



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

**APLICACIONES DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR EN EL ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD**

TESIS DOCTORAL
EVA MARÍA PIÑERO SAGREDO

Valencia, 2015



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

**“APLICACIONES DE LA RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR EN EL ESTUDIO DE LA
INFERTILIDAD”**

Tesis Doctoral

Eva M^a Piñero Sagredo

Directores:

Dr. Bernardo Celda Muñoz

Dr. Vicent Esteve Moya

Tutora:

Dra. Pilar D'Ocon

Departamento de Farmacología

Facultad de Farmacia

Valencia, 2015

Dr. Bernardo Celda Muñoz y Dr. Vicent Esteve Moya del departamento de Química-Física de la Universitat de Valencia,

Certifican que,

El presente trabajo titulado “Aplicaciones de la Resonancia Magnética Nuclear en el estudio de la Infertilidad”, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y que dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido por Dña. Eva M^a Piñero Sagredo con objeto de optar al grado de Doctor por la Universitat de Valencia,

y para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, en Valencia a 14 de Octubre de 2015.



Fdo. Dr. Bernardo Celda Muñoz



Dr. Vicent Esteve Moya

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría aprovechar la libertad que me brinda este apartado para hacer un balance de los años dedicados a este trabajo y que a pesar de las complicaciones y contratiempos que han podido surgir, los recuerdos que vienen en este instante a mi memoria son los buenos momentos vividos tanto profesionalmente como en el ámbito personal.

Mi agradecimiento va a mis directores de tesis, al Dr. Bernardo Celda, por su optimismo, su entusiasmo y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y al Dr. Vicent Esteve, por sus clases y enseñanzas de RMN. También agradecer a mi tutora de doctorado, la Dr. Pilar D'Ocon, a la que siempre recuerdo como una de las mejores profesoras de mi carrera.

El paso por el laboratorio de “Aplicaciones Bioquímicas y Biofísicas de la RMN” no sólo me ha dejado los datos que a continuación se tratan en esta tesis sino que me ha dado la oportunidad de conocer a una serie de personas, Ana, Ruben, M^a Carmen, Bea, Dani, Jose Manuel y Teresa, a las que agradezco su compañerismo. Con ellas he compartido momentos que recuerdo con gran cariño como los almuerzos, las tardes de fondue y palomitas y las reuniones de grupo que no sólo servían para compartir la información de nuestros proyectos sino también para forjar una buena amistad.

Gracias a mis amigas Laura y Esther por estar siempre dispuestas a escuchar, por todo su apoyo y sus ánimos y porque a pesar de que los años pasan y las dificultades para poder reunirnos son cada vez mayores, siempre encuentran un ratito para poder quedar y contarnos nuestras penas y alegrías.

Agradecer también a las chicas del grupos del café de Ciudad Real: Noelia, M^a Carmen, Cristina, Nuria, Mar y especialmente a Rosa, Antonia, Marisol y Conchi el cariño y la ayuda recibida, porque gracias a ellas el estar lejos de mi tierra y de mi familia se hace menos doloroso.

Gracias a mi familia, especialmente a mi hermano Paco y mi cuñada Merche porque sé que siempre puedo contar con ellos. A mis cuñados Mónica y Navarro porque además de familia son grandes amigos. A mis sobrinos Mónica, Sergio, Pau y Sofía por su alegría. Y a mis suegros Paco y Purin por toda su ayuda y sus ánimos.

Un agradecimiento muy especial para mis padres, por su apoyo, por sus consejos siempre permitiéndome que yo tomara mis propias decisiones y por toda la ayuda que me han dado y que me siguen dando.

Un gracias enorme a mis dos soles, Miguel y Claudia, por sus sonrisas, sus besos y sus abrazos.

Y finalmente, y no por ello menos importante, a la persona que ha hecho posible que terminara este trabajo. A Quico, mi marido y mi mejor amigo, por su apoyo en los momentos más difíciles, por sus ánimos en los momentos de debilidad, por sacarme una sonrisa en los momentos más tristes y por toda su ayuda y porque sin él no lo hubiera conseguido. Muchísimas gracias.

Posiblemente me haya olvidado de alguien, en cualquier caso mi más sincero agradecimiento a todos.

PREÁMBULO

La esterilidad se ha convertido en un problema de gran importancia en la actualidad. En general, se estima que la esterilidad afecta al 10-15 % de la población occidental (Bajo-Arenas 2009). Concretamente, se ha observado que el número de nacimientos en muchos países, fundamentalmente europeos, ha disminuido drásticamente en los últimos años (Morgan 2006). Los cambios en las tasas de fertilidad en los países industrializados podrían ser debidos a distintos factores tanto sociales como culturales y económicos, fundamentalmente el aumento en la edad de concepción de las mujeres (Billari 2006, Coleman 2007, McDonald 2007, Testa 2007). Este cambio demográfico puede tener graves consecuencias tanto sociales como económicas debido a la disminución de la población con edad de trabajar y consecuentemente del Producto Interior Bruto (PIB) (Ziebe 2008). Además, la esterilidad conlleva, a nivel individual, una serie de consecuencias negativas en las personas que padecen estas alteraciones, que van desde alteraciones fisiológicas, hasta psicológicas o sociales (Cousineau 2007).

Existen diversas causas de esterilidad, alteraciones uterinas, endometriales, ováricas, vaginales, inmunitarias,... Además de diversos factores que afectan a la fertilidad como son la edad (Menken 1986, Spira 1988, Dunson 2004) y factores del estilo de vida.

Para tratar de dar solución a estos problemas relacionados con la fertilidad se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida. Algunas de estas técnicas se pueden aplicar tras el control del ciclo natural de la mujer, sin estimular su ovulación o usando ciclos ligeros de estimulación, que tienen una serie de ventajas frente a los ciclos de estimulación convencionales. Sin embargo, los resultados son mejores si provocamos un desarrollo folicular múltiple mediante una estimulación ovárica (The ESHRE Capri Workshop Group 2009). De esta manera, aumentando el número de ovocitos, aumentamos las tasas de embarazo, pero incluimos el riesgo de gestación múltiple entre otros inconvenientes. La elección de los ciclos estimulados,

naturales o ligeros genera una gran controversia debido a la existencia de pros y contras para cada una de ellas.

En muchas de las técnicas de reproducción asistida es necesaria la extracción y selección de los ovocitos que van a ser empleados para una posterior fecundación. La importancia del ovocito en el adecuado desarrollo del embrión es incuestionable, ya que contribuye en la formación del cigoto aportando su citoplasma y la mitad del ADN nuclear. Es decir, que cuanto mayor sea la calidad del ovocito seleccionado mejores resultados obtendremos. Actualmente, el principal criterio de selección de ovocitos emplea una serie de características morfológicas (Wang 2007, Lasiene 2009, Rienzi 2011). Sin embargo, estos protocolos indicadores de calidad del ovocito no son completamente satisfactorios (Balaban 2006). Por esta razón, en los últimos años se está tratando de encontrar otros marcadores que definan la idoneidad de los ovocitos para el uso en técnicas de reproducción asistida. Una de las tendencias actuales es la búsqueda de biomarcadores de calidad ovocitaria en el líquido folicular (LF).

El líquido folicular es un biofluido que rodea al ovocito en crecimiento y que se forma durante una de las etapas del desarrollo folicular (foliculogénesis). Su composición implica alteraciones en las secreciones por parte de las células del folículo y alteraciones en los componentes del plasma debidos a procesos fisiológicos o patológicos. El líquido folicular contiene sustancias relacionadas con la actividad metabólica de las células ováricas y sustancias participantes en la maduración y fertilización del ovocito. Además también contiene moléculas implicadas en la proliferación y diferenciación de las células foliculares (Tsafriri 1988; Adashi 1994). Por lo tanto, el microambiente folicular es un determinante importante del desarrollo del ovocito (Chiu 2002) y a su vez del desarrollo del embrión.

Se han publicado diversos estudios realizados principalmente en muestras de líquido folicular de diferentes animales (Gerard 2002, Chang 1976, Gosden 1990, Leroy 2004a, Orsi 2005, Renaville 2010, Nandi 2007) en los que se trata de determinar la

composición de este fluido. Pero a pesar de la importancia del LF en el desarrollo del ovocito, el número de estudios encontrados que tratan de determinar su composición en humanos ha sido relativamente bajo (Ghiafeh-Davoodi 2005, Gull 1999, Józwik 2006).

La obtención de la composición metabólica de un biofluido podría permitir la búsqueda e identificación de posibles biomarcadores que puedan servir como indicadores de presencia o progresión de una enfermedad o alteración o de respuesta a una intervención terapéutica. En nuestro caso, el conocimiento del ambiente folicular, no sólo podría ayudar a la selección de los ovocitos de mayor calidad en los tratamientos de reproducción asistida, sino que también puede ayudar a mejorar los medios de cultivo empleados en la maduración in vitro de los ovocitos (Sutton 2003), selección de protocolos de estimulación más adecuados, etc. aumentando así las tasas de embarazo en la población.

Finalmente destacar que la técnica empleada para la realización de este trabajo ha sido la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La RMN es una de las técnicas más útiles para la determinación cuantitativa del perfil metabólico de muestras biológicas. Entre las características diferenciales de la aplicabilidad de la RMN en metabolómica destacan: I) cuantificación, II) robustez, III) reproducibilidad y IV) rapidez.

ÍNDICE

Preámbulo

Índice	1
Índice de figuras	7
Índice de tablas	15
Abreviaturas	17
Introducción	19
1. Desarrollo folicular	20
1.1. Ovarios.....	20
1.2. Foliculogénesis.....	22
1.2.1. Periodo fetal.....	22
1.2.2. Periodo prepuberal.....	24
1.2.3. A partir de la pubertad.....	25
1.3. Estadios foliculares.....	26
1.3.1. Folículos primarios.....	27
1.3.2. Folículos preantrales.....	28
1.3.3. Folículos antrales.....	28
1.3.4. Selección del folículo dominante.....	29

1.3.5. Folículos atrésicos.....	30
1.3.6. Folículos preovulatorios.....	30
1.4. Maduración del ovocito	32
2. Esterilidad	33
2.1. Definiciones de esterilidad	33
2.2. Datos demográficos	35
2.3. Etiología de la esterilidad femenina.....	38
3. Reproducción asistida.....	42
3.1. Inseminación artificial	43
3.2. Fecundación in vitro	43
3.3. Donación de ovocitos	44
3.4. Estimulación ovárica	45
3.5. Ciclo ligero	48
3.6. Ciclo natural	48
4. Evaluación de la maduración ovocitaria.....	50
5. Líquido folicular	52
5.1. Formación del líquido folicular	52
5.2. Propiedades físicas	54
5.3. Composición.....	57

5.4. Biomarcadores metabólicos de calidad ovocitaria en el líquido folicular	61
6. Metabolómica	64
6.1. Resonancia Magnética Nuclear	64
6.1.1. Bases de la RMN	65
6.1.2. Aplicaciones.....	68
Objetivos.....	71
Material y métodos.....	75
1. Muestras utilizadas	76
2. Obtención de las muestras.....	78
3. Preparación de las muestras para el análisis por RMN	79
4. Espectroscopía de RMN	80
4.1. Equipos y sondas usadas.....	80
4.2. Experimentos realizados.....	81
4.3. Condiciones de medida.....	91
5. Análisis de los datos y estadística	93
Resultados.....	101
1. Estudio de los espectros de RMN para la identificación de los metabolitos del líquido folicular	102

2. Estudio de los espectros de RMN para la comparación de las muestras de líquido folicular de mujeres donantes de óvulos frente a las pacientes de tratamientos de fertilidad.....	117
2.1. Agrupamiento jerárquico y PCA	118
2.2. Análisis Multivariable de la varianza (MANOVA) y Análisis de la varianza (ANOVA).....	118
2.3. Correlaciones	120
2.4. Estimación de concentraciones de Glucosa, Lactato y Piruvato	121
3. Estudio de los espectros de RMN para la comparación de las muestras de líquido folicular de mujeres sometidas a diferentes ciclos de estimulación ovocitaria.....	122
3.1. Tabla edad e IMC	122
3.2. Jerarquía y PCA.....	123
3.3. MANOVA y ANOVA.....	124
3.4. Correlaciones.....	141
3.5. Estimación de concentraciones.....	145
Discusión	147
1. Determinación de la composición del líquido folicular.....	148
1.1. Aminoácidos.....	149
1.2. Otros intermediarios de rutas energéticas: Glucosa, Lactato y Piruvato	153

1.3. Mio-inositol	156
1.4. Colina, Fosfocolina y Glicerofosfocolina	156
1.5. Cuerpos cetónicos.....	157
1.6. Acetato.....	159
1.7. Lípidos.....	160
1.8. Medida del tiempo de relajación T_2	162
2. Estudio comparativo entre mujeres donantes de ovocitos y pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica.....	163
2.1. MANOVA y ANOVA.....	165
2.2. Correlaciones entre metabolitos	167
2.3. Estimación de concentraciones.....	169
3. Estudio comparativo de los ciclos de estimulación.....	169
3.1. Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto a la edad	169
3.2. Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto al Índice de Masa Corporal.....	171
3.3. Estudio comparativo de los ciclos de estimulación	172
3.4. Colina, Fosfocolina y Glicerofosfocolina	177
3.5. Creatina.....	179
3.6. Citrato.....	180

3.7. Cuerpos cetónicos: β -Hidroxibutirato y Acetoacetato	182
3.8. Piruvato.....	185
3.9. Lípidos.....	187
3.10. Elección del tipo de estimulación	189
Conclusiones	191
Anexo I	
Anexo II	
Bibliografía	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Partes y dimensiones del aparato reproductor femenino	20
Figura 2.- Etapas del crecimiento folicular en el ovario, incluyendo la formación del cuerpo lúteo	22
Figura 3.- Disminución de la reserva de folículos y los correspondientes eventos reproductivos con respecto a la edad.....	25
Figura 4.- Concentraciones plasmáticas aproximadas de gonadotropinas y hormonas ováricas durante el ciclo sexual femenino normal	25
Figura 5.- A: Microfotografía retocada de un corte transversal del ovario de macaco hembra. B: Corte de ovario en él se observan distintos estadios del folículo; 1.- Folículos primordiales; 2.- Folículo preantral; 3.- Folículo antral; 4.- Folículo preovulatorio	26
Figura 6.- Esquematación de las estructuras de los diferentes estadios del folículo	27
Figura 7.- Imagen de microscopio de un folículo preovulatorio indicando cada una de sus partes: o.- óvulo; Cr.- Zona pelúcida; Fa.- antro con liquido folicular; Zg.- células granulares; Ti.- teca interna; Te.- teca externa.....	32
Figura 8.- Gráfica de los rangos de fertilidad total (TFR) en diversas regiones geográficas del mundo desde 1950 hasta 2005	36
Figura 9.- Pirámide poblacional para (A) 2004 y (B) proyecciones para 2050.	37
Figura 10.- Edad de parejas asociado a riesgo de aborto espontáneo, Estudio Europeo de Infertilidad y subfertilidad, 1991-1993 (n = 3174)	39

Figura 11.- Rangos de infertilidad conyugal con respecto a la edad de la mujer	39
Figura 12.- Ruta que sigue el fluido para su transporte desde el capilar tecal hasta el antro, donde se acumula el líquido folicular	53
Figura 13.- Aumento de la diferencia energética entre los estados de spin con el aumento de la fuerza del campo magnético	66
Figura 14.- Proceso de extracción del líquido folicular	78
Figura 15.- Tubo de RMN de 5mm de diámetro empleado para el análisis del Líquido Folicular	79
Figura 16.- Espectrómetro de RMN 11.75 T	80
Figura 17.- Espectrómetro de RMN 18.8 T	81
Figura 18.- Muestra las proyecciones F2 de los espectros 2D JRES no inclinado (Fig. 18a) e inclinado (Fig. 18b)	85
Figura 19.- Ejemplo de espectro 1H JRES RMN. A) ¹H NMR. B) J-resolved bidimensional. C) Proyección monodimensional del espectro J-resolved de una línea celular de <i>Catharanthus roseus</i> en el rango de 6.00–8.00 ppm	86
Figura 20.- Esquema explicativo del experimento COSY	87
Figura 21.- Esquema explicativo del experimento TOCSY	88
Figura 22.- Ventana del programa SPARKY con picos asignados	93
Figura 23 A, B y C.- Módulo de procesado de espectros Programa Abios	95
Figura 24.- Módulo de comparación de espectros programa Abios	95

- Figura 25.- Módulo de análisis estadístico programa Abios.....96**
- Figura 26.- Espectro de ^1H RMN 800MHz de líquido folicular medido a 298K con las asignaciones más significativas. A: Espectro 1D con supresión del agua mediante Presaturación. B: Detalle del espectro de presaturación (δ 2.7 a 4.6ppm). C: Detalle del espectro de presaturación (δ 0.4 a 2.4ppm)103**
- Figura 27.- Espectro de ^1H RMN 800MHz de líquido folicular medido 298K. A: Región de los alifáticos (0 a 4.5 ppm) del espectro 1D con supresión del agua mediante Presaturación. B: Región de los alifáticos (0 a 4.5 ppm) del espectro CPMG. C: Región de los alifáticos (0 a 4.5 ppm) del espectro DOSY104**
- Figura 28.- Proyección en una dimensión del espectro J-Resolved de ^1H RMN 800MHz de líquido folicular medido a 298K105**
- Figura 29.- Espectros 2D de ^1H RMN 500MHz de líquido folicular medido a 298K con las asignaciones más significativas.....106**
- Figura 30.- Relajación T_2 de las señales analizadas mediante la serie de espectros de ^1H RMN 800 MHz CPMG de líquido folicular medido 298K (2-0.7 ppm)111**
- Figura 31.- Espectro ^1H RMN 800MHz. A: Espectro 1D con supresión de agua mediante Presaturación de la región comprendida entre 5.5 y 0 ppm a diferentes temperaturas: 292K, 298K y 304K. B: Detalle Espectro 1D con supresión de agua mediante Presaturación de la región comprendida entre 2.2 y 0.2 ppm a diferentes temperaturas: 292K, 298K y 304K.....112**
- Figura 32.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1-47 (8.447-3.819 ppm) Mean dimension 1 (0.0007) B) MANOVA PICOS 48-94 (3.809-3.337 ppm) Mean dimension 1 (0.0221) C) MANOVA PICOS 95-141 (3.324-2.573 ppm) Mean dimension 1 (0.0001) D) MANOVA PICOS 142-185**

(2.566-0.828 ppm) Mean dimension 1 (0.0002). Class 0: Donantes (azul); Class 1: Pacientes (verde).....119

