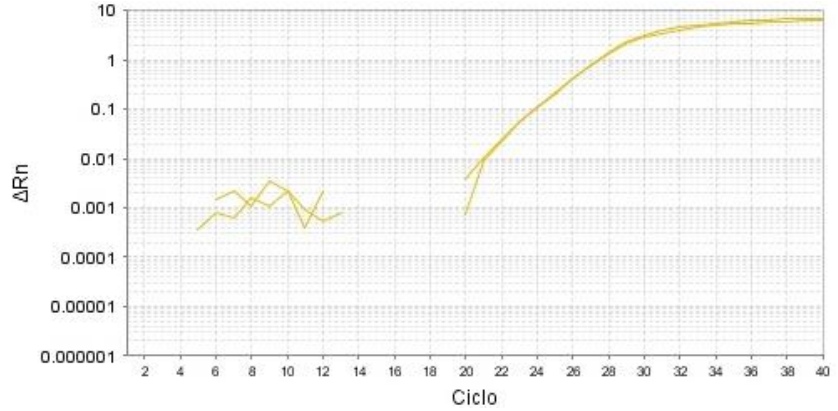
a)

**Gráfica 8. Disociación de VCAN**



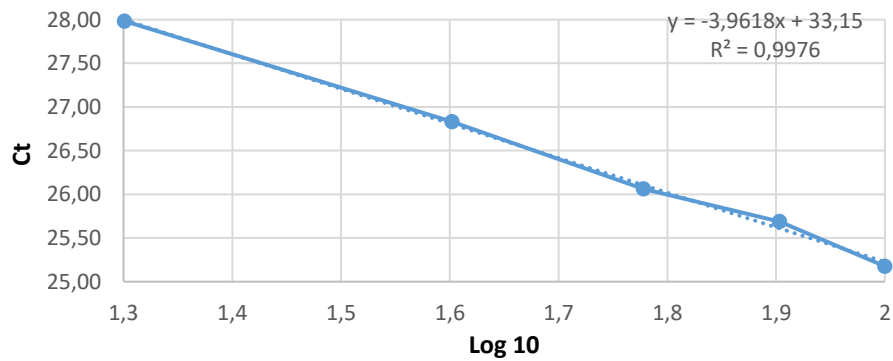
b)

**Gráfica 9. Amplificación de VCAN**



c)

**Gráfica 10. Regresión Logística del rango dinámico de VCAN**



**Tabla 12. Resultados de qRT-PCR de VCAN**

	Concentración de RNA				
	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng
<b>Ct</b>	25.12	25.71	26.12	26.87	27.84
<b>Melting</b>	81.58	81.43	81.43	81.28	81.29

d)

**Tabla 13. Resultados Electroforesis Capilar para VCAN**

Concentración RNA	100 ng	80 ng	60 ng	40 ng	20 ng	Marcador
<b>Gel</b>						300 233 pb 100
<b>Pureza</b>	94.43	93.61	90.90	88.21	84.63	<b>VCAN</b>
<b>Concentración</b>	55.62	54.49	51.38	45.61	39.74	

**Figura 7. Características del amplicón VCAN.** (a). Curva de disociación (b). Rango dinámico de PTGS2, muestra la gráfica resultante de concentraciones que van de 20 a 100 ng de RNA molde en diluciones seriadas (c). Corrimiento electroforético de los productos de PCR provenientes del rango dinámico.

El resultado para el iniciador PTGS2-A fue de una eficiencia de amplificación del 83.88% con una pendiente de -3.78, mientras que PTGS2-60 presentó una eficiencia del 100 % con una pendiente de -3.32; por último VCAN demuestra una eficiencia de 78.86%, con una pendiente de -3.96. Cabe mencionar que, un valor de la pendiente cercano o igual a -3.3 origina amplificaciones del 100%.

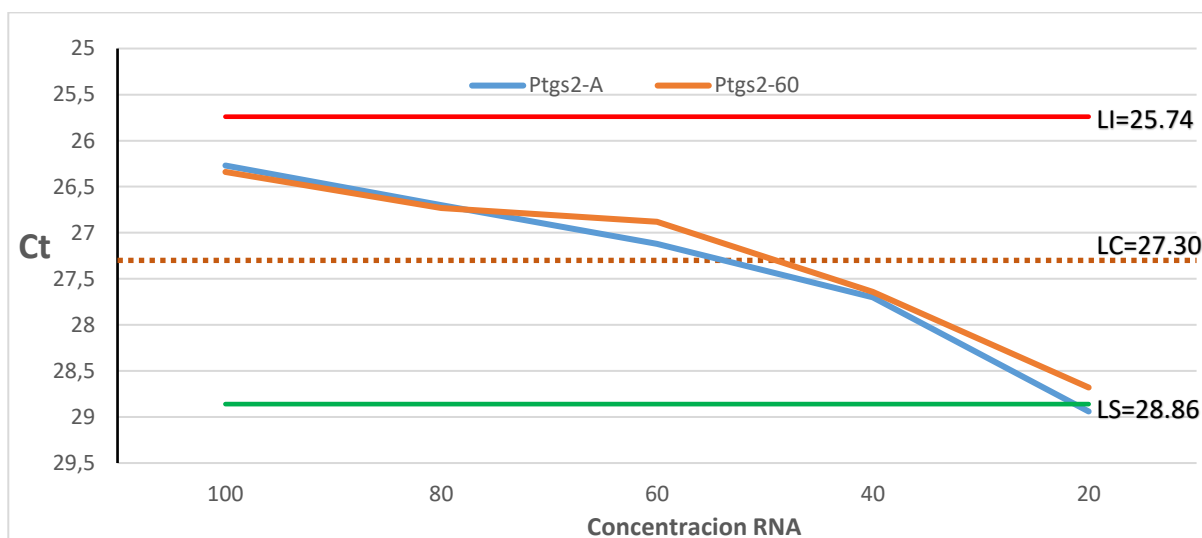
El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) para PTGS2-A fue de 0.9984, PTGS2-60 de 0.9910 y para VCAN de 0.9976. Este valor determina si el protocolo es reproducible, es decir si nuestra regresión logística presenta un índice de correlación  $\geq 0.95$  es aceptable para el rango dinámico establecido.

