



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría en Ciencias Médicas Odontológicas y
de la Salud

“Relación entre las mutaciones en el gen *NLRP7*, patrón de secreción de interleucina -1 β y falla recurrente en la implantación”.

Tesis

Que para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias Médicas, Odontológicas y
De La Salud

PRESENTA

Karina Arlen Sequeira Alvarado

Directora De Tesis

DRA PATRICIA GREYER GONZÁLEZ

Instituto Nacional De Perinatología

Secretaría De Salud

Programa de Maestría en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

TÍTULO DE TESIS

“Relación entre las mutaciones en el gen *NLRP7*, patrón de secreción de interleucina -1 β y falla recurrente en la implantación”.

DRA. KARINA ARLEN SEQUEIRA ALVARADO

ALUMNO

DRA. PATRICIA GREYHER GONZÁLEZ

TUTORA

DR. RICARDO FIGUEROA DAMIÁN

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DEDICATORIA

A mi mamá, **Ana Lilia Alvarado** por ser siempre ejemplo de vida.

A mi esposo, **Victor Fajnzylber** por su amor y apoyo infinito.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que con su ayuda invaluable participaron en la elaboración de este trabajo:

A Patricia Ramirez, Araceli Trejo, Mónica Aguinaga, Higinio Estrada, Eva Vega, Anayansin Molina, Julio de la Jara, Monica Quintana, Aurora Espejel, Irma Monroy, Rosario Pérez y Héctor Pérez Cano.

En especial a mi tutora, **Patricia Grether** por su apoyo absoluto, dedicación y entusiasmo durante este largo, pero enriquecedor proceso.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
MARCO TEÓRICO	8
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
DISEÑO DEL ESTUDIO	13
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	13
UNIVERSO DEL ESTUDIO	14
LUGAR	14
DURACIÓN.....	15
UNIDADES DE ESTUDIO	15
MÉTODOS DE MUESTREO	15
TAMAÑO DE LA MUESTRA	15
CRITERIOS DE SELECCIÓN	16
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	16
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	16
CRITERIO DE ELIMINACIÓN.....	16
VARIABLES EN ESTUDIO	17
ANÁLISIS MOLECULAR	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
ASPECTOS ÉTICOS.....	22
RESULTADOS	23
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	41
ANEXOS	42
BIBLIOGRAFIA	49

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La falla recurrente en la implantación (FRI) ocurre cuando embriones de buena calidad fallan en implantarse en dos tratamientos de fecundación in vitro (FIV). El gen *NLRP7* participa en inflamación y apoptosis, regula la secreción de interleucina 1 beta (IL-1 β) y se involucra en el establecimiento de la impronta en el ovocito. Sus mutaciones se han relacionado con abortos, enfermedad molar recurrente y óbitos.

OBJETIVO: Identificar mutaciones en el gen *NLRP7* en mujeres con FRI y relacionarlas con las concentraciones de IL-1 β en suero materno y sobrenadante del cigoto.

MATERIAL Y MÉTODOS: En un estudio trasversal en el Instituto Nacional de Perinatología, participaron pacientes en FIV con el antecedente de por lo menos un ciclo fallido entre abril de 2011 y julio del 2012. Previa firma de carta de consentimiento informado, se estudió el gen *NLRP7* mediante High Resolution Melting (HRM) para 9 de los 11 exones excepto el 4 y el 6 que se estudiaron directamente por secuenciación. Además, se cuantificó mediante ELISA la IL-1 β en suero materno post-estimulación hormonal y en el medio de cultivo sobrenadante de los cigotos.

RESULTADOS: Ingresaron al estudio 47 pacientes, de las cuales 26 tuvieron FRI y en las 21 restantes se observó que una fue baja respondedora, 6 presentaron mala calidad embrionaria y 14 lograron el embarazo. Se encontraron 7 diferentes variantes o mutaciones en 14 pacientes, 5 de las cuales tuvieron FRI. La mutación c.1018G>A E340K fue observada en seis pacientes, sólo una de ellas tuvo FRI, sin embargo, las 5 restantes tuvieron un mal desenlace reproductivo como aborto, baja respuesta a la hiperestimulación ovárica o mala calidad embrionaria. La mutación c.750C>A F250L se encontró en una paciente con FRI y 3 sin FRI. El polimorfismo c.955G>A V319I se detectó en 4 pacientes con FRI y en 2 con mala calidad embrionaria. Los cambios en *NLRP7* no se asociaron a disminución en la concentración de IL-1 β en suero ni en sobrenadante del cigoto. La cuantificación de IL-1 β en el sobrenadante de cigoto del día 3 fue más baja en las mujeres con FRI y con mala calidad embrionaria que en aquellas que lograron el embarazo (0.44 ± 0.2 vs. 6.5 ± 2.7 , $p=0.04$).

CONCLUSIONES: La mutación c.1018G>A E340K del gen *NLRP7* se observó en pacientes con infertilidad, baja respuesta a la hiperestimulación ovárica, mala calidad embrionaria y FRI, sin embargo es necesario ampliar el estudio para conocer mejor la participación de esta mutación en el evento reproductivo. No se observó asociación entre la presencia de variantes o mutaciones de *NLRP7* y alteraciones en la secreción de IL-1 β .

PALABRAS CLAVE: *NLRP7*, IL-1 β , Falla recurrente en la implantación.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Recurrent implantation failure (RIF) is determined when embryos of good quality fail to implant following several in vitro fertilization (IVF) treatment cycles. Implantation failure is related to either maternal factors or embryonic causes. NLRP7 is a member of the CATERPILLER protein family involved in inflammation and apoptosis. *NLRP7* has been shown in vitro to inhibit caspase-1-dependent IL-1 β secretion, is responsible for recurrent spontaneous abortions, stillbirths and intrauterine growth retardation.

OBJECTIVE: To investigate the role of *NLRP7* in RIF and the relationship with the concentration of IL-1 β as functional consequences.

MATERIAL AND METHODS: In a cross-sectional study prior informed consent letter all IVF patients with a history of at least one failed cycle at the National Institute of Perinatology between April 2011 and July 2012 were included. *NLRP7* was analyzed by High-Resolution Melting (HRM) in 9 of the 11 exons and directly sequenced exons 4 and 6. IL-1 β was quantified by ELISA in serum and in the supernatant of zygotes.

RESULTS: We included 47 patients, of whom 26 had FRI, one was low responder, 6 had poor embryo quality and 14 became pregnant. 7 changes were found in 14 patients, 5 of whom had FRI. The mutation c.1018G> A E340K was detected in one patient with FRI, 4 with poor embryo quality and in two with poor reproductive prognosis. The mutation c.750C> A F250L was found in a patient with FRI, and 3 without FRI. c.955G> A V319I was detected in 4 with FRI and 2 with poor embryo quality. *NLRP7* changes not associated with a reduction in the concentration of IL-1 β hormonal stimulation post supernatant or zygote. Quantification of IL-1 β in the supernatant of zygote of day 3 was lower in women with FRI and poor embryo quality. (0.44 ± 0.2 vs. 6.5 ± 2.7 p = 0.04).

CONCLUSION: The mutation c.1018G> E340K was associated with infertility, low response to ovarian hyperstimulation, poor embryo quality and FRI, however it is necessary to extend the study to better understand the involvement of this mutation in the reproductive event. There was no association between the presence of variants or mutations *NLRP7* and alterations in the secretion of IL-1 β .

KEYWORDS: *NLRP7*, IL-1 β , recurrent implantation failure.

MARCO TEÓRICO

Aproximadamente la mitad de todos los embriones humanos resultan en falla en la implantación. La mayoría de los embriones transferidos a el útero en un ciclo de fecundación in vitro no se implantan, por lo que la principal causa de falla de un ciclo de FIV es la falla en la implantación.¹ Múltiples factores pueden contribuir a esta falla; incluidas las anomalías genéticas y/o metabólicas del cigoto y las alteraciones en la receptividad endometrial.² El fenómeno de la implantación es estricta y secuencialmente controlado por sustancias que son secretadas por el cigoto, el endometrio o ambos.³ La falla recurrente en la implantación es una entidad aún no bien definida pero se considera que ocurre cuando embriones de buena calidad fallan en implantarse en dos o más tratamientos de fecundación in vitro de mujeres infértiles, sin encontrarse una causa directa.⁴

Recientemente se ha caracterizado a la familia de proteínas llamadas NLR que contienen un dominio de unión a nucleótidos y una región repetitiva rica en leucinas (LRR), que sirven como sensores intracelulares de la inmunidad innata regulando la inflamación y la apoptosis celular.⁵ Las proteínas multidominio consisten de un dominio LRR C-terminal el cual es responsable del reconocimiento del patrón molecular asociado a patógenos, una región central llamada NACTH (proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) un trans-activador (CIITA, HET-E) el cual codifica para una NTP-asa y es un dominio esencial para la multimerización) y por último el dominio N-terminal en el cual se unen las NLRs a distintas vías de señalización.⁶ La subfamilia más grande de NLRs es de 14 miembros. Las NLRPs (**N**ucleotide-binding oligomerization domain, **L**eucine rich **R**epeat and **P**yrin domain containing) están compuestas por un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos, una región rica en leucinas repetitiva y un dominio de pirina N-terminal y se localizan en dos regiones de cromosomas humanos 11p5 (NLRP6, 10 y 14) y 19q4 (NLRP2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 y 13).⁷ Los diferentes miembros de la familia NLRP se encuentran expresados en diversos tejidos reproductivos y algunos de ellos se expresan incluso en gametos, cigotos y blastocistos. La expresión de NLRP4, 5, 8, 9, 11, 12, 13 y 14 es elevada en ovocitos en vesícula germinal y Metafase II y disminuye progresivamente a través de la vida del cigoto hasta ser casi indetectable el día 5, mientras que la expresión de *NLRP2* y *NLRP7* muestra un patrón de secreción diferente, con una disminución notable de expresión el día 3 y un incremento el día 5 pos-fecundación.⁸

En el ratón, algunos miembros de la familia NLRP se han relacionado con el desarrollo embrionario, por ejemplo, los ratones nulos para NLRP5 son infértiles debido a que sus cigotos se detienen en un estadio de 2 células durante la embriogénesis,⁹ así también, los ratones nulos para *NLRP14* tienen cigotos que se detienen entre 2 y 8 células.¹⁰ En humanos, *NLRP2* y *NLRP7* parecen tener algún efecto regulador en el desarrollo embrionario ya que mutaciones en *NLRP2* causan Síndrome de Beckwith-Wiedemann y mutaciones en *NLRP7* mola recurrente biparental, abortos recurrentes, restricción en el crecimiento y óbitos, incluso se ha reportado que mujeres portadoras de polimorfismos, mutaciones heterocigotas o variantes raras no-sinónimas son susceptibles de presentar abortos recurrentes.¹¹ Estas observaciones sugieren que *NLRP2* y *NLRP7* participan en el desarrollo embrionario temprano y en el establecimiento de la impronta materna.

NLRP7 es una proteína solo encontrada en primates, se cree que *NLRP7* se ha originado de una duplicación del gen *Nalp2* de ratones.¹² El gen *NLRP7* contiene 11 exones y se encuentra en el cromosoma 19q13.4, codifica una proteína de 1037 residuos en su isoforma más larga. *NLRP7* tiene 3 isoformas V1, V2 y V3 con un corte y empalme alternativo que involucra los exones 5, 9, 10.¹³ La proteína NLRP7 no tiene ningún dominio conocido de unión al DNA o sobre las metiltransferasas del DNA, por lo que es poco probable que tenga un papel directo en el establecimiento o mantenimiento de la metilación de CpG. La metilación anormal observada en pacientes con enfermedad molar puede ser consecuencia de un desarrollo o maduración anormal del ovocito, momento en el cual se realiza la metilación materna.

Se ha propuesto que NLRP7 es un regulador negativo de la secreción de IL-1 β , CASP-1 dependiente, sin embargo Khare S et al,¹⁴ recientemente demostraron que NLRP7 dispara la formación del inflamosoma con activación de la caspasa-1 ASC-dependiente y su consecuente maduración de IL-1 β e IL-18 en respuesta a lipopéptidos acilados microbianos en macrófagos humanos. NLRP7 también limita el crecimiento intracelular de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en los macrófagos humanos infectados, en este experimento no se observó piroptosis NLRP7 dependiente, por lo que se sugiere que NLRP7 promueve la maduración de las citosinas pero no la muerte celular.¹⁵ Se ha demostrado que las pacientes con mutaciones en *NLRP7* presentan cuantificaciones disminuidas de IL-1 β y factor de necrosis tumoral (TNF) en células mononucleares sanguíneas.¹⁶ También se ha observado que su sobre-expresión se asocia con el desarrollo de seminomas testiculares, lo que apoya su importancia en la proliferación y/o la diferenciación celular.^{17, 18}

Las mutaciones de *NLRP7* se han asociado con mal pronóstico reproductivo en mujeres mientras que en varones no han mostrado tener ninguna repercusión sobre la espermatogénesis.¹⁹

Murdoch et al, estudiaron 3 pacientes con mutaciones que inactivan la expresión de *NLRP7*, a las que se les realizó fecundación in vitro, observándose cigotos de mala calidad y falla en la implantación, en la mayoría de los embriones.²⁰ Sin embargo, se desconoce si las pacientes con varios ciclos de reproducción asistida y falla en la implantación presentan mutaciones en este gen. Se desconoce también, si tiene un papel directo en el establecimiento de las marcas de impronta, o en el mantenimiento del cigoto temprano.²¹

Por otro lado la IL-1 β es secretada por el cigoto y las células trofoblásticas, interviene en el proceso de implantación, ya que incrementa la secreción de prostaglandina E2 y del factor inhibidor de leucemia (LIF), así como la expresión de la Integrina β -3. IL-1 β induce también la producción de IL-8 por el endometrio, con lo que se incrementa la migración y la supervivencia de las células trofoblásticas.²² Numerosos estudios han implicado al sistema de IL-1 en el proceso de implantación, aunque esta claro que no existe una única citosina ni factor de crecimiento que pueda explicar por si solo este complicado evento. La disminución en la expresión de la integrina α , β ₃ se ha observado en la deficiencia de fase lútea, la infertilidad de causa desconocida y las hidrosalpinx e interesantemente, la expresión de esta integrina es regulada por IL-1 secretada por el embrión.²³

Se ha demostrado que después de un proceso de fecundación in vitro (FIV), la implantación se correlaciona positivamente con altas concentraciones de IL-1 α e IL-1 β en suero. Las gonadotropinas usadas durante el ciclo de fecundación inducen producción local y sistémica de IL-1 β . Las tasas de implantación de pacientes en ciclos de fecundación asistida son más altas en aquellas que presentan mayores concentraciones sanguíneas de IL-1 β versus aquellas en las que se presentan concentraciones sanguíneas bajas el día de la administración de hCG.²⁴

Baraño et al, demostraron que la cuantificación de IL-1 β en sobrenadantes de cigoto a las 24 horas de la fecundación pueden predecir la probabilidad de embarazo, siendo diferencial entre aquellos que lograron la implantación y los que no.²⁵

Por los motivos anteriormente expuestos consideramos que *NLRP7* podría estar involucrada en la falla recurrente a la implantación, siendo la primera vez en la bibliografía que se explora en estas pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar si mujeres con falla recurrente en la implantación presentan mutaciones o polimorfismos en *NLRP7*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las concentraciones de IL-1 β en suero (tomado con y sin estimulación con gonadotropinas) entre las pacientes con y sin mutaciones en *NLRP7* y evaluar si existen diferencias.
- Determinar el patrón de secreción (día 1 y 3) de IL-1 β en el sobrenadante del cultivo del cigoto entre las pacientes con y sin mutaciones en *NLRP7* y evaluar si existen diferencias.