Figura 33.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Colina: Pico 3.189 (Colina NCH3) Anova: 0.012 Kruskal-Wallis: 0.030 B) Creatina: Pico 3.028 (Creatina NCH) Anova: 0.026 Kruskal-Wallis: 0.020 Class 0: Donantes; Class 1: Pacientes.....120

Figura 34.- Espectros de RMN 600 MHz de experimentos CPMG 136ms de una muestra aceptada para el estudio (verde) y una muestra eliminada (azul).....125

Figura 35.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1 a 75 (4.238-3.532 ppm) Mean dimension 1 (0.0000) B) MANOVA PICOS 76 a 150 (3.522-2.592 ppm) Mean dimension 1 (0.0002) C) MANOVA PICOS 151 a 221 (2.540-0.826 ppm) Mean dimension 1 (0.0001) Class 0: Estimulación Convencional (azul); Class 1: Estimulación Natural + Ligera (verde).....126

Figura 36.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 1.192 (β -Hidroxibutirato γ H) Anova: 0.008 Kruskal-Wallis: 0.003 B) Pico 3.027 (Creatina NCH) Anova: 0.007 Kruskal-Wallis: 0.004 C) Pico 3.213 (Glicerofosocolina NH) Anova: 0.016 Kruskal-Wallis: 0.027 D) Pico 3.202 (Fosfocolina NH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 E) Pico 3.189 (Colina NCH3) Anova: 0.034 Kruskal-Wallis: 0.050 F) Pico 2.669 (Citrato α 1H γ 1H) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 G) Pico 2.359 (Piruvato β H) Anova: 0.012 Kruskal-Wallis: 0.005 H) Pico 2.217 (Acetoacetato γ H) Anova: 0.048 Kruskal-Wallis: 0.059 I) Pico 2.027 (Glicoproteína Nac) Anova: 0.044 Kruskal-Wallis: 0.081 J) Pico 0.826 (Lípido CH3(CH2)n) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 Class 0: Estimulación Convencional; Class 1: Estimulación Natural + Ligera.....129

Figura 37.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA de los 75 picos en el intervalo 4.238-3.532 ppm (Mean dimension 2 (0.0000 0.0000)). B) MANOVA de 75 picos en el intervalo 3.522-2.592 ppm (Mean dimension 2 (0.0010 0.0255)). MANOVA de los 71 picos en el intervalo 2.540-0.826 ppm

(Mean dimension 1 (0.0020-0.4504) Class 0: Estimulación Convencional (azul); Class 1: Estimulación Ligera (verde); Class 2: Estimulación Natural (rojo)...130

Figura 38.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 3.213 (Glicerofosfocolina NH) Anova: 0.038 Kruskal-Wallis: >0.05 B) Pico 3.202 (Fosfocolina NH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.001 C) Pico 3.027 (Creatina NCH) Anova: 0.025 Kruskal-Wallis: 0.015 D) Pico 2.669 (Citrato α 1H γ 1H) Anova: 0.001 Kruskal-Wallis: 0.000 E) Pico 1.192 (β -Hidroxitirato γ H) Anova: 0.029 Kruskal-Wallis: 0.010 F) Pico 2.359 (Piruvato β H) Anova: 0.029 Kruskal-Wallis: 0.011 G) Pico 0.826 (Lípido CH₃(CH₂)_n) Anova: 0.001 Kruskal-Wallis: 0.002 Class 0: Estimulación Convencional; Class 1: Estimulación Ligera; Class 2: Estimulación Natural.....133

Figura 39.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1-75 (4.238-3.532 ppm) Mean dimension 1 (0.0000) B) MANOVA PICOS 76-150 (3.522-2.592 ppm) Mean dimension 1 (0.0000) C) MANOVA PICOS 151-221 (2.540-0.826 ppm) Mean dimension 1 (0.0438) Class 0: Donantes (azul); Class 1: Pacientes (verde)134

Figura 40.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 4.121 (Lactato α H) Anova: 0.031 Kruskal-Wallis: >0.05 B) Pico 3.189 (Colina NCH₃) Anova: 0.047 Kruskal-Wallis: 0.043 Class 0: Donantes; Class 1: Pacientes135

Figura 41.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 76-100 (3.522-3.335 ppm) Means dimension 1 (0.0049) B) MANOVA PICOS 101-125 (3.329-3.030 ppm) Means dimension 1 (0.0074) C) MANOVA PICOS 126-150 (3.027-2.592 ppm) Means dimension 1 (0.0388) D) MANOVA PICOS 151-175 (2.540-2.133 ppm) Means dimension 1 (0.0004) E) MANOVA PICOS 176-200 (2.123-1.711 ppm) Means dimension 1 (0.0324) Class 0: Donantes Estimulación Convencional (azul); Class 1: Donantes Estimulación Natural + Ligera (verde)136

Figura 42.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 2.359 (Piruvato β H) Anova: 0.024 Kruskal-Wallis: 0.002 Class 0: Donantes Estimulación Convencional; Class 1: Donantes Estimulación Natural + Ligera.....137

Figura 43.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1-45 (4.238-3.722) Means dimension 1 (0.0018) B) MANOVA PICOS 46-90 (3.711-3.420) Means dimension 1 (0.0179) C) MANOVA PICOS 91-135 (3.410-2.869) Means dimension 1 (0.0038) D) MANOVA PICOS 181-221 (2.087-0.826) Means dimension 1 (0.0083) Class 0: Donantes Estimulación Convencional; Class 1: Donantes Estimulación Natural + Ligera138

Figura 44.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 3.027 (Creatina NCH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 B) Pico 3.213 (Glicerofosocolina NH) Anova: 0.003 Kruskal-Wallis: 0.011 C) Pico 3.202 (Fosfocolina NH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 D) Pico 3.189 (Colina NCH₃) Anova: 0.003 Kruskal-Wallis: 0.012 E) Pico 2.669 (Citrato α 1H γ 1H) Anova: 0.008 Kruskal-Wallis: 0.001 F) Pico 1.192 (β -Hidroxibutirato γ H) Anova: 0.028 Kruskal-Wallis: 0.017 G) Pico 0.826 (Lípido CH₃(CH₂)_n) Anova: 0.028 Kruskal-Wallis: 0.017 Class 0: Pacientes Estimulación Convencional; Class 1: Pacientes Estimulación Natural + Ligera140

Figura 45.- Correlación Acetoacetato- β -Hidroxibutirato en A) Donantes E. Natural (+ Ligera) B) Donantes E. Convencional C) Pacientes E. Convencional143

Figura 46.- Comunicación ovocito-células del cúmulo.....148

Figura 47.- Introducción de los aminoácidos en las rutas metabólicas como sustratos energéticos152

Figura 48.- Conexiones entre los intermediarios más importantes de las rutas energéticas metabólicas en el folículo154

Figura 49.- Espectro monodimensional de ^1H RMN CPMG 600MHz de líquido folicular medido 298K	156
Figura 50.- Metabolismo de la Colina	178
Figura 51.- Metabolismo de la Creatina.....	180
Figura 52.- Metabolismo del Citrato	181
Figura 53.- Formación de los cuerpos cetónicos a partir de Acetil-CoA	183
Figura 54.- Reconversión de β-Hidroxi butirato a Acetil-CoA	184
Figura 55.- Formación del Acetil-CoA a partir de piruvato	186
Figura 56.- Formación del Lactato a partir de piruvato	186
Figura 57.- Formación del Oxalacetato a partir de piruvato	186
Figura 58.- Formación del aminoácidos a partir de piruvato	187

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tabla resumen de los compuestos determinados en líquido folicular en distintas publicaciones	57
Tabla 2.- Tabla resumen de los compuestos determinados en líquido folicular humano en distintas publicaciones	60
Tabla 3.- Distribución de las muestras empleadas para el estudio comparativo de ciclos en función de sus características.....	77
Tabla 4.- Desplazamientos químicos asignados a las señales y asignación a sus correspondientes grupos y metabolitos identificados.....	107
Tabla 5.- Correlaciones Metabolito-Metabolito en el líquido folicular de mujeres donantes de óvulos de espectros CPMG (valores de probabilidad en paréntesis). Grupo A: agrupados por edad; Grupo A1: donantes ≤ 25 años; Grupo A2: donantes ≥ 27 años. Grupo B: agrupados por rangos de fertilización normalizada; Grupo B1: $>60\%$; Grupo B2: $<50\%$. Grupo C: agrupados por los resultados de FIV; Grupo C1: embarazo positivo; Grupo C2: no embarazo o no transferencia del embrión.....	115
Tabla 6.- Edad e Índice de Masa Corporal de las muestras empleadas para este estudio (media \pm desviación estándar).....	117
Tabla 7.- Valores de correlaciones lineales entre determinados metabolitos obtenidos en los distintos grupos (probabilidad entre paréntesis).....	121
Tabla 8.- Valores de las medias de las concentraciones estimaciones de Glucosa, Lactato y Piruvato y sus respectivas desviaciones estándar	121
Tabla 9.- Valores de las medias y desviaciones estándar de la edad y el IMC para cada uno de los grupos estudiados (media \pm desviación estándar)	122

Tabla 10.- Valores de coeficientes de correlación lineal (probabilidad) entre diferentes metabolitos en diferentes grupos de muestras	142
Tabla 11.- Valores de los coeficientes de correlación y probabilidad entre determinados metabolitos y la edad en diferentes grupos de muestras.....	144
Tabla 12.- Valores de los coeficientes de correlación y probabilidad entre determinados metabolitos y el IMC en diferentes grupos de muestras	145
Tabla 13.- Valores de las medias de las concentraciones estimadas de Glucosa,Lactato y Piruvato y sus respectivas desviaciones estándar	146
Tabla 14.- Metabolitos identificados en el Líquido folicular humano	149

ABREVIATURAS

AMH: Hormona antimuleriana (Anti-Mullerian Hormone)

ANOVA: Análisis de la varianza (ANalysis Of VAriance)

ATII: AngioTensina II

Beta-EP: Beta-endorfina (Beta-Endorphine)

BFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico (Basic Fibroblast Growth Factor)

BMP-15: Proteína morfogénica de hueso-15 (Bone Morphogenic Protein-15)

CC: Citrato de Clomifeno

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill

D1: Periodo de relajación

DOSY: Diffusion-Ordered Spectroscopy

DQF-COSY: Double-Quantum Filtered-Correlation Spectroscopy

E2: Estrógenos

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)

FIV: Fecundación In Vitro

FSH: Hormona folículo estimulante (Folicle-Stimulating Hormone)

GC/MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography / Mass Spectrometry)

GH: Hormona del crecimiento (Growth Hormone)

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas (Gonadotropin-Releasing Hormone)

hCG: Gonadotropina coriónica humana (human Chorionic Gonadotropin)

HCY: Homocisteína (Homocysteine)

hMG: Gonadotropina menopáusica humana (human Menopausal Gonadotropins)

HPLC/MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (High-Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy

IA: Inseminación Artificial

ICSI: Inyección intracitoplasmática (Intracytoplasmic Sperm Injection)

IGF: Factor de crecimiento insulínico (Insulin-like Growth Factor)

IMC: Índice de Masa Corporal

IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad

LF: Líquido Folicular

LH: Hormona Luteinizante (Luteinizing Hormone)

MANOVA: Análisis multivariable de la varianza (Multivariate ANalysis Of VAriance)

NS: N° de adquisiciones (Number of Scans)

OMI: Inhibidor de la maduración del ovocito (Oocyte Maturation Inbibitor)

P: Progesterona

PCA: Análisis de la componente principal (Principal Component Analysis)

PIB: Producto Interior Bruto

Presat: Presaturación

PRL: PRoLactina

RA: Reproducción asistida

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: Especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxigen Species)

SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico

SW: Anchura espectral (Spectral Width)

T: Teslas

TE: Tiempo de Echo

TGF-beta: Factor de crecimiento transformante-beta (Tranforming Growth Factor-beta)

TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral-alfa (Tumour Necrosis Factor-alpha)

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy

WATERGATE: WATER supression by Gradient Tailored Excitation

ZP: Zona Pelúcida

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo folicular	20
1.1. Ovarios	20
1.2. Foliculogénesis	22
1.3. Estadios foliculares	26
1.4. Maduración del ovocito	32
2. Esterilidad	33
2.1. Definiciones de esterilidad	33
2.2. Datos demográficos	35
2.3. Etiología de la esterilidad femenina.....	38
3. Reproducción asistida.....	42
3.1. Inseminación artificial	43
3.2. Fecundación in vitro	43
3.3. Donación de ovocitos	44
3.4. Estimulación ovárica	45
3.5. Ciclo ligero	48
3.6. Ciclo natural	48
4. Evaluación de la maduración ovocitaria.....	50
5. Líquido folicular	52
5.1. Formación del líquido folicular	52
5.2. Propiedades físicas	54
5.3. Composición.....	57
5.4. Biomarcadores metabólicos de calidad ovocitaria en el líquido folicular	61
6. Metabolómica	64
6.1. Resonancia Magnética Nuclear	64

1. DESARROLLO FOLICULAR

El proceso de formación y maduración de los folículos ováricos, estructuras en cuyo interior se desarrolla el ovocito que posteriormente dará lugar al óvulo, tiene lugar en los ovarios de la mujer.

1.1. Ovarios

El ovario (Fig. 1) es un órgano intrapélvico que desempeña dos funciones importantes: el desarrollo de los óvulos o gametos femeninos y la producción y secreción de diversas hormonas sexuales (Guzmán 2003, Pritchard 1987).

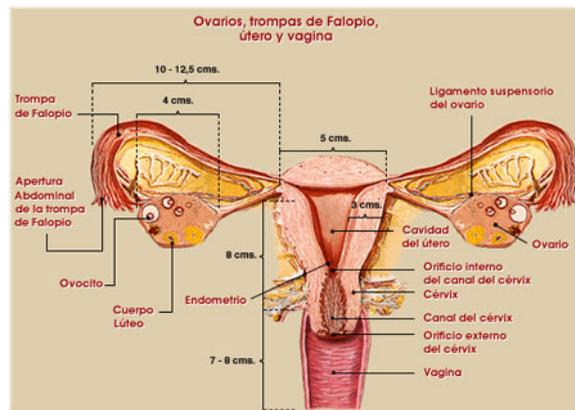


Figura 1.- Partes y dimensiones del aparato reproductor femenino.

Características morfológicas

Los ovarios son estructuras anatómicas pares, de forma más o menos almendrada, con un color amarillo grisáceo y su superficie es lisa antes de iniciarse la pubertad. A partir de este momento presenta una superficie irregular por las cicatrices que resultan de la ovulación. Su tamaño es variable dependiendo de la paridad de la mujer y la época del ciclo reproductor; tienen como medidas promedio, 3 cm. de longitud, 2 cm. de ancho y 1 cm. de grueso. Se encuentran situados en la pared lateral de la pelvis detrás del útero.

Estructura histológica

El ovario está formado por tejido fibroareolar llamado estroma, que consiste en cuatro capas:

- **Epitelio germinativo o superficial:** capa de revestimiento simple formado por una hilera de células epiteliales, de tipo cúbico o aplanado, que recubre la superficie del ovario. Este epitelio no es el responsable del origen de los óvulos. Actualmente se sabe que los óvulos provienen del endodermo del saco vitelino y emigran a los ovarios durante el desarrollo embrionario. El epitelio se continúa bruscamente con el peritoneo formando la *línea de Farré*, caracterizada por una línea blanca brillante.
- **Túnica albugínea:** túnica o cápsula blanquecina de tejido conectivo denso e irregular que recubre al ovario, no es excesivamente gruesa para permitir que se rompa fácilmente por los folículos preovulatorios. De esta capa depende el color pálido de la gónada.
- **Capa cortical:** Capa localizada inmediatamente por debajo de la túnica albugínea. Está constituida por tejido conjuntivo, cuyas células están muy próximas unas de otras. Estas células pueden producir esteroides. Esta zona es la porción funcional del mismo ya que en ella existen una serie de elementos que experimentan modificaciones cíclicas durante la vida de la mujer y que constituyen la dotación germinal, los folículos ováricos.
- **Médula:** Está situada en el centro del ovario. Está formada por tejido conectivo laxo y contiene los vasos sanguíneos y linfáticos, así como los nervios procedentes del hilio ovárico.

1.2. Foliculogénesis

La foliculogénesis (Fig. 2) es el proceso de maduración de los folículos ováricos. Es un proceso continuo donde los folículos crecen y entran en atresia cíclicamente desde la infancia hasta la menopausia (Guyton 2011, Ham 1985).

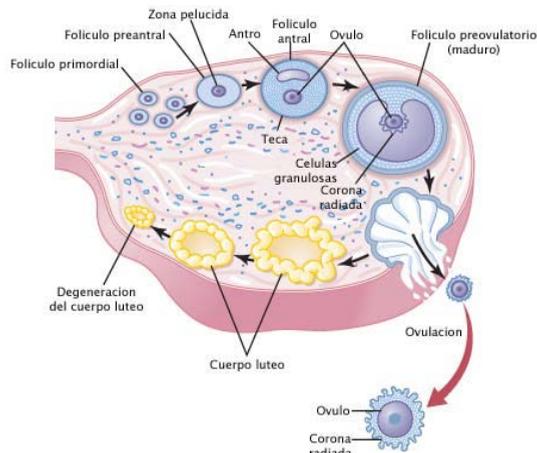


Figura 2. Etapas del crecimiento folicular en el ovario, incluyendo la formación del cuerpo lúteo (Guyton 2011).

1.2.1. Periodo fetal

El suministro de folículos en los ovarios humanos se establece durante el periodo fetal (Te Velde 1998). Las gónadas y células germinales comienzan a formarse en la semana 5 de vida intrauterina. Las células germinales se producen en el endodermo del saco vitelino. Tras su formación, estas células migran hacia la cresta genital, colonizándola, a partir de este momento las células pasan a denominarse ovogonias. Entre las semanas 6ª y 7ª de gestación el número total de ovogonias es de alrededor de 10000. A continuación se inicia un aumento del número de células germinales mediante un proceso de mitosis que dura hasta la semana 20 de gestación alcanzándose un número máximo de aproximadamente 7 millones. Esta reserva ha de servir las necesidades de reproducción para el resto de la vida de la mujer. La

inmensa mayoría de los folículos, tarde o temprano, se convertirán en atrésicos por apoptosis (Hsueh 1994).