Con estos resultados se observó que el iniciador PTGS2-60 presentó una mejor eficiencia de amplificación en comparación al iniciador PTGS2-A. Sin embargo, fue necesario evaluar otras propiedades específicas, como es el producto de amplificación del rango dinámico. Para ello se realizó un corrimiento de electroforesis capilar (EC), en el que se evaluó tamaño, pureza y concentración del amplicón (Figura 5 y 6, panel d). Con los datos obtenidos se confirmó que el tamaño del amplicón para PTGS2-A es de 199 pb, al evaluar la concentración y pureza de los amplicones se encontró que el producto de PCR proveniente de un molde de 20 ng presenta una pureza de 90.86 % y una concentración 63.12 ng, mientras que el producto de PCR proveniente de un molde de 100 ng presenta una pureza del 95.98% y una concentración de 78.08.

Para el amplicón de PTGS2-60 ng se tuvo un fragmento de 189-190 pb, con una pureza de 67.78% y una concentración de 50.32 para un producto de PCR proveniente de un molde de 20 ng. Por otro lado, el producto de PCR de un molde de 100 ng presentó una pureza del 81.88% y una concentración de 67.78

Finalmente, el amplicón de VCAN presentó un tamaño de 233 pb, con una pureza de 84.63 y una concentración de 39.74 para un producto de PCR proveniente de un molde de 20 ng. La pureza del producto de PCR de un molde de 100 ng fue de 94.43 con una concentración de 55.62.

Una vez que se obtuvieron los datos de expresión, se realizó un análisis de Cartas de control, para comparar los valores de Ct obtenidos por los iniciadores PTGS2-A y PTGS2-60. En la construcción de las cartas de control, la línea central (puntos) de 27.30 simboliza el valor medio de la característica de calidad. Finalmente, las otras dos líneas, límite inferior de 25.74 e superior de 28.6, flanquean a la anterior a una distancia determinada, gráfico 11. Estos límites fueron escogidos de manera que, si el proceso está bajo control, casi la totalidad de los puntos muestrales se halle entre ellos. Así que, un punto que se encontrado fuera de los límites de control se interpreta como una evidencia de que el proceso está fuera de control. Los resultados sugieren que ambos iniciadores cumplen con la calidad del proceso (Tabla 14).



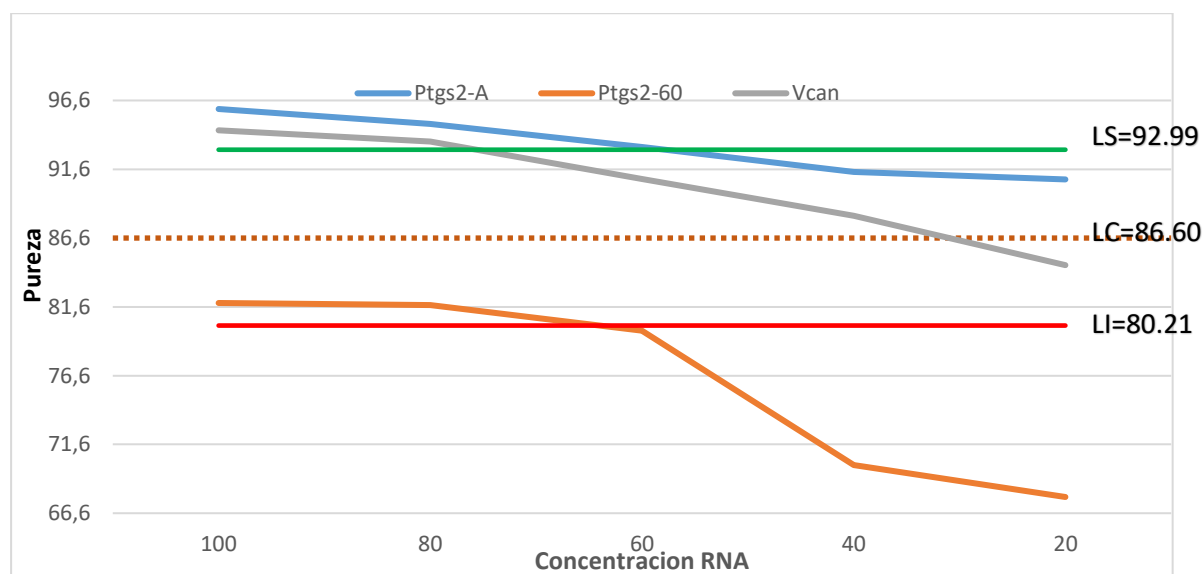
**Gráfica 11. Análisis de carta de control (inversa) para el gen PTGS2.** La gráfica muestra los valores de Ct del gen PTGS2 cuando se utilizan los iniciadores PTGS2-A y PTGS2-60. La línea roja marca el Límite Inferior (LI)=25.74, línea amarilla corresponde al Límite Central (LC)=27.30 y la línea verde denota el Límite Superior (LS)=28.86

El siguiente análisis de Cartas control fue valorar la pureza de los productos de PCR. De igual forma se construyó una carta de control para la pureza con las características siguientes: línea central de 86.60, el límite superior establecido fue de 92.99 y el límite inferior fue de 80.21, lo anterior se presenta en el gráfico 12.

**Tabla 14. Ct obtenidos de qRT-PCR para construcción de Cartas de Control para el gen Ptgs2**

Ct	Concentración RNA					Promedio	Rango
	100	80	60	40	20		
<b>Ptgs2-A</b>	26,27	26,7	27,12	27,7	28,94	27,35	2,67
<b>Ptgs2-60</b>	26,34	26,73	26,88	27,64	28,68	27,25	2,34
<b>Limite Superior (LS)</b>	28,86	28,86	28,86	28,86	28,86		
<b>Límite Inferior (LI)</b>	25,74	25,74	25,74	25,74	25,74		
<b>Limite Central (LC)</b>	27,3	27,3	27,3	27,3	27,3		

Al analizar los datos de pureza, tabla 15, se encontró que la pureza de los productos para PTGS2-A (línea azul) y VCAN (línea gris) presentan una pureza >94% situándolos por arriba de la línea central, no así para PTGS2-60 (línea naranja) quien presentó una pureza del 81.88%. Otra de las observaciones fue que a medida que la concentración del molde disminuía, los productos de PCR presentaban una pureza menor, siendo más notorio el cambio para los productos de PCR de PTGS2-60 (Gráfico 12).



**Gráfica 12. Cartas de control para el análisis de pureza de los productos de PCR.** La gráfica muestra los valores de pureza obtenidos por electroforesis capilar. La línea verde marca el Límite Superior (LS)=92.99, línea amarilla corresponde al Límite Central (LC)=86.60 y la línea roja denota el Límite Inferior (LS)=80.21.