HIPOTESIS DE INVESTIGACIÓN

1. Las mutaciones del gen *NLRP7* son frecuentes en mujeres con falla recurrente en la implantación.
2. Es posible que las mujeres con mutaciones en el gen *NLRP7* presenten disminución de las concentraciones de IL-1 β en sangre post- estimulación hormonal.
3. Es posible que la concentración de IL-1 β en el sobrenadante de los cigotos de mujeres con mutaciones en el gen *NLRP7* se encuentren disminuidas.

JUSTIFICACIÓN

La falla en la implantación es hoy en día uno de los principales retos de la reproducción humana; es la razón más importante por la cual mujeres que completan un ciclo de fecundación in vitro no logran el embarazo. *NLRP7* es una proteína que regula la secreción de IL-1 β y se cree que participa en el establecimiento de la impronta materna. Se expresa en el ovocito desde vesícula germinal, así como en embriones preimplantación y en el endometrio. Las mutaciones de este gen se han relacionado con mola hidatidiforme recurrente biparental, abortos recurrentes, restricción en el crecimiento y óbitos, patologías que son manifestaciones de un mismo evento llamado implantación. Actualmente no se sabe si la presencia de mutaciones en el gen de *NLRP7* pueda ser una de las causas de falla recurrente en la implantación, tampoco sabemos si estas mutaciones pueden modificar las concentraciones de IL-1 β en el suero de las pacientes bajo un tratamiento de estimulación hormonal o el patrón de secreción de IL-1 β en el sobrenadante de cigotos durante su desarrollo pre-transferencia. No se ha realizado un estudio hasta la fecha para evaluar *NLRP7* en este tipo de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de investigación: Analítica.

Tipo de diseño: Transversal Prolectivo.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Nuestro estudio fue aprobado por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Perinatología. Se invitó a participar mediante carta de consentimiento informado (**Anexo 1**) a mujeres que se encontraban en su segundo o tercer ciclo de fecundación in vitro en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" entre abril del 2011 y julio del 2012.

Se les solicitó otorgar 2 muestras sanguíneas; la primera, durante la misma toma de muestra del día 1 del ciclo cuando se cuantifican los valores basales hormonales de la paciente (en donde se obtuvieron 2 tubos: 1 para la extracción de DNA de linfocitos (4 mL) y otro para la cuantificación de IL-1 β (3 mL); y la segunda, (3 mL de sangre periférica) el día que se observaron 2 folículos de >18 mm, justo antes de la inyección de gonadotropina coriónica (último día de estimulación hormonal) para la segunda cuantificación de IL-1 β .

Todas las pacientes fueron estudiadas previamente para valorar las causas de infertilidad, brevemente; se les evaluó con determinaciones de hormona folículo estimulante, luteinizante, estradiol basal, prolactina, progesterona, perfil tiroideo, perfil andrológico, cultivos cervicales para *micoplasma*, *ureaplasma* y *Chlamydia tracomatis*, ultrasonido ginecológico, histerosalpingografía, sonohisterografía y laparoscopia diagnóstica en los casos necesarios.

Se inició la hiperestimulación ovárica al día 2 del ciclo menstrual utilizando dos esquemas alternativos: (1) FSHr (Gonal-F; Merck Serono) o (2) FSHr y menotropinas urinarias (Merapur; Ferring Pharmaceuticals). El protocolo de estimulación ovárica fue seleccionados por cada médico tratante: (1) protocolo largo estándar con agonista de GnRH (Lucrin; Abbott laboratorios) en solo 6 pacientes, o (2) protocolo flexible de antagonista (Cetrotide; Merck Serono) al alcanzar folículos de ≥ 14 mm, el protocolo consistió en la administración de FSH recombinante (Gonal-F, Merck Serono) y/o hMG (Merapur Ferring) en dosis de 150U a 450U diarias para la hiperestimulación ovárica y (Cetrotide Merck 0.2 mg/día) a partir del día 6 o cuando se observará un folículo >14 mm, hasta el día de la administración de gonadotropina coriónica recombinante hCGr (Ovidrel Merck Serono 250 mcg) para evitar la luteinización prematura. El desarrollo

folicular se monitorizó a partir del día 6 del ciclo con ultrasonografía y con cuantificación de estradiol, hormona luteinizante y progesterona. La respuesta de las pacientes a la hiperestimulación se clasificó como: baja (menor o igual a 5 ovocitos), moderada (6 a 10 ovocitos) y alta (más de 10 ovocitos). La hCG se inyectó una vez que se observaban >2 folículos de >18 mm. Los folículos fueron aspirados 36 h después de la administración de la hCG con aguja de 17 ga (Cook Medical, Bloomington, IN). Todas las pacientes recibieron 600mg de progesterona y 100 mg de ácido acetilsalicílico iniciadas el día de la captura ovular y hasta la determinación de la gonadotropina coriónica (hGC-β), 14 días post transferencia embrionaria.

Los ovocitos fueron analizados en el laboratorio de in-vitro para definir su estatus morfológico y se dejaron incubar por aproximadamente 4 horas para posteriormente realizar la fecundación en base a la técnica seleccionada. Al día 3 previa transferencia embrionaria se realizó la evaluación morfológica de los embriones utilizando la clasificación de Lucinda Veeck.

Se subclasificaron los embriones en: Calidad buena (embriones calidad 1 y 2) y calidad mala (embriones calidad 3, 4 y 5).

Las muestras para la cuantificación de IL-1β en suero, se centrifugaron inmediatamente tras su recolección a 3000 rpm por 5 minutos y se refrigeraron a -70 °C para su procesamiento conjunto posterior.

En el caso del análisis del líquido sobrenadante del cigoto o los cigotos (que normalmente se deshecha) se obtuvieron aproximadamente de 15 a 20 μL, del día 1 y 3 del desarrollo de todos los cigotos y se congelaron inmediatamente a -70°C para su posterior procesamiento. Solo se analizaron los sobrenadantes de los cigotos trasferidos.

UNIVERSO DEL ESTUDIO

LUGAR

Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Departamentos: Biología de la Reproducción Humana, Genómica Humana y Bioquímica y biología molecular.

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”

Departamento de Biología Molecular.

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I. A. P.

Centro de Investigación Biomédica.

High Throughput Genomics Center
Universidad de Washington. Seattle U.S.A.
www.htseq.org

DURACIÓN

Marzo 2011-Abril 2013.

UNIDADES DE ESTUDIO

Mujeres con diagnóstico de infertilidad que se encontraran cursando su segundo o tercer ciclo de fecundación in vitro en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

METODOS DE MUESTREO

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Muestreo por conveniencia de acuerdo con la temporalidad del estudio.

Se incluyeron todas las pacientes de la Clínica de Reproducción Asistida del INPer que asistieron a Fecundación in Vitro en el periodo comprendido entre abril del 2011 y julio del 2012 que cumplieron con los criterios de esta investigación.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Mujeres con diagnóstico de infertilidad cursando su segundo o tercer ciclo de fecundación in vitro en el departamento de Biología de la Reproducción Humana del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" que acepte participar en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Mujeres en su segundo o tercer ciclo de fecundación in vitro cuya causa de infertilidad sea masculina.

CRITERIO DE ELIMINACIÓN

1. Pacientes en las que no se logre la obtención de la muestra de DNA a una concentración de mínimo 20 ng/ μ L.
2. Mujeres que posterior a la toma de DNA, no continúen el ciclo de hiperestimulación hormonal por algún motivo.
3. Mujeres que durante el ciclo de FIV analizado presenten algún tipo de infección viral o bacteriana, con algún tipo de respuesta inflamatoria sistémica (fiebre).
4. Pacientes en quienes no se puedan recabar todos los datos referentes a las variables de estudio.
5. Pacientes que soliciten de manera voluntaria salir del estudio.

VARIABLES EN ESTUDIO

Mutación del gen *NLRP7*:

Definición conceptual:	Alteración o cambio en la secuencia de nucleótidos del gen conocido como <i>NLRP7</i> que se encuentra en el cromosoma 19q13.4, que puede ser heredable y que no es frecuente (<1%) en la población.
Definición operacional:	Mutación del gen <i>NLRP7</i> que indica cambios en el DNA que lleva a una proteína truncada o a un cambio de aminoácido que no ha sido encontrada en controles.
Tipo de variable:	Cualitativa dicotómica.
Escala de medición:	Presente o ausente.

Polimorfismo del gen *NLRP7*

Definición conceptual:	Alteración o cambio en la secuencia de nucleótidos del gen conocido como <i>NLRP7</i> que se encuentra en el cromosoma 19q13.4, que puede ser heredable y que es frecuente (>1%) en la población.
Definición operacional:	Polimorfismo del gen <i>NLRP7</i> .
Tipo de variable:	Cualitativa dicotómica.
Escala de medición:	Presente o ausente.

Interleucina 1 β

Definición conceptual:	Proteína citoquina que en los humanos está codificada por el gen <i>IL1B</i> . El precursor de la IL-1 β se escinde por la caspasa 1 (interleucina 1 beta convertasa).
Definición operacional:	Interleucina 1-beta medida en suero y en sobrenadante de cigoto.
Tipo de variable:	Cuantitativa continua
Escala de medición:	Picogramos/mililitro.

Implantación

Definición conceptual:	La implantación del blastocisto en el útero femenino o implantación del cigoto humano es la adhesión a la pared del útero del blastocisto. La implantación comienza al final de la primera semana (séptimo u octavo día) después
------------------------	--

de la fecundación y se extiende hasta el final de la segunda semana (14 días después de la fecundación).

Definición operacional: Pacientes que dos semanas después de habersele transferido uno, dos o tres cigotos presenten una cuantificación de hCG mayor de 1 mUI/mL

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

Escala de medición: Presente, ausente.

Falla recurrente en la implantación

Definición conceptual: Dos o más fallas de la implantación posterior a fecundación in vitro recurrentes cuando los embriones transferidos fueron de buena calidad.

Definición operacional: Pacientes que dos semanas después de la transferencia de uno, dos o tres cigotos en su tercer ciclo de FIV presenten una cuantificación de hCG menor de 1 mUI/mL

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

Escala de medición: Presente, ausente.

Respuesta a la hiperestimulación hormonal

Definición conceptual: Respuesta de cada paciente a las dosis de gonadotropinas administradas según estradiol sérico y número de folículos obtenidos.

Definición operacional: Respuesta dada en número de folículos exclusivamente. baja (menor o igual a 5 ovocitos), moderada (6 a 10 ovocitos) y alta (más de 10 ovocitos).

Tipo de variable: Cualitativa ordinal.

Escala de medición: Baja, moderada y alta.

Calidad embrionaria

Definición conceptual: Según la clasificación de Lucinda Veek:

Tipo I: 0% de fragmentación con blastómeros homogéneos de igual tamaño.

Tipo II: < 10% de fragmentación con blastómeros homogéneos de igual tamaño.

Tipo III: Dos subtipos: Tipo III-A: 10-25% de fragmentación con blastómeros homogéneos de igual tamaño. Tipo III-B:

25-50% de fragmentación con blastómeros de diferente tamaño.

Tipo IV: > 50% de fragmentación con blastómeros que pueden tener el mismo tamaño o no.

Tipo V: 100% de fragmentación.²⁶

Definición operacional: Calidad Buena : Tipo I y II
Calidad Mala: Tipo III, IV y V

Tipo de variable: Cualitativa ordinal.

Escala de medición: Buena o mala.

Edad materna

Definición conceptual: Cantidad de años cumplidos a la fecha.

Definición operacional: Edad cumplida en años a la fecha de la transferencia embrionaria.

Tipo de variable: Cuantitativa Discreta.

Escala de medición: Años.

Técnica de reproducción asistida

Definición conceptual: Son diversas técnicas de tratamiento de infertilidad en donde hay manipulación de gametos.