A partir de la 8ª semana de gestación se inicia la meiosis. Una célula germinativa posee únicamente un número haploide de cromosomas y para que ello ocurra los ovocitos primarios deben experimentar meiosis. La primera división meiótica (reduccional: reducción a la mitad del número de cromosomas) comienza en la vida prenatal, de este modo, una vez formados los folículos, duplican su DNA y entran en la profase de la primera división meiótica pero no la completan en esta etapa. Para la época del nacimiento aún están en reposo en la profase de la primera división meiótica. La reanudación de la meiosis se traduce en ovocitos completamente desarrollados durante la pubertad, la primera división meiótica se completa sólo después de la pubertad, en los folículos a punto de romperse en la superficie del ovario. La segunda división meiótica se complementará con la fecundación al penetrar el espermatozoide. Al finalizar estos procesos se habrá producido la formación de una sola célula fecundable haploide (óvulo), y tres células también haploides, pero no fecundables (corpúsculos polares).

Después de que los ovocitos entren en un prolongado estadio de diplotene en la meiosis, las precursoras de las células foliculares rodean a la célula germinal primordial (ovocito primario) formando una capa única, así se constituye el folículo primordial. Esta monocapa de células planas de pregranulosa surge de células epiteliales que se invaginan de la cresta genital en la semana 22.

Estos folículos están constituidos por una voluminosa célula central, célula germinal u ovocito primario de 25-30 μm de diámetro, que contiene abundante citoplasma de aspecto pálido con gránulos vitelinos, el conjunto de orgánulos habituales y con un núcleo voluminoso, pálido y redondo u ovoideo situado en el centro, cuya cromatina es fina y dispersa, aparte de la relacionada con el nucléolo prominente. El ovocito primario está rodeado de una capa de células epiteliales foliculares aplanadas que se disponen en una sola hilera, con su eje mayor paralelo a la superficie externa, de modo que el folículo tiene 40 μm de diámetro.

1.2.2. Periodo prepuberal

Durante la niñez, se cree que las células de la granulosa nutren al ovocito y secretan un factor inhibitor de la maduración del ovocito que lo mantiene en estado primordial. Después de comenzar la profase y antes de que se reanude esta fase, los cromosomas se extienden lo suficiente para perder el aspecto de cromosomas en profase; permanecen de esta manera hasta que se reanuda la meiosis años después. Los ovocitos que no se rodean de células de la pregranulosa se eliminan probablemente por apoptosis.

A continuación, factores intraováricos y otros factores desconocidos estimularán algunos de los folículos primordiales para estimular el crecimiento, mientras que el resto de folículos quedarán quiescentes durante meses o años.

La gran población de folículos primordiales servirá como fuente de desarrollo de folículos y/o ovocitos hasta el final de la vida reproductiva de la mujer. En el momento del nacimiento, el número de células con potencial para transformarse en óvulos irá decreciendo progresivamente hasta la menopausia de la mujer. Esto se debe a la disminución del número de mitosis celulares y el aumento de células que entran en atresia por apoptosis (Hsueh 1994).

En el momento del nacimiento quedan 1 millón de folículos primordiales (Fig. 3), unos 300000 permanecen en la menarquía y cientos desaparecen todos los meses a partir de entonces. El rango de desaparición de los folículos sigue un modelo bifásico, y se acelera por debajo de aproximadamente 25000 folículos en una edad media de 37-38 años (Faddy 1992). Finalmente, menos de 500 folículos alcanzan la madurez y ovulan debido a que sólo un folículo puede alcanzar la ovulación en cada ciclo (Selección Folicular). Tanto la cantidad como la calidad de los folículos disminuyen con la edad de las mujeres (Brook 1984, Gauden 1992, Te Velde 1998).

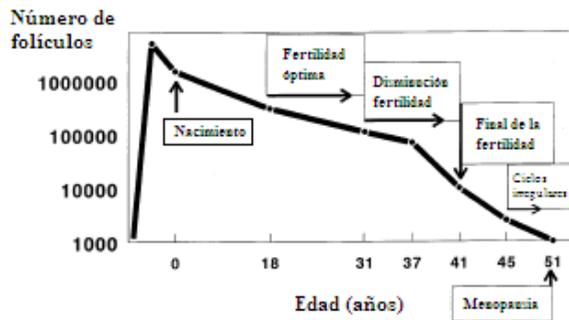


Figura 3.- Disminución de la reserva de folículos y los correspondientes eventos reproductivos con respecto a la edad (Faddy 1992).

1.2.3. A partir de la pubertad

En la pubertad los cambios que ocurren en la mujer dependen de que los ovarios comiencen a funcionar de manera completa. Ello se debe a que son estimulados por las células gonadotróficas de la adenohipófisis que comienzan a secretar las dos hormonas gonadotróficas, FSH y LH.

Cada 28 días, aproximadamente, se producen en la mujer sexualmente madura y no embarazada una serie de cambios secuenciales en las concentraciones de hormonas (Fig. 4) y péptidos (factores de crecimiento) (Erickson 2001) que provocan el crecimiento del folículo destinado a ovular desde folículo primordial hasta el preovulatorio.

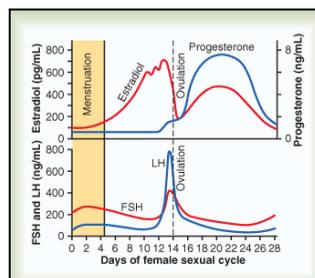
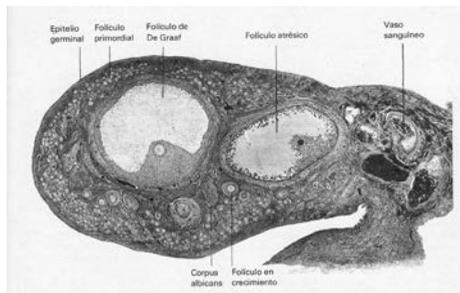


Figura 4.- Concentraciones plasmáticas aproximadas de gonadotropinas y hormonas ováricas durante el ciclo sexual femenino normal (Guyton 2011).

La maduración de un grupo de folículos empieza como respuesta a la FSH al comienzo del ciclo menstrual (Vermesh 1987), éstos van reduciéndose por atresia debida a la apoptosis o muerte celular programada, de manera que cuando comienza el ciclo menstrual sólo quedará uno de esos folículos totalmente desarrollado y se producirá la ovulación. A medida que avanza el ciclo, la LH aparece y es indispensable para la completa maduración del folículo (Balasch 1995) ya que favorece el crecimiento.

1.3. Estadios foliculares

A



B

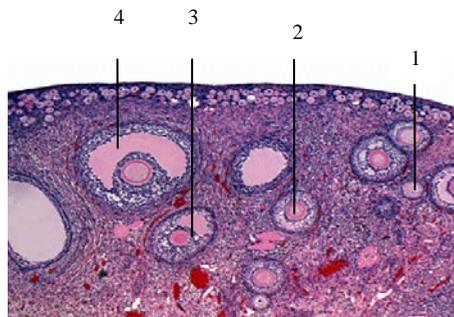


Figura 5.- A: Microfotografía retocada de un corte transversal del ovario de macaco hembra. B: Corte de ovario, en él se observan distintos estadios del folículo; 1.- Folículos primarios; 2.- Folículo preantral; 3.- Folículo antral; 4.- Folículo preovulatorio.

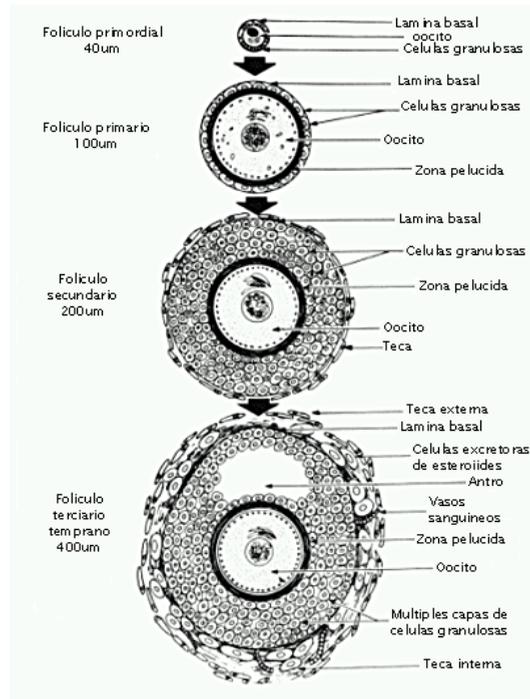


Figura 6.- Esquematación de las estructuras de los diferentes estadios del folículo.

1.3.1. Folículos primarios

Los folículos que han continuado su crecimiento pasan a formar los folículos primarios (100µm) (Fig. 5 y 6). El ovocito comienza una intensa etapa de crecimiento y las células foliculares que le rodean (células de la granulosa) adquieren forma cuboidal y proliferan.

Durante unos pocos días al comienzo de cada ciclo sexual menstrual femenino, las concentraciones de FSH y LH secretadas en la adenohipófisis experimentan un aumento ligero o moderado (Fig. 4); el ascenso de FSH es algo mayor y precede en unos días al de LH. Estas hormonas, sobre todo la FSH, inducen el crecimiento acelerado de 6 a 12 folículos primarios cada mes.

1.3.2. Folículos preantrales

Cuando los ovocitos en crecimiento están rodeados de más de una capa de células de la granulosa, el folículo pasará a denominarse folículo secundario o preantral (Fig. 5 y 6), llegando a formar entre 6 y 7 capas. En ausencia de estimulación de gonadotropinas, los folículos no se desarrollan más allá de este estadio entrando en atresia, es decir, que el desarrollo a partir de este folículo es dependiente de gonadotropinas; Durante el estadio preantral, el ovocito aumenta de tamaño, hasta $100\mu\text{m}$ de diámetro aproximadamente, y queda rodeado por la zona pelúcida. Las células granulosas proliferan por mitosis y forman varias capas de células cuboides o poligonales estratificadas con escaso citoplasma, finalmente el folículo queda rodeado por la lámina basal, alcanzando un diámetro total de $200\mu\text{m}$. El folículo va penetrando en la capa medular del ovario, donde queda rodeado de tejido conectivo ricamente vascularizado formado por células fusiformes formándose la teca que comienza a proliferar. Las células foliculares emiten prolongaciones citoplasmáticas al interior de la zona pelúcida y a través de la misma para ponerse en contacto con la membrana celular del ovocito. De esta manera el ovocito recibe nutrientes por las células foliculares.

1.3.3. Folículos antrales

En la fase antral comienza a acumularse líquido en pequeñas lagunas, este es el llamado líquido folicular, cuyo origen es un exudado del plasma sanguíneo y secreciones que son sintetizadas por las células foliculares. El aumento en la síntesis de este fluido se produce bajo el influjo continuado y sinérgico de los estrógenos y FSH. Las pequeñas lagunas se fusionan y ello origina que la mayor parte del folículo quede formada por un depósito de líquido (antro folicular) y que el ovocito quede desplazado hacia un extremo (Fig. 5 y 6). El LF proporciona un medio en el que el ovocito y las células de la granulosa circundante pueden nutrirse en un microambiente único para cada folículo. La formación del antro folicular divide la población de células de la granulosa en dos grupos principales; las células del cumulus asociadas con el ovocito y las células de la granulosa que delimitan la pared

folicular. Las células de la teca rodean íntimamente al folículo epitelial y pronto se diferencian en dos capas; la interna, teca interna, es relativamente celular y posee muchos capilares, y la externa, es más fibrosa y menos vascularizada. Sin embargo, la línea de separación entre las dos capas no es muy limpia. Las células de la teca tiene la capacidad de producir andrógenos (androstenediona y testosterona) en respuesta a la unión de LH a sus receptores específicos y las de la granulosa de convertir estos en estrógenos (estradiol) en virtud de la acción de la FSH sobre ella.

El folículo antral o terciario alcanza un diámetro de 400 μ m. Aquellos folículos antrales bien desarrollados también se denominan folículos de Graaf.

En esta etapa se decidirá que folículos van a desarrollarse, cuál de ellos va a ser el folículo dominante y cuales evolucionarán a atresia por la instauración de fenómenos apoptóticos.

1.3.4. Selección del folículo dominante

Transcurrida al menos una semana de crecimiento, pero antes de que se produzca la ovulación, uno de los folículos comienza a crecer más que los demás; los otros restantes empiezan a involucionar (folículos atrésicos).

El mecanismo de selección del folículo dominante no está todavía definido. Una posible explicación es que las grandes cantidades de estrógenos procedentes del folículo de crecimiento más rápido (por la multiplicación de las células de la granulosa y la acción de la FSH) produce la aparición de estrógenos en sangre periférica, que actúan sobre el hipotálamo produciéndose una caída brusca en la secreción hipofisaria de FSH, de esta manera se bloquea el crecimiento de los folículos menos desarrollados. Únicamente, el folículo más grande continuará su crecimiento por efecto de su retroalimentación positiva intrínseca.

1.3.5. Folículos atrésicos

De los varios folículos cuyo desarrollo se estimula en la mujer en cada ciclo, sólo uno alcanza las etapas finales de crecimiento y maduración y libera el ovocito. Los demás folículos voluminosos experimentan atresia por un proceso apoptótico que es caracterizado por distintos cambios morfológicos y bioquímicos como una fragmentación de DNA, alteración de la membrana plasmática y disminución del volumen celular (Jin 2011).

Para que ocurra la ovulación en otro mes, un nuevo conjunto de folículos debe desarrollarse y acercarse a la superficie.

En un corte de ovario, puede haber muchos folículos atrésicos y si apenas están comenzando a experimentar este cambio, quizá sea difícil diferenciarlos de los folículos normales. Sin embargo, cuando la atresia ha persistido cierto tiempo crecen fibroblastos hacia el folículo en degeneración y lo sustituye por tejido conectivo. Dos signos tempranos de atresia son el desplegamiento del epitelio folicular y de la teca interna (o una rotura del epitelio folicular) y la presencia de núcleos picnóticos en las células foliculares. Quizá también se adviertan signos histológicos de muerte celular en el ovocito.

La observación de un pigmento sanguíneo y a veces vestigios de un coágulo sanguíneo que indica la aparición de una hemorragia sirve para diferenciar folículos atrésicos antiguos de cuerpos amarillos en degeneración, ya que los folículos atrésicos degeneran antes de madurar, y en consecuencia, no hay motivo para que haya ocurrido hemorragia.

1.3.6. Folículos preovulatorios

El último estadio de desarrollo del folículo es el preovulatorio (Fig. 7). El folículo aumenta de tamaño por multiplicación celular y acumulación del líquido folicular en el antro. En dos semanas, el folículo pasa de $6,9 \pm 0,5$ mm a $18,8 \pm 0,5$ mm entre los días 11-14 (Gougeon 1986). El folículo completamente desarrollado es tan

voluminoso en relación al grosor de la corteza ovárica que causa un abultamiento en la superficie de éstos. Además, al crecer el folículo disminuye el grosor de la corteza entre él y la superficie ovárica.

En los folículos preovulatorios se distinguen las siguientes formaciones:

- Una cavidad central o antro, rellena de líquido (líquido folicular).
- Capa granulosa, formada por varias hileras de células esféricas o cúbicas con escaso citoplasma. En una zona del folículo existe una acumulación de células granulosas que se proyectan hacia el interior del antro. En el interior de esta acumulación de elementos celulares está situado el ovocito, que alcanza en esta etapa alrededor de 110 μm . Este grupo de células, por un lado forman cuerpo con la capa granulosa y por el otro extremo hacen relieve en el antro, se denomina disco oóforo. La hilera de células de la granulosa, que se ponen en inmediato contacto con la célula germinal, se denomina corona radiada. Entre la corona radiada y la célula germinal existe una zona refringente llamada membrana pelúcida, que está compuesta por polisacáridos producidos por las células foliculares. Entre ésta y el ovocito existe con frecuencia una zona clara llamada espacio perivitelino.
- Teca interna, formada por células conjuntivas, fusiformes u ovaes, que se disponen en varias hileras que rodean la capa granulosa. El límite entre estas dos capas, teca y granulosa, es rectilíneo. Las células que componen esta capa, al igual que las células de la granulosa, son hormonalmente activas, es decir, producen hormonas esteroideas y sus citoplasmas contienen grasa y un pigmento amarillo. Esta capa contiene abundantes vasos, que se disponen formando un rico plexo vascular.
- Teca externa, constituida por células conjuntivas que se disponen por fuera de la teca interna. Estas células son fusiformes u ovaes, semejantes a las células que componen el estroma ovárico.

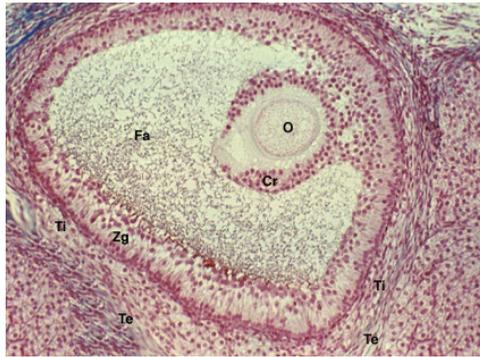


Figura 7.- Imagen de microscopio de un folículo preovulatorio indicando cada una de sus partes: o.- óvulo; Cr.- Zona pelúcida; Fa.- antro con liquido folicular; Zg.- células granulares; Ti.- teca interna; Te.- teca externa.

1.4. Maduración del ovocito

Para una adecuada competencia en el desarrollo posterior a la fecundación es muy importante que el ovocito haya adquirido competencia nuclear y citoplasmática.

Mientras el ovocito (ovocito primario) está localizado en el ovario, permanece en la profase avanzada de la primera división meiótica. Poco antes de salir del folículo ovárico, bajo la estimulación de la LH, el ovocito reinicia la meiosis. Tras esta división se separa el primer corpúsculo polar y entra en el espacio perivitelineo (Lasiene 2009). De este modo, el ovocito primario se convierte en ovocito secundario y, en el curso de este proceso, cada uno de los pares de cromosomas pierde una de las copias, que pasan a formar parte del corpúsculo polar expulsado. El ovocito secundario conserva solamente 23 cromosomas no emparejados. En ese momento, el óvulo, que permanece todavía en la fase del ovocito secundario, penetra en la cavidad abdominal. Después, casi de manera inmediata, se introduce a través de las fimbrias tubáricas en el extremo de una de las trompas. La segunda división meiótica se para en la metafase II que se completará si finalmente se produce la fecundación.

Tras la fecundación, el ovocito secundario se divide para formar el óvulo maduro y un segundo corpúsculo polar. Este óvulo maduro todavía presenta 23 cromosomas

en su núcleo (pronúcleo femenino). Posteriormente los 23 cromosomas sin pareja del pronúcleo masculino y los 23 cromosomas sin pareja del pronúcleo femenino se alinean para volver a formar una dotación completa de 46 cromosomas. Seguidamente comenzará el desarrollo embrionario.

La competencia citoplasmática se irá consiguiendo tras una serie de cambios citoplasmáticos que incluyen procesos celulares como la transcripción de RNAm (Hunter 1987, Kastrop 1991) traducción de proteínas (Sirard 1989), modificaciones post-traduccionales de proteínas (Levesque 1995) y cambio ultraestructurales (Kruip 1983, Hytell 1986).