**Tabla 15. Pureza de amplificaciones de los genes *Ptgs2* y *VCAN***

<b>PUREZA</b>	<b>Concentración RNA</b>						
	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>Promedio</b>	<b>Rango</b>
<b><i>Ptgs2-A</i></b>	95,98	94,89	93,23	91,41	90,86	93,27	5,12
<b><i>Ptgs2-60</i></b>	81,88	81,72	79,88	70,1	67,78	76,27	14,1
<b><i>VCAN</i></b>	94,43	93,61	90,9	88,21	84,63	90,36	9,8
<b><i>Limite Superior (LS)</i></b>	93,02	93,02	93,02	93,02	93,02		
<b><i>Límite Inferior (LI)</i></b>	80,24	80,24	80,24	80,24	80,24		
<b><i>Limite Central (LC)</i></b>	86,6	86,6	86,6	86,6	86,6		

Con el análisis anterior, se concluyó que a pesar de que el iniciador para PTGS2-60 mostró una eficiencia de amplificación del 100%, su concentración y pureza disminuyeron a medida que la concentración del molde bajo, por lo tanto, este iniciador no cumple con los estándares establecidos por el laboratorio, pues la pureza y concentración ideal de los amplicones debe ser por arriba del 90%

El siguiente paso de valoración de los iniciadores, consistió en verificar su comportamiento al generar el índice de expresión PVL para una cohorte embrionaria, utilizando a los iniciadores PTGS2-A, PTGS2-60, VCAN y L19, al término de la generación del índice se generó una predicción de embarazo para ambos iniciadores del gen PTGS2 con el fin de comprobar la predicción con el resultado clínico de embarazo. En esta etapa del proyecto se reclutaron un total de 17 pacientes con una edad promedio de 38.53 (Tabla 16). El número de muestras de CC de óvulos individuales analizados fue de 41, de los cuales 18 embriones fueron transferidos, 22 embriones presentaron aneuploidías y uno se encuentra en espera de ser transferido.

**Tabla 16. Demografía de la Población para la evaluación del Índice PVL**

	<b>PROM.</b>	<b>DE</b>	<b>RANGO</b>
<b>EDAD</b>	38.53	3.06	32-43
<b>IMC</b>	24.28	3.44	19,68-32,76
<b>%FER</b>	71.7	17.62	37,50-100

El análisis inicial fue evaluar reproducibilidad y repetibilidad de la expresión del gen PTGS2 utilizando a los iniciadores PTGS2-A y PTGS2-60. Se evaluaron las medias de

los valores obtenidos por cada iniciador para el gen PTGS2 a través de la prueba estadística de Mann-Whitney (panel a, figura 9), en donde se encontró una diferencia de 0.114 entre las medias de los Ct.

La reproducibilidad y repetibilidad de los niveles de expresión se midió a través de la prueba R&R (panel c, figura 9), los resultados mostraron una desviación estándar para repetibilidad de 0.18210 y para reproducibilidad de 0.0000, con una confianza del 99.99% y un p valor de 0.8239. Con lo anterior, se aprecia que no existe diferencia estadísticamente significativa en el valor del Ct generado por cada uno de los iniciadores del gen PTGS2.

Al comprobar que PTGS2 muestra el mismo patrón de expresión, se generó el índice PVL, la diferencia de la media para el índice PVL (PTGS2-A y PTGS2-60) fue de 0.091 de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney (panel a, figura 10). El análisis de reproducibilidad y repetibilidad mediante un estudio R&R (panel b, figura 10) mostró una desviación estándar para repetibilidad de 0.0000 y para reproducibilidad de 0.0000, con una confianza de 99.99% y un p valor de 0.9335. Los resultados demuestran que no existen diferencia estadísticamente significativa en la generación del índice PVL (Figura 10). Sin embargo, el gráfico de superposición (panel c, figura 10) mostró evidencia que existe diferencia evidente entre el comportamiento los índices PVL generados por cada iniciador, siendo una posible variable que pueda generar falsos diagnósticos al ser reemplazado.

