



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE INVESTIGACIÓN**

**“BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PROTEÍNICOS  
EN ZIGOTOS, EMBRIONES Y BLASTOCISTOS”**

**T E S I S**  
**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA**  
**OBTENER EL GRADO DE:**  
**MAESTRIA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**  
**P R E S E N T A:**  
**BIOL. EXP. NAMBO VENEGAS RAFAEL DE JESÚS**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. ALFONSO MÉNDEZ TENORIO**

**Dr. FRANCISCO ROCHA CÁRDENAS**

**MEXICO D.F. 2011**





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 17:00 horas del día 23 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

Búsqueda de biomarcadores proteínicos en cigotos embriones y blastocistos

Presentada por el alumno:

Nambo

Apellido paterno

Venegas

Apellido materno

Rafael de Jesús

Nombre(s)

Con registro: A 0 9 0 3 4 2

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Signature of Dr. Alfonso Méndez Tenorio

Dr. Alfonso Méndez Tenorio

Signature of M. en C. Francisco Rocha Cárdenas

M. en C. Francisco Rocha Cárdenas

Signature of Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez

Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez

Signature of Dra. Eva Ramón Gallegos

Dra. Eva Ramón Gallegos

Signature of Dr. Juan Carlos Santiago Hernández

Dr. Juan Carlos Santiago Hernández

Signature of Dr. Sergio Enrique Meza Toledo

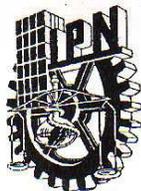
Dr. Sergio Enrique Meza Toledo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Signature of Dr. Manuel Jesús Piñón López

Dr. Manuel Jesús Piñón López

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Sección de Estudios de Posgrado e Investigación



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 23 del mes de Junio del año 2011, el que suscribe **Rafael de Jesús Nambo Venegas** alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular con número de registro A090342, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Alfonso Méndez Tenorio y cede los derechos del trabajo intitulado **Búsqueda de marcadores proteínicos en cigotos, embriones y blastocistos**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [rafaelnambo@yahoo.com.mx](mailto:rafaelnambo@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dr. Alfonso Méndez Tenorio

Atentamente,

Biol. Exp. Rafael de Jesús Nambo Venegas



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MAESTRÍA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA  
MOLECULAR**

**“BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PROTEÍNICOS EN  
ZIGOTOS, EMBRIONES Y BLASTOCISTOS”**

**NAMBO VENEGAS RAFAEL DE JESÚS**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ALFONSO MÉNDEZ TENORIO DEL LABORATORIO DE BIOINFORMÁTICA Y BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA ENCB-IPN Y DEL DR. FRANCISCO ROCHA CÁRDENAS DEL LABORATORIO FECUNDACIÓN *IN VITRO* DEL INSTITUTO VALENCIANO DE INFERTILIDAD Y CON EL APOYO DEL DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA DE LA UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA. CON EL APOYO DE LAS BECAS OTORGADAS POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), EL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL DISTRITO FEDERAL -ICYTDF- (CREACIÓN JOVEN) Y DE LA SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO (BECA TESIS).**

## Agradecimientos

A Díos  
A mis padres  
A mis amistades  
A mis profesores  
A mi comité tutorial  
A la ENCB-IPN

Pero quiero hacer mención de la gente que en este tiempo me ha brindado la mano para poder realizar mi sueño que de manera directa y de buena fe han confiado en mí y sin ellos esto no sería posible

Dr. Luis Marat Alvares  
Dra. Eva Ramón Gallegos  
Dra. Yolanda Gómez  
Dra. Julia Toscano

Dra. Isabel Ruiz  
Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda  
Dr. Víctor Romero Rodríguez

Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio

Y a toda esa gente que con acciones pequeñas pero constantes que con el paso del tiempo se suman sus esfuerzos y hacen la gran diferencia.

Sí es que he visto más que los demás es por que he estado en hombros de gigante

GRACIAS TOTALES

**Dedicatoria**

A  
MÍ  
Madre

# ÍNDICE

<b><u>I. INTRODUCCIÓN .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>II. JUSTIFICACIÓN.....</u></b>	<b><u>13</u></b>
<b><u>III. HIPÓTESIS .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>IV. OBJETIVO.....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>V. OBJETIVOS PARTICULARES .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS Y DE MEMBRANA DE OVOCITOS .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS Y DE MEMBRANA DE ZIGOTOS .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>VI. METODO .....</u></b>	<b><u>18</u></b>
VI.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA.....	18
VI.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE OVOCITOS.....	23
VI.3. RP-HPLC.....	27
VI.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	27
<b><u>VII. RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>VIII. DISCUSIÓN.....</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b><u>VIX. CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>36</u></b>
<b><u>X. PERSPECTIVAS.....</u></b>	<b><u>40</u></b>
<b><u>XI. REFERENCIAS.....</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b><u>VIII. ANEXOS.....</u></b>	<b><u>45</u></b>

## ABREVIATURAS

<b>FIV</b>	Fecundación <i>in vitro</i>
<b>ICSI</b>	Inyección intracitoplásmica de espermatozoide
<b>MALDI</b>	Espectrometría de masas por láser de desorción/ionización asistida por matriz
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>FISH</b>	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
<b>DGP</b>	Diagnostico Genético Preimplantacional
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
<b>COC</b>	Complejo cumulo-ovocito
<b>ECM</b>	Enfermedades congénitas del metabolismo
<b>CP</b>	Corpúsculo polar
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Fecundación</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2. Desarrollo embrionario temprano</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3. Equipo de HPLC</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4. Espectrometría de masas MALDI-TOF</b>	<b>15</b>
<b>Figura 5. Extracción de ovocitos</b>	<b>18</b>
<b>Figura 6. ICSI</b>	<b>20</b>
<b>Figura 7. Técnica de FISH.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 8. Cromatograma de cigotos 220nm</b>	<b>22</b>
<b>Figura 9. Cromatograma de cigotos 280nm</b>	<b>25</b>
<b>Figura 10. Cromatograma de embriones 220nm</b>	<b>26</b>
<b>Figura 11. Cromatograma de embriones 280nm</b>	<b>30</b>
<b>Figura 12. Cromatograma de blastocistos. 220nm</b>	<b>31</b>
<b>Figura 13. Cromatograma de blastocistos. 280nm</b>	<b>34</b>
<b>Figura 14. Espectro de Masas m/z</b>	<b>35</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Flujo en purga de columnas de HPLC</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2. Estrategia de análisis en equipo de HPLC</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 3. Proteínas identificadas en cigotos</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 4. Proteínas identificadas en embriones</b>	<b>23</b>
<b>Tabla 5. Proteínas identificadas en blastocistos</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 6. Proteínas compartidas.</b>	<b>27</b>
<b>Tabla 7. Posibles biomarcadores</b>	<b>30</b>

---

---

## RESUMEN

Con el desarrollo del presente estudio se pretendió implementar estrategias que permitan evaluar el proteoma embrionario permitiendo así elevar las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida. El encontrar criterios eficaces y fácilmente aplicables basados en la examinación para la selección embrionaria es una finalidad en la biología reproductiva ya que permite obtener buenos resultados con menos cantidad de ovocitos fecundados y por lo tanto menos embriones analizados, reduciendo el uso de material biológico y reduciendo los costos de proceso lo que beneficia a las parejas que deseen tener descendencia mediante este tipo de procedimientos. La manera como abordamos este problema fue realizando una búsqueda mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) que es una poderosa herramienta que posee una gran sensibilidad, resolución, utiliza muy poca muestra y es automatizable permitiendo analizar proteínas que pueden usarse como blancos para el diagnóstico preimplantacional.

Se extrajeron proteínas de muestras de cigotos, embriones y blastocistos, en el análisis de los cromatogramas se observaron las cumbres con los tiempos de retención para los péptidos a una longitud de onda de 220nm. Estos péptidos fueron analizados por espectrometría de masas.

## **ABSTRACT**

With the development of this study was intended to implement strategies to assess the embryonic proteome allowing higher rates of success of assisted reproduction treatments. Finding effective and easily applicable criteria based on the examination for embryo selection is a goal in reproductive biology as it allows good results with fewer fertilized oocytes and therefore fewer embryos analyzed, reducing the use of biological material and reducing processing costs which is beneficial to couples wishing to have children through such procedures. The way we approach this problem was doing a search using high performance liquid chromatography in reverse phase (RP-HPLC) that is a powerful tool that has great sensitivity, resolution, uses very little sample, is automatable and is possible to analyze proteins that can be used as targets for preimplantation diagnosis.

Protein samples were extracted from zygotes, embryos and blastocysts, the analysis of the chromatograms were observed peaks with retention times for peptides with a wavelength of 220nm. These peptides were analyzed by mass spectrometry.

# I. INTRODUCCIÓN

## *I.1 Desarrollo embrionario*

El desarrollo embrionario humano es un proceso continuo que comienza cuando el ovocito es fecundado por el espermatozoide hasta el nacimiento del nuevo ser vivo (Keith, M y Persaud, T, 2008). El desarrollo embrionario se divide en tres etapas:

- Etapa Pre-embrionaria o temprana: Comprende desde el momento de la fecundación, a nivel del tercio externo de las trompas de falopio, hasta la 2° semana de gestación. Aquí se desarrolla la implantación del huevo o cigoto en el endometrio del útero.
- Etapa Fetal: Comprende desde la 3° semana hasta la 8° semana de gestación. Aquí se desarrolla la formación de las tres capas germinativas: Ectodermo, mesodermo y endodermo.
- Etapa embrionaria: Comprende desde la 9° semana hasta la 40° semana. Aquí se desarrolla la formación de órganos y sistemas. Culmina con el inicio del parto.

En el presente trabajo solo nos enfocaremos en la descripción de la etapa temprana, la cual empieza con la fecundación.

La fecundación es el proceso por el cual dos células sexuales (ovocito y espermatozoide) se fusionan para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores. En la fecundación hay cinco pasos en la interacción ovocito –espermatozoide:

1. la quimioatracción del espermatozoide hacia el ovocito por moléculas solubles secretadas por el propio ovocito.
2. la exocitosis de la vesícula acrosómica para liberar sus enzimas.
3. la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito.
4. el pasaje del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

## 5. fusión de las membranas del ovocito y el espermatozoide (Gilgert).

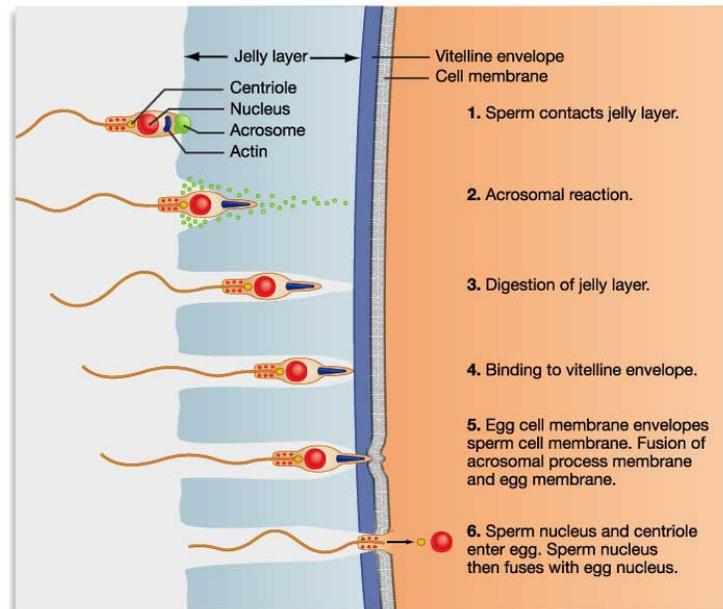


Figura 1. **Fecundación.**

A la célula procedente de la unión de los gametos sexuales se le denomina cigoto. Después de la fecundación, el desarrollo de un organismo multicelular continúa mediante el proceso denominado segmentación, una serie de divisiones mitóticas por medio de las cuales el gran volumen del citoplasma del cigoto es dividido en numerosas células nucleadas pequeñas. Las células de este estado de segmentación son denominadas blastómeras. En estas divisiones del citoplasma no hay un incremento del volumen ya que se llevan a cabo mediante la omisión de las fases  $G_1$  y  $G_2$  del ciclo celular. Cuando existen de 12 y 32 blastómeras, el ser humano en desarrollo se designa como mórula. Las células internas de la mórula están rodeadas de una capa de células que constituye la capa celular externa. La mórula esférica se forma tres días después de la fecundación y se introduce en el útero. Aproximadamente entre el cuarto y quinto día después de la fecundación aparece un espacio lleno de líquido, denominado cavidad del blastocisto. El líquido pasa desde la cavidad uterina a través de la zona pelúcida para formar dicho espacio. A medida de que el líquido aumenta en la cavidad del blastocisto, los blastómeros se separan en dos partes:

- Una capa de células externas delgada, el trofoblasto, que origina la parte embrionaria de la placenta.
- Un grupo de blastómeros centrales, la masa celular interna, que forma el embrión, la masa celular interna se denomina embrioblasto.