Sin embargo, en ocasiones, todo este desarrollo folicular y el posterior desarrollo embrionario y fetal puede sufrir alteraciones provocando situaciones que den lugar a una esterilidad en la mujer.

2. ESTERILIDAD

La especie humana tiene un bajo potencial reproductivo. Además la capacidad reproductiva natural en el ser humano es complicada de establecer porque existen numerosos factores medioambientales que dificultan la obtención de datos concretos. Por otra parte, el rendimiento reproductivo se encuentra influido no solo por factores medioambientales sino también por factores intrínsecos a la naturaleza de la especie. (Bajo-Arenas 2009).

2.1. Definiciones de esterilidad

Existe gran confusión y controversia por parte de los profesionales dedicados a la reproducción humana para nombrar las diferentes situaciones que se pueden presentar dentro del campo de la esterilidad. Este hecho puede producir variaciones en los valores de prevalencia obtenidos (Larsen 2005).

La European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) para unificar criterios realiza las siguientes recomendaciones (The ESHRE Capri Workshop, 1996):

- **Fertilidad:** capacidad para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito.
- **Esterilidad o infertilidad:** incapacidad de la pareja para conseguir un embarazo tras un año de exposición regular al coito. Se considera esterilidad primaria cuando nunca se ha conseguido embarazo sin tratamiento y esterilidad secundaria si tras una gestación conseguida sin tratamiento, transcurren más de 12 meses sin conseguir un nuevo embarazo.

En la literatura anglosajona este concepto aparece como infertilidad (no utilizan el término “esterilidad”). Sin embargo, en nuestro caso diferenciamos los términos “infertilidad” (se logra el embarazo, pero no llega a ser viable - por ejemplo, pacientes con aborto de repetición-) y “esterilidad” (imposibilidad para concebir o lograr el embarazo).

- **Subfertilidad:** capacidad para conseguir embarazo sin ayuda médica pero en un periodo superior a un año.
- **Fecundabilidad:** probabilidad de conseguir un embarazo durante un ciclo menstrual.
- **Fecundidad:** capacidad para conseguir un feto vivo y viable en un ciclo menstrual con exposición al coito.

Existe un proyecto de la ESHRE (European Classification of Infertility Taskforce (ECIT)), en el que participan diferentes países europeos que pretende unificar el vocabulario relativo a la esterilidad. (Jenkins 2004).

2.2. Datos demográficos

En general, se estima que la esterilidad afecta al 10-15 % de la población occidental (Bajo-Arenas 2009) aunque existen diversos estudios en los que se proporcionan diversos valores de prevalencia (World Health Organization 1991, Larsen 2005, Lunenfeld 2004, Greenhall 1990, Boivin 2007). Estas variaciones en los valores obtenidos son debidas a las diferencias en las definiciones de esterilidad (Larsen 2005), de la metodología que se utiliza para obtener los valores y las diferencias entre países y continentes (Nachtigall 2006). Además los estudio demográficos, sólo describen parejas sin hijos, lo que conlleva a un sesgo de infravaloración (no se contabilizan las esterilidades secundarias, ni las parejas que han adoptado, ni las esterilidades tratadas con éxito) y uno de supervaloración (se contabilizan las esterilidades voluntarias) (Bajo-Arenas 2009).

Se ha observado que el número de nacimientos en muchos países, fundamentalmente europeos, ha disminuido drásticamente en los últimos años (Fig. 8) y unas 80 millones de personas en el mundo tienen problemas de fertilidad (Nachtigall 2006). Además, diversos estudios muestran un progresivo aumento en la necesidad de tratamientos de reproducción asistida (Nyboe Andersen 2004, Nygren KG 2001a, Nygren KG 2001b, Nygren KG 2002).

Aunque existe una lucha, fundamentalmente por parte de los países desarrollados, para controlar y contener el crecimiento de la población, la mayoría de estos países tienen tasas de fertilidad que están por debajo de lo requerido para mantener su población actual, siendo Europa el continente con menores rangos de fertilidad (The ESHRE Capri Workshop Group 2010). Los rangos de fertilidad de Europa, de 1.5 niños por pareja, están por debajo de los 2.1 niños por pareja necesario para mantener estable su población (Ziebe 2008, Commission of the European Communities 2006, Commission of the European Communities 2007).

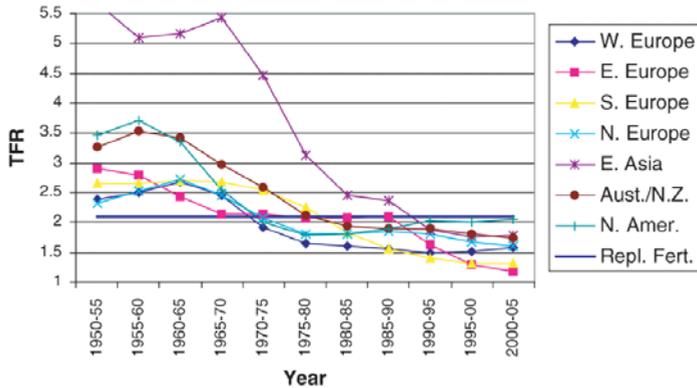


Figura 8.- Gráfica de los rangos de fertilidad total (TFR) en diversas regiones geográficas del mundo desde 1950 hasta 2005 (Morgan 2006).

Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, a pesar de que los intervalos de fertilidad son más elevados, también existen casos de infertilidad, atribuidos generalmente a diversos factores. Por ejemplo, deficiencias en las dietas de iodo y selenio (Longombe, 2000), exposición a las aflatoxinas que habitualmente contaminan los alimentos en países tropicales (Ibeh, 1994) y a tóxicos ambientales y ocupacionales como el arsénico, metales pesados, plomo, disolventes, pesticidas y químicos industriales (Mattison, 1991; Shahara, 1998, Younglai 2005) y el consumo de alcohol, tabaco y cafeína, que han sido relacionados con la disminución de la fertilidad tanto en hombres como en mujeres (Curtis 1997, Chang 2006, Kinney 2007). Pero el factor dominante que conduce a elevadas tasas de esterilidad en estos países son las infecciones pélvicas transmitidas sexualmente, como gonorrea y clamidia, o adquiridas después de abortos o partos, debido a los inadecuados servicios de atención médica (Sciarra, 1994; World Health Organization 2001). Esas infecciones pélvicas pueden conducir a salpingitis y peritonitis pélvica con el resultado de cicatrices en las trompas y esterilidad.

Por otro lado, los cambios en los valores de fertilidad en los países industrializados podrían ser debidos a distintos factores tanto sociales como culturales y económicos. La percepción del tamaño ideal de familia han disminuido en muchos países,

además los datos de fertilidad han descendido porque las parejas eligen no tener hijos, tener menor cantidad de niños, o posponer el tener hijos, todo ello debido a factores económicos, a la incorporación de la mujer al mercado laboral, a la tendencia a un matrimonio más tardío,... (Billari 2006, Coleman 2007, McDonald 2007, Testa 2007).

Dado que la fertilidad es el principal determinante del futuro tamaño y composición de la población en Europa, la consecuencia de este descenso en el número de nacimientos, junto con el aumento de la esperanza de vida, es el envejecimiento de la población que se está produciendo en los últimos tiempos y cuyo empeoramiento se prevé para los próximos años (Fig. 9). Este cambio demográfico puede tener graves consecuencias tanto sociales como económicas debido a la disminución de la población con edad de trabajar y consecuentemente del PIB (Ziebe 2008).

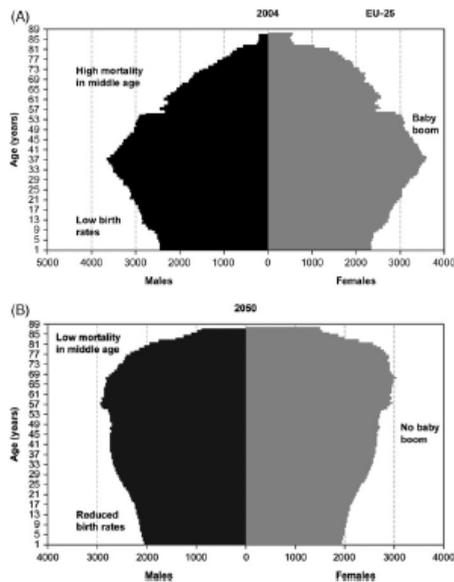


Figura 9.- Pirámide poblacional para (A) 2004 y (B) proyecciones para 2050 (Ziebe 2008).

Además, la infertilidad conlleva, a nivel individual, una serie de consecuencias negativas en las personas que padecen estas alteraciones, que van desde alteraciones fisiológicas, hasta psicológicas o sociales (Cousineau 2007).

Las causas de la esterilidad pueden ser tanto masculinas como femeninas, mixtas o múltiples. Además de la Esterilidad de origen desconocido.

2.3. Etiología de la esterilidad femenina

Las causas capaces de producir esterilidad femenina son muy numerosas y puede ser por: alteraciones del cérvix, causas uterinas (corporales), causas endometriales, alteraciones tubáricas, alteraciones ováricas, causas vulvares y vaginales, causas inmunitarias, factores hipotalámico-hipofisarios, alteraciones orgánicas o funcionales de la suprarrenal y del tiroides, factores cromosómicos y causas psicológicas. (González-Merlo 2003).

Además existen diversos factores que afectan a la fertilidad como son la edad y factores del estilo de vida.

Edad

Como se ha mencionado anteriormente, la proporción de mujeres que tienen su primer hijo después de los 35 años ha aumentado considerablemente en los últimos años. De hecho, en USA, el número de nacimientos (por 1000) de mujeres entre 35-39 años ha aumentado desde 19.0 en 1976 a 37.4 en 1998 (Ventura 1988, Guyer 1999).

Muchos estudios han concluido que mujeres con edad mayor ó igual de 35 años tienen una mayor frecuencia de varios eventos reproductivos adversos: esterilidad, abortos espontáneos, complicaciones en el embarazo, anomalías congénitas, mortalidad materna y mortalidad perinatal (Schwartz 1982, Newcomb 1991, Nyboe Andersen 2000, Djahanbakhch 2007).

Aunque tanto la edad del hombre como de la mujer están implicados en el aumento del riesgo de abortos espontáneos con el aumento de la edad, la edad avanzada de la mujer tiene un papel más importante (Fig. 10) (De La Rochebrochard, 2002).

		Maternal Age		
		20-29 Years	30-34 Years	35-44 Years
Paternal Age	20-29 Years	Standard Risk	High Risk	
	30-34 Years		High Risk	
	35-39 Years		High Risk	
	40-64 Years	High Risk	Highest Risk	

Figura 10.- Edad de parejas asociado a riesgo de aborto espontáneo, Estudio Europeo de Infertilidad y subfertilidad, 1991-1993 (n = 3174). (de la Rochebrochard, 2002).

Diversos estudios concluyen que la fecundidad disminuye conforme aumenta la edad de la mujer (Menken 1986, Spira 1988, Dunson 2004). La proporción de fertilidad en la mujer permanece relativamente estable hasta la edad de 30-32 años, a partir de esta edad comienza a disminuir y a partir de los 35 años estos valores decrecen con mayor intensidad (Fig. 11) (Menken 1986, Leridon 2004).

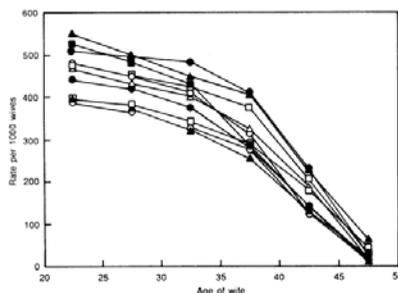


Fig. 1. Marital fertility rates by 5-year age groups (5). The ten populations (in descending order at age 20 to 24) are Hutterites, marriages 1921-30 (▲); Geneva bourgeoisie, husbands born 1600-49 (■); Canada, marriages 1700-30 (●); Normandy, marriages 1760-90 (○); Hutterites, marriages before 1921 (□); Tunis, marriages of Europeans 1840-59 (△); Normandy, marriages 1674-1742 (●); Norway, marriages 1874-76 (□); Iran, village marriages, 1940-50 (▲); Geneva bourgeoisie, husbands born before 1600 (○).

Figura 11.- Rangos de infertilidad conyugal con respecto a la edad de la mujer (Menken 1986).

Generalmente se ha sugerido que la mayor causa de esta disminución en la fertilidad se debe a la edad de los ovocitos (Abdalla, 1990; Abdalla, 1993; Navot 1991, The ESHRE Capri Workshop Group 2005). La implantación y el desarrollo temprano del embrión también pueden estar afectados por la edad maternal ya que incluso en la donación de ovocitos el número de abortos espontáneos aumenta con la edad de la mujer receptora (Speroff, 1994; Cano, 1995).

La relación entre el aumento de la edad maternal y el incremento de la incidencia de alteraciones cromosómicas también ha sido ampliamente analizada en múltiples estudios epidemiológicos (Hassold 1984, Sherman 2005).

Por otro lado, las complicaciones obstétricas aumentan considerablemente en mujeres de edad avanzada (Joseph 2005, Jacobsson 2004, Cnattingius 1992, Salihu 2003, FASTER Consortium 2005, Gilbert 1999, Berkowitz 1990, Bianco 1996), como son las complicaciones antes o durante el parto, la diabetes gestacional, desórdenes de hipertensión del embarazo, placenta previa. También aumenta el riesgo de sufrir eventos perinatales adversos (Hansen 1986, Cnattingius 1993).

Además el número de folículos disminuye desde la semana 20 de gestación y continúa durante toda la vida de la mujer. En la semana 20 de gestación el número de células germinales ha alcanzado los 7 millones de células germinales, que disminuyen hasta un millón en el momento del nacimiento y a unos 300000 por ovario en la pubertad, hasta una depleción completa en la menopausia. La fertilidad comenzaría a disminuir a los 31 años y a partir de los 41 años podría considerarse que la etapa de fertilidad de las mujeres ha terminado (Te Velde 1998) (Fig. 3).

Factores del estilo de vida

La literatura tiene claramente identificados una serie de factores del estilo de vida modificables que impactan potencialmente en la fertilidad de la población.

La mayoría de estos factores son alterables y las parejas que están intentando concebir deberían ser aconsejadas e informadas acerca de sus factores individuales del estilo de vida (Homan 2007). Algunos de estos factores son:

- **Obesidad y dieta:** la obesidad es un problema que está aumentando rápidamente en los últimos años, afectando a más de un millón de personas en todo el mundo (Haslam 2005). La obesidad está asociada con bajas proporciones de embarazos en mujeres con ciclos ovulatorios regulares (Van der Steeg 2008). Además es un factor de riesgo conocido para la anovulación, que conduce a la esterilidad (Norman 1998, Moran, 1999, Nelson 2007).

Por otro lado se ha demostrado una relación entre el estatus nutricional de la madre y los resultados negativos en el embarazo (Fall 2003, Keen 2003). El inicio del embarazo es un periodo vulnerable para el desarrollo embrionario y fetal y el ambiente en el momento de la concepción puede impactar en el desarrollo del embrión y la salud a largo plazo del niño (Chapin 2004).

- **Tabaco:** el consumo de tabaco ha sido asociado con efectos adversos en la fertilidad, aunque esto no está ampliamente reconocido (Roth 2001). En la mujer podría afectar al microambiente folicular y alterar los niveles hormonales en la fase luteal. Se han detectado cadmio y cotinina (metabolito de la nicotina) en el líquido folicular de mujeres fumadoras y con parejas fumadoras, teniendo acceso al desarrollo del folículo (Younglai 2005). Además la menopausia parece ocurrir 1-4 años antes en mujeres fumadoras que en no fumadoras (Baron 1990). Por último, un estudio demostró un aumento en el grosor de la zona pelúcida en fumadoras lo que podría hacer más difícil la penetración del espermatozoide al óvulo (Shiloh 2004).
- **Cafeína:** El consumo de cafeína ha sido asociado con fecundidad reducida en la población general (Wilcox 1988). La cafeína podría afectar a la reproducción femenina por alteración de la ovulación y la función del cuerpo lúteo a través de

modificaciones en los niveles hormonales (Klonoff-Cohen 2002) y ha sido asociado con altos niveles tempranos de E2 (Lucero 2001).

- **Alcohol:** El alcohol es un conocido teratógeno (Randall 1987, Chaudhuri 2000). Niveles moderados de consumo (7-8 bebidas por semana) han sido asociados con fertilidad reducida y con un alto riesgo de aborto espontáneo (Grodstein 1994). Niveles tan bajos de consumo de alcohol como una bebida por semana también ha sido asociado a una tasa de concepción reducida (Hakim 1998).

Se ha mostrado que el consumo de alcohol tiene efectos adversos en los resultados de embarazos, siendo la etapa más vulnerable para el feto las primeras semanas tras la concepción. (Day 1989, Collier 2002).

- **Contaminantes ambientales:** tóxicos ambientales y ocupacionales como el arsénico, metales pesados, plomo, disolventes, pesticidas y químicos industriales (Mattison, 1991; Shahara, 1998) influyen en la fertilidad de las mujeres.

La esterilidad de origen desconocido

La esterilidad inexplicada es un diagnóstico de exclusión, cuando la investigación diagnóstica de la pareja descartó otras causas posibles. No significa que no hay razón para la esterilidad, pero la causa no se ha podido identificar aún. Aproximadamente el 25-30% de las parejas estériles pertenecen a este grupo (Evers 2002).

3. REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Para solucionar estos problemas de fertilidad se han desarrollado los tratamientos de Reproducción Asistida (RA). Existen varias técnicas de RA en función del problema que este causando la esterilidad.

3.1. Inseminación artificial

La Inseminación Artificial (IA) es una Técnica de Reproducción asistida que consiste en depositar espermatozoides de una forma no natural en el aparato reproductor de la mujer en su período ovulatorio con el objetivo de lograr una gestación. De esta manera se intenta acortar la distancia que separa óvulo y espermatozoide y facilitar el encuentro entre ambos (Bonilla-Musoles 2010).

El procedimiento para llevar a cabo esta técnica comienza con una inducción de la ovulación para obtener un mayor número de ovocitos. Seguidamente se realiza un control de la foliculogénesis para lograr la sincronización entre ovulación y día de la inseminación. Posteriormente, se realiza una capacitación del semen para lograr el mayor número y con la mayor motilidad de los espermatozoides, la inseminación a las 24-48 horas y finalmente, un control de la fase lútea.