Definición operacional: Se considerarán 2 técnicas: a) la fecundación in vitro (FIV) en la cual la fecundación ocurre en el laboratorio pero de manera espontánea y b) la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) en la cual el espermatozoide es inyectado dentro del ovocito por métodos mecánicos.

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

Escala de medición: Nominal.

Infertilidad

Definición conceptual: La infertilidad (imposibilidad de concebir luego de haber mantenido relaciones sexuales sin protección durante un año) puede clasificarse de acuerdo a sus causas principales: Uterina, tubaria, ovárica, o no identificada.

Definición operacional: Endocrino-ovárica, tubaria, uterina, cervical o masculina.

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

Escala de medición: Nominal.

ANALISIS MOLECULAR

EXTRACCIÓN DEL DNA

De la muestra sanguínea con EDTA se realizó extracción de DNA por medio del Kit de extracción de DNA genómico (Wizard®, Promega). El DNA se preservó a -20°C para el procesamiento conjunto de las muestras. Una vez extraído el DNA se cuantificó mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000) para una concentración de aproximadamente 50 ng/μL.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se estandarizaron cada una de las reacciones según la temperatura de fusión (T_m), cantidad de cebadores (0.3 μM), y concentración de DNA. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para cada exón se incluyen en el **Anexo 2**. Se utilizó HotStar TaqMaster Mix Kit (Quiagen) para todas las reacciones de PCR. Las condiciones de PCR (Mastercycler® gradient Eppendorf) fueron: 120 s a 95°C, seguidos de 38 ciclos de (95°C 60s, T_m de cada exón, 72°C 60s). La secuencia en el número de nucleótidos se refiere a la cDNA, donde +1 corresponde a la A de ATG, codón de inicio según la secuencia de referencia NM_001127255.1²⁷

HIGH- RESOLUTION MELTING

Se analizaron por High-Resolution Melting (HRM) 9 de los 11 exones de *NLRP7* (los exones 4 y 6 se secuenciaron directamente). El procedimiento consiste en amplificar el gen de interés en segmentos de 80-250 pb en reacciones que contienen un colorante de unión a ADN de doble cadena fluorescente. Después de la PCR, los productos de reacción son desnaturalizados poco a poco, y la disminución resultante en la fluorescencia del ADN se mide en tiempo real. La forma de la curva de fusión de alta resolución generada variará con diferentes secuencias de ADN, proporcionando datos capaces de distinguir los amplicones que difieren por tan poco como un solo par de bases. HRM se puede utilizar para la detección de variaciones genéticas menores, tales como polimorfismos de un solo nucleótido, inserciones, deleciones e inversiones. Previa estandarización de la T_m (temperatura de fusión del ADN) de cada primer y exón, se procedió a realizar el HRM, se utilizó EvaGreen (Bio-Rad) como colorante, los datos se generaron usando CFX96™ PCR de tiempo real y fueron analizados usando el Software Precision Melt Analysis™. Los productos de reacción de PCR a continuación, se utilizaron como plantillas para la secuenciación de Sanger.

SECUENCIACIÓN

Una vez verificada la obtención del producto de PCR, mediante gel de agarosa al 2% **Anexo 3**. Se eliminaron los nucleótidos no consumidos y/o cebadores remanentes mediante el Kit de purificación de DNA (QIAquick PCR) cortando las bandas obtenidas. La concentración de los templados fue entre 10-30 ng/μL. Ya con el producto de PCR purificado, se llevó a cabo la reacción de secuenciación con el kit comercial BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). La purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación se realizó con Spin Column Centri Sep (Applied Biosystem) y se secuenció en ambas orientaciones usando ABI Prism 3130. Este procedimiento se realizó en los exones 4 y 6, en el caso del resto de exones obtenidos mediante HRM los templados de PCR fueron purificados (Kit de purificación de DNA (QIAquick PCR) y enviados para su secuenciación en Seattle Universidad de Washington (<http://www.htseq.org>). Los datos obtenidos se analizaron mediante la herramienta bioinformática **Ebiox** (<http://www.ebioinformatics.org/ebiox>), y se compararon con las bases de datos data base Hapman, 1000 Genomes Project y db SNP. La consecuencia funcional de los polimorfismos no sinónimos se evaluó mediante Polyphen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>). **Anexo 4**

CUANTIFICACIÓN DE IL-1 BETA

Se cuantificó IL-1β en suero y sobrenadante de los cigotos trasferidos mediante Fluorokine® MAP, que es una placa base con fijación de IL-1β. Se realizó una curva de calibración que va de 1.5-50 pg/mL, con un límite de sensibilidad de 0.1 pg/mL. El coeficiente de variación intra e inter ensayo fue de <5% y <10% respectivamente. Como primer paso se resuspendieron las macropartículas de la placa, posteriormente se prepararon la biotina y estreptavidina-PE. Se colocaron cada una de las muestras en cada pozo. Posterior a la incubación y a los lavados se agrega la biotina y la estreptavidina-PE La placa se leyó con un analizador Bio Rad. **Anexo 5**

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis estadístico con el programa *SPSS (Chicago, Illinois, USA) ver 20.0*, con estadística descriptiva para evaluar las características demográficas de la población agrupadas en frecuencias y porcentajes para variables categóricas, promedios y desviaciones estándar. Las diferencias entre los grupos se compararon con prueba de T para muestras independientes o U de Mann-Whitney para variables continuas. Se consideró diferencias significativas con una $p < 0.05$. Los resultados son expresados en (media ± EEM).

ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación se ajusta a las normas éticas internacionales, a la ley general de salud en materia de investigación en seres humanos y a la declaración de Helsinki.

De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de los pacientes en este estudio conlleva un tipo de riesgo: **MÍNIMO**.

El cambio de medio de cultivo de los cigotos es algo que se realiza como parte del procedimiento rutinario de FIV por lo que el análisis de éste, no implica ningún riesgo o manipulación agregada para el cigoto.

En la realización del presente estudio se tomaron en cuenta las disposiciones nacionales vigentes contenidas en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación en salud (RLGSIS).

El estudio se registró para obtener el dictamen favorable de los comités de investigación y de bioética para garantizar el bienestar de las pacientes y dar cumplimiento a lo estipulado en el artículo 14 del RLGSIS. Fué aprobado por las comisiones de investigación y de ética del Instituto Nacional de Perinatología con número 212250-23081 el 12 de marzo del 2012. Se protegió la privacidad de los individuos sujetos de investigación, no identificando a ninguno de ellos en los documentos generados durante el desarrollo del proyecto.

RESULTADOS

Previa firma de carta de consentimiento informado, se obtuvo muestra para extracción de DNA en 64 pacientes. Diecisiete pacientes fueron eliminadas, 10 de ellas debido a insuficiente cantidad o calidad de DNA para realizar la genotipificación y 7 que no completaron la hiperestimulación ovárica controlada por diversas razones.

El grupo de pacientes estudiadas fue de 47, todas mexicanas con un promedio de edad de 33 ± 2 años. Las pacientes se encontraban al inicio de su segundo o tercer ciclo de FIV.

Al final del proceso de FIV, 26 pacientes cumplieron con los criterios de Falla Recurrente de la Implantación (FRI) 14 lograron el embarazo, 6 pacientes mostraron mala calidad embrionaria y una paciente se consideró baja respondedora a la hiperestimulación hormonal.

En la tabla 1 se muestran los datos descriptivos de nuestras pacientes, y en la figura 1 el flujograma de inclusión de cada una de ellas.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PACIENTES	
Edad	33 (24-40) años
2do Ciclo de FIV	32
3er Ciclo de FIV	15
Causa de infertilidad	Factor tubo-peritoneal: 19 (40%) Factor endocrinológico: 9 (20%) Factor uterino: 5 (11.1%) Causa desconocida 14 (28.9 %)
Técnica usada	FIV: 44.4% ICSI 55.6 %
Ovocitos capturados	9 ± 8 (1-48) ovocitos
Porcentaje de embarazo	31.1%
Porcentaje de recién nacido en casa	24.4%

Tabla 1. Características generales del grupo estudiado.

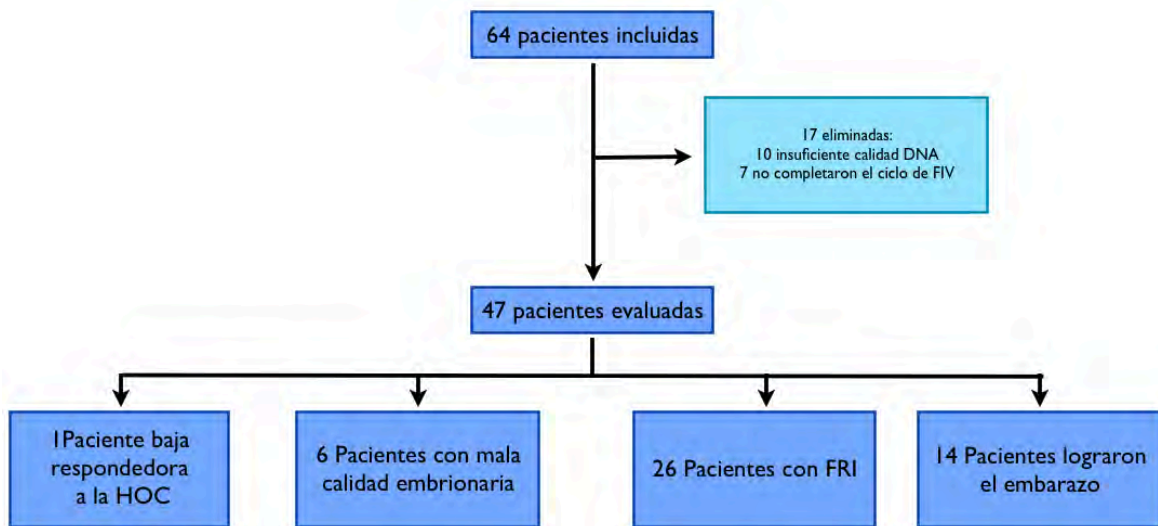
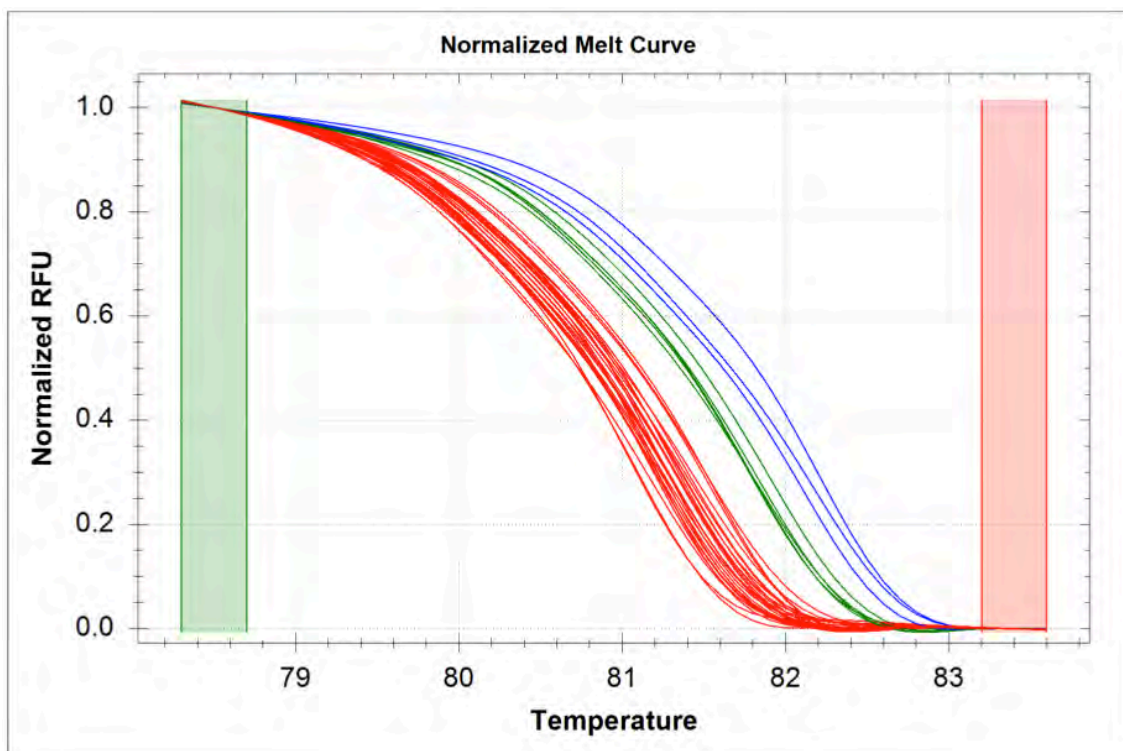


Figura 1. Flujograma de pacientes incluidas en el estudio, con el resultado reproductivo de cada una de ellas. HOC: Hiperestimulación ovárica controlada. FRI: Falla recurrente en la implantación.