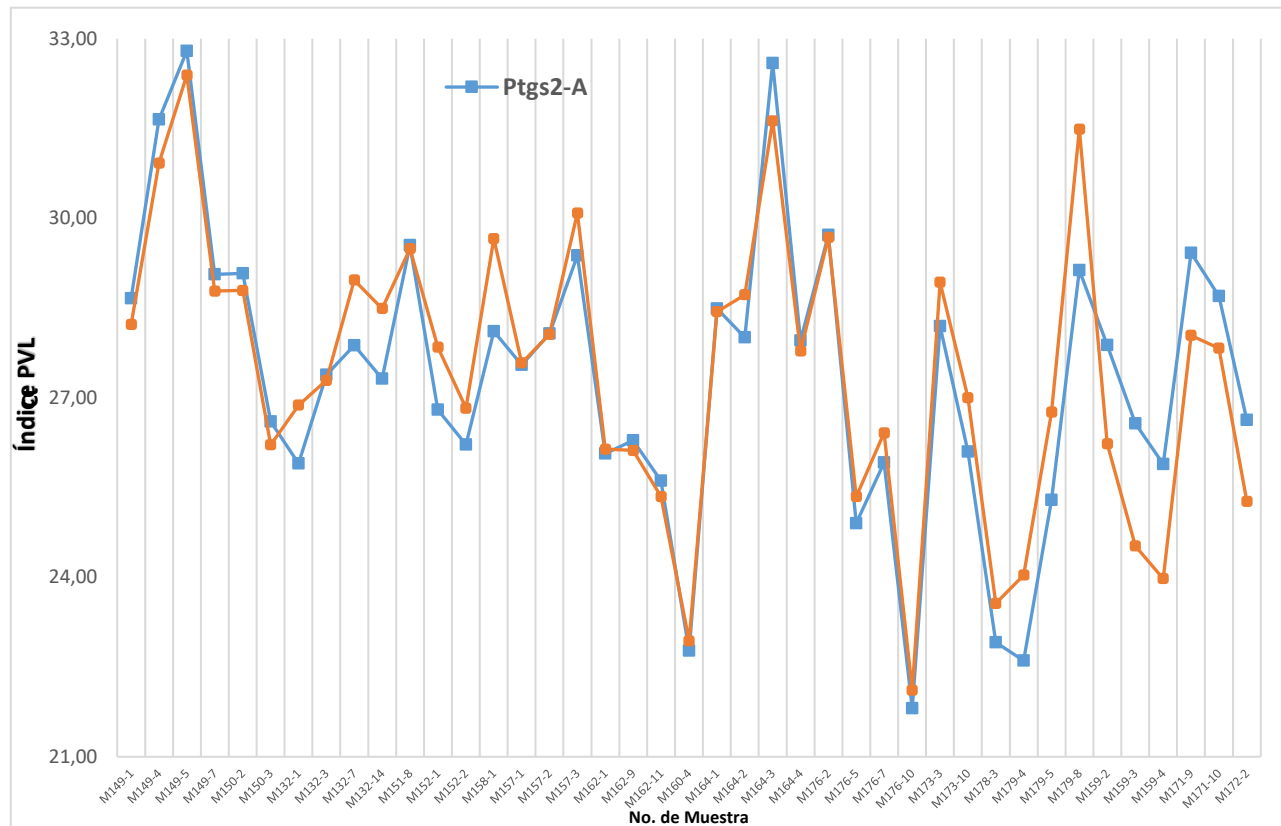
a) Tabla 17. Análisis Mann Whitney

Mann-Whitney		
Muestra	N	Mediana
Ct Ptg2-A	41	27.546
Ct Ptg2-60	41	27.781

b) Tabla 18. Resultados Estudio R&amp;R

Estudio R&R	
Diferencia	-0.114
IC para la diferencia	(-1.465; 1.252)
Confianza	99.9 %
Valor de P	0.8239
Desv. Estándar Repetibilidad	0.18210
Desv. Estándar Reproducibilidad	0.000

c) Gráfica 13. Superposición de los valores del Ct de cada juego de oligonucleótidos para el gen Ptg2



**Figura 8. Evaluación de reproducibilidad y repetibilidad para el índice de expresión PVL.** La imagen muestra el índice PVL generado por la expresión de los genes PTGS2 y VCAN. El gen PTGS2 se amplificó utilizando a los iniciadores PTGS2-A y PTGS2-60.

a) Tabla 19. Análisis Mann Whitney

Mann-Whitney		
Muestra	N	Mediana
PVL Ptgs2-A	41	55.836
PVL Ptgs2-60	41	56.498

b) Tabla 20. Resultados Estudio R&R

Estudio R&R	
Diferencia	-0.091
IC para la diferencia	(-4.528; 4.207)
Confianza	99.9 %
Valor de P	0.9335
Desv. Estándar Repetibilidad	0.000
Desv. Estándar Reproducibilidad	0.000

c) Gráfica 14. Superposición de índice PVL entre los oligonucleótidos para el gen Ptgs2

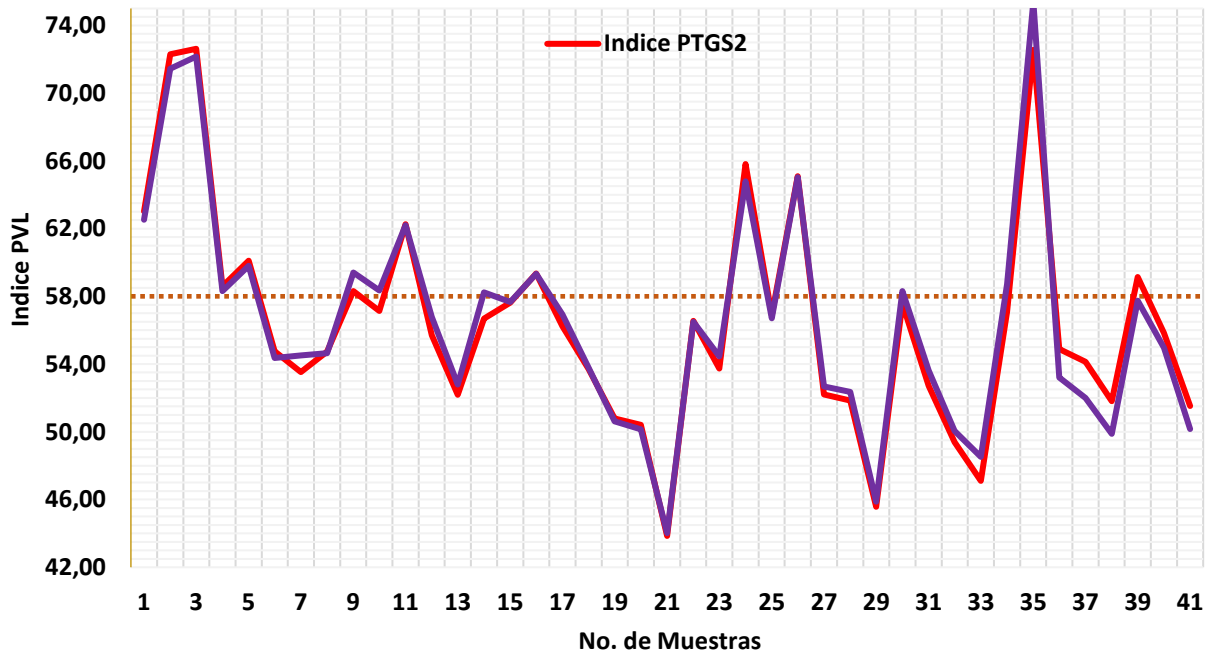


Figura 9. Evaluación de reproducibilidad y repetibilidad entre Índice PVL de Ptgs2-A y Ptgs2-60 para 41 muestras. a) Prueba de Mann-Whitney, b) Estudio R&R y c) Superposición de valores Ct de Ptgs2-A y Ptgs2-60



### 7.3 Manual de procedimientos y programa de capacitación del sistema de expresión PVL

Como parte final de la validación del sistema de análisis del perfil transcripcional de CC vía qRT-PCR, se realizó un manual de procedimientos y plan de capacitación para el nuevo personal como herramienta de selección embrionaria para el laboratorio de investigación y diagnóstico molecular del Instituto Ingenes (LIDMOL).