La IA se puede realizar tras el control del ciclo natural de la mujer, sin estimular su ovulación en caso de mujeres normoovuladoras. Sin embargo, los resultados son siempre mejores si provocamos un desarrollo folicular múltiple mediante una estimulación ovárica (The ESHRE Capri Workshop Group 2009). Aumentando el nº de ovocitos, aumentamos las tasas de embarazo, pero incluimos el riesgo de gestación múltiple, por lo que siempre se debe tener como objetivo la estimulación suave y controlada y conseguir una gestación única.

3.2. Fecundación in vitro

La Fecundación In Vitro (FIV) consiste en realizar la fecundación de los gametos femeninos (ovocitos) fuera del organismo de la mujer y la transferencia del embrión hacia el útero de la madre, donde se produce la implantación y el desarrollo embrionario como en un embarazo normal (González–Merlo 2003). Esta técnica se introdujo en 1978 (Stephoe 1978).

En este caso también se comienza con una estimulación ovárica para el desarrollo folicular múltiple e incrementar así la posibilidad de embarazo. Posteriormente se

realiza la captación ovocitaria mediante aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal. La inseminación de los ovocitos o microinyección-ICSI se puede realizar empleando la técnica ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Palermo 1992)). Finalmente se realiza la transferencia embrionaria.

3.3. Donación de ovocitos

En la donación de ovocitos el gameto femenino es aportado por una mujer distinta a la que recibirá éste o el embrión resultante. Desde la descripción de la primera gestación obtenida mediante esta técnica por Trounson *et al* en 1983 (Trounson 1983), y la primera gestación a término en 1984 por Lutjen *et al* (Lutjen 1984), su difusión ha crecido paulatinamente, debido tanto a los excelentes resultados obtenidos como a la ampliación de sus indicaciones.

Existen varias condiciones que debe cumplir una mujer para ser donante de ovocitos. De acuerdo con la legislación vigente en España (Ley 14/2006), las donantes deberán tener más de 18 años (en el IVI la edad debe estar comprendida entre 18 y 35 años), buen estado de salud psicofísica y plena capacidad de obrar. Deberá cumplir las exigencias de un estudio que incluirá sus características fenotípicas y psicológicas, así como las condiciones clínicas y determinaciones analíticas necesarias para demostrar que los donantes no padecen enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia, en el IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad) debe poseer un historial negativo para enfermedades de transmisión genética, y estudio negativo para sífilis, toxoplasma, rubeola, gonorrea, clamidia, hepatitis B y C y HIV (World Health Organization 1993) determinado previamente a la estimulación. Para obtener esta información las donantes son entrevistadas por los ginecólogos, además de realizarles una exploración ginecológica completa y una anamnesis. A continuación, tras las pruebas que descartan la presencia de enfermedades hereditarias e infecciosas, se programa un ciclo de reproducción asistida igual que para las pacientes infértiles y

se programa la recuperación de los ovocitos, mediante aspiración transvaginal guiada por ecografía y sedación general.

3.4. Estimulación ovárica

La estimulación ovárica (Remohí 2008) consiste en una inducción de la ovulación mediante diversos compuestos para obtener un mayor número de ovocitos que pueden ser empleados para las distintas técnicas de RA aumentando, de esta manera, las tasas de embarazo.

En la actualidad se dispone de un gran número de fármacos que se emplean en la estimulación ovárica en ciclos de RA.

1.- **Citrato de Clomifeno (CC):** Produce un incremento de Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH) con el aumento estable y progresivo de los niveles de estradiol al unirse con los receptores estrogénicos del hipotálamo, bloqueando la retroalimentación negativa del estradiol y activando la secreción de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Tras la supresión del tratamiento disminuyen los niveles de gonadotropinas hasta que el pico estrogénico endógeno provoca una nueva oleada de gonadotropinas a mitad de ciclo, desencadenando la ovulación.

2.- **Inhibidores de la aromatasa:** Bloquean la retroalimentación negativo que ejercen los estrógenos sobre el eje hipotálamo-hipofisario y que supondría un aumento de la FSH y de la LH. Además en el folículo produciría un aumento de los andrógenos, lo que aumentaría la expresión de receptores intrafoliculares para la FSH y estimularía también otros factores endocrinos y paracrinicos en éste.

4.- **Dexametasona:** Las pacientes con hirsutismo y niveles séricos elevados de andrógenos, son más resistentes al CC. Con este fármaco se consigue una disminución de los niveles de andrógenos en el microambiente folicular.

5.- Gonadotropinas

- Gonadotropina menopáusica humana (hMG): contiene tanto actividad FSH como LH. La hMG con su componente FSH recluta folículos ováricos y estimula su crecimiento.
- FSH y LH recombinante.
- Análogos de la GnRH: Agonistas y Antagonistas.

Los análogos de la GnRH son péptidos sintéticos que han sufrido modificaciones en su estructura para alterar su afinidad con el receptor de la GnRH. Antes de la aparición de estos análogos, en muchas de las mujeres sometidas a estimulación ovárica (con gonadotropinas exógenas) los tratamientos de RA eran cancelados por ovulaciones prematuras secundarias a la elevación precoz de la LH. Sin embargo, hoy en día su uso no sólo evita el pico prematuro de LH, sino que también produce un incremento de las probabilidades de embarazo, al aumentar el número de ovocitos aspirados y fecundados, y, por tanto, aumentando también el número de embriones disponibles para transferir.

Los Agonistas tienen mayor afinidad sobre el receptor que la GnRH natural. Estos agonistas dan lugar a un aumento inicial de la liberación de FSH y LH (efecto “flare up” o llamarada). Su efecto induce la aparición de un mayor número de receptores de la GnRH, “Upregulation”. Posteriormente, tras su uso de forma mantenida se produce una internalización del complejo receptor-molécula GnRH que conlleva a una disminución del número de receptores, que produce una regulación a la baja o desensibilización (downregulation). La hipófisis se hace refractaria a la estimulación por GnRH, conduciendo a una disminución de las gonadotropinas circulantes. Esta supresión conlleva un tiempo de tratamiento que como mínimo es de una semana.

Los Antagonistas actúan de forma competitiva, uniéndose al receptor, bloqueándolo, provocando así la supresión hipofisaria, profunda e inmediata, en el transcurso de unas horas. Este mecanismo de acción permite administrar los antagonistas GnRH en el transcurso de la estimulación ovárica. Con ellos se consigue en 4-8h lo que con los agonistas en 12-20 días y además no existe fenómeno de “flare-up”.

Existen dos situaciones especiales que se pueden dar con la estimulación ovárica:

- **Baja respuesta a la estimulación ovárica** que implica un fallo en alcanzar un cierto número de folículos o un nivel particular de estradiol en suero tras la estimulación ovárica controlada (Keay 1997). No existe un consenso claro para su definición que varía de un grupo a otro. Algunos autores consideran baja respuesta (Serafini 1988) cuando se producen menos de tres folículos a pesar de una adecuada estimulación. Otros establecen el punto de corte en cuatro folículos (Jenkins 1991). Finalmente, algunos autores utilizan tanto el número de folículos como el valor del pico de estradiol de 300 pg/ml durante la estimulación ovárica en su definición de baja respuesta (Fenichel 1989). Finalmente, se ha producido un consenso que recoge los criterios mínimos que definen este trastorno (al menos dos de las siguientes características deben estar presentes): i) Edad maternal avanzada (≥ 40) o cualquier otro factor de riesgo para la baja respuesta ovárica; ii) Baja respuesta ovárica previa (≤ 3 ovocitos con un protocolo de estimulación convencional); iii) Test de reserva ovárica anormal.

- **Alta respuesta a la estimulación ovárica** que ocurre cuando la paciente responde con un mayor número de ovocitos al deseable. La alta respuesta se definió en varios estudios previos en pacientes con altos niveles de estradiol, por encima de 3000 pg/mL el día de la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Simon 1995) ó cuando se recuperan, tras una estimulación ovárica controlada, 10-15 ovocitos (Pellicer 1996, Toner 1990).

Debido a la aparición del síndrome de hiperestimulación ovárica y de embarazos múltiples existe una tendencia a recurrir a los ciclos naturales o a la estimulación ligera.

3.5. Ciclo ligero

En los últimos años la disponibilidad clínica de los antagonistas de GnRH ha facilitado el desarrollo de protocolos de estimulación ligeros para FIV (Fauser 2005).

Este protocolo consiste en un ciclo natural, pero utilizando antagonistas para evitar la ovulación precoz. En muchas ocasiones se inicia una dosis suave de gonadotropinas junto con el antagonista para evitar que se bloquee el desarrollo del folículo.

En la literatura más reciente se están acumulando evidencias a favor de la estimulación ovárica ligera. Particularmente jóvenes, pacientes buenas respondedoras y pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) podrían beneficiarse de este tipo de estimulación. Sin embargo, un asunto importante con respecto al uso de la estrategia de tratamiento ligero es la reducción por ciclo de la probabilidad de embarazo (Verberg 2009).

3.6. Ciclo natural

El primer embarazo mediante FIV se consiguió a partir de un ciclo natural (Stephoe 1978), es decir, sin utilizar estimulación ovárica, y de hecho, fue el método de elección durante los primeros años de la RA. Sin embargo, su uso fue abandonado debido a las bajas tasas de implantación y embarazo que se conseguían, así como debido a la elevada tasa de cancelación de los ciclos debido a las ovulaciones espontáneas.

Un ciclo natural en FIV se basa en la obtención de ovocitos de una paciente sin tener que recurrir a la estimulación ovárica, de forma que se aprovecha el ciclo menstrual

de la mujer. Así, cuando el folículo del ovario alcanza el tamaño compatible con un ovocito maduro, generalmente alrededor de 17-18 mm de diámetro medio y se observa un pico de LH endógeno, se programa la punción folicular para obtener el ovocito que va creciendo y madurando dentro del folículo ovárico. El ovocito, una vez en el laboratorio, es procesado para su FIV de la misma forma que los ovocitos obtenidos por estimulación ovárica controlada.

Este tipo de ciclos presentan una serie de ventajas frente a los ciclos estimulados al evitar la aparición de las complicaciones anteriormente mencionadas (está asociado a riesgo 0 de síndrome de hiperestimulación ovárica y riesgo 0 de embarazos múltiples) y, por ciclos, se reducen los costos, ya que requiere mucha menos medicación hormonal. Además son más simples, menos agotadores tanto física como emocionalmente, no consumen tanto tiempo y se pueden repetir ciclos consecutivos (Pelinck 2002). A esto hay que añadir los efectos del tratamiento hormonal a largo plazo que aún se desconocen (Brinton 2005). Algunos autores indican que podría relacionarse a un mayor riesgo frente al cáncer de mama y ovario (Bristow 1996).

Además, en los últimos años se está estudiando sobre el posible efecto negativo que puede tener la estimulación ovárica sobre la calidad ovocitaria y por consiguiente, sobre la calidad de los embriones generados in vitro. Ésta es una cuestión que se mantiene en controversia debido, en gran medida, a los pocos ciclos naturales que se llevan a cabo en la actualidad con los que se puedan establecer comparaciones.

Se cree que elevadas dosis de gonadotropinas durante los ciclos de estimulación ovárica pueden ejercer un posible efecto deletéreo sobre el estado cromosómico de los ovocitos y consecuentemente de los embriones generados a partir de estos ovocitos (Soares 2003). Por ejemplo, se ha sugerido que estimulaciones más severas pueden facilitar errores de segregación de los cromosomas durante la mitosis (Baart 2007).

El inconveniente de los ciclos naturales es su menor efectividad debido a la alta tasa de cancelación, fundamentalmente por el aumento prematuro de LH y ovulación precoz (Pelinck 2002).

Sin embargo, existen cada vez más datos que apoyan los beneficios de los ciclos naturales. Algunos estudios proporcionan tasas acumuladas de embarazo y recién nacido vivo tras cuatro ciclos consecutivos muy aceptables, del 46% y 32% respectivamente (Nargund 2001). Otros estudios que comparan los resultados de ambos tipos de estrategias observan tasas de implantación y recién nacido vivo por ciclo iniciado similares entre ellas (Lukassen 2003). La combinación del ciclo natural de FIV y el cultivo prolongado in vitro de embriones hasta estadio de blastocisto (Día 5 ó 6) ha mejorado las tasas de implantación, consiguiendo resultados de alrededor del 53% (Trokoudes 2005).

Así pues, la utilización de ciclos naturales está recobrando mucha importancia, por varios motivos; el primero por la eliminación del uso de las gonadotropinas exógenas para la inducción de la estimulación, lo cual conlleva la supresión de los efectos secundarios así como los costes económicos del tratamiento per se; el segundo por el mejor manejo de los ciclos que evitan ovulaciones espontáneas y el tercero, por el elevado grado de sofisticación de los laboratorios de embriología clínica en donde existe un mejor control de los parámetros que influyen directamente sobre la viabilidad embrionaria, como la calidad del aire, la temperatura, los niveles de oxígeno durante el cultivo, etc. (De los Santos 2002).

4. EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN OVOCITARIA

La importancia del ovocito en el desarrollo adecuado del embrión, antes, durante, y tras el proceso de la implantación es incuestionable (Hunter 2000, Krisher 2004) ya que el ovocito contribuye en la formación del cigoto con la aportación de su citoplasma y la mitad del ADN nuclear.

Durante la estimulación ovocitaria se van a generar ovocitos de diferentes tamaños, sin embargo, no todos serán maduros, es decir, no todos los ovocitos que se

recuperan serán receptivos a ser fecundados tras su inseminación. Únicamente serán receptivos aquellos que hayan llegado a la segunda metafase de la división meiótica.

Para tener una idea aproximada del grado de maduración de los ovocitos, se le asigna un grado madurativo que depende del aspecto morfológico y el grado de expansión de las células del cúmulo (Wang 2007, Lasiene 2009, Rienzi 2011). Este grado de expansión no siempre se correlaciona con el estado de maduración, lo que da un carácter subjetivo a esta clasificación.

Además del aspecto de los complejos corona-cúmulo-ovocito, los ovocitos ya aislados tienen su propia morfología. Cuando se separa la capa de células del cúmulo para preparar los ovocitos, además de conocer la madurez nuclear hay que evaluar la morfología ovocitaria y todas sus variedades dismórficas, ya que alteraciones en la madurez nuclear y citoplásmica pueden causar alteraciones en la morfología ovocitaria.

La valoración de la morfología ovocitaria se hace observando la apariencia de la Zona Pelúcida (ZP), el espacio perivitelino, el corpúsculo polar, la forma del ovocito y su citoplasma (Lasiene 2009, Rienzi 2011).

En cuanto a la forma, el ovocito debe ser prácticamente esférico. El corpúsculo polar debe ser único, equilibrado y bien delimitado. El espacio perivitelino de ovocitos con un buen pronóstico debe ser prácticamente virtual, no observándose ninguna zona más amplia que aquella en la que está el corpúsculo polar. Los ovocitos en metafase II (MII) de buena morfología deben de mostrar un citoplasma claro, con ausencia de tonalidades, granulosidad moderada y ausencia de inclusiones. La zona pelúcida de un ovocito normal debe de ser proporcionada, definida y regular. El grosor de la zona pelúcida varía de 10 a 31 micras con una media de 17,5 micras.

Además, se ha observado que existe una relación entre la birrefringencia de la ZP y la calidad embrionaria. Varios estudios demuestran que los ovocitos con alta birrefringencia generan embriones con una mayor tasa de implantación y embarazo. Estos estudios están de acuerdo con el presente en el que se demuestra que la

puntuación de la birrefringencia de la zona pelúcida influye tanto en la tasa de fertilización como en la calidad embrionaria (De Almeida 2010).

Estas características morfológicas son actualmente el principal criterio de selección de ovocitos que se emplearán en los tratamientos de reproducción asistida, (Wang 2007, Lasiene 2009, Rienzi 2011), sin embargo, estos protocolos indicadores de calidad del ovocito no son completamente satisfactorios (Balaban 2006). Por esta razón, en los últimos años se está tratando de encontrar otros marcadores que definan la idoneidad de los ovocitos para el uso en técnicas de reproducción asistida. Una de las tendencias actuales es la búsqueda de biomarcadores de calidad ovocitaria en el líquido folicular.

5. LÍQUIDO FOLICULAR

El LF es un biofluido que rodea al ovocito en crecimiento y que se forma durante una de las etapas del desarrollo folicular. Este líquido juega un importante papel en la maduración de los ovocitos ya que les proporciona los nutrientes y factores necesarios para su desarrollo.

5.1. Formación del líquido folicular

En 1974, RG Edwards describió el líquido folicular como un derivado de plasma sanguíneo de los capilares de la teca y secreciones sintetizadas en la pared del folículo (Edwards 1974) indicando que su composición reflejaba cambios en los procesos secretores de la capa granulosa y de la teca interna y alteraciones en los componentes del plasma debidos a procesos fisiológicos o patológicos.

La formación del líquido folicular comienza cuando la teca está vascularizada. Inicialmente, los capilares no son abundantes en la región del córtex ovárico que contiene folículos primordiales (Van Wezel 1996, Herrmann 1998), y en la mayoría de las especies se desarrollan generalmente como una red simple alrededor de folículos en estadios preantrales (Jiang 2002). La red de capilares continúa su desarrollo y expansión conforme el folículo va creciendo. La vascularización del

folículo puede variar entre folículos dominantes y subordinados (Acosta 2007, Berisha 2005), difiere entre folículos con ovocitos de diferente calidad (Huey 1999), o disminuye en la atresia folicular (Jiang 2003, Clark 2004). Además, alteraciones en la presión y flujo capilar tecal de sangre podría alterar la formación del líquido folicular.

Para que el fluido sea transportado al interior del folículo (antro) desde la teca es necesario que atraviese el endotelio y la lámina basal subendotelial antes de atravesar el intersticio tecal, la lámina basal folicular y la membrana granulosa (Fig. 12). Cambios en la permeabilidad de los capilares de la teca conducirán a un edema de los tejidos de la teca (Espey 1980, Cavender 1988).

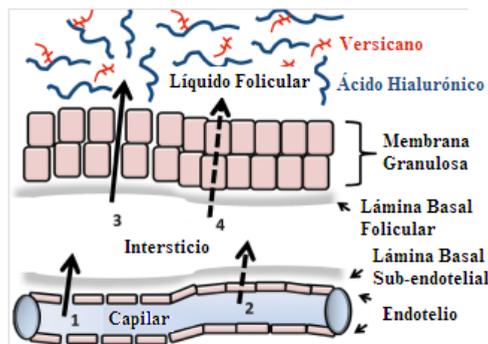


Figura 12.- Ruta que sigue el fluido para su transporte desde el capilar tecal hasta el antro, donde se acumula el líquido folicular.