HIGH RESOLUTION MELTING

El análisis de los exones 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 11 mediante HRM facilitó la exploración de todo el gen *NLRP7* en las 47 pacientes. **Figuras 2 y 3.**



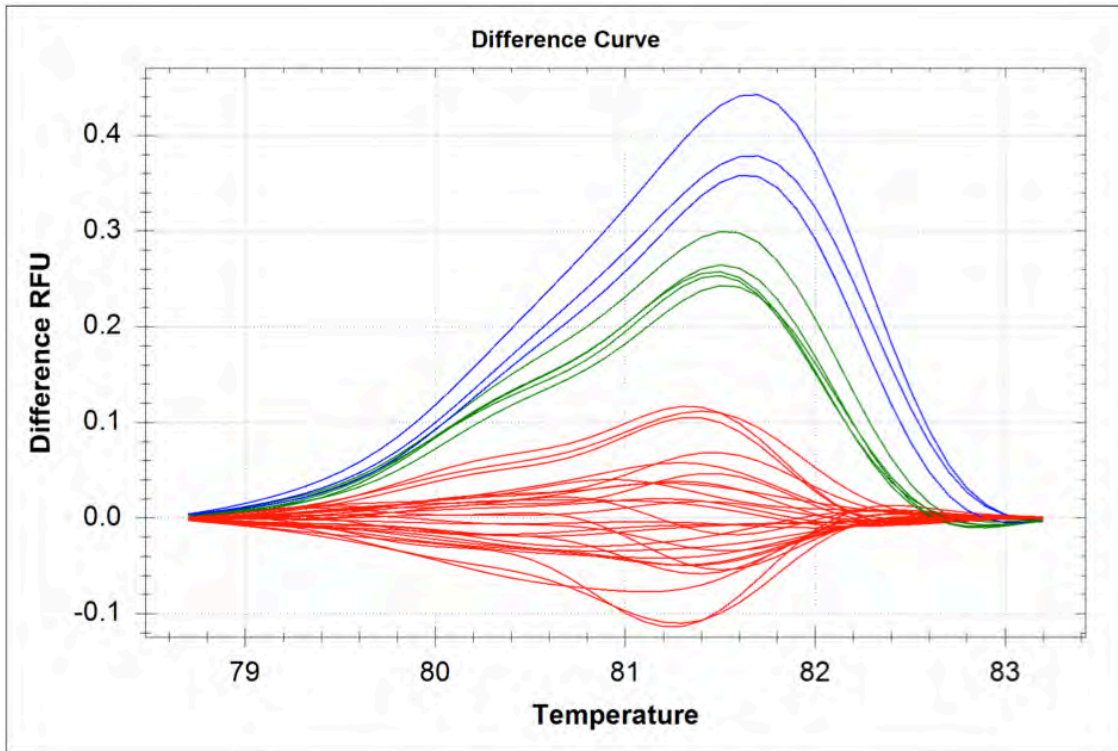
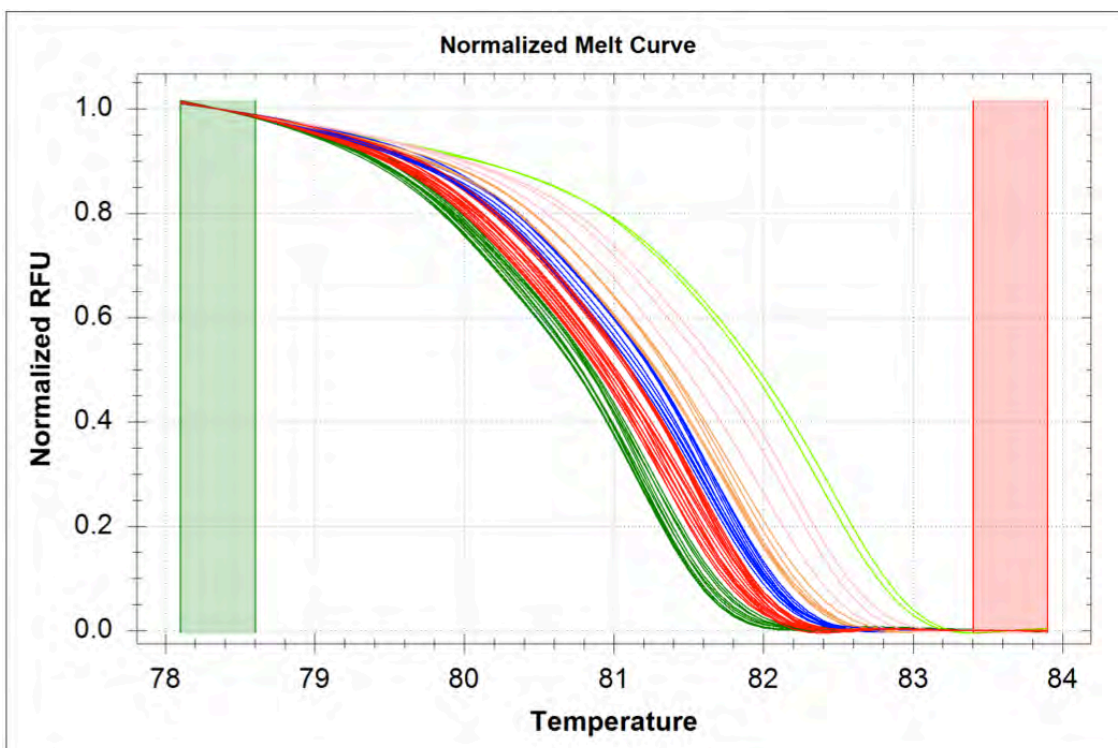


Figura 2 y 3. Análisis del exón 1 por HRM. Se observan 3 grupos en donde se engloban 62 muestras (31 pacientes por duplicado). Al secuenciar una muestra por grupo no se observaron cambios en ninguno de ellos.

El único cambio encontrado por este método se observó en el exón 3 y por secuenciación se identificó la mutación c.295G>T E99X. Esta mutación se observó en una paciente sin FRI (tabla 4). Figuras 4 y 5.



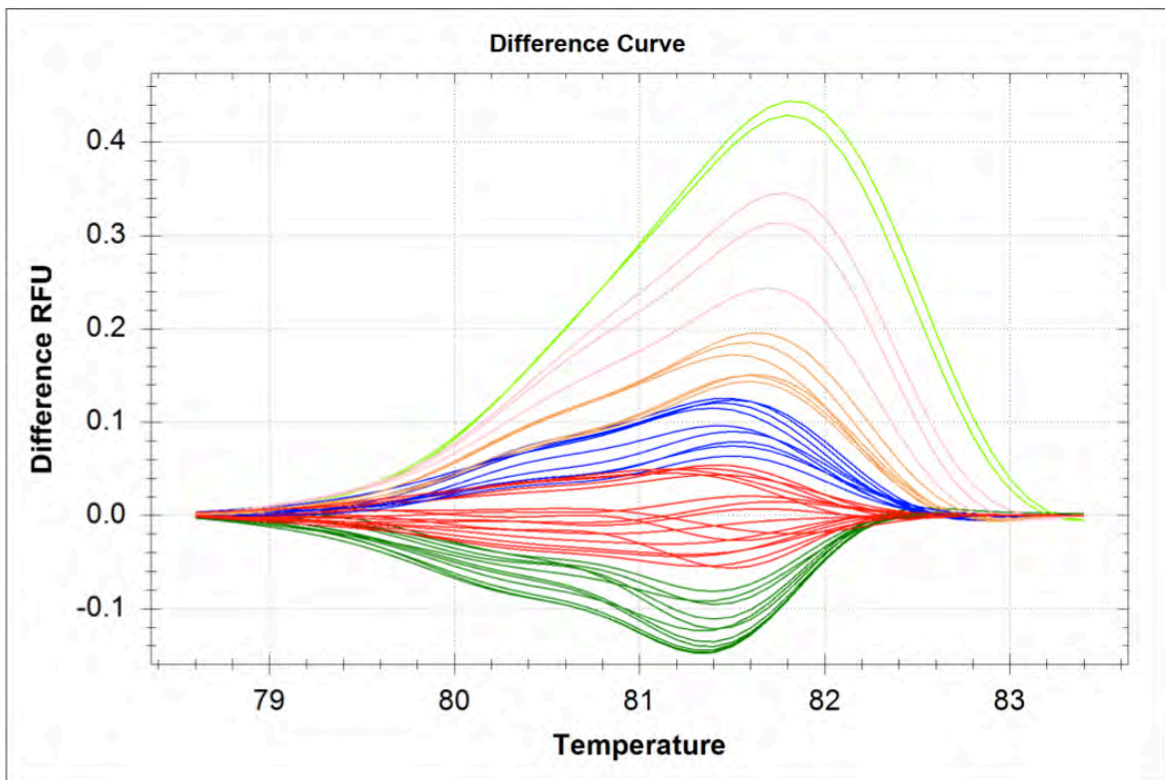


Figura 5 y 6. Análisis del exón 3. Se observan 6 grupos en donde se incluyen 62 muestras (31 pacientes por duplicado). La curva de disociación verde limón se encuentra alejada del resto, y al ser valorada por secuenciación se observó la mutación c.295G>T E99X. El resto de los grupos no mostraron alteraciones en su secuencia.

SECUENCIACIÓN TIPO SANGER

El estudio del DNA mostró en total 7 diferentes cambios en el gen *NLRP7* cuya nomenclatura y ubicación se muestra en la tabla 2 y la localización de éstos en el gen se muestra en la figura 6.

Cuatro de los cambios observados (c.353-56A>G, c.309G>A Q130Q, c.955G>A V319I, c.1137G>A K379K) son reportados como variantes frecuentes en la base de datos 1000 Genome Database, fase 1, referido como MAF (minor allele frequency) que es la frecuencia en la que se encuentra el menos común de los alelos en una población dada y fue investigada en 1094 sujetos de 14 zonas geográficas. Tres de las variantes no sinónimas (c.295G>T E99X, c.750C>A F250L, c.1018G>A E340K) no se encuentran referidas en esta base. Tabla 2.

Nomenclatura HGVS	Nombre de la proteína HGVS	Mutación o variante	SNP	MAF
c.295G>T E99X	p.Glu99	No sinónima	rs104895507	N/A
c.353-56A>G	N/A	N/A	rs775884	G=0.373
c.309G>A Q130Q	p.Gln130Gln	Sinónima	rs775883	A=0.373
c.750C>A F250L	p.Phe250Leu	No sinónima	rs140816006	N/A
c.955G>A V319I	p.Val319Ile	No sinónima	rs775882	A=0.278
c.1018G>A E340K	p.Glu340Lys	No sinónima	N/D	N/A
c.1137G>A K379K	pLys379Lys	Sinónima	rs10418277	A=0.191

Tabla 2. Características de las mutaciones y variantes detectadas en la población estudiada de acuerdo con la base de datos publicada en Infervers NLRP7 sequence variants y la HGVS Human Genome Variation Society. MAF Frecuencia del alelo menor en 1094 individuos de todo el mundo, obtenido de 1000 human project.

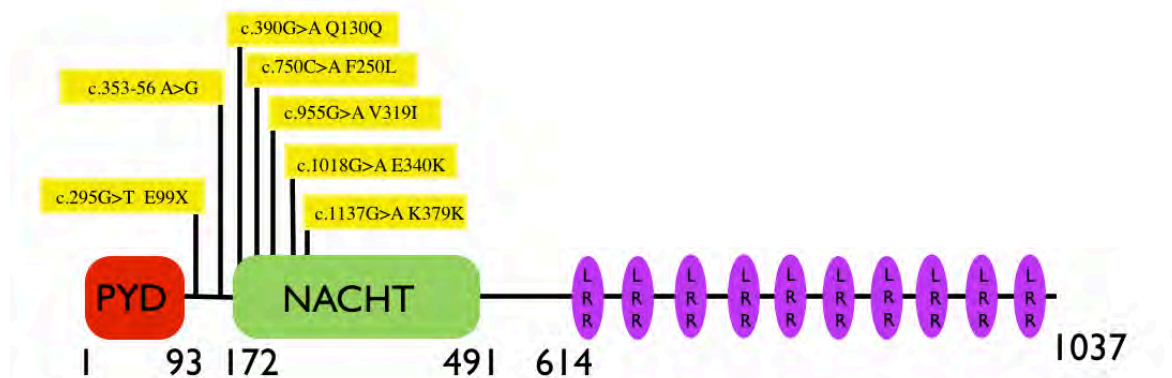


Figura 6. Se muestra la localización de las mutaciones y variantes encontradas en el gen NLRP7 y se puede observar que las mutaciones detectadas se ubicaron en la región NATCH o cerca de ella.

El polimorfismo c.353-56A>G (rs775884) fue observado en 8 mujeres, 6 con FRI y 2 sin FRI, sin embargo, dado que este polimorfismo se ubica en una región intrónica (intrón 3), y se sabe que no participa en ningún corte-empalme, se excluyó del análisis de los cambios detectados en NLRP7 de nuestras pacientes.

Como se comentó en párrafos anteriores, de las 47 mujeres estudiadas, al final, 26 cumplieron con los criterios de FRI por haber presentado 2 o más fallas de FIV habiéndose transferido embriones de buena calidad. Cinco de las 26 pacientes (19%) mostraron variaciones en el gen *NLRP7*, mientras que 9 de 21 pacientes (43%) sin FRI presentaron variaciones en el gen.

Número de caso	FRI	Polimorfismo o mutación	Historia clínica
473	Si	c.955G>A V319I	Infertilidad tubaria. Endometriosis II ^a
475	Si	c.955G>A V319I	Infertilidad endócrina. Hipotiroidismo
481	Si	c.955G>A V319I	Infertilidad endócrina. SOP
482	Si	c.955G>A V319I + c.1018G>A E340K + c.750C>A F250L	Infertilidad de causa desconocida. 6 TE fallidas, líquido en endometrio
486	Si	c.1137G>A K379K + c.955G>A V319I	Infertilidad tubaria. Endometriosis I ^a

Tabla 3. Cambios o mutaciones de NLRP7 en pacientes con FRI y datos clínicos relevantes. ^a Clasificación de la ASRM, SOP Síndrome de ovarios poliquísticos, TE Transferencia embrionaria

Número de caso	FR I	Polimorfismo o mutación	Historia clínica
474	No	c.1018G>A E340K	Infertilidad tubaria. Antecedente de infección por Chlamydia/Ureaplasma
512	No	c.955G>A V319I	Infertilidad endocrina. Hipotiroidismo
476	No	c.1018G>A E340K + c.750C>A F250L	Infertilidad tubaria. Endometriosis III ^a Hipotiroidismo. Antecedente de infección por Chlamydia
478	No	c.955G>A V319I + c.309 G>A Q130Q	Infertilidad endocrina. SOP
483	No	c.955G>A V319I + c.1018G>A E340K	Infertilidad tubaria. Endometriosis IV ^a . No se transfirió por baja reserva ovular, desarrolló solo 1 folículo
484	No	c.750C>A F250L +	Infertilidad endocrina. SOP

		c.1018G>A E340K	Aborto diferido a las 10 sdg
485	No	c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	Infertilidad de causa desconocida 4 FIVTE. Embarazo con óbito a las 20 SDG. Antecedente de Cáncer parotídeo
460	No	c.295G>T E99X	R. N. masculino sano. Infertilidad tubaria. Endometriosis IV ^a
472	No	c.309 G>A Q130Q	Embarazo gemelar nacidos sanos. Miomatosis uterina

Tabla 4. Cambios o mutaciones de NLRP7 en pacientes sin FRI y datos clínicos relevantes. ^a Clasificación de la ASRM, SOP Síndrome de ovarios poliquísticos, TE Transferencia embrionaria, sdg semanas de gestación

A continuación se efectuará la descripción de cada una de las variantes observadas y su relación hasta ahora conocida con las diversas patologías reproductivas y el análisis funcional.