Durante es etapa del desarrollo o blastogenia el producto de la concepción se conoce como blastocisto. Unos seis días después de la fecundación, el blastocisto se adhiere al epitelio, el trofoblasto comienza a proliferar, a esta etapa se le llama implantación (Keith, M y Persaud, T, 2008).

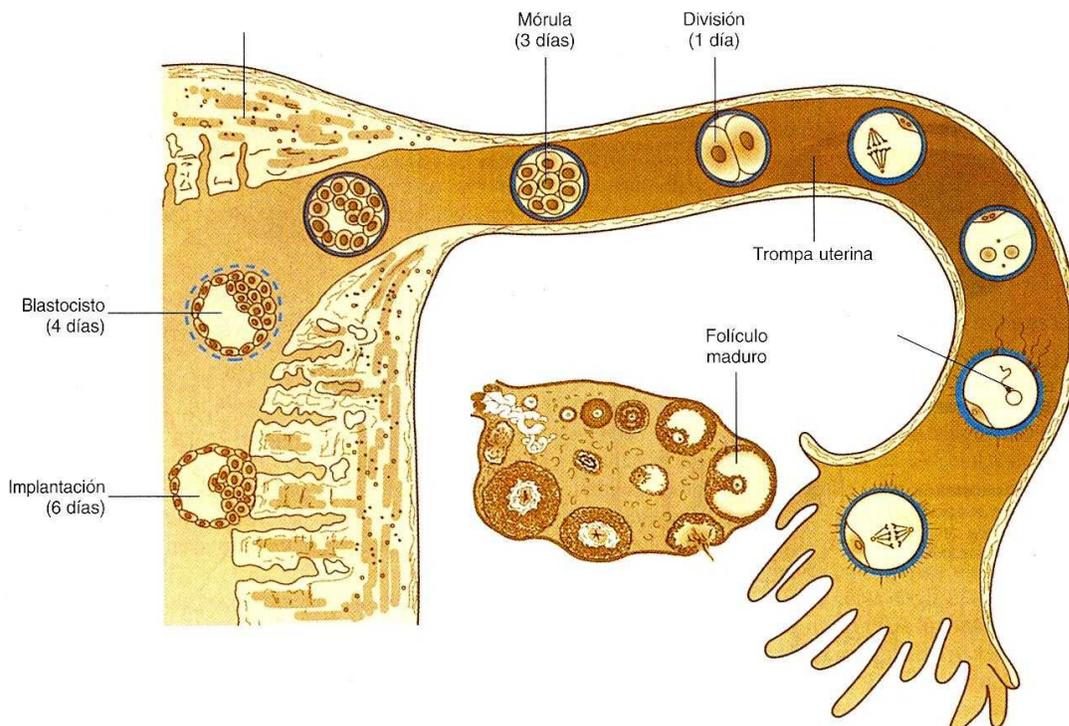


Figura 2. **Desarrollo embrionario temprano.**

## ***1.2 Infertilidad***

Los estudios en biología reproductiva y genética humana se han enfocado a generar conocimiento y mejorar las técnicas para el cuidado de la salud en aras de un bienestar social. Es así como el área de salud reproductiva se ha esmerado particularmente en crear las tecnologías que permitan un mejor tratamiento, seguro y eficaz que facilite a las parejas el conformar una familia pero sin dejar de

lado el aspecto de la salud de sus hijos, por lo tanto hoy en día se realizan alrededor del mundo estudios que permiten crear las estrategias necesarias para poder obtener diagnósticos, certeros y efectivos para las distintas patologías que puedan detectarse desde la misma etapa embrionaria puesto que durante el desarrollo embrionario, las células sufren cambios bioquímicos, en parte dirigidos por la acción de proteínas, en su mayoría citoplasmáticas.(Evans y Florman, 2002). Al pasar la primeras etapas de el desarrollo estas proteínas toman el control de las células recién generadas, con la finalidad de llevar a cabo un óptimo avance sobre las etapas tardías en la cual las células empiezan a sintetizar proteínas de novo (Pellicer *et al*, 1999). Poco se sabe sobre estos y otros mecanismos, como la capacidad de las células madre en transformarse en otros tipos celulares. Esta investigación ayudará a mejorar la comprensión de la biología celular y destacar la complejidad de este tipo de células que expresan al menos el 25% de todas las proteínas (Mayani y Paras, 1986). Las proteínas que se encuentran expresadas en estas etapas tempranas sugieren ser las coordinadoras del desarrollo, el compromiso y la diferenciación de los diferentes tipos celulares (Pan *et al*, 2009).

Así mismo, estudios epidemiológicos en neonatos indican que las malformaciones congénitas son de origen blastogénico, y que 94% de los casos corresponden a defectos de la línea media (Park, 1995). Es importante conocer los procesos que se efectúan durante la vida embrionaria y fetal, ya que alteraciones en estas etapas pueden resultar en defectos al nacimiento (Gamiz *et al*, 2003).

La etapa del desarrollo que comprende desde la fecundación hasta el final de la gástrula, constituye la blastogénesis (Gianaroli *et al*, 2003). Durante este periodo ocurren eventos de manera simultánea o secuencial en estructuras contiguas (Gilbert, 2005).

Las alteraciones en el proceso de morfogénesis del tubo neural o de las extremidades ocurren en esta etapa y son ejemplos dramáticos; también es tiempo crítico para los productos de los genes homeobox, o del receptor de expresión del ácido retinóico (Tesarik y Greco, 1999). Ejemplos como estos nos motivan a buscar proteínas que funcionen como indicadores de un desarrollo

celular normal, o que su presencia sea necesaria para etapas posteriores e inclusive en la regulación de genoma, o como es bien sabido necesarias para mantener la salud del ser humano (Gianaroli *et al*, 2006). El encontrar herramientas eficaces que permitan la selección de embriones óptimos con la finalidad de llegar a una feliz gestación es una finalidad de la medicina reproductiva.

La combinación de la proteómica con la genética, biología molecular, bioquímica y biofísica de proteínas han producido una técnica de gran alcance, dando por resultado novedosos métodos para analizar mezclas complejas de las proteínas. Las tecnologías de proteómica que emergen prometen aumentar la velocidad de procesamiento de identificación de las mezclas complejas de proteínas y conocer sus niveles de expresión, el enfoque de este estudio se concentra en la caracterización y análisis de estas proteínas con la finalidad de establecer un diagnóstico celular, que contribuya con el Diagnóstico genético preimplantacional (DGP) tanto en embriones como en amniocitos para detectar enfermedades ligadas al sexo, enfermedades monogénicas, y genopatías (errores innatos del metabolismo).

Como ya se ha mencionado la biología de la reproducción se ha esmerado por entender los mecanismos que regulan el desarrollo embrionario, pero sobre todo se han enfocado a la condición genética a nivel de cromosomas pues este tipo de padecimientos se presentan con mayor frecuencia y su estudio conlleva el uso de técnicas que van desde la citogenética clásica hasta técnicas de citogenética molecular como la Hibridación *in situ* fluorescente y recientemente la incorporación de tecnología de vanguardia como lo son los microarreglos que se encuentra en etapas de estudio (Raga *et al*, 1997). Actualmente con las técnicas antes mencionadas sigue en incógnito en gran parte de las ocasiones la causa de la interrupción, bloqueo e inclusive la apoptosis de los embriones. Esto nos indica que la etiología va mas allá de los datos clínicos de los padres e inclusive de la organización y distribución de los cromosomas, nos lleva a la regulación celular a nivel del proteoma. Pero como estudiar algo tan vasto. Algunos grupos se han dedicado a caracterizar proteínas en células madre de origen embrionario actual

mente se sabe que son alrededor de 1,000 proteínas las que se encuentran en este tipo celular pero en una buena parte no se sabe la función que desempeñan (Pan *et al*, 2009).

### ***1.3 Biomarcadores***

Por otro lado las investigaciones sobre todo en enfermedades del tipo infeccioso han desarrollado protocolos en los que se utilizan diversas técnicas de extracción, purificación, caracterización y cuantificación de proteínas. En los cuales se ha integrado una herramienta de gran utilidad la bioinformática que abre un campo en el conocimiento y el desarrollo de la ciencia. Al unirse con la biología molecular surgen nuevos protocolos que pueden ser usados en las diversas disciplinas del cuidado de la salud.

Es de gran interés el estudio de los perfiles de expresión proteica dado que los niveles de expresión en proteínas varía tremendamente de unas cuantas copias a mas de un millón, es importante entender que una proteína expresada tiene poco que ver con su significado reales decir que no por tener una elevada tasa de expresión significa que sea una proteína con una función trascendental para la célula.

Los niveles de expresión de las proteínas en un tiempo dado están controlados por:

1. la tasa de transcripción del gen
2. la eficiencia de la traducción del mRNA a proteína
3. la tasa de degradación de la proteína en la célula

Es así como un perfil de expresión proteico se entiende como un despliegue de información sobre las proteínas que se elabora en sangre y otros líquidos del cuerpo o tejidos en un momento dado y este se puede usara para encontrar y diagnosticar una enfermedad o afección.

Para esto tenemos que hablar de los biomarcadores que pueden ser de tres tipos:

- a) morfológicos
- b) bioquímicos
- c) genéticos.

Un biomarcador es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, tipo de hoja, etc.) que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B (como vigor, altura, resistencia a enfermedades, etc.) Puede considerarse como un marcador, pues la presencia de A necesariamente implica la de B.

La importancia de los biomarcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés.

En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés. Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción, por lo que se ven menos influidos por el ambiente.

Estos marcadores tienen la ventaja de que la técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva debido a que utiliza pequeñas cantidades de material. Además, el control genético de la mayoría de las isoenzimas es bien conocido, por lo que es posible realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles. Por otro lado, las isoenzimas tienen base genética codominante (es decir, que en un individuo diploide es posible visualizar la expresión de ambos alelos); son selectivamente neutrales y están libres de efectos deletéreos (cuando los alelos tienen efectos negativos que imposibilitan la reproducción del genotipo que los posee), efectos pleiotrópicos

(cuando un gen controla la expresión de más de un carácter en un individuo) y/o epistáticos (dominancia de un gen sobre otro).

Cada vez es más frecuente el uso de biomoléculas para obtener información relativa al desarrollo de procesos biológicos, tanto aplicables a la producción industrial como al diagnóstico y pronóstico de enfermedades, la monitorización de tratamientos, o el diseño de nuevos medicamentos.