Sin embargo es necesario un mecanismo adicional para la acumulación de líquido en el antro. En un estudio sobre este hecho (Clarke 2006) se mostraron evidencias de la presencia de moléculas grandes osmóticamente activas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, en el líquido folicular que pueden ejercer una presión osmótica. Estos glicosaminoglicanos y proteoglicanos son demasiado grandes para difundir libremente del folículo y podrían contribuir a la acumulación del líquido folicular al producir un potencial osmótico en el antro del folículo.

Barrera hemato-folicular

La composición del líquido folicular es similar al suero con respecto a los componentes de bajo peso molecular, siendo, en la mayoría de los electrolitos, las mismas concentraciones tanto en el líquido folicular como en el suero (Gosden 1988, Shalgi 1972). Sin embargo, para tamaños mayores de 100 kDa, las proteínas plasmáticas se encuentran progresivamente en menores concentraciones que en plasma (Andersen 1976). Esto sugiere la existencia de una barrera hemato-folicular para tamaños de 100 kDa (Clarke 2006). Esta barrera probablemente existe a nivel de la lámina basal folicular y adicionalmente a nivel de los capilares de la teca, especialmente para moléculas grandes (Zhou 2007). De la misma manera que esta barrera impediría la entrada al folículo de moléculas de determinado tamaño, también impediría el transporte en sentido inverso, es decir, que moléculas grandes producidas por el ovocito o por las células de la granulosa tampoco podrían atravesar la membrana de la granulosa o la lámina basal folicular.

5.2. Propiedades físicas

Temperatura

La temperatura del líquido Folicular es menor que la temperatura corporal y del estroma ovárico (Fisch 1990). La temperatura en los folículos de conejo fue $2.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ menor que la corporal y $1.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ menor que en el estroma ovárico. No se observaron diferencias entre las temperaturas obtenidas de folículos grandes y pequeños, y diferentes condiciones de medida dieron resultados similares (Grinstead 1980). El significado fisiológico de este gradiente es desconocido.

Volumen

El tamaño folicular aumenta exponencialmente previamente a la ovulación (Fisch 1990). El líquido folicular comienza a acumularse cuando el folículo alcanza un diámetro de unos 0.3 mm (Gosden 1987). O'Herlihy et al. (O'Herlihy 1980) mostraron que el tamaño medio folicular en ciclos espontáneos fue de 21 mm, que

correspondía a un volumen medio de líquido folicular de 5.1 ml. En diversos estudios se ha observado una relación directa entre el volumen del líquido folicular y los resultados en IVF (Quigley 1982, Scott 1989, Simonetti 1985).

Color y Absorbancia Espectrofotométrica

El Líquido folicular es descrito como un líquido de color amarillento o pajizo (Edwards 1974). Pero la intensidad de su color amarillento varía. Para la cuantificación de los pigmentos presentes se analizó el patrón de absorbancia espectrofotométrica de los líquidos foliculares en el espectro visible. En un estudio se identificaron dos picos en el espectro del amarillo a 415 y 455 nm, pero la cantidad de absorbancia varió entre los folículos individuales. También se observó que los ovocitos fertilizados pertenecían a los folículos cuyo líquido folicular tuvo una absorbancia a 455 nm, mayor que los ovocitos rechazados para la fertilización (Bayer 1988, Bayer 1990).

Viscosidad e Índice de Refracción

El líquido folicular también se ha descrito como un fluido ligeramente viscoso. (Edwards 1974). La viscosidad será determinada principalmente por su contenido en proteínas. Se ha determinado la viscosidad y el índice de refracción del Líquido folicular (Fisch 1996). Los resultados sugieren que el líquido folicular se comporta como un fluido No-Newtoniano, es decir, que su viscosidad cambia a diferentes tasas de cizallamiento. Además ni la viscosidad ni el índice de refracción del líquido folicular mostraron correlación con los resultados en FIV.

Contenido de electrolitos y Osmolaridad

La osmolaridad del líquido folicular es igual que la del plasma (Edwards 1974, Shalgi 1972, Gosden 1988, Chong 1977). Además, no se identificaron gradientes de concentración (líquido folicular frente a plasma) con respecto a los principales electrolitos: sodio, potasio (Edwards 1974, Shalgi 1972, Chong 1977), cloro (Shalgi 1972, Chong 1977), magnesio y calcio (Chong 1977). Asimismo, no se ha

encontrado información que relacione las medidas de electrolitos o de la osmolaridad en el líquido folicular con los resultados en IVF (Fisch 1990).

pH y Gases

Shalgi et al (Shalgi 1972), determinaron que el valor del pH del líquido folicular (7.267 ± 0.013) era menor al valor normal de suero aceptado en humanos (7.36-7.44) y que aunque $p\text{CO}_2$ es el mayor determinante del pH en el líquido folicular, este fluido debe además contener una gran cantidad de ácidos no volátiles.

Sin embargo, posteriormente se indicó que el pH del líquido folicular humano era similar al del suero y que era mayoritariamente controlado por $p\text{CO}_2$ (Edwards 1974).

Presión intrafolicular (Fisch 1990)

En estudios iniciales (Zachariae 1958a, Zachariae 1958b) se determinaron las presiones intrafoliculares en folículos preovulatorios de rata apreciándose un aumento de la presión previo a la ovulación, lo cual sugirió que este podría ser el mecanismo por el cual se produce la rotura del folículo (ovulación).

Sin embargo, en un estudio posterior, la presión media en folículos preovulatorios de conejo fue de 17 mm Hg y de 50 mm Hg para los folículos preatrésicos. Además se observó una disminución en la presión de 5 mm Hg en el momento de la ruptura del folículo (ovulación) pero sin aumento preovulatorio de ella (Espey 1963). Asimismo, en otro experimento se observó que impidiendo la ovulación no se producen cambios en la presión intrafolicular y que la inyección de fluido, es decir, del volumen del líquido folicular no produciría un aumento de dicha presión, posiblemente por el cambio en las propiedades elásticas de la pared del folículo (Rondell 1964).

5.3. Composición

Se han publicado diversos estudios realizados principalmente en muestras de líquido folicular de animales como yeguas (Gerard 2002), cerdos (Chang 1976, Gosden 1990), vacas (Gosden 1990, Leroy 2004a, Orsi 2005, Renaville 2010) y ovejas (Gosden 1990, Nandi 2007) en los que se determinan: metabolitos específicos, lípidos, electrolitos, enzimas, proteínas, hormonas y compuestos inorgánicos en folículos de distintos tamaños y estadios, empleando reacciones y protocolos establecidos y kits comerciales. En la tabla 1 se ha realizado una recopilación de los compuestos localizados en líquido folicular que se pueden encontrar en la bibliografía actual.

Tabla 1.- Tabla resumen de los compuestos determinados en líquido folicular en distintas publicaciones.

<i>COMPUESTO</i>	<i>ESPECIE (REFERENCIA)</i>
METABOLITOS	
Acetato	Equino (Gerard 2002), Porcino (Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990) y Ovino (Gosden 1990)
Ácido a-aminoadípico	Porcino (Chang 1976)
Ácido a-amino-n-butírico	Porcino (Chang 1976)
Ácido aspártico	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Ácido glutámico	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Ácido úrico	Porcino (Chang 1976)
Alanina	Porcino (Chang 1976, Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990, Orsi 2005), Ovino (Gosden 1990) y equino (Gerard 2002)
Arginina	Porcino (Chang 1976) y Bovino (Orsi 2005)
Asparagina	Bovino (Orsi 2005)
Asparagina + Glutamina	Porcino (Chang 1976)
Carnosina	Porcino (Chang 1976)
Media-cistina	Porcino (Chang 1976)
Citrulina	Porcino (Chang 1976)
Creatina/Creatinina	Equino (Gerard 2002)
Creatinina	Porcino (Chang 1976, Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990) y Ovino (Gosden 1990, Nandi 2007))

Etanol	Porcino (Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990) y Ovino (Gosden 1990)
Fenilalanina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Fosfoetanolamina	Porcino (Chang 1976)
Fosfoserina	Porcino (Chang 1976)
Glicina	Porcino (Chang 1976, Gosden 1990), Bovino (Orsi 2005, Gosden 1990) y Ovino (Gosden 1990)
Glucosa	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005, Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
Glutamina	Bovino (Orsi 2005)
Glutamato/Glutamina	Equino (Gerard 2002)
b-Hidroxitbutirato	Porcino (Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990, Leroy 2004) y Ovino (Gosden 1990)
Histidina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
3-Metilhistidina	Porcino (Chang 1976)
Isoleucina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Lactato	Porcino (Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990, Orsi 2005, Leroy 2004) y Ovino (Gosden 1990, Nandi 2007)) y equino (Gerard 2002)
Leucina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Lisina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Metionina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Ornitina	Porcino (Chang 1976)
Piruvato	Bovino (Orsi 2005)
Poliaminas	Equino (Gerard 2002)
Prolina	Porcino (Chang 1976)
Sarcosina	Porcino (Chang 1976)
Serina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Taurina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Tirosina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Treonina	Porcino (Chang 1976), Bovino (Orsi 2005)
Trimetilamina	Equino (Gerard 2002)
Triptófano	Bovino (Orsi 2005)
Valina	Porcino (Chang 1976, Gosden 1990), Bovino (Gosden 1990, Orsi 2005) y Ovino (Gosden 1990)
Urea	Bovino (Leroy 2004), Ovino (Nandi 2007)
LÍPIDOS	
Triglicéridos	Porcino (Chang 1976), Bovino (Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
Fosfolípidos	Porcino (Chang 1976)

Colesterol (Total)	Porcino (Chang 1976), Bovino (Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
Colesterol (Ésteres)	Porcino (Chang 1976)
Ácidos grasos no esterificados	Bovino (Leroy 2004)
Ácido graso Palmítico (C16:0)	Bovino (Renaville 2010)
Ácido graso Esteárico (C18:0)	Bovino (Renaville 2010)
Ácido graso Oleico (C18:1n9)	Bovino (Renaville 2010)
Ácido graso Linoleico (C18:2n6)	Bovino (Renaville 2010)
Ácido graso Araquidónico (C20:4n6)	Bovino (Renaville 2010)
Ácido graso C20:3n6	Bovino (Renaville 2010)
Ácido graso Docosapentanoico (C22:5n3)	Bovino (Renaville 2010)
PROTEÍNAS Y ENZIMAS	
Proteína total	Porcino (Chang 1976), Bovino (Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
GOT	Porcino (Chang 1976)
Fosfatasa alcalina	Porcino (Chang 1976) y Ovino (Nandi 2007)
Fosfatasa ácida	Ovino (Nandi 2007)
Lactato deshidrogenasa	Ovino (Nandi 2007)
COMPOSICIÓN IÓNICA	
Na	Porcino (Chang 1976) , Bovino (Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
K	Porcino (Chang 1976) , Bovino (Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
Ca	Porcino (Chang 1976) y Ovino (Nandi 2007)
P	Porcino (Chang 1976) y Ovino (Nandi 2007)
Cl	Bovino (Leroy 2004) y Ovino (Nandi 2007)
Mg	Ovino (Nandi 2007)
HORMONAS	
Estradiol	Equino (Gerard 2002)
Progesterona	Equino (Gerard 2002)
Estrógeno	Equino (Gerard 2002), Porcino (Chang 1976)
Estradiol + Estrona	Porcino (Chang 1976)
Testosterona	Porcino (Chang 1976)

A pesar de la importancia del LF en el desarrollo del ovocito, el número de estudios encontrados que trataban de determinar la composición del líquido folicular en humanos ha sido relativamente bajo. A modo de resumen, los componentes del

Líquido folicular en humanos encontrados en la bibliografía se muestran en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2.- Tabla resumen de los compuestos determinados en líquido folicular humano en distintas publicaciones.

<i>COMPUESTO</i>	<i>ESPECIE (REFERENCIA)</i>
METABOLITOS	
Bilirrubina	Ghiafeh-Davoodi 2005
Glucosa	Ghiafeh-Davoodi 2005, Gull 1999
Lactato	Gull 1999
Isoleucina	Józwik 2006
Leucina	Józwik 2006
Valina	Józwik 2006
Lisina	Józwik 2006
Metionina	Józwik 2006
Fenilalanina	Józwik 2006
Treonina	Józwik 2006
Histidina	Józwik 2006
Triptófano	Józwik 2006
Alanina	Józwik 2006
Glicina	Józwik 2006
Serina	Józwik 2006
Fosfoserina	Józwik 2006
Arginina	Józwik 2006
Prolina	Józwik 2006
Hidroxiprolina	Józwik 2006
Glutamina	Józwik 2006
Ácido Glutámico	Józwik 2006
Asparagina	Józwik 2006
Ácido Aspártico	Józwik 2006
Taurina	Józwik 2006
Ornitina	Józwik 2006
Tirosina	Józwik 2006
Cisteína	Józwik 2006
Amonio	Józwik 2006
Urea	Józwik 2006

LÍPIDOS	
Triglicéridos	Ghiafeh-Davoodi 2005
Colesterol (Total)	Ghiafeh-Davoodi 2005
PROTEÍNAS Y ENZIMAS	
Proteína total	Ghiafeh-Davoodi 2005
Albúmina	Ghiafeh-Davoodi 2005
COMPOSICIÓN IÓNICA	
Na	Ghiafeh-Davoodi 2005
K	Ghiafeh-Davoodi 2005
Ca	Ghiafeh-Davoodi 2005
P	Ghiafeh-Davoodi 2005
Fe	Ghiafeh-Davoodi 2005
Mg	Ghiafeh-Davoodi 2005
HORMONAS	
Estradiol	Ghiafeh-Davoodi 2005

El proteoma del líquido folicular se ha determinado con más detalle. En un estudio proteómico se han identificado 210 proteínas, entre ellas, varias enzimas antioxidantes importantes, por ejemplo, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión transferasa,... (Angelucci 2006).

Finalmente, en el líquido folicular se pueden detectar otros compuestos relacionados con el estilo de vida, como por ejemplo la cotinina (metabolito de la nicotina) que se detecta tanto en fumadores activos como en pasivos, siendo la concentración dosis dependiente (Zenzes 1996). En las mujeres con un mayor Índice de Masa Corporal se muestra un perfil metabólico del líquido folicular alterado, con un aumento de determinados metabolitos, como la insulina, el lactato y los triglicéridos, proteína C reactiva y niveles de actividad androgénica, que podrían ser asociados con peores resultados reproductivos observado típicamente en estos pacientes (Robker 2009).

5.4. Biomarcadores metabólicos de calidad ovocitaria en el líquido folicular

El microambiente folicular es un importante determinante del desarrollo del ovocito (Chiu 2002). Diferencias en la composición metabólica del líquido folicular

correlacionan con el desarrollo de competencia de los ovocitos humanos. Por lo tanto, el perfil metabólico del líquido folicular podría ser una importante técnica de selección de gametos/embriones (Wallace 2012).

Además, se ha observado en yeguas el papel del microambiente folicular determinando el destino del folículo, es decir, en la selección del folículo dominante (Fortune 2004).

Otro estudio, empleando ovocitos de ratones, trata de caracterizar el perfil metabólico en tres grupos de ovocitos a lo largo de su maduración (complejos cúmulo-ovocito, ovocitos despojados de las células del cúmulo y ovocitos despojados co-cultivados con células del cúmulo). Los datos indican que las horas finales de la maduración podría proporcionar un único marcador de la competencia del ovocito, además en los complejos cúmulo-ovocito fecundables se aprecia un aumento de glucosa y una mayor producción de lactato que en aquellos que no pudieron ser fecundados posteriormente (Preis 2005).

En 2009 se publicó una revisión que proporcionaba una visión del conocimiento actual sobre los predictores bioquímicos de la calidad del ovocito en el líquido folicular, describiendo tanto los resultados procedentes de estudios de un único marcador bioquímico como de aquellos procedentes de estudios de metabolómica. En esta revisión se analizaron diversos grupos de moléculas, que se enumeran a continuación, como posibles biomarcadores con argumentos a favor y en contra (Revelli 2009):

- Hormonas: Gonadotropinas (LH, FSH, hCG), Hormona del Crecimiento (GH), Prolactina (PRL), Estrógenos (E2), Progesterona (P), Andrógenos y Corticoides.
- Factores de crecimiento de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF-beta): Inhibina y Activina, Hormona Anti-Mulleriana (AMH) y Proteína Morfogénica de Hueso-15 (BMP-15).

- Otros Factores de crecimiento e Interleucinas: Factor de Crecimiento Insulínico (IGF), Amphiregulin, Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (BFGF) e Interleucinas.
- Especies reactivas del oxígeno (ROS): ROS y Factores antioxidantes, Óxido Nítrico, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.
- Factores anti-apoptóticos.
- Proteínas, Péptidos y Aminoácidos: Alfa-Fetoproteína, CEA y CA-125, Antígeno CD44, Alfa1-Antitripsina, Leptina, Endotelina-2, Inhibidor de la Maduración del Ovocito (OMI), Homocisteína (HCY), Beta-Endorfina (beta-EP), Lactoferrina, Angiotensina II (ATII), Prorenina y Aminoácidos como alanina, glicina y ácido D-aspartico.
- Carbohidratos: Hialuronano y Mio-inositol.
- Prostanoides.

Por último, el conocimiento del ambiente folicular *in vivo* puede ayudar a mejorar los medios de cultivo empleados en la maduración *in vitro* de los ovocitos. Metabolitos incluidos en el medio como glucosa, piruvato, oxígeno y aminoácidos han mostrado tener influencia en la maduración y competencia del ovocito. La manipulación de esta información podría mejorar los resultados de la maduración *in vitro* de los ovocitos y, por lo tanto, de la producción de embriones *in vitro* (Sutton 2003).

La búsqueda de biomarcadores que puedan servir como indicadores de presencia o progresión de una enfermedad o de respuesta a una intervención terapéutica ha aumentado en los últimos años. Múltiples estudios, han resaltado diversos análisis en los niveles de expresión de genes (transcriptómica), traducción a proteínas (proteómica), incluyendo las modificaciones post-traducción y la red metabólica

(metabolómica), como un enfoque a un sistema biológico que define el fenotipo y como un puente entre el genotipo y el fenotipo (Fiehn 2002).

6. METABOLÓMICA

La metabolómica es la ciencia que trata de obtener, analizar y comparar los perfiles metabólicos o metabolomas de sistemas biológicos determinados.

En 1998 Olivier et al (Olivier 1998) definieron por primera vez “metaboloma” como el conjunto cuantitativo de todas las moléculas de bajo peso molecular presentes en las células en un estado concreto fisiológico o de desarrollo. Sin embargo, posteriormente Beecher (Beecher 2003), proporcionó otra definición, donde metaboloma consiste “sólo en aquellas moléculas natales (compuestos no poliméricos) que participan, en general, en reacciones metabólicas y que son requeridas para el mantenimiento, crecimiento y función normal de la célula.