Variante c.955G>A V319I, fue la encontrada con mayor frecuencia (8 pacientes), en los cinco casos con FRI que tuvieron variante o mutación, los 5 tuvieron esta variante (100%) y de los 9 casos sin FRI que tuvieron variante o mutación, en 3 se observó esta variante (30%). Esta variante no se ha relacionado con efectos o consecuencias fenotípicas de acuerdo con la base editada por la Dra. Rima Slim.²⁸ Al realizarse en análisis de predicción funcional de los SNPs humanos con el programa PolyPhen 2 se predice que esta variante sea benigna. (figura 7)

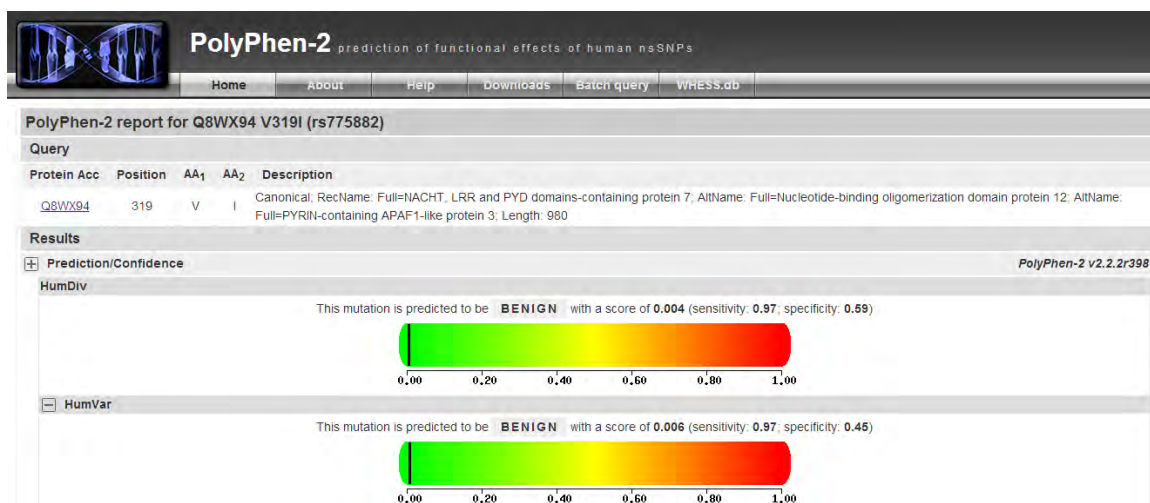


Figura 7. Análisis de predicción funcional de los SNPs humanos con el programa PolyPhen 2 donde se predice que esta mutación sea benigna.

Variante c.1018G>A E340K fue la observada en segundo lugar en frecuencia. Se observó en seis casos, en una de 5 pacientes con FRI (20%) y en 5 de 9 (56%) pacientes sin FRI. Esta variante se considera de consecuencia desconocida pero se ha relacionado con aborto espontáneo y mola recurrente en estudios previos.^{28,30} El análisis con PolyPhen 2 predice una mutación probablemente dañina. (figura 8)

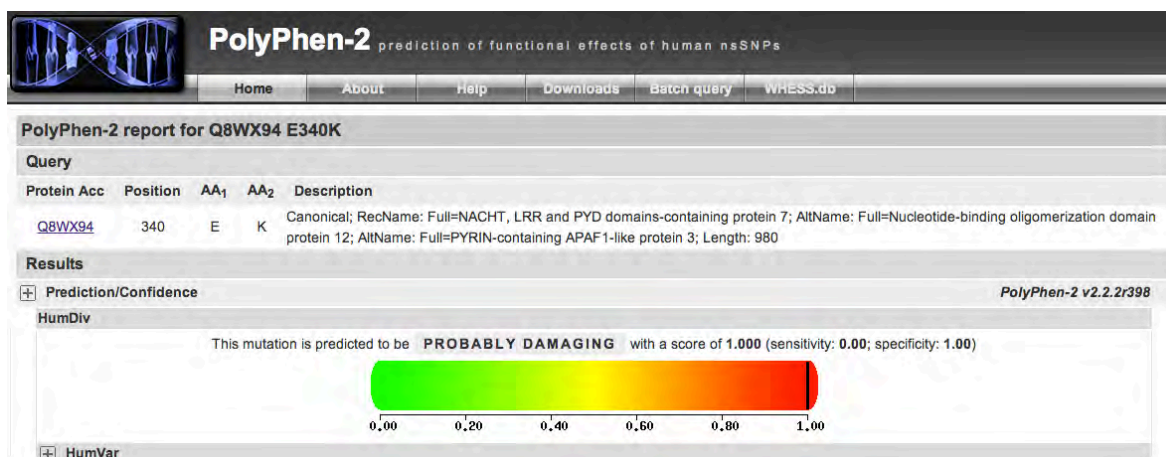


Figura 8. Análisis de predicción funcional de los SNPs humanos con el programa PolyPhen 2 donde se predice que esta mutación es probablemente dañina.

Variante c.750C>A F250L tuvo el tercer lugar en frecuencia observándose en 4 pacientes, una de las 4 con FRI que tuvieron variantes (25%) y tres de 9 sin FRI que tuvieron variantes (30%) tablas 3 y 4. Del total de 26 mujeres con FRI una presentó esta variante (4%) y de las 21 mujeres sin FRI, 3 tuvieron esta variante (14%). Las consecuencias de este cambio son desconocidas. Se ha relacionado con mola recurrente familiar y con mola no recurrente. El análisis con PolyPhen 2 predice una mutación benigna (figura 9)

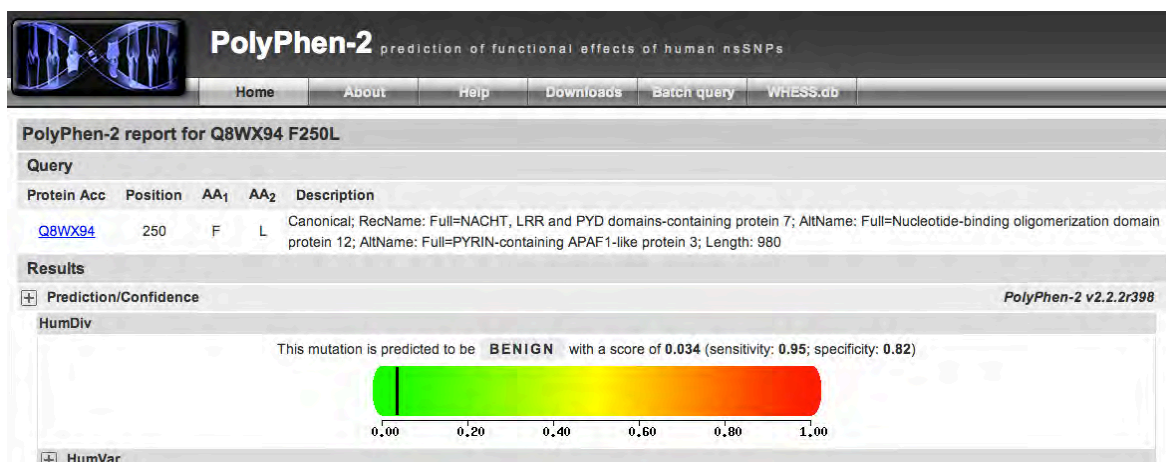


Figura 9. Análisis de predicción funcional de los SNPs humanos con el programa PolyPhen 2 donde se predice que esta mutación sea benigna.

Variante c.309 G>A Q130Q se observó en 3 casos, uno con FRI y dos sin FRI

Variante c.1137G>A K379K se observó en 1 caso de FRI.

Estas dos últimas variantes corresponden a polimorfismos sinónimos, es decir, aún cuando hay un cambio de base Guanina por Adenina, no modifican el aminoácido que se agrega al polipéptido y no tienen efecto fenotípico.

Variante c.295G>T E99X. Fue encontrada en una sola paciente en estado heterocigoto sin FRI, resultando un R.N. sano, en esta mutación se produce un cambio de una Guanina por una Citosina generando un codón de paro por lo que hay una terminación prematura de la cadena polipeptídica. No se cuenta con análisis predictivo de PolyPhen 2, sin embargo, el estado de homocigocidad, produciría la ausencia de la proteína NLRP7.

CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUCINA 1 BETA EN SUERO MATERNO

La cuantificación de IL-1 β basal (previo a estimulación hormonal) presentó una gran cantidad de resultados no detectables (45 de 47 pacientes, 95.7% IL-1 β =0 pg/mL).

En la determinación post estimulación hormonal se presentaron menos pacientes negativas (30 de 47 pacientes 63.8%).

Al comparar a las pacientes entre ellas mismas, en 17 casos se obtuvo incremento de la IL-1 beta basal post estimulación hormonal (0.2 ± 0.1 vs 8.7 ± 2.8 $p=0.004$) lo que apoya la hipótesis de que la estimulación hormonal promueve la secreción de IL-1 β sistémica. El incremento en la IL-1 beta no mostró diferencias entre las pacientes que lograron embarazo y las que no, (9.4 ± 3.8 vs 7.4 ± 3.6 $p=0.71$).

CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUCINA 1 BETA EN MEDIO DE CULTIVO SOBRENADANTE DEL CIGOTO.

En el día 1 post fecundación no se logró cuantificar la IL-1 beta (los valores obtenidos fueron de 0 pg/mL en las 47 pacientes).

En el día 3 del desarrollo embrionario, se observaron concentraciones cuantificables en solo 10 pacientes (21.2%).

El análisis comparativo del sobrenadante de cigotos del día 3 la concentración de IL-1 β entre mujeres con FRI y aquellas que lograron el embarazo, si mostró diferencias significativas (0.44 ± 0.2 vs. 6.5 ± 2.7 $p=0.04$).

En cuanto al análisis de la secreción de IL-1 β en las pacientes con cambios en *NLRP7* y FRI observamos como efectivamente la concentración esta disminuida en las pacientes que no lograron el embarazo pero no podemos aseverar una repercusión funcional, ya que la IL-1 β aumentó post estimulación hormonal en el suero de algunas de ellas, inclusive se observó una cuantificación mayor en la pacientes 482 portadora de tres cambios en *NLRP7* (c.955G>A V319I + c.1018G>A E340K + c.750C>A F250L).

	FRI	NLRP7	IL-1 β Día hCG pg/mL	IL-1 β SN Día 3 pg/mL	RN vivo
474	Si	c.1018G>A E340K	0	0	No
476	Si	c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	0	0.9	No
482	Si	c.955G>A V319I + c.1018G>A E340K + c.750C>A F250L	94	0	No
484	No	c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	0	0	No
485	No	c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	12	0	No
460	No	c.295G>T E99X	10.5	9.72	Si

Tabla 5. Concentraciones de IL-1 β en suero el día de la aplicación de la hGC y sobrenadante de cigoto del día 3 en pacientes portadoras de algún cambio en *NLRP7*, RN: Recién Nacido

RESPUESTA A LA HIPERESTIMULACIÓN Y CALIDAD EMBRIONARIA

En la tabla 6 se muestra la respuesta observada a la hiperestimulación con FSH o menopausinas de las pacientes que presentaron cambios en el gen *NLRP7*.

NLRP7	Ovocitos capturados	Ovocitos Fecundados	Embriones no trasferidos	Embriones transferidos
483 c.955G>A V319I + c.1018G>A E340K	0	0	0	No se transfirió
474 c.1018G>A E340K	4	4	1 100% fragmentación	2 (6) III, 1 (4) III
476 c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	3	2	2 (4) IV	No se transfirió
482 c.955G>A V319I+ c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	8	8	2 (6) IV 1(5) II 1(6)II	3 (8)II
484 c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	4	3	0	1 (8) II 1 (6) III
485 c.750C>A F250L + c.1018G>A E340K	13	11	3(6) III 4(7)III 2(4) III	2(8)II
460 E99Xc.295G>T	17	16	2 (6)IV 4(6)III 3 (4) IV 1(7) III 40% fragmentación 3 (8)II vitrificados	3 (8)II

Tabla 6. Respuesta a la hiperestimulación y calidad embrionaria. Se resume la evaluación del ciclo de FIV de las pacientes con cambios en *NLRP7*. La clave n (n) I a IV significan: número de embriones (número de blastómeras) calidad embrionaria

Todas las pacientes con la mutación c.1018G>A E340K excepto las pacientes 482 y 485 tuvieron mala calidad embrionaria, ambas con historia de infertilidad de causa desconocida, la paciente 482 presentó 3 ciclos fallidos de FIV, con 3 transferencias embrionarias más, también fallidas. La calidad de los embriones transferidos fue buena. Se reportó además la presencia de líquido en cavidad endometrial en 3 de sus transferencias. En cuanto a la paciente 485 presentó antecedente de 4 FIV en medio particular, refiriendo 3 fallidos y uno con aborto diferido a las 7 SDG. Tras este ciclo de transferencia embrionaria actual logró el embarazo pero presentó óbito femenino a las 20 semanas de gestación sin malformaciones aparentemente. No se realizó estudio genético del feto.