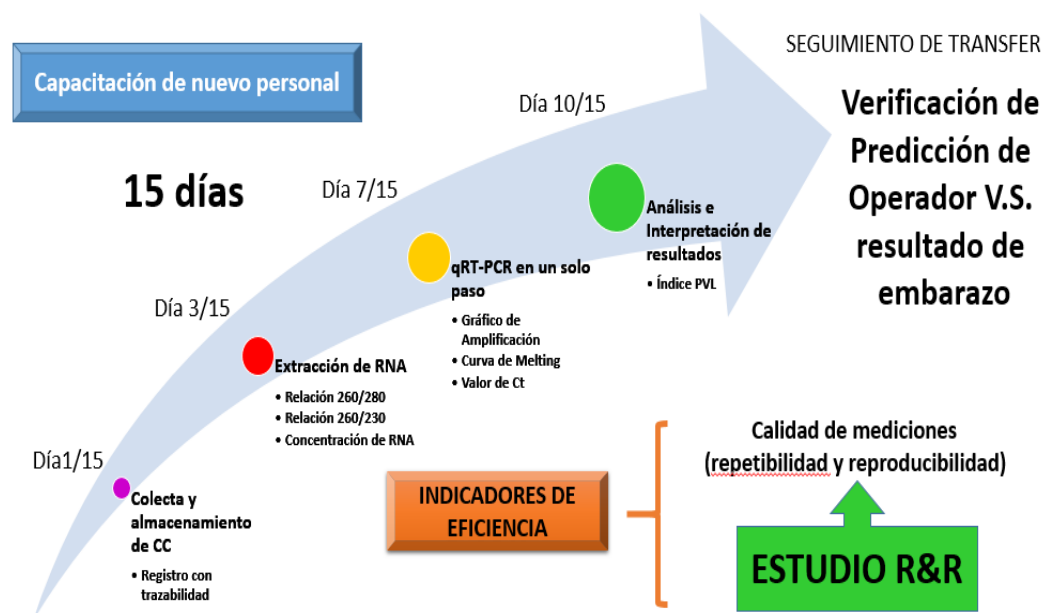
La elaboración del manual de procedimientos estuvo sujeta a especificaciones propias del instituto Ingenes, figura 11. Este manual, está dirigido a pacientes con historial de pérdidas recurrentes, edad materna avanzada, Fallo de implantación tras varios intentos FIV, Pacientes con endometriosis, baja reserva y aquellas pacientes que no se han embarazado con diagnóstico normal de PGD. Este procedimiento aplica para las áreas médicas, laboratorio FIV y LIDMOL del instituto Ingenes, así mismo el manual de procedimientos fue revisado por el jefe inmediato y el jefe del departamento para su operatividad inmediata.

<b>MANUAL DE PROCEDIMIENTOS</b>	
<b>1. TÍTULO</b>	<b>PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA METODOLOGÍA DE SCORE DE IMPLANTACIÓN (SI) POR MEDIO DE UN ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL UTILIZANDO LA TÉCNICA DE RT-PCR.</b>
<b>2. DEFINICIÓN Y PROPÓSITO</b>	Describir el procedimiento de procesamiento de muestras de células de la cúmula para realizar el análisis del perfil transcripcional de los biomarcadores (Ptgs2, Vcan y L19) relacionados con calidad ovular y competencia en embriones candidatos a transferencia, mediante la generación del Score de Implantación como herramienta de predicción del potencial de implantación.
<b>3. ALCANCE</b>	Este procedimiento aplica para las áreas Médica, Laboratorio de Fertilización In Vitro (FIV) y el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDMOL) del Instituto Ingenes.

**Figura 10. Manual de procedimientos para el análisis del perfil transcripcional de Células de la Cúmula (CC)**

El programa de capacitación se elaboró para personal con conocimientos básicos en Biología Molecular y qRT-PCR (figura 12). Este programa está dividido en 4 puntos de

aprendizaje: Colecta y almacenamiento de CC, extracción de RNA, qRT-PCR en un solo paso y análisis e interpretación de resultados. Teniendo una duración aproximada de 15 días hábiles.



**Figura 11. Programa de capacitación para el nuevo personal.** La flecha marca el progreso de la capacitación, punto morado 1) Colecta y almacenamiento de CC, rojo 2) Extracción de RNA amarillo 3) qRT-PCR y verde 4) Análisis e interpretación de resultados

Los indicadores de eficiencia para la evaluación de la capacitación se establecieron de acuerdo a los parámetros de calidad mediante un estudio R&R. La evaluación de los indicadores se programará al finalizar cada una de las etapas de aprendizaje del nuevo operador, se tomará como referencia el operador que está a cargo de la capacitación. Sin embargo, para cada una de las etapas se tomarán parámetros específicos, en la etapa 1, se evaluará el registro correcto y almacenamiento de la muestra; en la etapa 2, la concentración y los radios de pureza del RNA; en la etapa 3, la cercanía numérica en los duplicados de los Ct y gráficos de *melting* y finalmente se evaluará la etapa la interpretación y generación de resultados utilizando el modelo matemático.



## VIII. DISCUSIÓN

La validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba que se ha desarrollado, optimizado y estandarizado adecuadamente para un fin concreto. La validación incluye estimaciones de las características de rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba.

Para que una prueba esté validada es necesario realizar un cuidadoso seguimiento del rendimiento de la misma a diario, a menudo controlando el comportamiento de los controles internos a lo largo del tiempo. Esto garantiza que la prueba, según la validación original, mantenga siempre sus características de rendimiento. En el caso de que empiece a dar resultados que no concuerden con los datos de la validación original, la prueba podría no ajustarse al fin deseado.

El desarrollo de este proyecto tuvo como objetivo validar una prueba diagnóstica que será empleada para la selección de embriones con potencial de implantación con miras hacia el futuro de transferencias únicas. Es evidente que la identificación y validación de un modelo de predicción de potencial de implantación puede mejorar las tasas de embarazo, reduciendo el número de intentos y el número de embriones candidatos a transferir, haciendo cada vez más tangible las transferencias SET (*Single Embryon Transfer*). En medicina Reproductiva existen grandes avances, Wathlet y colaboradores (2011-2013), Lager y colaboradores (2013) y Ekart y colaboradores (2013), sustentan que el uso de un panel de genes puede generar modelos predictivos con buena precisión (Kordus R. et al., 2017) y sensibilidad al adicionarle características propias de la paciente, proporcionando un método de evaluación cuantitativa para selección embrionaria. En el presente estudio, se evaluó y validó el modelo predictivo propuesto por Ocampo y colaboradores (Tesis doctoral, A. Ocampo, 2018).

Al ser un modelo de predicción cuantitativa, es de gran relevancia determinar la repetitividad y reproducibilidad (R&R) de las mediciones con el fin identificar

variaciones observadas durante el proceso (Portuondo-Paisan Y. et al., 2010) que influyan en el resultado.

Los métodos para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones denominados estudios R&R están basados en evaluaciones estadísticas de las dispersiones de los resultados. Estos métodos permiten descomponer la variabilidad del sistema en dos componentes independientes: la repetibilidad y la reproducibilidad (Llamosa R. et al., 2007). La repetitividad es la precisión de un sistema en condiciones controladas posibles y la reproducibilidad es la variabilidad de las mediciones de una característica que pueda modificar el resultado de la medición (Vinasco L.E, 2018). Para la validación del modelo de predicción de Ocampo y colaboradores se emplearon estudios R&R.