En general los estudios de metabolómica permiten la búsqueda de grupos específicos de metabolitos como aminoácidos, lípidos, péptidos, ácidos grasos, esteroides, azúcares, estrógenos, etc.

Tres de las plataformas más comúnmente usadas para el análisis de metabolitos son: la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de masas (HPLC/MS) (Isaaq 2009).

6.1. Resonancia Magnética Nuclear

La Espectroscopia de RMN de Alta Resolución proporciona una herramienta única para el estudio de metabolitos y del metabolismo en tejidos y biofluidos, permitiendo obtener datos cualitativos y cuantitativos. Puede ser utilizado con éxito sobre una amplia variedad de componentes orgánicos en distintos fluidos corporales (Bell 1989 y Vion-Dury 1992) y ha sido ampliamente utilizada en metabolómica en gran número de áreas durante los últimos 20 años (Lindon 2004a, Lindon 2004b).

Algunos estudios resaltan el papel de la metabolómica en la búsqueda de biomarcadores que sirvan como indicadores de estadio y progresión de enfermedad, de respuesta a una intervención terapéutica,...etc (Martínez-Bisbal 2002a, Martínez-Bisbal 2002b, Casanova 2003, Gadea 2004, Martínez-Bisbal 2004a).

Las principales ventajas de la RMN son su alta reproducibilidad (Dumas 2006 y Keun 2002a), es una técnica automatizable, no destructiva, no selectiva en la detección de metabolitos, tiene la capacidad de detectar simultáneamente múltiples clases de metabolitos y una vez determinado el protocolo y las condiciones de medida se pueden obtener una serie de experimentos en un tiempo limitado con una preparación mínima de la muestra. La mayor limitación de esta técnica para la obtención de los perfiles metabólicos es su relativa baja sensibilidad que la hace inapropiada para el análisis de metabolitos de baja abundancia.

Todas estas ventajas hacen que la espectroscopia de RMN se convierta en una técnica única de interés en biomedicina para estudios de metabolómica. De hecho, la RMN ha sido utilizada para el análisis de metabolitos incluyendo, análisis en la enfermedad de alzheimer, en cáncer de próstata, análisis de aminoácidos, nucleótidos y nucleosidos, vitaminas, carbohidratos y péptidos (Barba 2008, Jordan 2007, Martínez-Bisbal 2002a, Martínez-Bisbal 2002b, Casanova 2003, Martínez-Bisbal 2004a, Mountford 2004).

6.1.1. Bases de la RMN

Las primeras detecciones empleando la Resonancia Magnética Nuclear fueron llevadas a cabo de manera independiente por Purcell (Purcell 1946) en Harvard y Bloch (Bloch 1946) en Stanford en 1945.

La espectroscopia de RMN es una técnica espectrofotométrica que utiliza las propiedades de los núcleos atómicos en el seno de un campo magnético para obtener información de la estructura y composición de la materia. Los cinco núcleos que han sido más útiles en sistemas de interés biológico son ^1H , ^{31}P , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , siendo el

^1H y el ^{13}C los más estudiados por ser los más abundantes en los compuestos orgánicos.

Un protón o neutrón desapareado puede conferir un spin al núcleo completo; puesto que este posee una carga, originará un campo magnético con su giro. En un campo magnético los núcleos con spin positivo se orientan en la misma dirección del campo, este estado se considera de mínima energía (spin α), por el contrario, los núcleos con spin negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, estado de mayor energía (spin β). La diferencia de energía entre los dos estados de spin, depende de la fuerza del campo magnético aplicado (H_0), de manera que esta diferencia energética aumenta conforme mayor sea el campo (Fig.13).

Cuando una muestra que contiene núcleos dotados de ciertas propiedades magnéticas es colocada en un campo magnético e irradiada por un pulso intenso de radiación (radiofrecuencias, rf), los núcleos en spin α son promovidos al β , es decir entran en resonancia. Cuando vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE). El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, espectro de RMN.

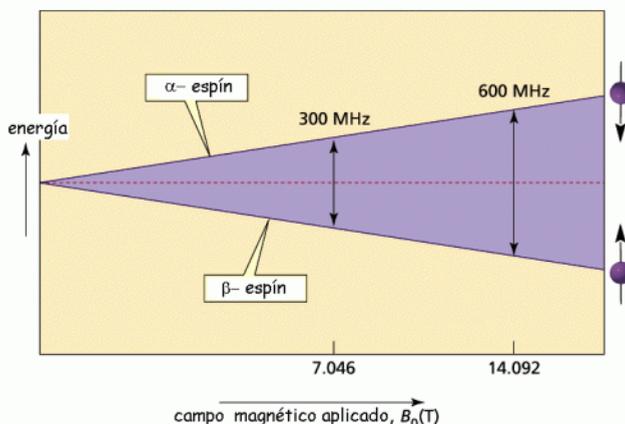


Figura 13.- Aumento de la diferencia energética entre los estados de spin con el aumento de la fuerza del campo magnético.

Apantallamiento o protección magnética por los electrones.

Los núcleos no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. El campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Por lo general, los efectos de protección, o apantallamiento, de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (ppm) (Proctor 1950).

Desacoplamiento espín-espín

Los campos magnéticos de otros protones del entorno de un protón dado afectan a la frecuencia de absorción de este. Cuando los espines magnéticos de dos tipos diferentes de protones interactúan se produce el desdoblamiento de señales en multipletes, desdoblamiento de espín-espín. Se dice que los protones están acoplados magnéticamente.

Las distancias entre los picos de los multipletes dan información estructural. A la distancia entre los picos de un multiplete (en Hertzios) se le llama constante de acoplamiento (Jab) entre los protones magnéticamente acoplados. Las constantes de acoplamiento ayudan a distinguir entre los posibles isómeros de un compuesto.

De manera resumida, cada núcleo dentro de una molécula posee una determinada frecuencia de resonancia en el seno del campo magnético (desplazamiento químico, que identifica un átomo o grupo atómico de un compuesto), una intensidad de señal (área bajo la curva) y una multiplicidad (número de picos en los que se desdobra una señal determinada por la constante de acoplamiento). De estas tres características se puede deducir el tipo de grupo al que pertenece, la concentración con la que se encuentra y que grupos funcionales se encuentran cerca de este núcleo, respectivamente. Es decir, cada resonancia observada en un espectro de RMN es

específica de un compuesto y proporciona gran cantidad de información estructural respecto a los componentes de la muestra.

Utilizando el desplazamiento químico (indicador de la naturaleza del ambiente químico en el que localizamos la molécula), el acoplamiento espín-espín (que proporciona información acerca del número y naturaleza de los núcleos cercanos y acerca de la conectividad entre estos) y la relajación o difusión (da una aproximación del tamaño y movilidad de una molécula y además del ambiente a gran escala en el que localizamos la molécula) podemos obtener una rápida identificación de todos los componentes considerados como interesantes en el análisis (Dunn 2005).

6.1.2 Aplicaciones

La Resonancia Magnética Nuclear es una técnica muy versátil que desde su desarrollo inicial ha expandido continuamente su área de aplicación (Grupo Especializado de Resonancia Magnética Nuclear- RSEQ 2006).

Como se ha comentado anteriormente, la RMN proporciona gran cantidad de información acerca de la estructura de un compuesto.

Además en las dos últimas décadas la espectroscopia de RMN de alta resolución se ha establecido como la única técnica capaz de determinar con resolución atómica la estructura (o tendencias conformacionales) de macromoléculas biológicas en disolución. En la actualidad, mediante métodos multidimensionales y multinucleares sobre moléculas enriquecidas en los isótopos apropiados es posible determinar la estructura tridimensional de proteínas globulares con masas por encima de 30kDa, de fragmentos de doble cadena de ADN de varias decenas de pares de bases, de oligosacáridos complejos, y de fragmentos de ADN y ARN aislados o unidos a proteínas con las que interaccionan. De hecho, la RMN, junto con la difracción de rayos X, constituyen la tecnología fundamental de los proyectos de proteómica estructural.

La Resonancia Magnética nuclear también se emplea en Química supramolecular, es decir, en el estudio de las entidades químicas constituidas por dos o más unidades conectadas por interacciones no covalentes. Abarca tanto el análisis de interacciones entre ligandos de bajo peso molecular y receptores sintéticos como el de los procesos de reconocimiento molecular en sistemas biológicos. Esta aplicación tiene gran importancia en la industria farmacéutica debido a su uso para el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos, empleándose en la selección de dianas terapéuticas, en la identificación de inhibidores de dianas con interés terapéutico y en la optimización de inhibidores basada en la caracterización estructural de las interacciones diana-ligando.

Aplicaciones de la Espectroscopia de RMN

La RMN ha desarrollado sus aplicaciones clínicas de manera exponencial, fundamentalmente, debido a la aparición de la RMN de imagen (RMI), que se ha convertido en una herramienta de diagnóstico radiológico indispensable. No obstante sus aplicaciones en este campo han trascendido únicamente al uso anatómico, siendo imprescindible y complementario a los rayos X. Sin embargo, en los últimos años, se está introduciendo en el mundo clínico la espectroscopía de RMN (ERM) que permite el estudio de los perfiles metabólicos en localizaciones específicas del organismo abriendo nuevas vías para la comprensión de los procesos bioquímicos in vivo y la consiguiente utilidad en el diagnóstico clínico (Martínez-Bisbal 2002a, Martínez-Bisbal 2002b, Casanova 2003, Gadea 2004, Martínez-Bisbal 2004a).

La ERM se puede llevar a cabo in vivo, esto supone una ventaja fundamental por no tener que asumir ninguna hipótesis sobre el sistema bajo estudio. Además no existe una manipulación de las muestras y puede proporcionar el valor promedio metabólico de una parte del sistema bajo estudio (Volumen único).

Sin embargo la ERM in vivo también presenta una serie de inconvenientes como son: la baja sensibilidad por el reducido valor de S/N debido al límite del campo

magnético en clínica (3T) y la anchura de líneas grandes originadas por los cortos valores de T_2 de los metabolitos en los tejidos respecto a la disolución.

La ERM junto con la RMI, han demostrado su aplicabilidad para comprender la correlación entre los cambios bioquímicos y diferentes patologías en distintos órganos. Se ha empleado como apoyo para el diagnóstico de patologías del sistema nervioso central (tumores, epilepsia, esquizofrenia, esclerosis múltiple, Alzheimer, deterioro cognitivo, depresión (Martínez-Bisbal 2002a, Martínez-Bisbal 2002b, Casanova 2003, Gadea 2004, Martínez-Bisbal 2004a)), próstata (Mountford 2004), cáncer de mama (Sitter 2002) y carcinoma de ovario y de colon (Mountford 2004).

La espectroscopía de RMN también se puede llevar a cabo in vitro, donde la composición y concentración de las muestras, al contrario de lo que ocurre in vivo, son constantes a lo largo de la muestra (son uniformes), por lo que la dimensión y la localización de la muestra no tienen que ser contemplados como un parámetro experimental. La espectroscopia de RMN se emplea para llevar a cabo los estudios de metabolómica.

OBJETIVOS

La esterilidad se ha convertido en un problema de gran importancia en la actualidad. Esta disminución de los nacimientos debidos a diversas razones ha tenido como consecuencia el aumento de los embarazos llevados a cabo a través de técnicas de reproducción asistida.

Estas técnicas se pueden realizar tras el control del ciclo natural de la mujer, usando ciclos ligeros de estimulación o mediante ciclos de estimulación convencionales. Cada uno de estos protocolos tiene una serie de ventajas e inconvenientes que genera una gran controversia a la hora de la elección del protocolo más apropiado.

Por otro lado, uno de los procesos para tratar de aumentar las tasas de embarazo en algunas de estas técnicas es la selección del ovocito más idóneo para la fecundación en función de una serie de características morfológicas. Sin embargo, estos protocolos indicadores de calidad del ovocito no son completamente satisfactorios. Por esta razón, en los últimos años se está tratando de encontrar otros marcadores que definan la idoneidad de los ovocitos para el uso en técnicas de reproducción asistida. Una de las tendencias actuales es la búsqueda de biomarcadores de calidad ovocitaria en el líquido folicular (LF).

La obtención de la composición metabólica del líquido folicular no sólo podría ayudar a la selección de los ovocitos de mayor calidad en los tratamientos de reproducción asistida, sino que también puede ayudar a mejorar los medios de cultivo empleados en la maduración in vitro de los ovocitos, selección de protocolos de estimulación más adecuados, etc. aumentando así las tasas de embarazo en la población.

El objetivo fundamental de esta tesis es la obtención, mediante el uso de la espectroscopia de RMN, de la composición exhaustiva y cuantitativa del líquido folicular y la posterior búsqueda de alteraciones metabólicas en este fluido de

mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida. Para ello este trabajo se divide en tres objetivos particulares.

En primer lugar, se tratará de identificar la composición metabólica del LF mediante el uso de diferentes espectros de RMN tanto monodimensionales como bidimensionales, homonucleares (^1H) y heteronucleares (^1H - ^{13}C). Para ello se realizará una serie de experimentos de RMN en muestras de líquido folicular de donantes de ovocitos. Este primer objetivo es fundamental para la identificación posterior de los posibles marcadores de calidad ovocitaria en el líquido folicular.

Posteriormente, se tratará de identificar alteraciones cuantitativas en los componentes del fluido estudiado, que discriminen entre las muestras de donantes de ovocitos y las pacientes con problemas de fertilidad sometidas a tratamientos de reproducción asistida y con baja respuesta a la estimulación ovárica. En este caso, se llevarán a cabo experimentos monodimensionales que permitan la comparación cuantitativa de los perfiles metabólicos de ambos grupos. De esta manera, se pretende la observación de posibles alteraciones metabólicas que se hayan podido producir en mujeres sometidas a un tratamiento de infertilidad. Para este objetivo es fundamental la identificación inicial de los componentes del líquido folicular en los espectros de RMN.

La búsqueda de posibles correlaciones entre distintos metabolitos y la edad o el índice de masa corporal es otro objetivo que nos permitirá determinar si estas características van a influir en el perfil metabólico de las pacientes o donantes.

Finalmente, se realizará la caracterización y comparación de las muestras sometidas a distintos protocolos de estimulación ovocitaria o carentes de estimulación para tratar de encontrar diferencias o similitudes que ayuden a la elección de los protocolos de estimulación más apropiados. Se realizarán experimentos monodimensionales que permitan la obtención de perfiles que serán analizados mediante distintas metodologías estadísticas. Las muestras, en esta ocasión, se dividirán en función del tipo de estimulación empleada, si son donantes o pacientes,

de los rangos de fertilidad normalizada, de los resultados de la fecundación y de la edad.

De manera resumida, con este trabajo se pretende obtener toda la información cuantitativa metabólica posible del LF que permita entender mejor la esterilidad y predecir y mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras utilizadas	76
2. Obtención de las muestras.....	78
3. Preparación de las muestras para el análisis por RMN	79
4. Espectroscopía de RMN	80
4.1. Equipos y sondas usadas.....	80
4.2. Experimentos realizados.....	81
4.3. Condiciones de medida.....	91
5. Análisis de los datos y estadística	93

1. MUESTRAS UTILIZADAS

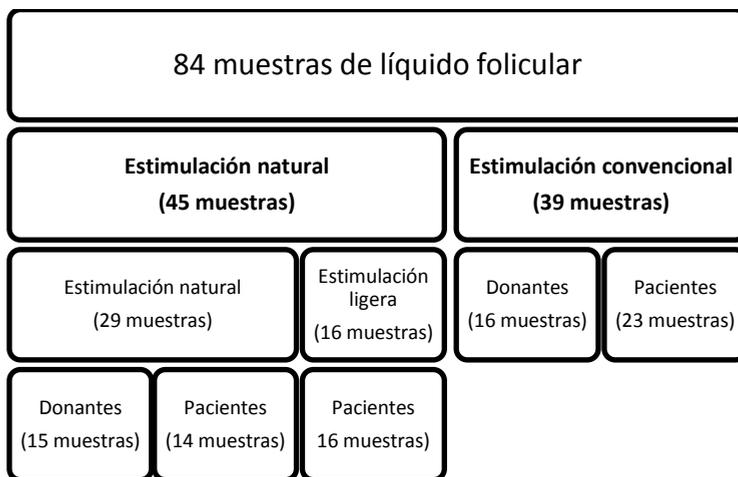
Para la realización de este trabajo se han analizado un total de 167 muestras de Líquido folicular empleando Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. Todas estas muestras fueron proporcionadas por el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) con la correspondiente autorización por parte de las mujeres implicadas en el estudio (Anexo I). Estas muestras se dividieron inicialmente en tres grupos, un grupo para cada uno de los objetivos a desarrollar. El número de muestras y las características de cada grupo son las siguientes:

- Para la identificación de los metabolitos presentes en el líquido folicular se emplearon 30 muestras pertenecientes al grupo de mujeres donantes de óvulos. Todas las donantes debían tener edades comprendidas entre los 18 y los 35 años, poseer un historial familiar negativo para enfermedades de transmisión genética, un cariotipo normal (estudio cromosómico), un estudio negativo para enfermedades de transmisión sexual, normalidad del aparato reproductor, salud física y mental y por último una historia de fertilidad previa y/o adecuada respuesta al tratamiento de estimulación ovárica.
- Para la comparación de muestras de donantes frente a muestras de pacientes se emplearon:
 - o Grupo de pacientes: 29 muestras pertenecientes al grupo de mujeres con edades comprendidas entre los 18 y los 35 años, con protocolo de estimulación convencional (agonistas), con baja respuesta a la estimulación ovárica (Ferraretti 2011) y sometidas a tratamientos de reproducción asistida.
 - o Grupo de donantes: 24 muestras de donantes de óvulos con edades comprendidas entre los 18 y los 35 años, con protocolos de estimulación convencional (antagonistas o citrato de clomifeno), con historial familiar negativo para enfermedades de transmisión genética, un cariotipo normal

(estudio cromosómico), un estudio negativo para enfermedades de transmisión sexual, normalidad del aparato reproductor, salud física y mental y por último una historia de fertilidad previa y/o adecuada respuesta al tratamiento de estimulación ovárica.

- Para el estudio comparativo de ciclos estimulados se emplearon 84 muestras de líquido folicular repartidas de la manera que aparece en la siguiente tabla.

Tabla 3.- Distribución de las muestras empleadas para el estudio comparativo de ciclos en función de sus características.



Para la estimulación convencional se emplearon diferentes protocolos basados en el uso de agonistas y antagonistas de GnRH y protocolos que utilizaban citrato de clomifeno (ver apartado 3.4 Estimulación ovárica en Introducción).