Debido a que 4 de nuestras pacientes presentaron mala calidad embrionaria no se pueden considerar dentro del grupo de FRI, pero si como parte de un espectro de mal resultado reproductivo que abarca desde la infertilidad hasta el óbito. Dos de ellas presentaron la variante c.1018G>A E340K, variante posiblemente perjudicial, en cuyas portadoras no se han reportado hijos vivos según la base de datos de infevers.²⁸

Dos pacientes con algún cambio en *NLRP7* lograron un embarazo sano a término sin complicaciones, una de ellas heterocigota para la mutación E99Xc.295G>T. La segunda es portadora de 2 polimorfismos sinónimos: c.353-56A>G + c.309 G>A Q130Q. En la figura 10 se observan los cambios encontrados en *NLRP7* en todos los grupos de pacientes encontradas.

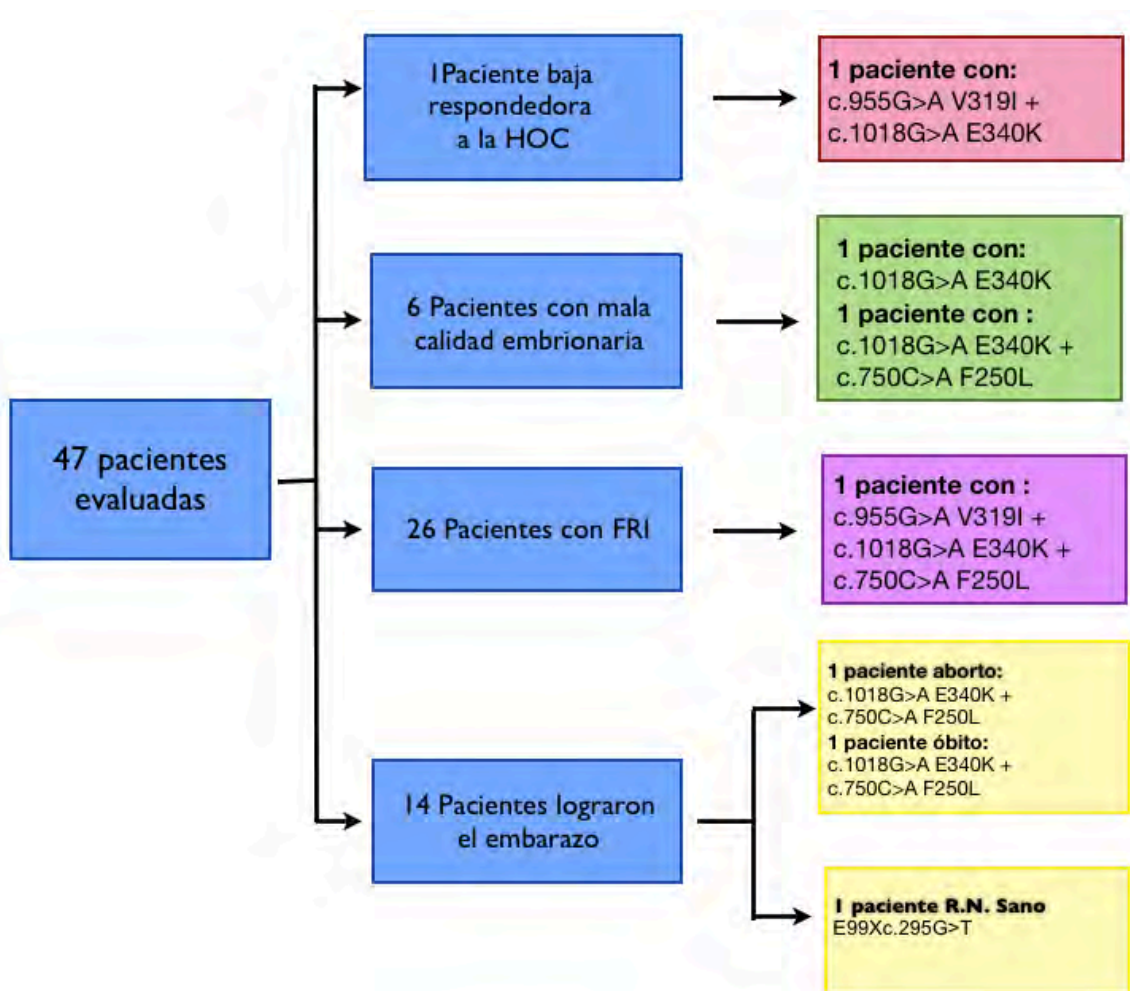


Figura 10.. Resultados reproductivos en las pacientes con cambios en NLRP7. HOC Hiperestimulación ovárica controlada.

DISCUSION

Una de las grandes preguntas de la práctica de la fecundación in vitro es el porque una paciente que se somete a ciclos repetidos de fecundación in vitro con transferencia de embriones de aparente buena calidad no logra el embarazo; esta frustrante e inexplicable falla en la implantación es lo que nos llevó a realizar este estudio.

En este estudio informamos por primera vez mutaciones y polimorfismos en el gen *NLRP7* en pacientes con infertilidad, mala calidad embrionaria y falla recurrente en la implantación en una serie de 47 pacientes que entraron en un segundo o posterior ciclo de FIV de las cuales 26 tuvieron falla recurrente de la implantación (FRI), una fue baja respondedora, 6 presentaron mala calidad embrionaria y 14 lograron el embarazo.

Nosotros mostramos la posible correlación entre el genotipo (los alelos afectados, su naturaleza y localización) y el fenotipo (el desenlace reproductivo).

Los polimorfismos sinónimos e intrónicos (c.353-56A>G, c.309G>A Q130Q, c.1137G>A K379K) se han reportado previamente en población sana, y sin ningún efecto reproductivo. Según el reporte de 1000 Genome Project website se han encontrado en diversas poblaciones siendo polimorfismos frecuentes >5%.²⁹

El polimorfismo c.955G>A V319I fue encontrado en 5 casos de FRI, en 3 de 5 en estado heterocigoto sin ninguna otra alteración del gen y aunque, se reporta en el análisis funcional como benigno, no podríamos descartar un efecto modificador del desenlace reproductivo, considerando que en nuestro caso la población estudiada es en sí una población especial ya que las concepciones son acompañadas de una gran manipulación externa (estimulación hormonal, captura folicular y transferencia embrionaria). Según el 1000 Genome phase 1 population tiene una frecuencia en la población de 27%.

La mutación c.1018G>A E340K se observó en 6 pacientes: una con FRI, una con baja respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada, dos con mala calidad embrionaria y dos con aborto y óbito respectivamente. Esta mutación se reporta como perjudicial en el análisis funcional y ha sido asociada previamente a embarazos molares recurrentes y abortos en población mexicana,³⁰ en nuestro caso se presentó en mujeres con infertilidad, baja respuesta a la hiperestimulación, mala calidad embrionaria y FRI por lo que se amplía el espectro de mal pronóstico, sin embargo, se requiere ampliar el estudio para definir la participación de p.E340K en este desenlace.

Esta mutación causa la eliminación del último aminoácido del asa-p de la NTP-asa en la región NATCH. En el estudio de Estrada y cols. No se encontró en 50 controles de población mexicana.³⁰

La mutación c.750C>A F250L fue encontrado en cuatro pacientes: una con FRI, una con mala calidad embrionaria, un caso de aborto y uno de óbito. Aún cuando se reporta como benigno en el análisis funcional, el hecho de haberse encontrado en todos los casos asociado con la mutación c.1018G>A E340K, sugiere que podría haber un efecto aditivo entre ambas. No se encuentra reportada en la base de datos 1000 Genome Database. En la base de datos infevers²⁸ no se reporta alguna consecuencia conocida, se ha reportado en estudios previos en pacientes con mola hidatiforme, y no fue observada en controles sanos.¹¹

El efecto de estas dos mutaciones sin sentido puede ser: a) patogénico, b) que incrementa la susceptibilidad de las pacientes a la infertilidad o mala calidad embrionaria y/o FRI o, c) ser variantes raras y por ello no se encuentran en reportes de variantes como 1000 Genome Database website. La mutación c.1018G>A E340K ha sido estudiada en 50 controles mexicanas con éxito reproductivo sin encontrarse en ninguna de ellas.³⁰

De especial interés, es el hallazgo de una paciente heterocigota para la mutación c.295G>T E99X en *NLRP7* que produce una proteína truncada. Las mutaciones que truncan la proteína se consideran menos susceptibles de ser moduladas por el entorno genético de los pacientes o por factores ambientales y su efecto en general se considera grave. Esta paciente, logró un embarazo viable y sano lo que apoya lo previamente reportado por Quian J et al.³¹ quién sugiere que mujeres heterocigotas para esta mutación, se encuentran en riesgo de aborto y óbito, pero también presentan embarazos viables.

Otro hallazgo interesante en este estudio es que las variantes observadas se localizaron en la región NACHT o cerca de ella. Dicha región es un dominio NTPasa altamente conservado evolutivamente e implicado en apoptosis y transcripción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)³² Recientemente se publicó que la región LRR (leucine-rich repeat) localizada en los exones del 5 al 10, es la que concentra la mayor proporción de mutaciones y en segundo lugar está la región NACHT (exón 4), sin embargo, en nuestro estudio sólo encontramos variantes o mutaciones en la región NACHT.

Nuestros datos sugieren que las pacientes con mutaciones y variantes en el gen *NLRP7* podrían tener algún papel en patologías como infertilidad, mala calidad embrionaria y falla recurrente en la implantación.

No se encontraron enfermedades autoinmunes en ninguna de nuestras pacientes como se ha reportado previamente,¹⁴ lo que si encontramos es presencia de endometriosis en 4 de las pacientes con cambios en *NLRP7*.

El análisis de la cuantificación de IL-1 β en suero en las pacientes con alteraciones de *NLRP7* no pudo ser fácilmente analizado debido a que resultó con concentraciones más bajas y con un mayor número de pacientes con concentraciones indetectables a lo reportado previamente. Karagouni E et al,²⁴ habían informado la detección de IL-1 β en un 58% de 33 pacientes con concentraciones post hCG de 68.5 ± 24.6 pg/mL versus 20.5 ± 13.4 pg/mL en mujeres con embarazo y sin embarazo respectivamente. Esta diferencia podría deberse a que se ocuparon diferentes protocolos de hiperestimulación ovárica controlada (agonista versus antagonista de GnRH) o a que la hCG en si, estimule la secreción de IL-1 β y no la estimulación con hMG/FSHr, de cualquier manera debido a este gran número de resultados negativos es difícil concluir si existe asociación o no a los polimorfismos en *NLRP7*.

Igualmente encontramos una gran cantidad de datos negativos en las concentraciones de IL-1 β en el medio de cultivo de los cigotos por lo que tampoco podemos concluir que se deba a las variantes encontradas en *NLRP7*, pero ya que si se encontró asociación con embarazo viable reafirmamos que la regulación de la secreción IL-1 β es fundamental para el proceso de implantación.

Baraňao et al²⁵ reportaron concentraciones de IL-1 β en sobrenadante de cultivo de embriones a las 24 horas de 49 ± 7 pg/mL, sin embargo nosotros no encontramos cantidades detectables en ese mismo momento, nuestros resultados concuerdan más con lo reportado por Seifer et al,³³ los cuales refirieron no haber logrado cuantificar mediante ELISA IL-1 β en sobrenadantes de cigotos humanos de 2 a 6 células, y por lo reportado en ratones por Kruessel et al,³⁴ los cuales refirieron un patrón de expresión de ARNm de IL-1 β hasta la mórula compacta, con muy baja expresión en el estadio de 8 células y no detectable en 2 células. Por su parte Zang et al,⁸ reportaron la expresión de *NLRP7* en embriones humanos disminuida en día 3, con un aumento significativo el día 5, por lo que esto parece concordar en que la secreción de IL-1 β y su regulación son mas importantes el día 5 post-fecundación, desgraciadamente en nuestro centro de reproducción pocas veces se transfiere en día 5, y todas nuestras pacientes fueron

trasferidas el día 3 por lo que no se contó con estos datos, de cualquier manera resulta interesante que en las mujeres con FRI y mutaciones en el gen *NLRP7* las concentraciones IL-1 β el día 3 del desarrollo embrionario fueron en todas muy bajas, casi indetectables.

Por todo lo anteriormente expuesto no podemos hablar de una correlación entre la baja funcionalidad de la IL-1 β y los cambios observados en *NLRP7*. Serán necesarios mas estudios al respecto.

Datos previos han reportado que los embriones de las pacientes con mutaciones y variantes de *NLRP7* tienen anomalías tempranas del desarrollo post-cigótico,³⁵ lo cual observamos también en nuestras pacientes con la mutación c.1018G>A E340K, ya que varias de ellas tuvieron embriones de mala calidad y la única paciente que presentó adecuada calidad embrionaria y logró el embarazo tuvo un producto obito a las 20 semanas de gestación. En el resto de las pacientes que presentaron polimorfismos no se observó una diferencia importante en cuanto a la calidad de los cigotos transferidos, aunque es de llamar la atención que ninguna tuvo cigotos para congelar excepto en aquellas que si lograron el embarazo, por lo que habría que considerar en un futuro cuando se acumule mas información realizar diagnóstico genético pre-implantación en los cigotos de las pacientes que presenten mutaciones en *NLRP7* para saber si además de alteraciones en la morfología se observa un mayor número de aneuploidias.