Los resultados de la evaluación del sistema de medición mostraron que la variación y desviación estándar de la repetibilidad del estudio es de 0% al establecer como variable de estudio a los operadores (AZ y PO), debido al adiestramiento y capacitación del operador 2 (PO) en esta metodología se comprobó que esta variación disminuyó a lo largo del estudio, siendo comprobable con el pronóstico de embarazo realizado por el operador 2 (PO) (Ver Anexo. III)

Como parte de las mejoras al sistema PVL, se evaluó el uso de un nuevo iniciador para el gen PTGS2, su análisis fue estricto pues se consideraron varios parámetros como fueron: eficiencia de amplificación, pureza y concentración de los productos de PCR. El iniciador PTGS2-60 presentó una eficiencia de amplificación del 100% con respecto al iniciador para PTGS2-A usado actualmente. Sin embargo, al analizar la pureza y concentración de los productos de PCR, se encontró que el iniciador PTGS2-60 no cumplía con los requerimientos mínimos aceptables de estas propiedades para el sistema de selección. Debido a que, a medida que la concentración del molde disminuye, la pureza del amplicón es menor, lo que sugiere que el amplicón

posiblemente presenta algún remanente de la reacción de PCR o en su defecto restos de iniciadores.

A pesar de se encontraron algunas que limitaciones en el uso del iniciador PTGS2-60, el siguiente paso fue generar el índice PVL para su evaluación. En esta etapa se analizaron 41 muestras las cuales fueron procesadas simultáneamente y por duplicado; para fines del análisis cada juego de iniciadores se tomó como un operador independiente, teniendo a PTGS2-ACTUAL como P-1 y PTGS2-60 como P-2. El análisis de los datos no mostro una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza de 99.9%.

Como parte final del proyecto, se dio seguimiento a los embriones transferidos. Un total de 10 pacientes fueron transferidas, el resultado: 3 pacientes con predicción acertada de embarazo positivo y 3 pacientes con predicción de falso positivo de embarazo, la falla en la predicción posiblemente se debe a la condición de la paciente pues entre los factores etiológicos que presentan están la endometriosis y también la baja respuesta al tratamiento hormonal. El índice de expresión acertó en embarazo negativo para 4 pacientes.

Lo habitual es que las modificaciones técnicas realizadas en una prueba validada, como los cambios o mejoras de los protocolos, así como la conversión de una prueba en un sistema semiautomático o totalmente automático no exijan una completa revalidación de la prueba. En lugar de ello, se lleva a cabo una comparación de los métodos para determinar si las modificaciones relativamente pequeñas de la prueba afectan a los resultados.

La comparabilidad puede establecerse ejecutado el procedimiento modificado y el original en paralelo, con el mismo conjunto de muestras en ambos, y realizando varias ejecuciones. El conjunto de muestras escogido para esta comparación debe representar el intervalo completo de funcionamiento de ambas pruebas. Si los

resultados del procedimiento modificado y del método original validado se determina que son comparables en un experimento basado en un criterio pre-especificado, la prueba modificada sigue considerándose validado para el fin deseado.

## **IX. CONCLUSIONES**

- El sistema de selección embrionaria PVL, es un sistema reproducible que cumplió con una estricta validación en sus procedimientos
- El análisis de repetitividad y reproducibilidad, presentó un alto nivel de concordancia entre operadores, demostrando que no existen variaciones en la ejecución del protocolo y el resultado final.
- El uso del iniciador PTGS2- 60, podría ser una alternativa al generar el perfil de expresión de células de la cúmula, sin embargo, aún se necesita hacer una selección mayor de embriones, en donde el índice de expresión se genere con el iniciador PTGS2-60.
- La demostración definitiva de la prueba comprobó la eficiencia en la selección de embriones con potencial de implantación.



## **X. PERSPECTIVAS**

El uso combinado de la evaluación morfológica tradicional y el modelo de predicción propuesto por Ocampo y colaboradores son una herramienta de diagnóstico molecular que puede ser utilizada para la selección de los mejores embriones candidatos a transferencia, reduciendo así el número de embriones transferidos y el número de tratamientos FIV.

Las modificaciones metodológicas que se proponen al sistema de análisis transcripcional de CC vía PVL propuesto por Ocampo y colaboradores, no son viables, debido a la premisa de que al utilizar un modelo matemático todos los parámetros que influyen en el resultado deben de modificarse para tener los resultados confiables, es decir se debe reestructurar un nuevo estudio basado en el modelo empleado por Ocampo y colaboradores.

Es necesario, continuar con las investigaciones sobre las problemáticas más comunes presentadas en pacientes con infertilidad, con el fin de reducir el desgaste emocional que tienen dichas parejas; sin embargo, el uso de un modelo matemático de predicción proporciona un valor de cohorte que puede ser usado, no sólo en medicina reproductiva, sino también existe una variedad de estudios que puedan dar pie, al uso de herramientas analíticas para poder realizar diagnósticos personalizados basados en un valor de cohorte, evitando los falsos diagnósticos.

Así mismo, una premisa importante debe ser que las investigaciones de diagnóstico no se queden solo en la parte de incubación de idea, sino que continúen a la validación y generación de un producto que se útil, no solo para los investigadores sino para la sociedad.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, et al. 2010. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human molecular genetics* 19: 397-410
- Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, et al. 2010. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Human reproduction* 25: 1259-70
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 121: 647-53
- Alfaidy N, Hoffmann P, Gillois P, Gueniffey A, Lebayle C, et al. 2016. PROK1 Level in the Follicular Microenvironment: A New Noninvasive Predictive Biomarker of Embryo Implantation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 101: 435-44
- Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, et al. 2009. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction* 138: 629-37
- Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. 2010. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular human reproduction* 16: 531-8
- Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, et al. 2008. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Molecular human reproduction* 14: 711-9
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Developmental biology* 138: 16-25
- Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Maver A, Kopitar AN, Lovrecic L. 2015. Transcriptomic Analysis and Meta-Analysis of Human Granulosa and Cumulus Cells. *PloS one* 10: e0136473

- Capco DG, Gallicano GI, McGaughey RW, Downing KH, Larabell CA. 1993. Cytoskeletal sheets of mammalian eggs and embryos: a lattice-like network of intermediate filaments. *Cell motility and the cytoskeleton* 24: 85-99
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. 2003. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301: 215-8
- Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. 2007. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 134: 645-50
- Conti M, Franciosi F. 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human reproduction update* 24: 245-66
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, et al. 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update* 16: 231-45
- Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Guglielmo MC, Brambillasca F, et al. 2015. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human reproduction update* 21: 427-54
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122: 829-38
- Esposito G, Vitale AM, Leijten FP, Strik AM, Koonen-Reemst AM, et al. 2007. Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility. *Molecular and cellular endocrinology* 273: 25-31
- Evian Annual Reproduction Workshop G, Fauser BC, Diedrich K, Bouchard P, Dominguez F, et al. 2011. Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Human reproduction update* 17: 829-47
- Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. 2007. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human reproduction* 22: 3069-77