#### ***1.4 HPLC***

Existen diversas tecnologías que nos permiten abordar con gran precisión esta necesidad de encontrar biomarcadores dentro de una compleja mezcla de biomoléculas de las cuales las proteínas tienen una gran gama de variación pero las técnicas de separación y análisis en proteómica han estado surgiendo y perfeccionándose para llegar a realizar purificaciones y caracterizaciones a partir mínimas concentraciones de estas mezclas complejas que se encuentran en los sistemas biológicos. Entre las diferentes técnicas de separación encontramos a la (HPLC) cromatografía líquida de alta eficacia por sus siglas en inglés *High performance liquid chromatography* que se basa en la separación de los componentes de las mezclas basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Donde el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad

identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos. Esta técnica también tiene sus variantes o modificaciones que la han optimizado según las necesidades de los investigadores y la que usamos en este trabajo es la HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , donde la R es una cadena alquil tal como  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  o  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente apolar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. A la cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interface compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

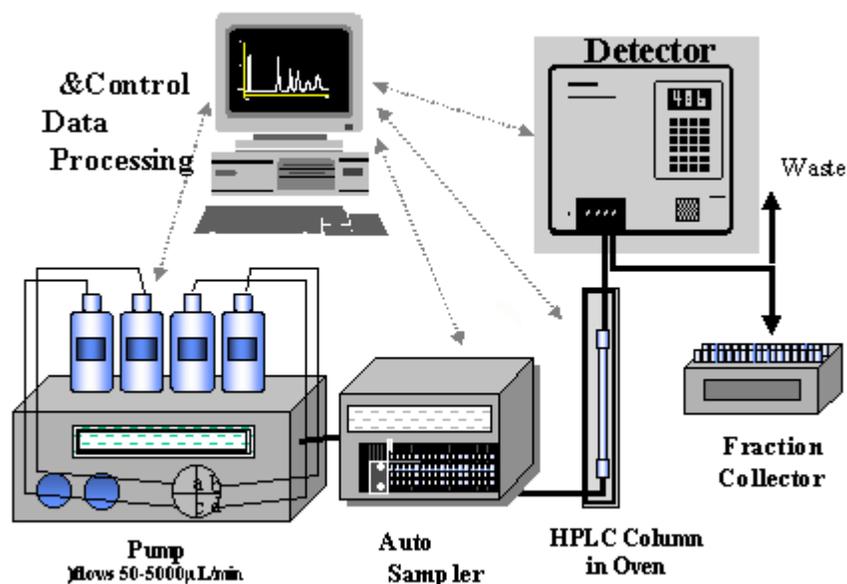


FIGURA 3. Equipo de HPLC.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquílica larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase inmóvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como que la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un

tampón como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contra-iones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

### ***1.5 Espectrometría de masas***

Sin embargo aunque con el HPLC se pueden separar las proteínas de una mezcla compleja, es posible lograr la identificación de estas con el uso de la espectrometría de masas que se encuentra entre las técnicas más precisas para la determinación de las masas molares.

Para el estudio de péptidos y proteínas una de las variantes de esta técnica mas utilizada es la espectrometría de masas por láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-TOF). En la MAILDI, la proteína o el péptido que se quiere estudiar se precipita con un compuesto orgánico como el acido trans-3-indol acrílico o sales orgánicas como el cloruro de sodio o el trifluoroacetato de plata. La muestra se irradia con un láser pulsado, como un láser de nitrógeno. La energía del láser eyecta iones excitados electrónicamente de la matriz, cationes y macromoléculas neutras, creando así una columna de gas denso por encima de la superficie de la muestra. La macromolécula se ioniza por las colisiones y la formación de complejos con cationes pequeños, tales como  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ag^+$ . (Atkins, 2008).

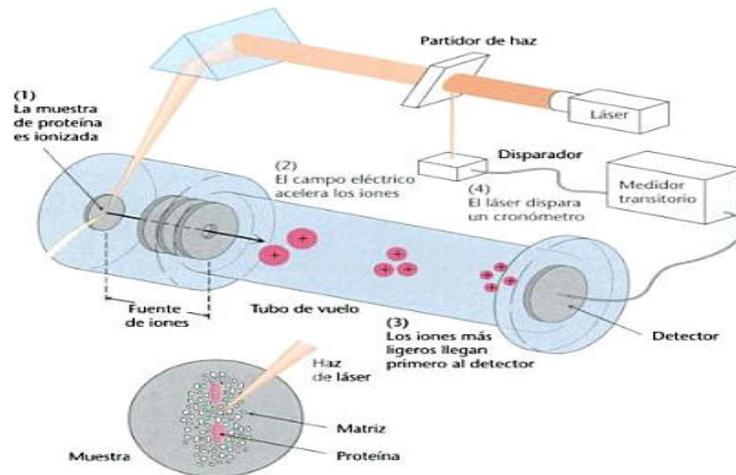


Figura 4. **Espectrometría de masas MALDI-TOF.** (1) la muestra de la proteína embebida en una matriz apropiada se ioniza por la aplicación de un haz de láser. (2) un campo eléctrico acelera los iones formados a través del tubo de vuelo hacia el detector. (3) los iones más ligeros llegan primero al detector. (4) el pulso del láser ionizante también activa un reloj que mide el tiempo de vuelo de los iones (Stryer, 2008).

Después de haber generado los iones en fase gaseosa, se puede utilizar varias aproximaciones para determinar su masa. En el análisis de tiempo de vuelo (time of flight, TOF), los iones se aceleran en un campo eléctrico hacia el detector. Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, viajan más rápido y llegan primero al detector. De este modo se pueden analizar pequeñas cantidades de biomoléculas (Stryer, 2008).

## II. ANTECEDENTES

Durante las últimas tres décadas, la evaluación de la calidad de los ovocitos antes de la FIV convencional se ha mantenido mayormente subjetiva y en gran medida "depende del observador". Durante la recolección de los ovocitos (metafase II) están rodeadas por varias células del cúmulo. Estas células de la granulosa juegan un papel importante en la regulación de la maduración de los ovocitos (Lawrence *et al*, 1980; Larsen *et al* 1986). En el complejo cumulo-ovocito (COC), las uniones intercelulares permiten la transferencia de pequeñas moléculas de bajo peso molecular entre las células del cumulo y los ovocitos (Gilchrist *et al*, 2004; Pangas y Matzuk 2005). Numerosos estudios han proporcionado pruebas de una relación entre la morfología del COC, según la evaluación de la observación microscópica, y la capacidad de fertilización (Sato *et al*, 2006). Aunque la mayoría de los ovocitos pueden ser fertilizados, sólo la mitad llegan a etapas de pre-implantación y los que llegan a la etapa de la implantación son aun menos. Una serie de estudios sugieren que los cambios en la expresión génica, como pentraxina 3 (PTX3) en células del cumulo se puede controlar para la selección de los ovocitos y embriones para la implantación (Elvin *et al*, 1999; Yan *et al*. 2001; Su *et al*. 2004; Zhang *et al*. 2005; Assou *et al*, 2006). Por lo tanto, los estudios de expresión génica en ovocitos humanos y células del cúmulo, podrían contribuir no sólo a la identificación de los factores implicados en la maduración de ovocitos, sino que también proporcionan valiosos marcadores moleculares de la expresión de genes anormales en los ovocitos con competencia reducida (Falco *et al*. 2006; Inan *et al*, 2006).

Proteínas específicas se pierden en ovocitos humanos sometidos a la maduración *in vitro*, en comparación con los ovocitos resultantes de la inducción de la ovulación *in vivo* (Trounson *et al*. 2001). Otro estudio en el que se uso (metionina marcada  $^{32}\text{S}$ ) muestra tanto las diferencias cualitativas y cuantitativas en la síntesis de proteínas y una serie de proteínas se observaron específicamente en ciertas etapas de la maduración de los ovocitos y en las

células del cumulo de bovinos (Wu *et al*, 1996; Khatir *et al*, 1998). El análisis de los niveles de expresión de la proteína (síntesis y degradación) y modificaciones post-traduccionales reveló que los ovocitos no pueden sintetizar todas las proteínas necesarias para el crecimiento (Schultz *et al*, 1979; Salustri y Matriiiozzi 1983; Schultz 1986). Algunas proteínas en los ovocitos se obtienen a partir de suero (Glass, 1971), y células del cúmulo, ya que se demostró que pueden contribuir con los ovocitos secretando proteínas a través de la transferencia de moléculas mediada por las uniones de hueco o “gaps” en los ratones, (Matzuk *et al*, 2002) demostraron la comunicación bidireccional entre los ovocitos y células del cumulo y es esencial para el desarrollo de los ovocitos para someterse a la fertilización y la embriogénesis.

En otro estudio, el uso de RP- LC-MS/MS combinado con 1D-SDS-PAGE, sirvió para que se identificaran 1.625 proteínas de mamíferos y 735 proteínas de *Sus scrofa* obtenidas de cigotos porcinos que incluye tanto las proteínas citosólicas y de membrana (Mukesh Kumar Gupta, 2009). En otro estudio se utilizó proteómica de alto rendimiento para analizar las proteínas extraídas de 2700 ovocitos maduros de ratón que carecen de zona pelúcida y se ha logrado identificar 625 proteínas diferentes (Ping Zhang, 2009).

Desde su lanzamiento en 1987, la técnica MALDI-MS ha sido principalmente utilizada para el análisis cualitativo de biomoléculas como las proteínas y péptidos, pero esta tecnología requiere que las proteínas se encuentren purificadas por eso se utiliza la electroforesis de alta resolución como lo es la 2D-PAGE para separarlas en la mayoría de los proyectos de proteómica (Aebersold y Goodlett, 2001).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades congénitas del metabolismo son raras individualmente pero frecuentes en su conjunto, debido al gran número de entidades descritas. A menudo se presentan clínicamente en el periodo neonatal. Los avances en su diagnóstico y tratamiento, por un lado, han mejorado enormemente el pronóstico en muchas de ellas y, por otro, nos permiten prevenir nuevos casos mediante el consejo genético y el diagnóstico prenatal (Park, 1995). Por todo ello, es de suma importancia que los neonatólogos y pediatras estén familiarizados con estas enfermedades, ya que serán ellos los que habrán de identificar a los pacientes que se pueden beneficiar de un estudio más profundo y de un tratamiento específico.

Las enfermedades congénitas del metabolismo (ECM) se deben a defectos genéticos, nucleares o mitocondriales, que van a ocasionar una alteración en la estructura o función de una proteína (Sanjurjo, 2003; Scriver, 2001), lo que conduce a: A) acumulación de algunas sustancias en los diferentes líquidos orgánicos; B) déficit de otras o disminución en la producción de energía; C) depósito intracelular de productos, ó D) pérdida de función de algún receptor o transportador. En general, la sintomatología clínica dependerá de la toxicidad de los metabolitos acumulados, del lugar donde se depositen o de la función de los productos deficitarios, incluido el déficit energético.

Son enfermedades raras pero debido al gran número de entidades descritas, hoy más de 500 (Sanjurjo, 2003). De ellas, aproximadamente 100 pueden presentarse en el periodo neonatal (Saudubray *et al*, 2002). En nuestro país se ha comunicado una incidencia de 1/1,176 recién nacidos, con un recién nacido afectado por cada 274 ingresos (Baldellou, 1998).

Por último, al ser enfermedades hereditarias, su diagnóstico nos permite en muchas ocasiones la prevención de nuevos casos.

Según cifras del INEGI para el Censo de Población y Vivienda del año 2000, el estado con mayor población con alguna de estas discapacidades es el Estado de México, que reporta 33 mil 232 casos. En segundo lugar está el Distrito

Federal con 27mil 500 personas afectadas. Con el desarrollo del presente estudio se pretenden implementar estrategias que permitan evaluar el proteoma embrionario permitiendo así elevar las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción asistida. El encontrar criterios eficaces y fácilmente aplicables basados en la examinación para la selección embrionaria es una finalidad en la biología reproductiva ya que permitiría obtener buenos resultados con menos cantidad de ovocitos fecundados y por lo tanto menos embriones analizados, reduciendo el uso de material biológico y reduciendo los costos de proceso lo que beneficiaría a las parejas que deseen tener descendencia mediante este tipo de procedimientos. De acuerdo con datos emitidos por la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (Red LARA), en México 2 de cada 10 parejas padecen infertilidad, por lo que incorporar metodologías de vanguardia aplicadas a la reproducción humana contribuiría en una mejor comprensión biológica de este problema de salud pública. La manera como pretendemos abordar este problema es realizar una búsqueda mediante la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa mejor conocida como (RP-HPLC) de sus siglas en inglés *High performance liquid chromatography reverse phase*. Ya que es una poderosa herramienta que posee una gran sensibilidad, resolución utiliza muy poca muestra y es automatizable permitiendo separa las proteínas para su identificación mediante espectrometría de masas.

## **IV. HIPÓTESIS**

Si se extraen proteínas citoplasmáticas y de membrana y se realiza un perfil de su expresión podremos encontrar algún biomarcador que podría ser utilizado como un diagnóstico celular.

## **V. OBJETIVO**

Realizar la búsqueda de biomarcadores moleculares proteicos que puedan servir para establecer un diagnóstico celular, que contribuya con el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) para detectar enfermedades ligadas al sexo, enfermedades monogénicas y genopatías (errores innatos del metabolismo).