Aún no sabemos si la función de *NLRP7* es importante para el correcto establecimiento de la impronta durante la ovogénesis, posiblemente *NLRP7* tenga un papel en el control del tiempo del crecimiento o en las señales requeridas para el establecimiento de la impronta materna, Djuric U et al,³⁶ reportaron que las pacientes con mola y mutaciones en el gen *NLRP7* presentan patrones de metilación normal poscigótica y refieren las alteraciones de la impronta mas como una consecuencia.

En las pacientes con mola se ha observado una abundante actividad de las células T deciduales, indicando entonces una alteración en la regulación de la inflamación endometrial en pacientes con mutaciones en *NLRP7*. Aunque no es claro como la respuesta inflamatoria de la madre puede interferir con la metilación de los genes improntados es plausible que pueda causar un ambiente hostil o desfavorable para los blastocistos que tratan de mantener su propia impronta tal y como sucede justamente en las pacientes sometidas a fecundación in vitro con inyección intracitoplasmática.³⁷

La inflamación es una vía muy compleja, que involucra muchos genes, por lo que la modificación de uno de estos puede responder de diferentes formas y la intensidad de la respuesta puede ser variada inclusive por el ambiente. De esta manera podemos

entender que las pacientes sometidas a fecundación in vitro pudieran estar aun más afectadas por un polimorfismo en *NLRP7* que la población en general.

Este estudio es el primer acercamiento a la relación entre infertilidad, mala calidad embrionaria, FRI y *NLRP7*, ya que en la literatura no se encuentra ningún reporte previo de esta asociación. Son necesarios más estudios para clarificar el estatus de estas asociaciones con mal pronóstico reproductivo, además tal vez en un futuro puedan ofrecerse opciones de manejo para este tipo de pacientes, como ya se empezó a reportar en mujeres con mutaciones en *NLRP7* y molas recurrentes mediante ovodonación.^{38, 39}

CONCLUSIONES

1. La variante o mutación c.1018G>A E340K del gen *NLRP7* se observó en pacientes con infertilidad, baja respuesta a la hiperestimulación ovárica, mala calidad embrionaria y en una paciente con FRI, es necesario ampliar el número de muestras para aclarar si existe asociación o no.
2. La presencia simultánea de las variantes o mutaciones c.1018G>A E340K y c.750C>A F250L en pacientes con mala calidad embrionaria, FRI, aborto y obito sugieren un posible efecto sinérgico modificador del desenlace reproductivo entre estas, por lo que no se descarta un efecto aditivo.
3. La frecuencia del polimorfismo c.955G>A V319I (rs775882) fue alta en nuestra población (A=0.148) y semejante a lo encontrado en la base de 1000Genome (A=0.278) por lo que es poco probable que se asocie a falla reproductiva.
4. La concentración de IL-1 β en suero post estimulación hormonal de las mujeres con polimorfismos y mutaciones de *NLRP7* fue similar a las que no presentaron cambios en el gen *NLRP7*.
5. Las concentraciones de IL-1 β en sobrenadante de cigoto del día 3 del desarrollo embrionario en pacientes con alteraciones de *NLRP7* fueron muy bajas, pero pacientes sin cambios en *NLRP7* que no lograron el embarazo también presentaron concentraciones bajas, por lo que se requieren más estudios a este respecto.

ANEXOS

ANEXO1

CARTA INFORMATIVA

“Relación entre las mutaciones en el gen NLRP7, patrón de secreción de interleucina -1 β y falla recurrente en la implantación”.

INSTITUCIÓN RESPONSABLE: INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

INVESTIGADORAS RESPONSABLES:

Dra. Karina Sequeira Alvarado y Dra. Patricia Grether González

Por medio de esta carta, le invitamos a participar en una investigación que estamos haciendo en este Instituto y que se trata de lo siguiente:

Algunas parejas que entran a fecundación In Vitro (o fertilización in vitro), no logran embarazarse a pesar de que parece que todo en su cuerpo funciona bien.

Nosotros estamos investigando la posibilidad de que un gen que actúa facilitando que el óvulo fecundado (también llamado cigoto), se implante en el útero, pueda estar dañado y eso dificulte que el cigoto se pueda pegar a la capa interna del útero llamada endometrio.

Para hacer este estudio necesitamos que usted nos permita tomarle de su brazo, dos muestras de sangre de 7mL y 3 ml. cada una (que es como tres cucharaditas). Una muestra cuando inicia el ciclo y otra al final de su estimulación hormonal.

Con esas muestras vamos a estudiar dos cosas, su material genético (el DNA) para ver si hay algún cambio o mutación en un gen que se llama NLRP7 que es uno de los que sirven para que el óvulo fecundado se pegue en el endometrio. Además mediremos una sustancia llamada interleucina 1 beta (IL-1 β). Esta sustancia se produce cuando el gen NLRP7 funciona bien y le ayuda en su función.

Por otro lado, cuando ya se haya pasado el óvulo fecundado al interior de su cuerpo, utilizaremos el medio de cultivo en el que estaba para medir la IL-1 β . Ese medio normalmente se tira porque ya no sirve para otra cosa, pero ahí podemos medir esa sustancia.

Participar en este estudio es totalmente voluntario y si no quiere, no habrá ninguna consecuencia en el manejo que está recibiendo en el Instituto y el procedimiento de In Vitro, se hará igual que con todas las parejas.

Si acepta participar, los resultados del estudio completo se los daríamos a conocer seis meses después de la toma de la muestra.

En este estudio:

1. Los investigadores verán mi expediente para conocer la información que necesiten
2. Los investigadores me tomarán dos muestras de sangre, por lo que deberán picar una vena del brazo, eso puede producir dolor leve o tal vez formar un moretón. Algunas personas durante la punción se sienten mareadas o se desmayan, pero por lo general la toma de sangre no produce problemas serios.
3. En estas muestras se estudiarán unas mutaciones o cambios en el material genético que se sospecha que puedan tener que ver con las fallas en la fecundación in vitro y una sustancia que

puede tener relación con alteraciones en la implantación o adherencia del óvulo fecundado a la matriz.

4. Los investigadores van a estudiar la sustancia llamada interleucina 1 beta en el medio de cultivo que se le va cambiando al óvulo fecundado y que normalmente se tira. No se le va a hacer nada al óvulo fecundado, sólo se estudiará el medio que normalmente se le quita cuando le hacen el cambio.
5. Seis meses después de finalizar el estudio, las investigadoras me informará el resultado en la consulta externa de Genética del Instituto.
6. Al participar en el estudio no recibiremos ningún beneficio personal pero los resultados de la investigación podrán ayudar en el futuro a parejas con problemas parecidos al nuestro.
7. Si los resultados de este estudio ayudan a crear en el futuro productos comerciales como medicinas, nosotros no recibiremos ningún beneficio económico.
8. Los resultados de este estudio son confidenciales. Pueden ser usados para publicaciones médicas, presentaciones en congresos, pero no podrá saberse cuáles resultados son míos.
9. Mi participación es completamente voluntaria y sin costo alguno. Puedo dejar de participar en cualquier momento, sin que esto tenga consecuencias en mi relación con el grupo de médicos, ni en la atención de mi hijo (a) si fuera el caso.

Atentamente

Dra. Karina Sequeira
Biología de la Reproducción Humana

Dra. Patricia Grether
Departamento de Genética

Instituto Nacional de Perinatología 55.20.99.00 ext. 316 y 317

CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D. F. a _____ de _____ del 20_____.

Yo _____ he sido informada verbalmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio **“Relación entre las mutaciones en el gen NLRP7, patrón de secreción de interleucina -1 β en suero y por el cigoto y falla en la implantación”**.

El/la Dr./Dra. _____ nos explicó en que consiste el proyecto de investigación, he tenido la oportunidad de hacer todas las preguntas que he querido y me han contestado claramente. Me explicaron también que mi participación es voluntaria y después de reflexionar, estoy de acuerdo en participar en el estudio.

Tanto el proyecto de investigación como las condiciones de participación se nos explicaron. Un miembro del grupo de investigación resolvió todas nuestras preguntas y nos explicó que la participación es voluntaria.

Además se me entregó una copia de la carta informativa y del consentimiento informado.

Nombre y firma de la mujer: _____

Testigo 1: _____

Relación con la mujer: _____

Testigo 2: _____

Relación con la mujer: _____

Nombre del investigador: _____

Firma: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO PARA EL USO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

TITULO DEL PROYECTO: “Relación entre las mutaciones en el gen NLRP7, patrón de secreción de interleucina -1 β y falla recurrente en la implantación”.

Solicitamos su autorización para que lo que quede de las muestras que se van a tomar para este estudio, pueda ser guardado para su posible uso en investigación en el futuro. Las muestras se conservarán bajo la custodia del Instituto Nacional de Perinatología.

Cada muestra de sangre que se obtenga de usted, contiene información que puede servir para realizar otros estudios adicionales que no se han considerado en esta investigación.

Con esta carta queremos preguntarle cuál sería su decisión respecto a lo que quiere que hagamos con sus muestras una vez que esta investigación se termine. Usted no tiene que aceptar esto para poder participar en el estudio que se le ha propuesto y su decisión de aceptar o de no aceptar, no afectará el tratamiento que usted requiere.

Si usted está de acuerdo en que sus muestras se usen en otros estudios, se guardaría absoluta confidencialidad.

Por favor escoja alguna de las opciones siguientes:

Acepto que mis muestras sean utilizadas solamente para esta investigación.

Acepto que mis muestras sean utilizadas para ésta y para otras investigaciones relacionadas o no con esta investigación.

Acepto que mis muestras se guarden para cualquier uso, pero que sea comentado conmigo y se utilicen solamente si otorgo mi autorización expresa.

No acepto que guarden mis muestras.

Nombre y firma de la paciente _____

Testigo 1: _____

Testigo 2: _____

Nombre del investigador: _____

Firma: _____

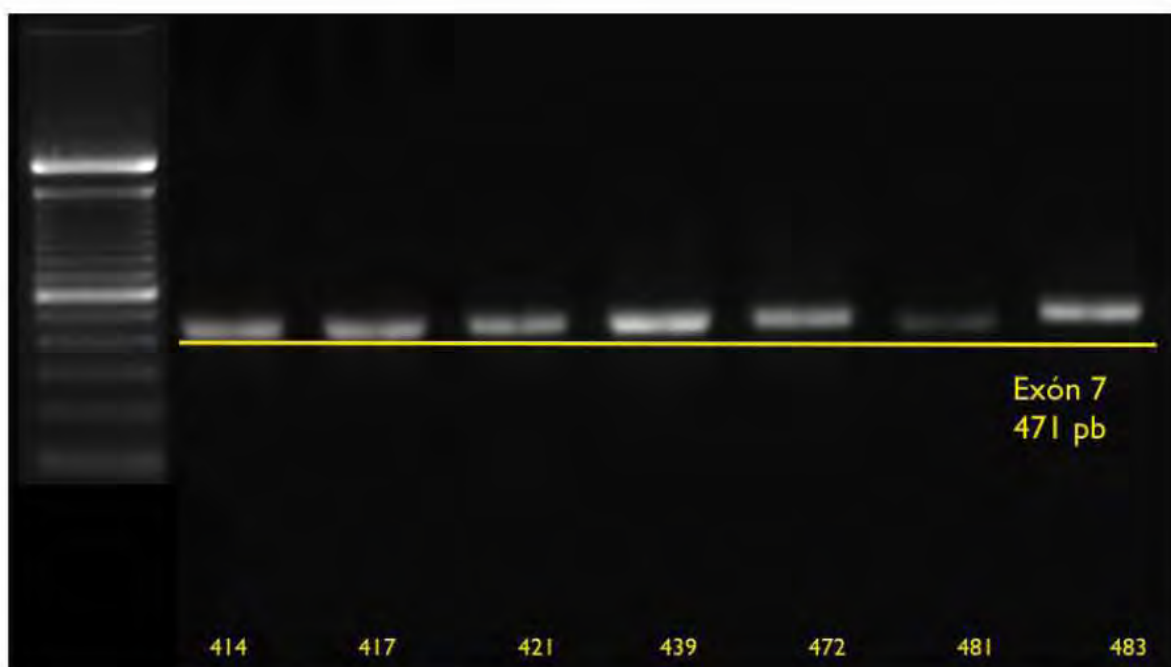
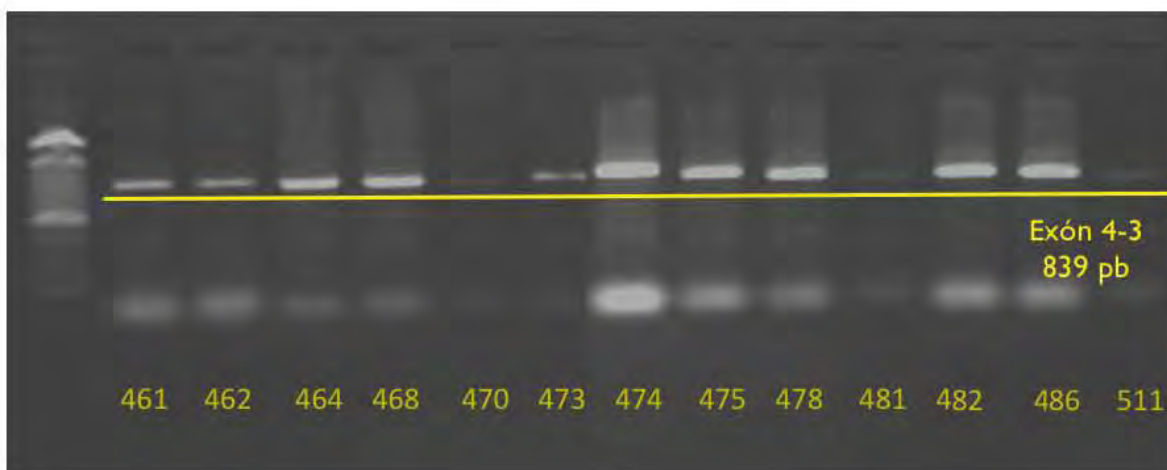
Lugar y fecha: _____