- Fragouli E, Wells D, Lager AE, Kayisli UA, Patrizio P. 2012. Alteration of gene expression in human cumulus cells as a potential indicator of oocyte aneuploidy. *Human reproduction* 27: 2559-68
- Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, Anahory T, et al. 2007. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reproductive biomedicine online* 14: 175-83
- Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL. 2011. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility* 96: 47-52 e2
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human reproduction update* 14: 159-77
- Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, et al. 2008. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human reproduction* 23: 1118-27
- Jang JK, Rahman T, Kober VS, Cesario J, McKim KS. 2007. Misregulation of the kinesin-like protein Subito induces meiotic spindle formation in the absence of chromosomes and centrosomes. *Genetics* 177: 267-80
- Jovanovic VP, Sauer CM, Shawber CJ, Gomez R, Wang X, et al. 2013. Intraovarian regulation of gonadotropin-dependent folliculogenesis depends on notch receptor signaling pathways not involving Delta-like ligand 4 (Dll4). *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 11: 43
- Kordus RJ, LaVoie HA. 2017. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. *Reproduction* 153: R69-R83
- Li R, Albertini DF. 2013. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14: 141-52
- Liu X, Morency E, Li T, Qin H, Zhang X, et al. 2017. Role for PADI6 in securing the mRNA-MSY2 complex to the oocyte cytoplasmic lattices. *Cell cycle* 16: 360-66

- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, et al. 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human reproduction* 19: 2869-74
- Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, et al. 2007. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reproductive biomedicine online* 14: 628-34
- Munne S, Tomkin G, Cohen J. 2009. Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. *Fertility and sterility* 91: 943-5
- Ocampo A, Pedraza J, Ortiz G, Hernández-Pérez E, Porchia L, López-Bayghen E. 2018. Assessment of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 and Versican gene expression profile from the cumulus cells: association with better in vitro fertilization outcomes. *Journal of Ovarian Research* 11: 10
- Ocampo A, Pedraza J, Ortiz G, Hernandez-Perez E, Porchia L, Lopez-Bayghen E. 2018. Assessment of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 and Versican gene expression profile from the cumulus cells: association with better in vitro fertilization outcomes. *J Ovarian Res* 11: 84
- Oktem O, Urman B. 2010. Understanding follicle growth in vivo. *Human reproduction* 25: 2944-54
- Olooto WE, Amballi AA, Adeleye AO, Banjo TA. 2012. A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2: 379-85
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. 2000. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *The Journal of biological chemistry* 275: 39523-8
- Practice Committee of American Society for Reproductive M. 2008. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility* 90: S60
- Raga F, Muñoz M, Ferrer P. 2011. Folliculogenesis.
- Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, et al. 2007. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing

- follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Molecular endocrinology* 21: 2189-202
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, et al. 2008. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319: 611-3
- Reproductiva SAdM. 2012. Infertility: An Overview. *A Guide for patients*. 19
- Russell DL, Robker RL. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human reproduction update* 13: 289-312
- Sanchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1822: 1896-912
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139: 685-95
- Traboulsi W, Brouillet S, Sergent F, Boufettal H, Samouh N, et al. 2015. Prokineticins in central and peripheral control of human reproduction. *Hormone molecular biology and clinical investigation* 24: 73-81
- Unuane D, Tournaye H, Velkeniers B, Poppe K. 2011. Endocrine disorders & female infertility. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 25: 861-73
- van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL, Ayoubi TA. 2008. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Molecular human reproduction* 14: 157-68
- Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, et al. 2011. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Human reproduction* 26: 1035-51
- Weiss RV, Clapauch R. 2014. Female infertility of endocrine origin. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 58: 144-52

- Xu Y, Shi Y, Fu J, Yu M, Feng R, et al. 2016. Mutations in PADI6 Cause Female Infertility Characterized by Early Embryonic Arrest. *American journal of human genetics* 99: 744-52
- Yurttas P, Vitale AM, Fitzhenry RJ, Cohen-Gould L, Wu W, et al. 2008. Role for PADI6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development* 135: 2627-36
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, et al. 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human reproduction* 24: 2683-7

## **XII. ANEXOS**



## I. POBLACION OBJETIVO 1

Muestra	Edad	IMC	Etiologia	FIV/ICSI	% Fert.	Predicción	Transfer	Beta	Dest. Emb
M8-8	37	25,63	Mala Calidad	FIV	100	Positivo	SI	Positivo	Cong
M8-9	37	25,63	Mala Calidad	FIV	100	Negativo			Cong
M95-1	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Positivo	Si		1
M95-2	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Negativo	NO	No aplica	Congela
M95-3	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Positivo	NO	No aplica	Congela
M95-4	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Positivo	SI		4
M95-5	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Negativo	SI		5
M95-6	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Negativo	NO	No aplica	MII
M95-7	32	22,19	Baja respuesta	ICSI	87,5	Negativo	NO	No aplica	ZR
M106-2	34	27,82	Tubarica	ICSI	30,77	Negativo			Congela
M107-6	35	29,64	Mala Calidad	FIV/ICSI	58,33	Positivo	NO	No aplica	Anormal
M107-9	35	29,64	Mala Calidad	FIV/ICSI	58,33	Negativo			Congela
M107-12	35	29,64	Mala Calidad	FIV/ICSI	58,33	Positivo			Congela
M108-4	41	21,19	Edad	FIV	50	Negativo	NO	No aplica	No amplifico
M110-4	37	24,02	Edad	FIV	66,67	Positivo	NO	No aplica	No amplifico
M110-12	37	24,02	Edad	FIV	66,67	Negativo	NO	No aplica	No amplifico
M111-4	30	20,2	Fallo Gestacional	ICSI	60	Positivo	NO	No aplica	Anormal
M113-2	41	25,4	Edad	FIV	69,23	Negativo	NO	No aplica	Anormal
M113-6	41	25,4	Edad	FIV	69,23	Negativo	NO	No aplica	Anormal
M113-8	41	25,4	Edad	FIV	69,23	Negativo	NO	No aplica	Anormal
M113-11	41	25,4	Edad	FIV	69,23	Negativo	NO	No aplica	Anormal
M114-3	42	19,23	Baja respuesta	FIV	75	Positivo	NO	No aplica	Anormal
M116-1	43	27,06	PCO	FIV/ICSI	100	Negativo	NO	No aplica	Bloqueo
M116-2	43	27,06	PCO	FIV/ICSI	100	Positivo	NO	No aplica	MII
M116-3	43	27,06	PCO	FIV/ICSI	100	Negativo	NO	No aplica	MII
M117-1	40	21,76	Endometriosis	FIV/ICSI	100	Positivo	NO	No aplica	Bloqueo
M117-2	40	21,76	Endometriosis	FIV/ICSI	100	Negativo	NO	No aplica	Bloqueo