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Extracción de proteínas de cigotos
2. Extracción de proteínas de embriones
3. Extracción de proteínas de blastocistos
4. Digestión de proteínas a péptidos
5. Purificación de péptidos mediante RP-HPLC
6. Recolección de fracciones peptídicas
7. Análisis de los diferentes patrones de cromatogramas
8. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas

## **VII. METODO**

### ***VII.1. Obtención de muestra***

Para iniciar se tuvo que informar a los pacientes sobre la estrategia y los posibles riesgos del mismo según la declaración de Helsinki asentándose en un consentimiento firmado especificando que se utilizara el material biológico que no sea viable o en condiciones que indiquen anomalías que pongan en riesgo el desarrollo del embrión o que repercutan en la salud de la madre. VER CONSENTIMIENTO INFORMADO EN ANEXOS

### ***VII.2. Punción Folicular y lavado de Ovocitos***

Se prepararon los tubos para punción (Falcon 2057, Becton Dickinson, R.U.) en termobloque a 37°C. Se colocaron cajas de Petri (Falcon 1029) sobre la superficie caliente (37 °C) de la K Systems, aproximadamente 10 minutos antes de la punción. El objetivo de este paso es evitar un shock térmico. Las placas pueden colocarse inicialmente cerradas y abrirse en el momento en que llegue el primer tubo de punción, ya que se aprovecha tanto la tapa como la base. La punción folicular se realizó en el quirófano. Una vez que los tubos que contienen el líquido folicular se trasladaron al laboratorio, se siguen los siguientes pasos:

Se vertió el líquido folicular sobre las cajas de Petri precalentadas como se ha indicado anteriormente. Y se buscaron los ovocitos mediante inspección directa del líquido de la punción, con el objetivo de menor aumento (8-10 X), con el fin de dominar un mayor campo visual, lo que facilita notablemente la localización. La observación de los ovocitos resultó relativamente fácil, ya que en la mayoría de los casos destacan por el aspecto característico del cúmulo refringente y generalmente abundante que los rodea.

Una vez que se localizó el ovocito, se aspiró un poco de medio tamponado con una pipeta Pasteur, y se recogió el ovocito y se depositó en la primera placa de lavado. De esta manera se consigue trasladar el mínimo de sangre.

Ya terminada la punción y recuperación de los ovocitos de un ovario, se realizó la misma operación con el segundo. Al terminar la punción, se procedió al lavado de los ovocitos como sigue:

- Se trasladaron todos los ovocitos obtenidos a la placa de lavado.
- Se limpiaron los ovocitos con la ayuda de agujas y jeringas de 1ml, retirando el material oscuro de los cúmulos y los restos de sangre.
- Una vez limpios, los ovocitos se colocaron en una placa de cultivo, haciéndolos pasar por las tres gotas de lavado destinadas para tal fin, con objeto de eliminar los restos del medio tamponado. Se rotuló la placa con el nombre y apellidos de la paciente, y numeraron los ovocitos. Se realizó la clasificación morfológica.
- Posteriormente se llevaron los ovocitos a la incubadora a 37 °C y 6% CO<sub>2</sub> hasta el momento de la inseminación o de la ICSI.

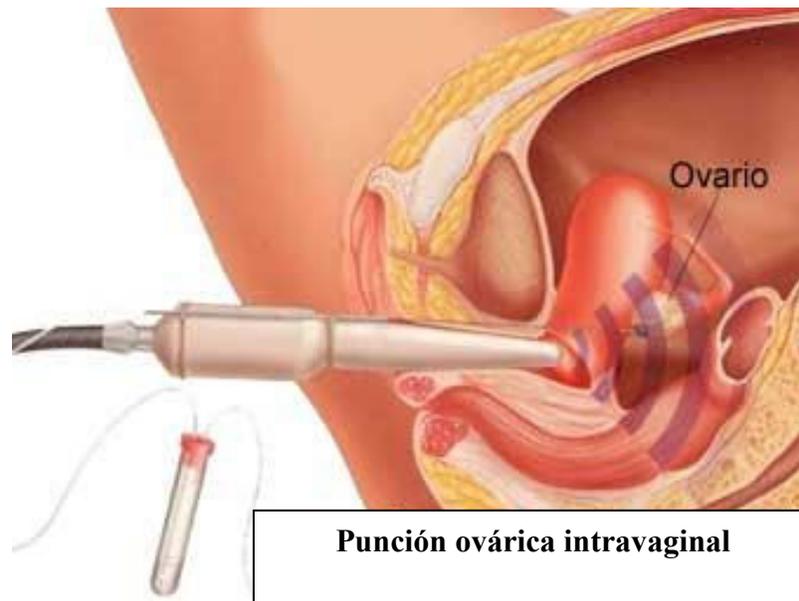


Figura 5. **Extracción de ovocitos.** En esta imagen se muestra como son aspirados los ovocitos guiados por un transductor ultrasonográfico.

### **VII.3. Fecundación-ICSI**

A diferencia de la fecundación in vitro convencional (FIV), en donde la presencia de las células del cúmulo es imprescindible para beneficiar la fecundación, cuando se utiliza la técnica de ICSI los ovocitos necesitan ser liberados de dichas células con objeto de facilitar su manipulación durante el proceso de microinyección.

Los complejos corona-cúmulo-ovocito son identificados y clasificados inmediatamente después de la aspiración y se incuban a 37 °C y 6% de CO<sub>2</sub>.

La eliminación de las células del cúmulo se realizó entre 2 y 4 horas después de la punción folicular. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando una solución de hialuronidasa de 80 UI/mL y dispositivos con capilares de distinto grosor (Stripper, Mid-Atlantic Diagnostics, INC, EE.UU.; Denudation Pipettes, Swemed, Suecia).

Una vez que ya obtuvimos decumulados los ovocitos y preparados los espermatozoides procedimos a realizar el set up de la ICSI, es decir, a la preparación de la placa de ICSI y a la colocación de las pipetas Holding y de microinyección en un microscopio invertido (Olympus, Serie IX2). Una vez realizado el set se colocan los ovocitos en la placa de microinyección y se procedió inmediatamente a la ICSI.

Una vez localizado el ovocito, enfocamos la zona media de éste, que será aquel plano en que aparecen nítidas la membrana plasmática y las paredes externa e interna de la zona pelúcida.

Bajamos la pipeta Holding y la de inyección hasta que queden en el mismo plano focal. Rotamos el ovocito hasta que queda visible el corpúsculo polar (CP). Aspiramos con la pipeta Holding de manera que el ovocito quede inmóvil con el CP en la posición horaria de las 12.00, la 1.00, las 5.00, las 6.00, las 7.00 o las 11.00. Esto es importante, ya que la posición del CP nos indica cuál puede ser la posición del huso meiótico.

Por último, se acerco todo lo posible el espermatozoide a la punta de la pipeta. Una vez que tenemos el espermatozoide en la pipeta de inyección listo para ser microinyectado y el ovocito inmovilizado, correctamente enfocado y colocado:

- Con la pipeta de inyección se presiono suave y gradualmente sobre la zona pelúcida.
- Una vez traspasada la zona pelúcida, seguimos presionando la membrana del ovocito y procuramos que se perfile perfectamente un cono alrededor de la pipeta moviéndola de arriba abajo y se aplica mas presión, una vez perfilado el cono seguimos presionando hasta que se rompió la membrana y se deslizó por los bordes de la pipeta. Entonces se aspiró un poco del citoplasma, para asegurarnos de que rompimos la membrana e inyectamos el espermatozoide.



Figura 6. **ICSI**. En esta imagen se muestra el procedimiento de Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

#### VII.4. Diagnóstico Genético Preimplantacional (FISH)

Transcurridas 72 horas los embriones debieron tener entre 6 y 8 células (Gámiz, 2008 #22), etapa en la cual se realizó la biopsia de una o dos blastómeras, para lo cual fue necesario que los embriones se encuentren en un medio libre de calcio y magnesio y en una solución HEPES (Capmany, 1996 #13). Disminuida la tensión de la unión de las blastómeras se procedió a realizar la aspiración de la blastómera, con un daño mínimo para el embrión (Dumoulin, 1992 #17). Se procede a realizar el análisis cromosómico mediante la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Rocha, 2008 #26), una vez que se detectaron embriones anormales cromosómicamente pueden ser utilizados con los fines de la extracción de proteínas.

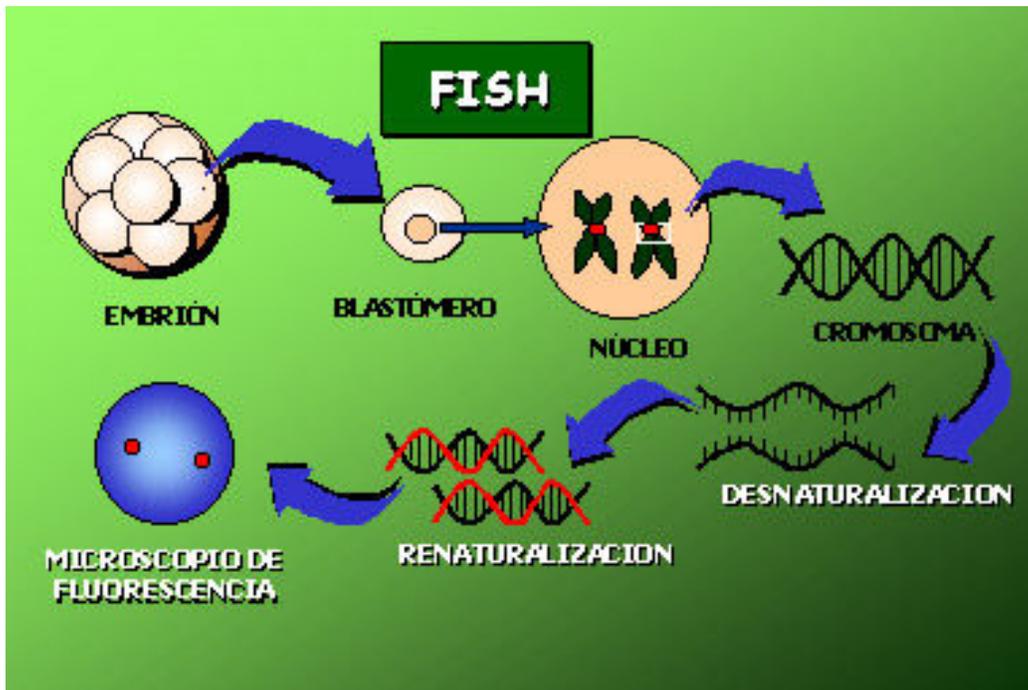


Figura 7. **Técnica de FISH.** En esta imagen se muestra el mecanismo de la reacción de Hibridación *in situ* Fluorescente, en la cual se hibridan sondas de DNA unidas a un fluorocromo el cual se une al material genético nativo con la finalidad de observar cromosomas (Rubio, 2005 #25).

Los embriones que son diagnosticados como no viables fueron almacenados a la temperatura de  $-195.8^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido en solución HEPES hasta su uso.

### ***VII.5. Extracción de proteínas***

Para la extracción de proteínas totales de los tres grupos de estudio (zigotos, embriones y blastocistos) se llevó a cabo el mismo diseño de extracción.

Se partió de un conjunto de 30 células por grupo, para el caso de embriones día 3 y para blastocistos día 5, se sabe que en promedio tienen entre 8 y  $>100$  células respectivamente pero se consideró como una célula a su conjunto partiendo de un solo cigoto.

Los tres tipos de muestra fueron recolectados posteriormente a su evaluación y diagnóstico como material no viable, se procedió a cambiarlas de su gota de medio de cultivo (Vitrolife AB, Kungsbacka, Suecia) y se colectaron en una gota de  $50\ \mu\text{l}$  de solución de HEPES para mantener su integridad y se colocaron en tubos de PCR estériles, posteriormente se criopreservaron a  $-195.8^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido para su posterior uso.

El día de uso, se descongelaron y se procedió a retirarles la zona pelúcida para esto cada una de las células fue cambiada de su medio isotónico a una gota de solución de Tyrode a pH 2.5, en la cual se dejaron reposar durante 5 minutos y mediante efecto mecánico con agujas de  $0.35\ \text{mm}$  fue retirada la zona pelúcida y las células fueron llevadas a una gota de  $50\ \mu\text{l}$  de medio isotónico.