ANEXO 2

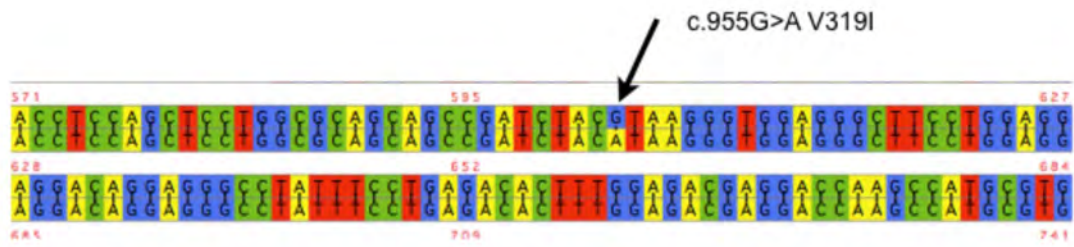
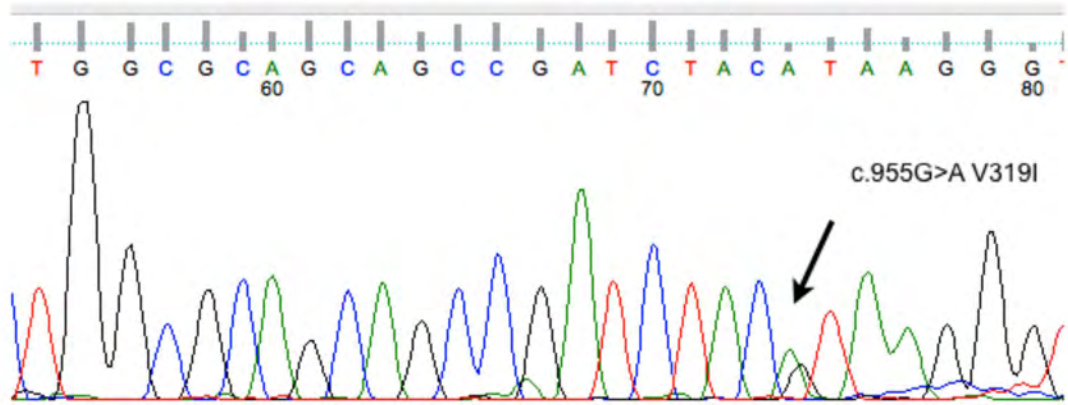
SECUENCIA DE PRIMERS⁴⁰

Exón		Secuencia	Tm °C	Tamaño pb
1	Forward	GCCCAATTACAGCCAAATCCCTGAG	60	604
	Reverse	GGCCGAGGCAGACAGATTACCTAAA		
2	Forward	ACCGTGCTGGGCCAGATTTTCAGT	72	1140
	Reverse	GCAGAGGTTGCAATGAGCAGAGACG		
3	Forward	CCACCATGCCTGGCTGACACTTTAT	66	340
	Reverse	GCAGAGGTTGCAATGAGCAGAGACG		
	Seq Rev	CACCTTGCATGCTCTCAAACACCA		
4	Forward-1	GTAGTGGCTCCGTCTCTGCTCATTG	62	737
	Reverse-1	AGGCCATCGACCACGAACAGGATTC		
	Forward-2	GACGACGTCACTCTGAGAAACCAAC	58	757
	Reverse-2	TGCAGAGGAAACGCAGGAACAGC		
Forward-3	TTTGCTGAAGAGGAAGATGTTACCC	62	839	
Reverse-3	CCTAATTGCCAAGTCGTGTCTCC			
4	Forward-4	GTGGGCGCAGATGTCCGTGTTT	60	803
	Reverse-4	CCTAATTGCCAAGTCGTGTCTCC		
5	Forward	GGTCTCAGTTTCTAGCCCAAGTT	62	839
	Reverse	ACACGGTGAAAACCTGTCTGTGC		
6	Forward	CCACTGCACCCGGCCAAGAATT	62	597
	Reverse	GCTGGGGGCCACTGCTCTCAATC		
	Seq fwd	ATACATGCCTCCACACAATGTGAG		
7	Forward	GATCACGCCTTTGCATTCCAGACTG	62	471
	Reverse	AGCAGGTGTTTATTTTCAGCAAGAGG		
	Seq fwd	AGCTGATAGGGTATACTCTG		
8	Forward	TGGCCATGATGACTCCCACAGG	58	418
	Reverse	CCAGGTTTTTAAAAGTTACATTTG		
9	Forward	CTTCACAGGGCGTTAGCCGAGG	66	456
	Reverse	TCTTGTCACTTTCCCGGGCTGG		
10	Forward	GCCCCAGCAAATATGCTGCTTG	60	571
	Reverse	GGACATGTTGGCATGCCTCTAG		
	Seq rev	AAACCCATACCTGAGTAT		
11	Forward	CTGTCCCCCAGAAAATCCCAAAAAC	62	588
	Reverse	CAACCGAATCATCCCTGAACTTC		

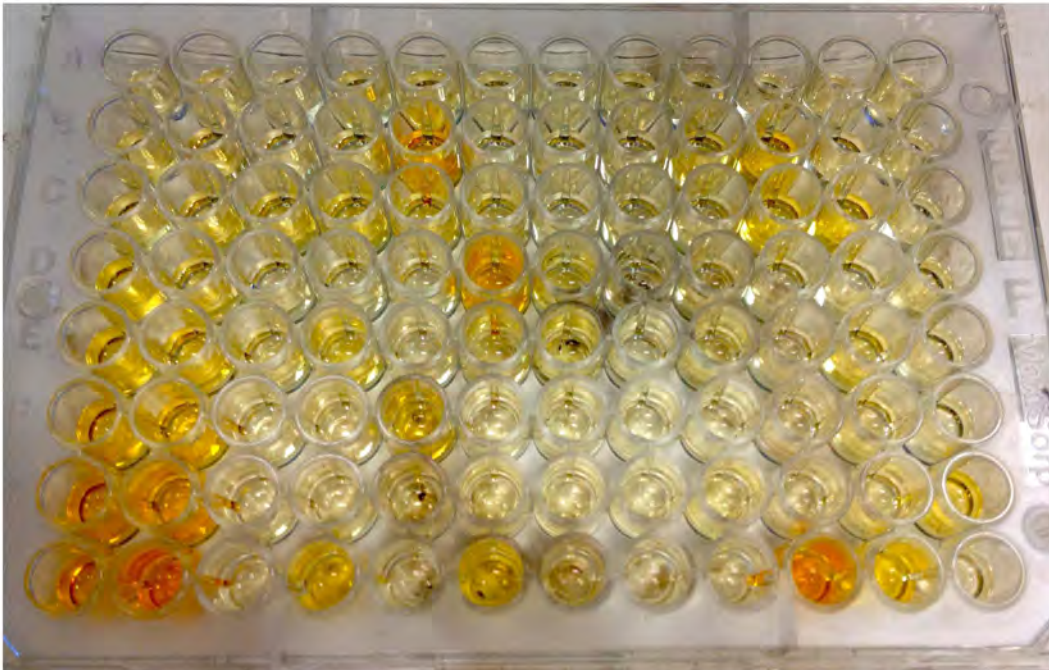
ANEXO 3



ANEXO 4



ANEXO 5



BIBLIOGRAFIA

- ¹ Sharif KW, Ghunaim S. Management of 273 cases of recurrent implantation failure: results of a combined evidence-based protocol. *Reprod Biomed Online* 2010;21:373-380.
- ² Cakmak H, Taylor HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update* 2011;17:242-253.
- ³ Kahraman S, Bahce M, Samli H, et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2000;15: 2003-2007.
- ⁴ Potdar N, Gelbaya T, Nardo L. Endometrial injury to overcome recurrent embryo implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012;25:561.571.
- ⁵ Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:372-379.
- ⁶ Pinheiro AS, Proell M, Eibl C, Page R, et al. Three-dimensional structure of the NLRP7 pyrin domain: insight into pyrin-pyrin-mediated effector domain signaling in innate immunity. *J Biol Chem* 2010;285:27402-27410.
- ⁷ Tschoop J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:95-104.
- ⁸ Zhang P, Dixon M, Zucchelli M, et al. Expression analysis of the NLRP gene family suggests a role in human preimplantation development. *Plos One* 2008;3:e2755.
- ⁹ Tong ZB, Gold L, Pfeifer KE, et al. Maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet* 2000;26:267-268.
- ¹⁰ Hamatani T, Falco G, Carter MG et al. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004;13:2263-2278.
- ¹¹ Messaed C, Chebaro W, Di Roberto RB, et al. NLRP7 in the spectrum of reproductive wastage: rare non-synonymous variants confer genetic susceptibility to recurrent reproductive wastage. *J Med Genet* 2011;48:540-548.
- ¹² Tian X, Pascal G, Monget P. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol Biol* 2009;9: 202.
- ¹³ Okada K, Hirota E, Mizutani Y, et al. Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. *Cancer Sci* 2004; 95:949-954.
- ¹⁴ Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB,, et al. An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 2012, 36:464-476.

-
- ¹⁵ Ariffin JK, Sweet MJ. Differences in the repertoire, regulation and function of Toll like Receptors and inflammasome forming Nod-like Receptors between human and mouse. *Curr Opin Microbiol.* 2013 Mar 26. pii: S1369-5274(13)00024-6. doi: 10.1016/j.mib.2013.03.002. [Epub ahead of print]
- ¹⁶ Messaed C, Akoury E, Djuric U, et al. NLRP7, a nucleotide oligomerization domain- like receptor protein, is required for normal cytokine secretion and co-localizes with Golgi and the microtubule-organizing center. *J Biol Chem* 2011, 286:43313-43323.
- ¹⁷ Kinoshita T, Wang Y, Hasegawa M, et al. PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1- dependent interleukin-1beta secretion. *J Biol Chem* 2005; 280: 21720–21725
- ¹⁸ Deveault C, Hua Quian J, Chebaro W. NALP7 mutations in women with diploide androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation. *Hum Mol Genet* 2009;18:888-897.
- ¹⁹ Wang CM, Dixon PH, Decordova S. Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region. *J Med Genet* 2009; 46:569-575.
- ²⁰ Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 2006;38: 300–302.
- ²¹ El-Maarri O, Slim R. Familial hydatidiform molar pregnancy: the germ line imprinting defect hypothesis? *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;301: 229 -241.
- ²² Vassiliadis S, Relakis K, Papageorgiou A. Endometriosis and infertility: A multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. *Clin Dev Immunol* 2005;12: 125-129.
- ²³ Bigonnesse F, Labelle Y, Akoum A. Triphasic expression of interleukin-1 receptor type 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle of fertile women and women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 2001;75:79-87.
- ²⁴ Karagouni E, Chryssikopoulos A, Mantzavinos T et al. Interleukin-1 β and interleukin-1 α may affect the implantation rate of patients undergoing in vitro fertilization–embryo transfer *Fertil Steril* 1998; 70: 553-559
- ²⁵ Baraňao R, Piazza A, Rumi L, et al. Interleukin-1 β levels in human embryo culture supernatants and their predictive value for pregnancy. *Early Hum Dev.* 1997; 48: 71-80
- ²⁶ Veek, L.L. (1999). *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology.* Parthenon Publishing.
- ²⁷ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001127255.1
- ²⁸ [http:// fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/](http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/)
- ²⁹ The 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes *Nature.* 2012;491:56-65.
- ³⁰ Estrada H, Buentello B, Zenteno JC. et al. The p.L750V mutation in the NLRP7 gene is frequent in Mexican patients with recurrent molar pregnancies and is not associated with recurrent pregnancy loss. *Prenat Diagn* 2013;33:205-208.

-
- ³¹ Qian J, Deveault C, Bagga R, et al. Women Heterozygous for NALP7/NLRP7 Mutations Are at Risk for Reproductive Wastage: Report of two novel mutations. *Hum Mut* 2007;28:741-749.
- ³² Koonin EV, Aravind L (May 2000). "The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation". *Trends Biochem. Sci.* 25 (5): 223-224.
- ³³ Seifer DB, Romero R, Berlinsky D, et al. Absence of immunoreactive cytokines in supernatants of individual preimplantation human embryos. *Am J Reprod Immunol* 1993;23:105-107.
- ³⁴ Kruessel JS, Huang HY, Wen Y. Different pattern of interleukin-1 β -(IL-1 β), interleukin-1 receptor antagonist-(IL-1ra) and interleukin-1 receptor type I- (IL-1R I) mRNA-expression in single preimplantation mouse embryos at various developmental stages. *J Reprod Immunol* 1997;34:103-120.
- ³⁵ Slim R, Ao A, Surti U. Recurrent triploid and dispermic conceptions in patients with NLRP7 mutations. *Placenta* 2011;32:409-412.
- ³⁶ Djuric U, El-Maarri O, Lamb B. Familial molar tissues due to mutations in the inflammatory gene, NALP7, have normal postzygotic DNA methylation. *Hum Genet* 2006;120:390-395
- ³⁷ Gomes MV, Huber J, Ferriani RA, et al. Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod* 2009;15:471-477.
- ³⁸ Ogilvie CM, Renwick PJ, Khalaf Y et al. First use of preimplantation genotyping in prevention of recurrent diandric complete hydatidiform mole. *Reprod Biomed Online* 2009;19:224-227.
- ³⁹ Fisher RA, Stuart AL, Carby A. What a difference an egg makes. *Lancet* 2011;378:1974.