## II. POBLACION OBJETIVO 2

Muestra	Edad	IMC	Etiología	FIV/ICSI	% Fert.	Indice-ptgs2(A)	Indice-ptgs2(60)	Transferencia	Beta	Embrión transferido
M132-1	39	25,33	Edad	FIV	50	53,52	54,51	NO	No Aplica	NV
M132-3	39	25,33	Edad	FIV	50	54,74	54,64	NO	No Aplica	NV
M132-7	39	25,33	Edad	FIV	50	58,32	59,41	NO	No Aplica	Anormal
M132-14	39	25,33	Edad	FIV	50	57,14	58,34	NO	No Aplica	VG
M149-1	39	19,68	Edad	FIV	37,5	63,02	62,53	NO	No Aplica	C
M149-4	39	19,68	Edad	FIV	37,5	72,30	71,45	SI	Positivo	4
M149-5	39	19,68	Edad	FIV	37,5	72,62	72,17	SI	Positivo	5
M149-7	39	19,68	Edad	FIV	37,5	58,59	58,31	NO	No Aplica	Anormal
M150-2	41	27,06	Edad	FIV/ICSI	75	60,10	59,81	NO	No Aplica	Anormal
M150-3	41	27,06	Edad	FIV/ICSI	75	54,76	54,37	NO	No Aplica	Anormal
M151-8	35	25,71	Endometriosis/ Fallo gestacional	ICSI	50	62,26	62,20	NO	No Aplica	Anormal
M152-1	35	18,37	Baja Respuesta	FIV	100	55,70	56,79	NO	No Aplica	Anormal
M152-2	35	18,37	Baja Respuesta	FIV	100	52,18	52,79	NO	No Aplica	Anormal
M157-1	40	21,48	Edad	FIV	66,67	57,62	57,66	NO	No Aplica	Anormal
M157-2	40	21,48	Edad	FIV	66,67	59,35	59,33	NO	No Aplica	Anormal
M157-3	40	21,48	Edad	FIV	66,67	56,22	56,93	NO	No Aplica	BLOQ
M158-1	43	25,91	Edad	FIV	100	56,69	58,24	SI	Negativo	1
M159-2	43	32,76	Edad	FIV	90	54,89	53,20	NO	No Aplica	Anormal
M159-3	43	32,76	Edad	FIV	90	54,13	52,01	NO	No Aplica	Anormal
M159-4	43	32,76	Edad	FIV	90	51,80	49,89	NO	No Aplica	Anormal
M160-4	38	24,54	Baja Respuesta	FIV/ICSI	80	43,85	44,02	SI	Negativo	4
M162-1	35	27,1	PCO	FIV	54,55	53,70	53,78	NO	No Aplica	C
M162-9	35	27,1	PCO	FIV	54,55	50,79	50,62	NO	No Aplica	Anormal
M162-11	35	27,1	PCO	FIV	54,55	50,41	50,14	NO	No Aplica	Anormal
M164-1	41	20,55	Endometriosis	FIV	71,43	56,55	56,50	SI	Negativo	1
M164-2	41	20,55	Endometriosis	FIV	71,43	53,74	54,45	SI	Negativo	2

## II. POBLACION OBJETIVO 2 (CONTINUACIÓN)

Muestra	Edad	IMC	Etiología	FIV/ICSI	% Fert.	Indice- ptgs2(A)	Indice- ptgs2(60)	Transferencia	Beta	Embrión transferido
M164-3	41	20,55	Endometriosis	FIV	71,43	65,80	64,79	SI	Negativo	3
M171-9	41	26,5	Baja Respuesta	FIV	81,82	59,14	57,75	SI	Positivo	9
M171-10						55,84	54,97	SI	Positivo	10
M172-2	39	25,51	Edad	FIV	71,43	51,53	50,17	SI	Negativo	2
M173-3						57,56	58,32	SI	Positivo	3
M173-10	32	21,48	Normal	FIV	70	52,71	53,61	SI	Positivo	10
M176-2	40	22,49	Baja Respuesta	FIV	80	65,09	65,04	NO	No Aplica	Anormal
M176-5	40	22,49	Baja Respuesta	FIV	80	52,21	52,68	SI	Negativo	5
M176-7	40	22,49	Baja Respuesta	FIV	80	51,84	52,36	NO	No Aplica	Anormal
M176-10	40	22,49	Baja Respuesta	FIV	80	45,58	45,88	SI	Negativo	10
M178-3	36	24,46	Endometriosis	FIV/ICSI	57,14	49,39	50,04	SI	Negativo	1
M179-4	38	23,83	Edad	FIV	83,33	47,09	48,52	SI	Negativo	4
M179-5	38	23,83	Edad	FIV	83,33	57,11	58,72	SI	Negativo	5
M179-8	38	23,83	Edad	FIV	83,33	72,56	75,41	SI	Negativo	8

### III. ACERTIVIDAD ENTRE OLIGONUCLEOTIDOS PARA EL GEN PTGS2

Prediccion PTGS2-A	Prediccion PTGS2-60	Transferencia	Beta	PTGS2-A v.s Beta real	PTGS2-60 v.s Beta real	
Positivo	Positivo	SI	Positivo	COINCIDE	COINCIDE	
Positivo	Positivo	SI	Positivo	COINCIDE	COINCIDE	
Positivo	Positivo	SI	Negativo	ERROR	ERROR	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Positivo	Negativo	SI	Negativo	ERROR	COINCIDE	
Positivo	Negativo	SI	Positivo	COINCIDE	ERROR	
Positivo	Negativo	SI	Positivo	COINCIDE	ERROR	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Positivo	Positivo	SI	Positivo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Positivo	ERROR	ERROR	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Negativo	SI	Negativo	COINCIDE	COINCIDE	
Negativo	Positivo	SI	Negativo	COINCIDE	ERROR	
Positivo	Positivo	SI	Negativo	ERROR	ERROR	
				<b>ERROR</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
				<b>COINCIDENCIA</b>	<b>13</b>	<b>11</b>