### ***VII.6. Digestión de proteínas de células en solución.***

Para este paso se requirieron tubos de  $1.5\ \text{ml}$  siliconados, todos los tubos fueron lavados con etanol y con agua miliQ, se dejaron secar al aire en campana de flujo.

Posteriormente se centrifugaron los tres tubos que contenían a cada uno de los grupos a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, utilizando un equipo Allegra 25R, Beckman Coulter, con la finalidad de retirar el medio isotónico de preservación.

El medio isotónico fue retirado mediante pipeteo de extracción con cuidado de no resuspender el botón. Después se adicionó medio de lisis (UREA 6 M, TRIS-Base 100 mM), se resuspendió mediante vortex continuo durante 2min y se sonicó durante 5 min. Se volvió a centrifugar a 13 000 rpm durante 10min a 4°C con la finalidad de romper las células y poder retirar las proteínas.

Se recuperó el sobrenadante mediante pipeteo de extracción con sumo cuidado y se transfirió a tubos de 1.5 ml resuspendiendo en 100 µl de buffer de lisis. Se adicionó 5 µl del agente reductor (200 mM de DTT y 100 mM TRIS) y se mezcló suavemente con vortex durante 30 segundos y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura de 25°C.

Posterior mente se añadieron 20 µl del agente alquilante (200 mM de Iodoacetamida y 100 mM de TRIS) mezclando con vortex durante 30 segundos y se dejó incubar durante 1 hora a 25°C

Terminado el tiempo de incubación, se redujo la concentración de urea diluyendo la muestra con 775 µl de agua MiliQ y se mezcló gentilmente con vortex durante 30 segundos. La dilución es para obtener una concentración de urea en 0.6M que es una concentración óptima con la que puede trabajar con Tripsina.

A la mezcla se le añadieron 100 µl de la solución de Tripsina (200 ng/ µl) y se mezcló suavemente con vortex durante 15 segundos y se dejó incubar a 37°C durante 13 horas. Pasado el tiempo se detuvo la reacción y se ajustó el pH a 4 con ácido acético. Se concentraron las muestras hasta sequedad (concentrador 5301, Eppendorf), para finalmente resuspender las muestras en 40 µl de fase móvil (agua 0.1% TFA).

### ***VII.7. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa RP-HPLC***

Esta técnica se realizó con un equipo Waters-2295 con un detector de lámpara de fluorescencia multi  $\lambda$  (Waters2475) y un arreglo de diodos (Waters-

2996), esto con la finalidad de que podamos separa los péptidos producidos en la digestión previa, con una columna de resina (Waters, Atlantis Columns. T3. 3  $\mu$ m, 1.0 X 150 mm) así también poder desalar la muestra para que pueda ser leída por el equipo de espectrometría de masas.

### VII.7.1.Preparación del HPLC

Primero se tuvo que preparar cada una de las fases con agua MiliQ previamente degasificada mediante filtración por membrana (Milipore, HVLP 0.45 $\mu$ ) y movimiento continuo en parrilla (Corning, stirrer / hot plate) y se sonicó durante 10 minutos (Cole Palmer).

Posteriormente se colocaron cada una de las fases en el siguiente orden.

- Acetonitrilo 0.1% TFA
- TFA 0.1% agua
- Acetonitrilo
- Agua

Se lavaron las columnas con la fase de agua y después se purgó cada una de ellas con su fase, primero en húmedo durante 10 minutos y después en seco durante 10 minutos también, verificando que la presión se mantuviera estable. Posteriormente se purgó el inyector y la columna con agua durante 5 minutos.

<b>PURGADO</b>	<b>ACETONITRILO 0.1% TFA</b>	<b>AGUA 0.1% TCA</b>	<b>ACETONITRILO</b>	<b>AGUA</b>
<b>HÚMEDO</b>	400	400	165	<b>255</b>
<b>SECO</b>	<b>148</b>	<b>148</b>	<b>190</b>	<b>95</b>

TABLA 1. **FLUJO EN PURGA DE COLUMNAS DE HPLC.** Esta tabla muestra las presiones en (psi) estándar en el flujo de purga de columnas estas presiones están en relación a un flujo de 0.06 ml/min.

Las muestras se resuspendieron en 40  $\mu$ l de fase móvil (agua 0.1% TFA) y son colocadas en viales de HPLC (Waters, Screw top vial, 12X32mm) para que puedan ser inyectadas en el equipo.

#### VII.7.2. METODO DE ANALISIS MEDIANTE RP-HPLC

Muestra	Volumen de inyección ( $\mu$ l )	Función	Tiempo de corrida (min)
		equilibrio	30
blanco	20	inyección	60
		equilibrio	10
embriones	15	inyección	60
		equilibrio	30
Duplicado	15	inyección	60
		equilibrio	30
zigotos	15	inyección	60
		equilibrio	30
duplicado	15	inyección	60
		equilibrio	30
blastocistos	15	inyección	60
		equilibrio	30
duplicado	15	inyección	60

Tabla 2. **Estrategia de análisis en equipo de HPLC.** En esta tabla se muestran los tres grupos celulares, tiempos y los volúmenes de inyección para ser analizados por RP-HPLC.

Una vez realizados los cromatogramas correspondientes se procedió a concentrar las muestras por evaporación en un concentrador durante 3-4 horas, utilizando el equipo Concentrator-ependor 5301. Una vez liofilizadas se conservaron a 4 grados para su posterior estudio.

## **VII.8. Espectrometría de Masas**

Para esta parte del estudio se colectaron las cumbres resultado de los cromatogramas y se liofilizaron como se comenta en el paso anterior, los cuales fueron reconstituidos cada uno en una solución 10mg/ml que contiene la matriz de ionización (ácido  $\alpha$ -4hidroxicinámico) y son alicuotados a 0.8  $\mu$ l de matriz y 0.8  $\mu$ l de muestra y fueron moteadas cada una de las muestras en una serie de 6 puntos que son reconocidos cardinalmente por el espectrómetro de masas (MALDI TOF/TOF Analyzer 4800 plus) el cual utiliza un placa de acero inoxidable (384 Opty TOF 123 mm X 81 mm, ABciex) la cual una vez moteada se deja secar a 25°C y es montada en la platina del equipo para su lectura.

### **VII.8.1. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO**

Se usaron 13 calibradores estándar (AB ciex) y se utilizó como control interno la proteína Enolasa en 6 puntos de detección

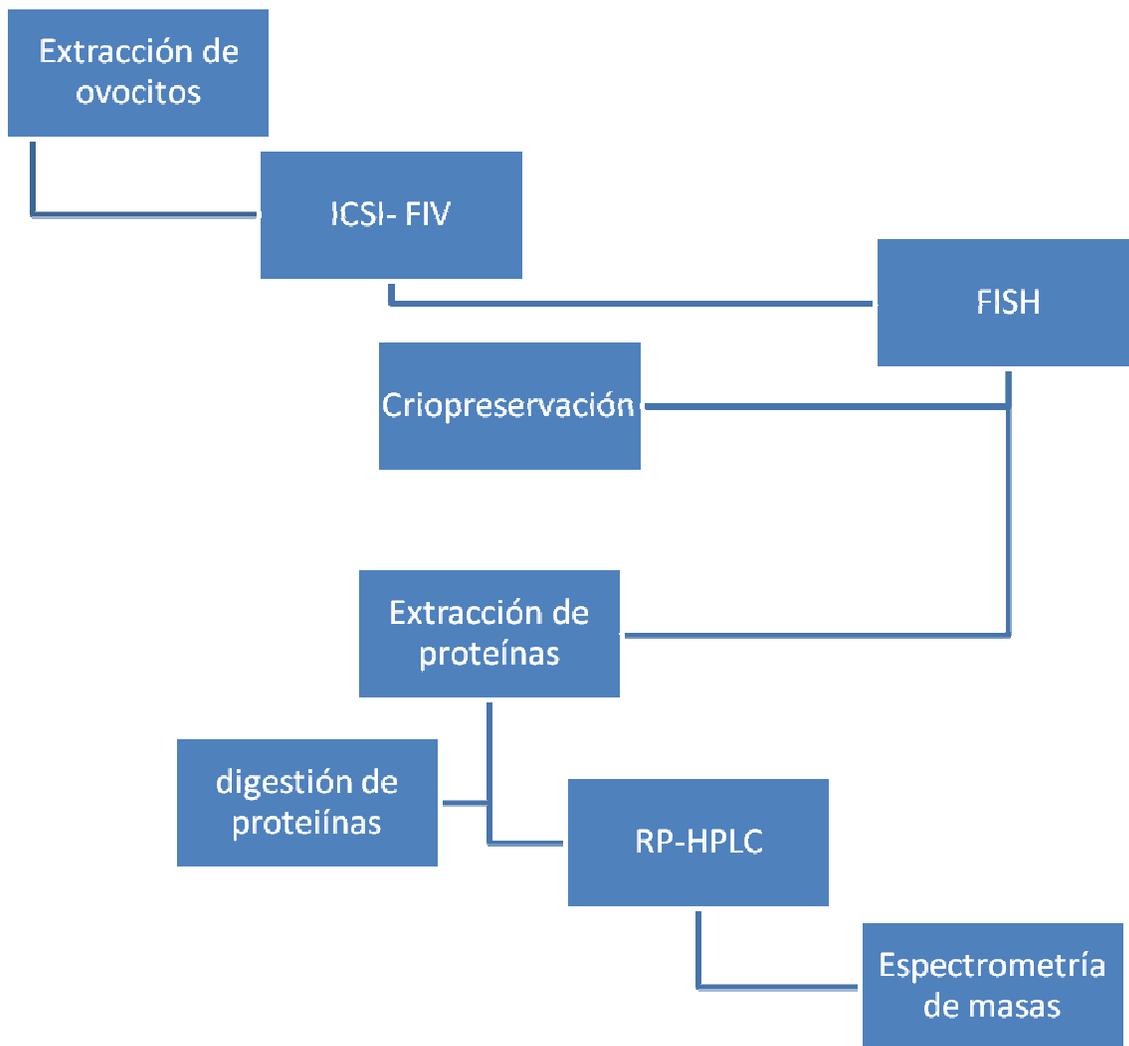
### **VII.8.2. CONFIGURACIÓN DEL EQUIPO**

Se calibró el laser a 400- 2000 nm y 6000 hertz

## **VII.9. Identificación de Proteínas**

Se utilizó la plataforma MASCOT y se buscó en la base de datos de swisprot con los criterios estándar de MS/MS.

**VII.10. Diagrama de Flujo del Método.**



## VIII. RESULTADOS

### VIII. 1 HPLC

Los siguientes cromatogramas muestran los diferentes perfiles de agrupación peptídica del extracto de cada uno de los grupos celulares, los cuales fueron detectados mediante un arreglo de diodos con un intervalo de 210nm a 350nm, pero solo poniendo énfasis en la longitud de onda de 220nm y de 280nm. A continuación solo se ilustran los cromatogramas de la longitud de onda de 220nm.

#### VIII.1.1 ZIGOTOS

En la figura 8 podemos observar el cromatograma obtenido a 220 nm correspondiente a la muestra de zigotos, en el cual se obtuvieron 9 grupos de péptidos con los siguientes tiempos de retención: 3.2, 5.03, 8.6, 16.53, 26.37, 40.39, 48.23, 51.31 y 54.89 minutos de corrida.

En la figura 9 se muestra el cromatograma obtenido a 280 nm, en el cual se obtuvieron los péptidos con los siguientes tiempos de retención: 3.31, 4.28, 7.30, 33.68, 36.83, 40.93, 48.77, 55.05 minutos de corrida.

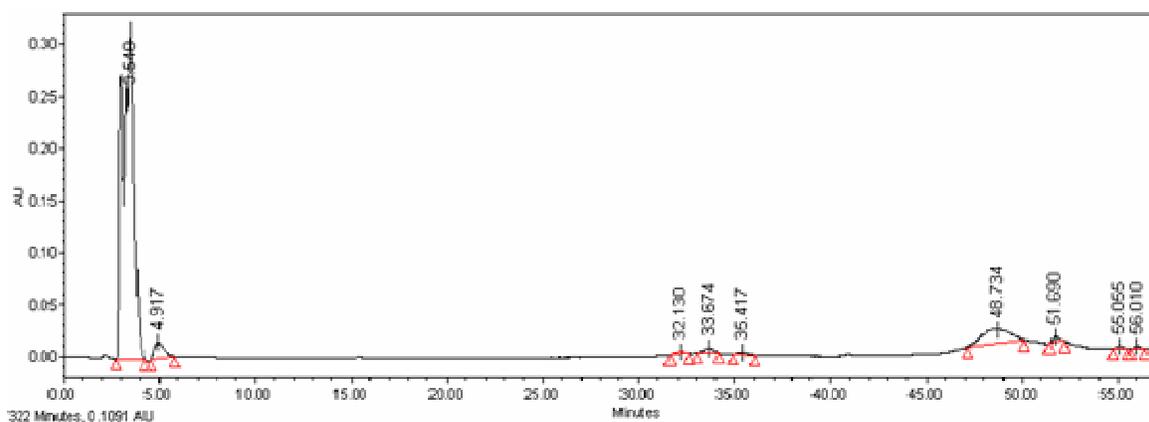


Figura 8. **Cromatograma de zigotos a 220 nm.** En este cromatograma se muestra el perfil de separación de los péptidos de la muestra de zigotos en una corrida de 60min.

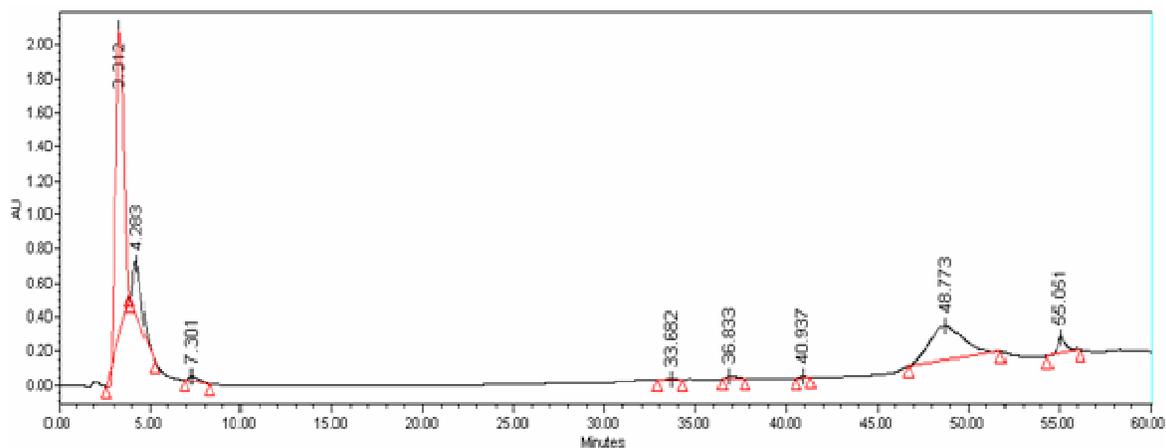


Figura 9. **Cromatograma de zigotos a 280 nm.** En este cromatograma se muestra el perfil de separación de los péptidos de la muestra de zigotos en una corrida de 60min.

En la tabla 3 a cada uno de estos grupos le asignamos un nombre para su posterior identificación en el espectro de masas, basado en la inicial del grupo y el número en orden de aparición en el cromatograma correspondiente.

Péptidos de zigotos	Tiempo de retención a 220 nm	Tiempo de retención a 280 nm
Z1	3.54	3.31
Z2	4.91	4.28
Z3	32.13	7.30
Z4	33.67	33.68
Z5	35.41	36.83
Z6	48.73	40.93
Z7	51.69	48.77
Z8	55.05	55.05
Z9	56.01	

Tabla 3. **Tiempo de retención para el grupo de zigotos.** Cada uno de estos picos peptídicos fue renombrado con una letra y un número según el orden de aparición en el cromatograma, en esta tabla se compara la detección a 220 y 280 nm, con la finalidad de cerciorarnos que se estén observando péptidos.

## VIII.1.2 EMBRIONES

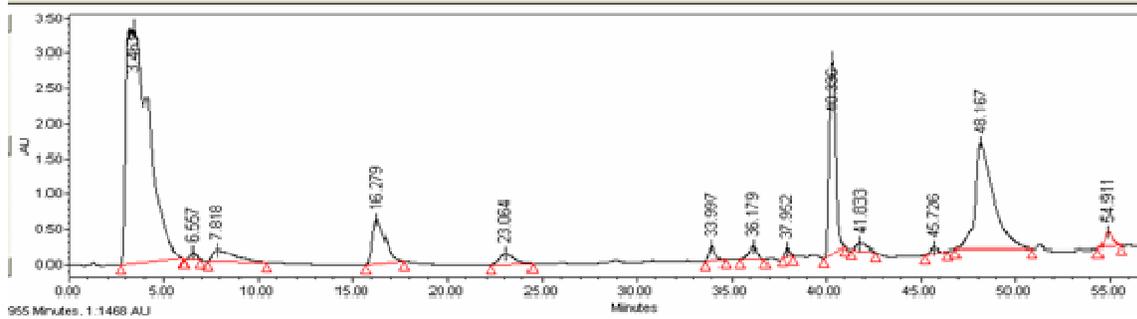


Figura 10. **Cromatograma de embriones a 220 nm.** En este cromatograma se muestran las cumbres con los tiempos de retención para los péptidos del grupo de embriones en un a longitud de onda de 220nm.

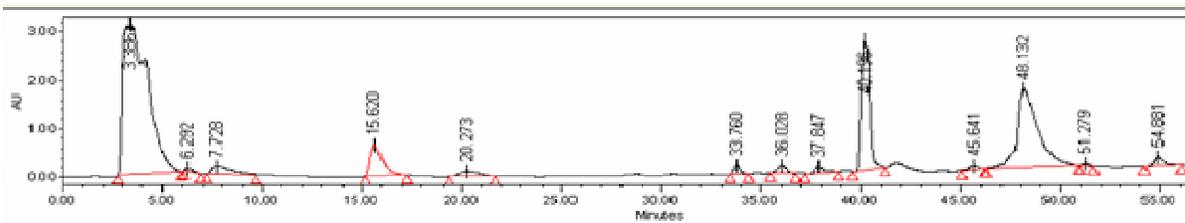


Figura 11. **Cromatograma de embriones a 280 nm.** En este cromatograma se muestran las cumbres con los tiempos de retención para los péptidos del grupo de embriones en un a longitud de onda de 280nm.

En la tabla 4 a cada uno de estos grupos le asignamos un nombre para su posterior identificación en el espectro de masas, basado en la inicial del grupo y el número en orden de aparición en el cromatograma correspondiente.

<b>Péptidos de embriones</b>	<b>Tiempo de retención a 220 nm</b>	<b>Tiempo de retención a 280 nm</b>
E1	3.46	3.36
E2	6.55	6.29
E3	7.81	7.72
E4	16.27	15.62
E5	23.06	20.27
E6	33.99	33.76
E7	36.17	36.02
E8	37.95	37.84
E9	40.33	40.19
E10	41.83	45.64
E11	45.72	48.13
E12	48.16	51.27
E13	51.91	54.88

Tabla 4. **Tiempo de retención para el grupo de embriones.** Cada uno de estos picos peptídicos fue renombrado con una letra y un número según el orden de aparición en el cromatograma, en esta tabla se compara la detección a 220 y 280 nm, con la finalidad de cerciorarnos que se estén observando péptidos.

### VIII.1.3 BLASTOCISTOS

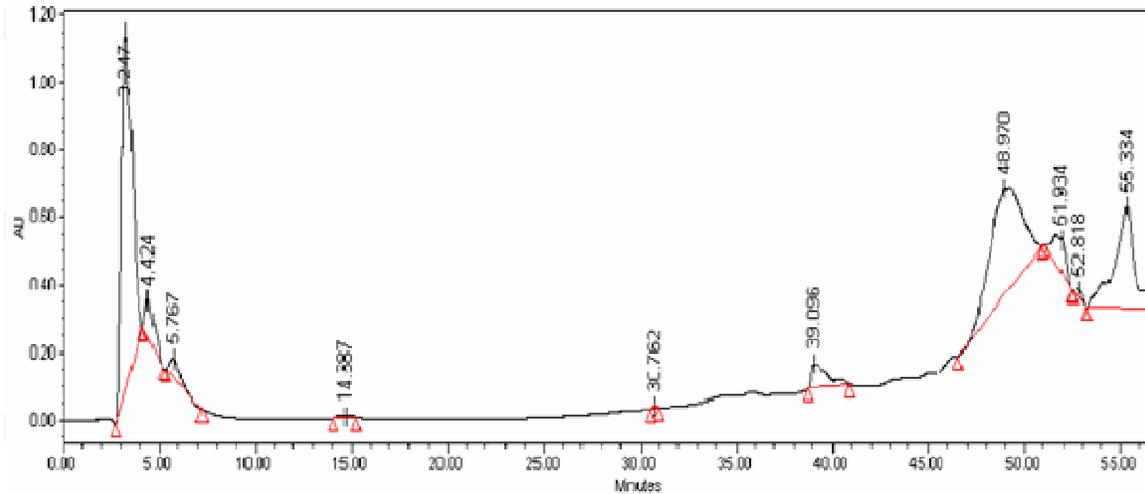


Figura 12. **Cromatograma de blastocistos a 220 nm.** En este cromatograma se muestran las cumbres y tiempos de retención para el grupo celular de Blastocistos observado a una longitud de onda de 220 nm.

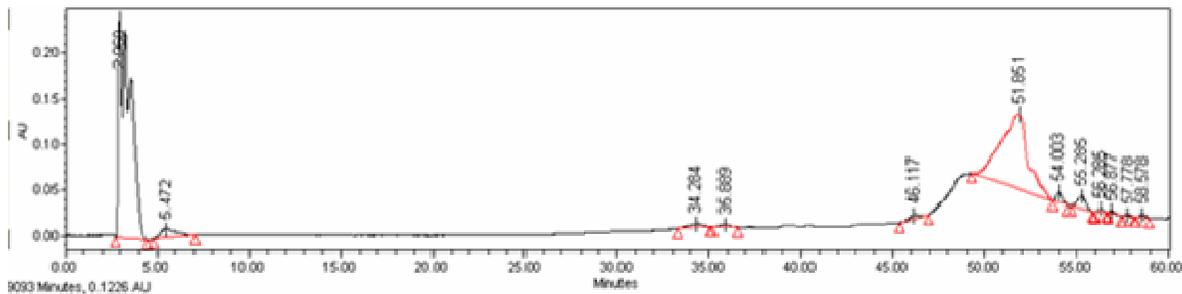


Figura 13. **Cromatograma de blastocistos a 280 nm.** En este cromatograma se muestran las cumbres y tiempos de retención para el grupo celular de Blastocistos observado a una longitud de onda de 280 nm.

En la tabla 5 a cada uno de estos grupos le asignamos un nombre para su posterior identificación en el espectro de masas, basado en la inicial del grupo y el número en orden de aparición en el cromatograma correspondiente.

<b>Péptidos de blastocistos</b>	<b>Tiempo de retención a 220 nm</b>	<b>Tiempo de retención a 280 nm</b>
B1	3.27	2.96
B2	4.42	5.47
B3	5.76	34.28
B4	14.38	35.88
B5	30.76	46.11
B6	39.09	51.00
B7	48.97	55.28
B8	51.93	56.28
B9	52.81	56.87
B10	55.33	57.77-58.57

Tabla 3. **Tiempo de retención para el grupo de cigotos.** Cada uno de estos picos peptídicos fue renombrado con una letra y un número según el orden de aparición en el cromatograma, en esta tabla se compara la detección a 220 y 280 nm, con la finalidad de cerciorarnos que se estén observando péptidos.

VIII.1.4. TABLA DE PROTEINAS IDENTIFICADAS

ZIGOTOS	EMBRIONES	BLASTOCICTOS
SL9A6_HUMAN , sodio / hidrógeno intercambiador de 6	A2AP_HUMAN Alfa-2-antiplasmina	PON1_HUMAN Suero de la paraoxonasa / arilesterasa 1
K2C1_HUMAN Queratina, un tipo II citoesqueleto OS	A1AT_HUMAN Alfa-1-antitripsina	ZN699_HUMAN , las proteínas dedo de zinc 699
ANT3_HUMAN Antitrombina III OS	TRIL_HUMAN TLR4 interactor con repeticiones ricas en leucina	KPCA_HUMAN , la proteína quinasa C de tipo alfa
A1AT_HUMAN Alfa-1-antitripsina OS	APOC3_HUMAN Apolipoproteína C-III	ZN883_HUMAN , la proteína de dedos de zinc 883
APOA2_HUMAN Apolipoproteína A-II OS	A2MG_HUMAN Alfa-2-macroglobulina	AMFR2_HUMAN , E3 ubiquitina-proteína ligasa AMFR
K2C1_HUMAN Queratina, un tipo II citoesqueleto	NELF_HUMAN, Nasal embryonic luteinizing hormone-releasing hormone factor	TNR6C_HUMAN , Trinucleótidas repetir que contienen genes de proteínas 6C
K2C1B_HUMAN Queratina, tipo II del citoesqueleto 1b	MYCT1_HUMAN , la proteína Myc o	PRA10_HUMAN , miembro de la familia PRAME 10
NR2C1_HUMAN , subfamilia de receptores nucleares 2 miembro del grupo C 1	HNF6_HUMAN , el factor nuclear de hepatocitos 6	MUC12_HUMAN , mucina-12
ABHGA_HUMAN , Abhidrolase dominio que contienen proteínas 16A SO	RDH16_HUMAN , deshidrogenasa Retinol 16	KS6B1_HUMAN , proteína ribosomal S6 kinasa beta-1
ZN394_HUMAN , las proteínas dedo de zinc 394 OS	SPAS1_HUMAN , espermatogénesis asociadas a serina ricas en proteína 1	CF138_HUMAN , parcheado de dominio que contienen proteínas C6orf138

CE164_HUMAN	Proteína de 164 kDa centrosomal OS	STAG1_HUMAN , cohesin subunidad SA-1	PGM2_HUMAN , fosfoglucomutasa-2
APOA1_HUMAN	Apolipoproteína AI	TMED6_HUMAN , transmembrana emp24 dominio que contienen proteínas 6	HEN1_HUMAN , hélice-lazo-hélice de la proteína 1
K1C10_HUMAN	Queratina, tipo I del citoesqueleto 10	ZIK1_HUMAN , las proteínas dedo de zinc interactuar con ribonucleoproteína K	PP2_HUMAN , Tripeptidyl peptidasa-2
DEN1A_HUMAN	DENN dominio que contienen proteínas 1A	IL32_HUMAN , la interleucina-32	MPP10_HUMAN , U3 nucleolar pequeño ribonucleoproteína proteína MPP10
PAP1L_HUMAN , poliadenilato proteína de unión		NAT8B_HUMAN , probable N-acetil-8B	Ig alfa-1-C de la cadena región
PDC10_HUMAN proteínas muerte celular programada 10		PLXA4_HUMAN , Plexin-A4	Alfa-2-macroglobulina
CASP5_HUMAN , Caspasa-5		SL9A6_HUMAN , sodio / hidrógeno intercambiador de 6	Suero de la paraoxonasa / arilesterasa 1

Tabla IV. En esta tabla se muestran las proteínas diferenciales en cada uno de los tres grupos de estudio, estas proteínas fueron analizadas mediante la plataforma MASCOT bajo los criterios estándar para MS/MS mediante un equipo MALDI TOF/TOF.

## IX. DISCUSIÓN

En una primera instancia empezaremos con el análisis de los cromatogramas producidos por RP-HPLC, los cuales se llevaron a cabo bajo un gradiente de dos fases la primera es de acetonitrilo 0.1% TFA, y la segunda fase es de agua 0.1% TCA, esto con la finalidad de que se puedan separar los péptidos de una manera más eficaz debido a la diferencia de sus mismas polaridades y la interacción obligada con la matriz de la columna. Esto provocó que se presentaran la mayoría de los picos en los extremos de los cromatogramas ya que se diferenciaron muy bien entre los más polares al inicio de la corrida y los menos polares hacia el final. Este paso de separación nos permitió tener dos ventajas selectivas en el método sobre otras estrategias como las que se utilizan en HPLC convencional e incluso sobre técnicas electroforéticas como lo es la separación por 2D-PAGE. Ya que el método utilizado nos permite desalar los péptidos de una manera extra fina que nos permite ser detectados con mayor sensibilidad por el equipo de espectrometría de masas puesto que libera las cargas ocupadas por las interacciones con la sal procedente de la extracción y al estar ionizados los péptidos pueden ser procesados mejorando la resolución y sensibilidad.

Cabe mencionar que los cromatogramas se realizaron por duplicado inyectando en cada uno de ellos 15µl de muestra y se logró el correcto registro de los tiempos de retención para cada una de las crestas peptídicas las cuales solo variaron en decimas o centésimas de segundos lo cual no es una diferencia significativa y podemos asegurar que se tratan de los mismos grupos peptídicos. Asimismo podemos observar que los grupos peptídicos que se procesaron en cada uno de los tres grupos celulares es muy parecido y en algunos de ellos solo cambia en concentración, esta concentración inferida por el área de la curva que se produce, puesto que por la escasa cantidad de muestra, ablando en número de células y por ende en la concentración de proteína total no se realizó una cuantificación de manera tradicional con una curva tipo. Asimismo se podría haber realizado una cuantificación inferida por un control interno, pero tampoco se realizó ya que no se contó con un péptido purificado y conocido del cual estemos seguros que tenemos

el registro de su tiempo de retención en las condiciones de nuestra separación, es por esto que este paso de purificación peptídica no se cuantificó, pero se podría cuestionar el por qué se realizó la separación a nivel de los péptidos y no a nivel de proteínas que sería más sencillo de encontrar un control interno como la Albumina o la  $\gamma$ globulina, que comúnmente se usan. La respuesta a este cuestionamiento es la siguiente; No se realizó de este modo por que se consideró que la muestra es muy poca y las células tienden a adherirse a las superficies de los tubos aun que estos sean siliconados, y para no perder muestra en el cambio de tubos y así evitar en lo posible la manipulación de estas, se decidió que se haría la digestión mediante tripsinización en el mismo tubo y se llevara en este hasta su inyección al equipo de HPLC. Es muy posible que en un estudio posterior realicemos la cuantificación a nivel de proteínas puesto que ya hemos estandarizado el método de extracción lo cual es muy importante ya que nuestras células no son cultivables y son de muy difícil acceso

Así mismo hablaremos de los resultados obtenidos mediante el análisis para la identificación de las proteínas que se realizó en un equipo MALDI TOF/TOF y se realizó un MS/MS para la identificación utilizando la plataforma MASCOT en la cual se registraron 120 proteínas de las cuales 63 alrededor del 50% son proteínas que se encuentran diferenciales entre los grupos de estudio. Sin embargo cabe destacar que el grupo de embriones son el grupo que menos proteínas se identificó y coincide con las áreas trazadas en su cromatograma, sin embargo es en este grupo en el único que se encontraron expresadas proteínas de muerte celular programada y también caspasas, de mayor abundancia la caspasa 5, lo cual nos habla de que el embrión detiene su desarrollo mediante esta vía apoptótica que se desencadena en una cascada que es regulada negativamente. Así mismo cabe mencionara que el grupo de los cigotos es el grupo que en mayor proporción presenta la expresión de Albumina y Queratina intracelular tipo I y II. Pero no presenta proteínas que nos den la imagen de que va a detener su desarrollo embrionario temprano, pero junto con el grupo de los blastocistos son los que presentan la mayoría de las proteínas expresadas, tomemos en cuenta que en el estadio de blastocisto ya se están generando

proteínas de novo y que en los cigotos son las proteínas producidas en la ovogénesis y la maduración del ovocito, es lógico pensar que en el estadio de embrión de día 3 estas proteínas se encuentren disminuidas debido a su desgaste y tasa de utilización y para los procesos de la segmentación por eso no es sospechoso que encontremos proteínas que dan estructura al citoesqueleto ya que durante esta etapa el citosol sufre grandes cambios en su composición y su estructura. Mientras que en el estadio de blastocisto hemos encontrado una proteína de gran interés que es la interleucina 32, que nos indica que el blastocisto está mandando señales al útero para su implantación pero esto no es todo ya que se sabe que las células del sistema inmune durante la implantación cambian la función autoinmune por una función de guía en la implantación es decir que las células NK que se encuentran en el tracto reproductivo no juegan un papel protector si no más bien un papel de señalización celular, lo cual vemos por la expresión de este tipo de proteínas.

## X. CONCLUSIÓN

Para empezar hablemos de la extracción, ya que fue un método estandarizado de novo para la extracción de solamente 30 células en solución, esto ha sido todo un logro pues los métodos convencionales en general se basan en una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  de proteína total o a partir de un cultivo celular  $\geq 50\ 000$  células, o de  $0.5\ \text{cm}^3$  de tejido. Y el encontrar las cantidades y las soluciones que se requerían para solo 30 células fue a base de varios ensayos y de una revisión basta de bibliografía dado que no sabemos la concentración de proteína por célula en promedio pero se maneja basado en cálculos en  $8\mu\text{g/ml}$  lo cual es una cantidad ínfima y esa cantidad ya es en relación a las 30 células.

El haber obtenido las señales en los cromatogramas es una referencia de una buena digestión y el gradiente que se usó fue de gran importancia puesto que nos permitió tener cumbres peptídicas bien definidas y suficientemente separadas entre sí para poder ser colectadas y así poder ser identificadas en MS/MS. En tanto que la identificación ha sido exitosa y se logró la identificación de un gran número de proteínas teniendo en cuenta que la concentración de la muestra es paupérrima se logró la identificación y diferenciación de grupos de proteínas que se encuentran diferencialmente en cada uno de los grupos celulares.

## XI. PERSPECTIVAS

- Realizar la búsqueda de biomarcadores en un conjunto de células procedentes de blastómeras bajo los siguientes criterios de inclusión: haber sido biopsiadas de embriones de 8 células en día tres; haber resultado negativas a aneuploidías mediante DGP; que el embrión haya continuado su desarrollo de manera óptima al estadio de blastocisto.

Cabe mencionar que se pueden extraer hasta dos células del embrión en día tres sin afectar su desarrollo hasta blastocisto (Hardy, K., *et al.*, 1990), esto con la finalidad de tener un control negativo.

- Realizar el mismo estudio con un número mayor de células por grupo de muestra con la finalidad de poder analizar las proteínas con una baja expresión. Realizar la RP-HPLC a nivel de proteínas con un control interno para poder hacer cuantitativo el estudio.
- Con las proteínas seleccionadas como biomarcadores realizar la elaboración de sus aptámeros, con la finalidad de observar su expresión.
- Elaborar un microarreglo con las proteínas encontradas para poder observar su expresión y utilizarlo como posible diagnóstico celular.

•

## XII.REFERENCIAS

Atkins, P. (2008). Química-Física. 8 ed. Editorial Médica Panamericana. 654-656

Keith, M., Persaud, T.V.N. (2008). Embriología Clínica. 8 ed. Elsevier, España.

Evans, J. P., Florman, H. M. (2002). The state of the union: the cell biology of fertilization. Nat Cell Biol 4 Suppl: s57-63.

Mayani, H., Paras, T. (1986). Diferenciación celular. Ciencias-UNAM: 20-24.

Pan, C., Kumar, C., et al. (2009). Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. Mol Cell Proteomics 8(3): 443-50.

Park, Y. W. (1995). Evaluation of neck masses in children. Am Fam Physician 51(8): 1904-12.

Gamiz, P., C. Rubio, et al. (2003). The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. Hum Reprod 18(11): 2413-9.

Tesarik, J., Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Hum Reprod 14(5): 1318-23.

Stryer, L. (2008). Bioquímica. 6 ed. Editorial Reverte. España. Pag.92-96.

Saudubray, J. M., Nassogne, M. C., et al. (2002). Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates: an overview. Semin Neonatol 7(1): 3-15.

Pellicer, A., Rubio, C., Vidal, F., Mínguez, Y., Giménez, C., Egozcue, J., Remohí, J., Simón, C. (1999). In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. Fertility and Sterility. 71(6): 1033-1039.

Gianaroli, L., Magli, M., Ferraretti, A., Fortini, D., Grieco, N. (2003). Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. Fertility and Sterility. 80(2): 341-349.

Gilbert, S. (2005). Biología del desarrollo. 7 ed. Editorial Médica Panamericana.

Gianaroli, L., Magli, M., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Borghi, E., Ermini, B. (2006). Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. Human Reproduction. 22(1): 241-249.

Raga, F., Bauset, C., Remohi, J., Bonilla-Musoles, F., Simón, C., Pellicer, A. (1997). Reproductive impact of congenital Müllerian anomalies. Human Reproduction. 12(10): 2277-2281.

Lawrence, T., Dekel, N., Beers, W. (1980). Binding of Human Chorionic Gonadotropin by Rat Cumuli Oophori and Granulosa Cells: A Comparative Study. Endocrinology. 106 (4): 1114.

Gilchrist, R.B, Ritter, L.J., Armstrong, D. T. 2004. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. Animal Reproduction Science. 82: 431-446.

Pangas, S., Matzuk, M. (2005). The Art and Artifact of GDF9 Activity: Cumulus Expansion and the Cumulus Expansion-Enabling Factor. Biology of Reproduction. 73(4): 582-585.

INEGI: <http://www.inegi.org.mx/lib/Entidades.aspx?vecet=00,&s=est&tema=Causa%20de%20la%20discapacidad%20-%202000%20-%20entidad%20federativa&urldato=%2fest%2fcontenidos%2fespanol%2frutinas%2fept.asp%3ft%3dmdis04&c=4214>

Figura 1.- [www.upload.wikimedia.org](http://www.upload.wikimedia.org)

Figura 4.- [www.infertil.com.mx](http://www.infertil.com.mx)

Figura 5.- [www.firstivf.net](http://www.firstivf.net)

Figura 6.- [www.ivi.es](http://www.ivi.es)

## XIII.ANEXOS

### XIII.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROTOCOLO DE INVESTIGACION

FECHA: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_

Sr(a). \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_

CON DOMICILIO EN: CALLE \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_

CD. O MUNICIPIO \_\_\_\_\_ TELEFONO \_\_\_\_\_

Declaro que:

- Entiendo que las muestras **no viables** producto de mis tratamientos de reproducción asistida serán utilizadas únicamente para el proyecto de investigación “BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PROTEÍNICOS EN ZIGOTOS, EMBRIONES Y BLASTOCISTOS”.
- Entiendo que la información referente a mi persona será tratada de forma confidencial y codificada de forma que quede protegida mi identidad.
- Consiento que se comparta la información arrojada por los análisis de rutina para los tratamientos de reproducción asistida solo para este estudio.
- Entiendo que cualquier resultado patológico que resulte en los estudios a mi persona con motivo de la investigación, me serán necesariamente comunicados por los responsables del protocolo.
- He leído y comprendido toda la información dada, estoy satisfecho(a) de la información recibida, he podido formular todas las preguntas que he creído convenientes y me han aclarado todas las dudas planteadas.

**“EN CONSECUENCIA DOY MI CONSENTIMIENTO PARA QUE PARTICIPE EN EL PROTOCOLO”**

NOMBRE Y FIRMA DE LA  
PERSONA QUE INFORMÓ

NOMBRE Y FIRMA DEL DONADOR

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**XIII.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

Yo \_\_\_\_\_ con RFC \_\_\_\_\_

- En ejercicio de mi libre voluntad permito que las muestras de **células no viables** que entregaré en este acto para el protocolo de investigación “BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PROTEÍNICOS EN ZIGOTOS, EMBRIONES Y BLASTOCISTOS”. Realizado por el Instituto Valenciano de Infertilidad y el Instituto Politécnico Nacional. Y que se encuentran en un recipiente debidamente identificado, son mías.

En México, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma del Donante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Testigo

**ESTE CONCENTIMIENTO DEBERA CONSERVARSE DURANTE TODO EL TIEMPO DURACIÓN DEL PROTOCLO DE INVESTIGACION Y SE MANTENDRA EN CUSTODIA EN EL INSTUTO ESPECIALIZADO EN INFERTILIDAD Y MEDICINA REPRODUCTIVA INSEMER Y/O EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO ESTRICTA CONFIDENCIALIDAD Y ESTARA A LA DISPOSICIÓN DE LAS AUTORIDADES COMPETENTES CUANDO SEA REQUERIDA**



Todas las requisiciones serán ofrecidas sin ningún costo para usted. Además, usted no tendrá ningún gasto como resultado de su participación en este estudio.

**¿Recibiré algún pago por participar?**

Usted **NO** recibirá ningún pago por participar en este estudio. Ni beneficio producto del análisis de las células donadas.

**¿Quién participa en el estudio?**

Todas las parejas que se sometan a tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad como fecundación *in vitro* o inyección intracitoplásmica de espermatozoides que deseen de manera altruista contribuir a la generación de conocimiento y desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico para parejas infértiles.

**¿Qué significa participar?**

Si usted está de acuerdo con participar en el estudio, las células no viables que son ovocitos atrésicos no fecundables, embriones que han detenido su desarrollo sin motivo aparente, embriones analizados genéticamente y que son positivos para enfermedades congénitas o que por su condición génica detendrán su desarrollo y/o ponen en riesgo la vida de la madre. Este tipo de células no son compatibles con la vida y por legislación mundial es deber de el embriólogo desecharlas de manera adecuada, sin embargo estas células que no son compatibles con la vida pueden servir para investigaciones científicas que nos ayuden a entender mejor el desarrollo embrionario y aportando las herramientas necesarias para que las parejas infértiles del mundo tengan la oportunidad de concebir.

**¿Qué se hará con mis muestras?**

Serán utilizadas con el respeto y la dedicación adecuada bajo los estándares de protocolos de investigación científica con muestras de origen humano.

**¿Me beneficio con este estudio?**

**NO** usted, no se beneficiara con este estudio

**¿Cuáles son los riesgos de participar en el estudio?**

Usted ni las células viables corren ningún riesgo. Solo serán utilizadas células consideradas no viables.

**¿La información que yo daré, será confidencial?**

Con el objeto de proteger la confidencialidad de la información que usted nos dé, se usará un número del estudio para identificarla a usted y sus documentos Ese número solo será conocido por Usted y el personal del estudio y la asociación entre su número y su nombre se guardará en un lugar seguro con llave. Su entrevista y los resultados de sus pruebas serán tratados como expedientes médicos confidenciales de acuerdo con las leyes. El Investigador Principal del estudio será responsable de asegurar que toda su información se mantenga confidencial. El personal que trabaja en este estudio puede ver su información para verificar datos y procedimientos del estudio. Otras personas que pueden ver

su expediente y que mantendrán su información confidencial, incluyen autoridades mexicanas que regulan estos estudios, los comités de ética o las personas que se aseguran de que el estudio se hace de la forma correcta. La información que la identifica no se les dará a personas que no trabajen para el estudio.

**¿Qué otra cosa necesito saber acerca de este estudio?**

Usted no está obligada a participar en éste ni en ningún otro estudio, y puede negarse a contestar preguntas específicas o retirarse de él cuando lo desee. Los investigadores solo usarán información sobre usted en la investigación hasta el momento del término del estudio.

**¿Qué hago si tengo otras preguntas, comentarios, o dudas?**

Este formulario de consentimiento explica el proyecto de investigación. Si usted tiene preguntas, comentarios o alguna preocupación sobre el estudio o sobre el proceso de consentimiento, por favor siéntase libre de preguntar o discutir con el personal del Proyecto. Si no tiene preguntas ahora, usted puede preguntar en cualquier otro momento.

Usted debe comprender bien sus alternativas antes de firmar este formulario. Si tiene preguntas adicionales más adelante, puede llamar o escribir al Investigador Principal.

**¿Qué significa mi firma?**

Su firma significa que usted comprende la información que se le ha dado sobre el estudio en este formulario de Consentimiento. Si usted firma el formulario significa que está de acuerdo con participar en el estudio. Usted recibirá una copia del formulario de Consentimiento Informado.

**Aprobaciones y seguimiento**

El protocolo del estudio y este documento de consentimiento informado han sido revisados por el Comité Científico Ético del IPN, Secretaria de Salud. Estos comités vigilan la seguridad de las personas y muestras biológicas que participan en este estudio y también protegen sus derechos.

Por favor tómese un tiempo y pregunte todo lo que quiera a nuestro personal antes de tomar su decisión. El personal que trabaja en este estudio es capacitado y le responderán todas sus dudas.

---

Nombre y firma del donador

### XIII.4 Carta de actividades experimentales en INMGEN



México D.F. a 16 de Junio del 2011

Dr. Alfonso Méndez Tenorio  
Laboratorio de Biotecnología y Bioinformática Genómica  
Departamento de Bioquímica ENCB-IPN

M en C. Francisco Rocha Cárdenas  
Embriología y Genética INSEMER

PRESENTES

Por medio de la presente me permito manifestar que el alumno Nambo Venegas Rafael de Jesús con número de boleta A090342 inscrito en el programa de Biomedicina y Biotecnología Molecular de la ENCB-IPN se encuentra realizando actividades experimentales en las instalaciones de la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica -México-INMEGEN, la cual esta a mi cargo y bajo mi supervisión realiza las siguientes actividades experimentales:

- Extracción de proteínas totales de cigotos, embriones y blastocistos.
- Digestión de proteínas.
- Purificación de péptidos mediante RP-HPLC.
- Identificación de proteínas mediante MS/MS.

Que son parte del proyecto de tesis de maestría intitulado "Búsqueda de Biomarcadores Proteómicos en Cigotos, Embriones y Blastocistos" que realiza bajo su tutoría. Sin más que notificarles y agradeciendo la atención a la presente queda de Uds.



Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda  
Investigador Asociado  
Unidad de Proteómica Médica  
INMEGEN  
[jreyes@inmegen.gob.mx](mailto:jreyes@inmegen.gob.mx)

ccp: Dra. Eva Ramón Gallegos  
Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez  
Dr. Juan Carlos Santiago Martínez  
Dr. Sergio Enrique Meza Toldeo

[www.inmegen.gob.mx](http://www.inmegen.gob.mx)

Periférico Sur No. 4124, Torre Zafiro II, 6to. Piso  
Col. Jardines del Pedregal, México, D.F. 01900, México  
Tel. +52 (55) 5350 1900 Fax +52 (55) 5350 1999

## XIII.5 Carta de donación de muestras biológicas por INSEMER



**INSEMER**

Instituto Especializado en Infertilidad  
y Medicina Reproductiva

México D. F. a 1 de Abril del 2011

A quien corresponda

Por medio de la presente el que suscribe me permito hacer de su conocimiento que estoy enterado y de acuerdo con el desarrollo del proyecto intitulado "búsqueda de biomarcadores proteínicos en cigotos, embriones y blastocistos" desarrollado por el Bio Exp. Rafael de Jesús Nambo Venegas que se encuentra inscrito en el programa de maestría en Biomedicina y Biotecnología Molecular de la ENCB-IPN. Para lo cual es necesario la recolección de muestras biológicas (ovocitos, cigotos, blastocistos y/o blastómeros) las cuales han sido recolectadas posteriormente a los tratamientos de infertilidad realizados en el Instituto Especializado en Infertilidad y Medicina Reproductiva -INSEMER y son clasificados como material no viable o de desecho por lo que el laboratorio de fecundación in vitro del INSEMER dona este material con fines de investigación.

El material donado es desecho de los tratamientos realizados a las pacientes de las historias clínicas enlistadas a continuación y sus expedientes así como los consentimientos informados se encuentran bajo resguardo del instituto.

4550	4553	4558	4560	4561	4552	4566	4560	4560	4563
4567	4568	4572	4575	4576	4579	4582	45988	4591	4596
4609	4611	4619	1624	4635	4642	4666	4668	4673	4675
4677	4691	4692	4695	4697	4699	4705	4709	4719	4721
4723	4730	4731	47336	4741	4750	4753	4759	4762	4766

Sin más por el momento y a sus órdenes si requiere mayor información queda de usted.

*Victor Romero Rdz.*

Embriologo. Víctor Romero Rodríguez

Director del Laboratorio de Fecundación *in vitro*

Insemer

vromero@insemer.com

Tel: 26231126 ext: 116

TORRE PALMAS  
Av. Paseo de las Palmas 735, Int. 1408 y 1008  
Col. Lomas de Chapultepec, C.P. 11000 México D.F. Deleg. Miguel Hidalgo  
Tels: 2623-1115 con 5 líneas Fax: 2623-1116 :: 01-800-830-69-96

[www.insemer.com](http://www.insemer.com)