Todas las donantes debían tener las mismas características que en los estudios anteriores (características básicas para ser aceptadas en el programa de donación de óvulos en el IVI), es decir, edades comprendidas entre los 18 y los 35 años, con historial familiar negativo para enfermedades de transmisión genética, un

cariotipo normal (estudio cromosómico), un estudio negativo para enfermedades de transmisión sexual, normalidad del aparato reproductor, salud física y mental y por último una historia de fertilidad previa y/o adecuada respuesta al tratamiento de estimulación ovárica.

2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La obtención de las muestras de líquido folicular se llevó a cabo en el IVI mediante punción folicular (Fig. 14), es decir, se realizó una punción transvaginal guiada por ecografía vaginal. Se acopla una aguja fina y larga a la sonda vaginal del ecógrafo y se introduce, a través de la pared vaginal, en el folículo más cercano al punto de entrada. Cuando la punta de la aguja está en el centro del folículo, se aplica el vacío y se aspira el líquido folicular que hay en su interior. Únicamente se aspiró el líquido folicular procedente de un folículo preovulatorio, independientemente de otros folículos. Finalmente el líquido folicular es analizado bajo microscopio por los biólogos para informar si existe un ovocito en el tubo extraído.

Seguidamente, los ovocitos fueron separados del resto del contenido de la punción, que fue recogido y homogeneizado. Posteriormente el fluido se centrifugó 5 min a 10000 rpm para retirar las células y tras extraer el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su preparación.



Figura 14.- Proceso de extracción del líquido folicular.

3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR RMN

Material

- Tubos Eppendorf de 1.5mL
- Centrífuga Eppendorf
- D₂O
- Vórtex
- Tubo de RMN 5mm (Fig. 15)

Las muestras de líquido folicular empleadas para el análisis por RMN se descongelaron a temperatura ambiente, una alícuota de 600 μ L se depositó en un tubo Eppendorf y se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 14000 rpm para eliminar posibles residuos sólidos que pudieran dar interferencias en la medida. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante al que se adicionaron 60 μ L de D₂O. Se agitó unos segundos en el vórtex y se volvió a centrifugar durante 15 segundos para recoger parte de la muestra que se pudiera haber quedado por las paredes. Finalmente, toda la disolución que se introdujo en un tubo de RMN de 5mm de diámetro limpio y seco (Fig. 15).



Figura 15.- Tubo de RMN de 5mm de diámetro empleado para el análisis del Líquido Folicular.

4. ESPECTROSCOPIA DE RMN

4.1. Equipos y sondas usadas

Tres equipos distintos se han utilizado para realizar este trabajo

- Espectrómetro de RMN de 11.75 T (Teslas): Avance DPX Bruker 500Mhz (Fig. 16) equipado con una criosonda TXI de 5mm ^1H $\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$. Para la adquisición de los espectros se empleó inicialmente el programa XWINNMR versión 3.1.



Figura 16.- Espectrómetro de RMN 11.75 T

- Espectrómetro de RMN de 18.8 T: Bruker Digital Avance 800 MHz (2000) (Fig. 17) equipado con una criosonda de triple resonancia TCI para H-C/N-2H.



Figura 17.- Espectrómetro de RMN 18.8 T

- Espectrómetro de RMN de 14.1 T: Avance DPX Bruker 600Mhz equipado con una sonda QXI (5mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$). El equipo posee un robot automatizado con control de temperatura para la incorporación automática de las muestras. En este equipo se emplea como software de adquisición el TOPSPIN versión 1.3.

4.2. Experimentos realizados

(Ver secuencias de pulsos en Anexo II)

Los experimentos de RMN sirven para asignar señales del esqueleto de una molécula orgánica relacionando los picos observados según el tipo de experimento que diseñemos. Así, los experimentos monodimensionales proporcionan información sobre desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento. En los experimentos bidimensionales homonucleares se pueden separar en las dos dimensiones estas dos interacciones diferentes (desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento), o correlacionar núcleos acoplados escalarmente, o estudiar distancias entre protones, etc. Y si se trata de experimentos bidimensionales

heteronucleares, según el tipo de experimento, proporcionan diferente información, como por ejemplo, correlaciones a través de acoplamiento escalar a un enlace entre un protón y el heteronúcleo al que está directamente unido, o correlaciones entre un protón y un heteronúcleo situado a una distancia de 2 o 3 enlaces, etc.

El experimento básico se lleva a cabo siguiendo 4 pasos.

1. **Magnetización permanente.** La muestra que se desea analizar se coloca bajo un campo magnético uniforme de intensidad muy alta. Una mayor uniformidad de este campo, determinada por variaciones en intensidad del mismo, proporciona un resultado mejor. Si la uniformidad del campo no es perfecta, esto se compensa con técnicas de procesado de señal.
2. **Excitación de la muestra con un pulso de radiofrecuencia.** Una vez la muestra ha llegado al equilibrio bajo el campo magnético uniforme, se excita con un pulso de radiofrecuencia.
3. **Recogida de datos.** Inmediatamente después de la finalización de la transmisión del pulso, se recoge con una pequeña antena la respuesta de la muestra a la excitación. La forma de la respuesta depende de la composición de la muestra.
4. **Procesado de señal y presentación de resultados.** La señal recogida se procesa adecuadamente obteniéndose un espectro.

Espectros de protón

De los espectros de protón ^1H se puede obtener información acerca de los desplazamientos químicos, de las estructuras multiplete, de las constantes de acoplamiento homonuclear y la integración de todos los protones presentes en la muestra. Además, la anchura de la línea está relacionada con los mecanismos de relajación T_2 ($M_{xy}(t) = M_{xy}(0) * e^{-t/T_2}$). Alternativamente, otros experimentos

relacionados pueden dar información extra como, por ejemplo, experimentos de temperatura variable, el uso de reactivos relajantes o complejantes...

La secuencia de pulsos básica para obtener un espectro de protón consiste en los siguientes pasos:

- Periodo de relajación ($d1$) para alcanzar el estado de pre-equilibrio
- Pulso ($p1$) para crear la magnetización transversal
- Adquisición durante el periodo t_2 (acq).

El espectro de protón es normalmente adquirido de una manera automatizada tras realizar una serie de cambios de los parámetros predefinidos. Posteriormente el espectro es procesado con los parámetros determinados y finalmente se realiza una mejora de la fase del espectro. En algunas aplicaciones, es conveniente una buena precisión y resolución en los espectros adquiridos para obtener valores de integración fiables, en estos casos, se utiliza un experimento de protón con un pulso de 90° y un periodo de relajación largo para evitar la saturación parcial de la señal.

Los espectros de protón se representan como intensidad de la resonancia frente a frecuencia relativa. Normalmente, de estos espectros se obtiene el desplazamiento químico (posición de la resonancia) y las constantes de acoplamiento (líneas de separación dentro de un multiplete).

En muestras donde el agua es el componente mayoritario, como es el caso del líquido folicular, es necesario aplicar a las muestras analizadas métodos de supresión de la señal del agua. Esta reducción afecta también a los alrededores inmediatos de la señal del agua, resultando una pérdida de información espectral. Dos ejemplos de estas secuencias de supresión del agua son Presaturación y Watergate. Estos experimentos aportan espectros muy complejos en los que las señales de metabolitos menos abundantes pueden estar solapadas por las señales de los que están presentes en mayor proporción.

Presaturación (zgpr)

La Presaturación (presat) es el procedimiento más simple y ampliamente usado para minimizar y suprimir la intensa resonancia del agua. Se basa en aplicar un pulso de baja potencia a la resonancia del disolvente antes de la secuencia de pulsos (Hoult 1976), obteniendo un espectro convencional en el cual la intensa resonancia del disolvente se ha minimizado para ver las señales más pequeñas.

Watergate (zggpw5)

WATERGATE (WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation) (Liu 1998) es otra técnica usada para eliminar la señal del agua en muestras acuosas. Al contrario que la presaturación, este método está basado en la técnica del gradiente spin echo usada también para la medida de la constante de difusión y espectros DOSY.

J-resolved (jrespr.vem)

Para reducir el solapamiento de las señales y extraer más información se realiza la espectroscopia J-resolved que separa la información del desplazamiento químico y los acoplamientos espín-espín en ejes diferentes, resultando un espectro bidimensional. La proyección del espectro bidimensional en uno monodimensional proporciona la visión del espectro sin el acoplamiento entre protones.

Una vez se ha procesado el espectro son necesarias una serie de técnicas de procesamiento rutinarias para la obtención del espectro:

- Aplicación de funciones ventana echo-like (p.ej. sine) para mejorar la resolución.
- Cálculo de la magnitud del espectro final para evitar las formas de línea retorcidas.

- Inclinación del espectro 2D 45° para eliminar el acoplamiento homonuclear de la primera dimensión, después de esto, el espectro 2D contendrá sólo información del desplazamiento químico en la primera dimensión (F2) e información del acoplamiento J en la segunda dimensión (F2).
- Simetrización del espectro en la dimensión indirecta, El espectro 2D JRES debería ser simétrico en esta dimensión y, por lo tanto, comparando con puntos de datos simétricos en la dimensión indirecta y cogiendo el mínimo de 2 puntos de datos se eliminara los picos no deseados procedentes de los artefactos.
- Se puede realizar una proyección opcional del perfil del espectro 2D a lo largo de F2 (pJRES). La proyección del espectro al que no se le ha realizado la inclinación de 45° (Fig. 18a) será similar a un espectro 1D ordinario mientras que la proyección inclinada del espectro (Fig. 18b) no contiene ningún multiplete, cada protón aparecerá como un solo pico independientemente de la multiplicidad de la señal original.

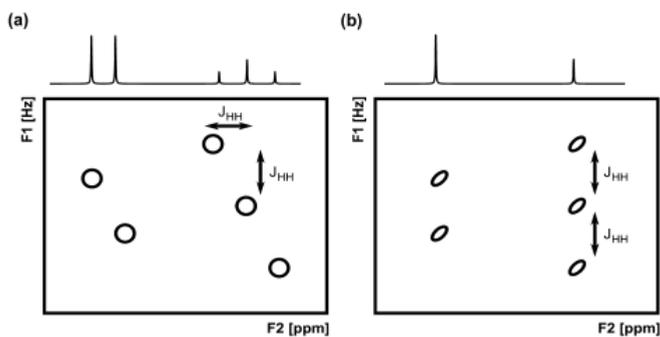


Figura 18.- Muestra las proyecciones F2 de los espectros 2D JRES no inclinado (Fig. 18a) e inclinado (Fig. 18b)

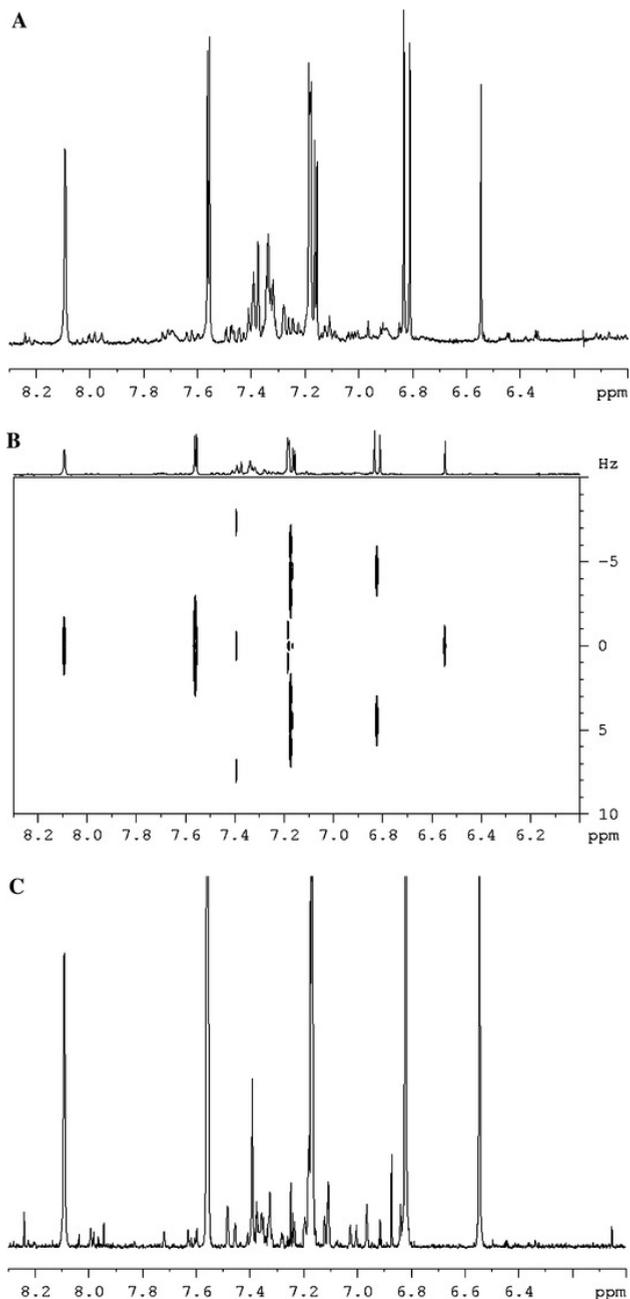


Figura 19. Ejemplo de espectro ^1H JRES RMN. A) ^1H NMR. B) J-resolved bidimensional. C) Proyección monodimensional del espectro J-resolved de una línea celular de *Catharanthus roseus* en el rango de 6.00–8.00 ppm (Mustafa 2009)

Sin embargo, es difícil asignar las señales a un metabolito específico empleando únicamente los complejos espectros monodimensionales, debido a la gran cantidad de señales y al solapamiento entre ellas. Para relacionar un desplazamiento dado con su metabolito correspondiente se requiere la ayuda de experimentos bidimensionales.

DQF-Experimento homonuclear COSY (cosydfgpst19)

La técnica COSY (Correlation Spectroscopy) (Derome 1990, Piotto 1992) permite el mapeo de los núcleos (protones) que tienen acoplamientos escalares en una molécula (Fig. 20), es decir que establece una correlación 2D que permite conocer que señales están acopladas escalaramente en el espectro y determinar el valor de estos acoplamientos. La característica más notable del COSY es la obtención de correlación directa entre 2 protones acoplados, que inmediatamente sugiere que los mismos están en una relación geminal o vecinal en la molécula.

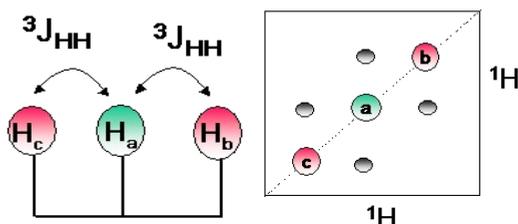


Figura 20.- Esquema explicativo del experimento COSY

El experimento COSY utilizado es el DQF-COSY que es un experimento homonuclear 2D COSY (CORrelation Spectroscopy) con filtro de doble cuanto. El filtro de doble cuanto consigue eliminar o al menos reducir las señales que no estén acopladas, es decir, singletes. Además tiene la ventaja de que se eliminan las señales de grupos metilos no acoplados, que suelen crear un intenso ruido T_1 en los espectros homonucleares que puede enmascarar algunas señales. Una ventaja del experimento DQF-COSY es la sensibilidad de fase, que hace que estos espectros tengan una mayor resolución. Otra ventaja es la cancelación parcial de los picos de

la diagonal. Una tercera ventaja es la eliminación de las señales fuertes, por ejemplo, ^1H de disolventes que no experimentan acoplamiento escalar.

La información en un espectro COSY está en los picos de cruce fuera de la diagonal. Estos picos indican el acoplamiento escalar entre dos espines y por lo tanto que un reducido número de enlaces separan a los núcleos correspondientes.

TOCSY (*mlevgpstw5*)

También se realizó un experimento TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) (Bax 1985) que es complementario al COSY. Este experimento suministra correlaciones entre espines directamente acoplados, pero incluye además correlaciones entre todos los espines de un sistema, aunque no estén directamente acoplados (Fig. 21). Por ejemplo, en una cadena de protones acoplados A-B-C-D, en el experimento TOCSY observaríamos picos cruzados de A con B, C y D si los acoplamientos B-C y C-D son apreciables. Podemos correlacionar, en principio, mediante el TOCSY todos los núcleos de un sistema de espines. En el TOCSY los componentes de los multipletes en los picos de cruce están en fase mientras que en el COSY estos componentes están en antifase. En condiciones de baja resolución, los componentes en antifase del COSY se superponen y tienden a anularse mutuamente, mientras que en el TOCSY se refuerzan, por lo que esta resulta una técnica más sensible.

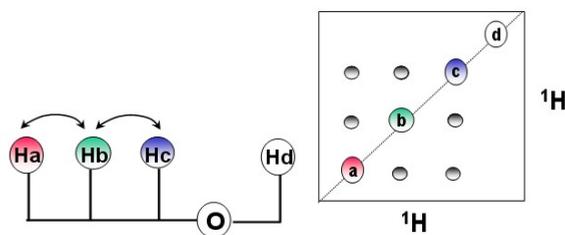


Figura 21.- Esquema explicativo del experimento TOCSY

La apariencia del espectro TOCSY es similar al COSY, con picos simétricos alrededor de la diagonal, pero con mucha mayor abundancia de picos de cruce.

HSQC (inv4prst)

Además del protón, el núcleo ^{13}C también se puede emplear para realizar algunos de estos experimentos bidimensionales. Este núcleo ofrece la ventaja de obtener espectros más resueltos al disminuir el solapamiento de las resonancias por la mayor dispersión de los desplazamientos químicos de ^{13}C . Sin embargo, posee los inconvenientes de tener una reducida sensibilidad debido a la baja abundancia natural de este núcleo y su menor constante giromagnética. La sensibilidad de esta espectroscopia se ha mejorado empleando una criosondaTM (Bruker Biospin, Alemania) (Keun 2002b), que disminuye la temperatura, reduciendo el ruido producido principalmente por la electrónica para la detección de la señal.

El experimento de 2D ^{13}C realizado fue un HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (Bax 1985) que fue adquirido para ayudar a la asignación de las señales y proporcionar correlaciones a través del acoplamiento escalar a un enlace entre un protón y el heteronúcleo al que está directamente unido, en este caso el ^{13}C .

Este experimento HSQC permite correlacionar protones y carbonos unidos directamente a través de un enlace con elevada sensibilidad.

CPMG (spinechoNpr.vem /cpmgpr.vem)

Debido a la complejidad de los espectros monodimensionales, descritos al inicio del apartado, se realizan otros experimentos que disminuyen los solapamientos de las señales seleccionando las moléculas en función de diferentes propiedades espectroscópicas. Para eliminar las señales procedentes de las macromoléculas se emplea la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Las diferentes propiedades de relajación en función del tamaño de la molécula son utilizadas para eliminar las resonancias de las moléculas más grandes, ya que relajan antes. Distintos experimentos de relajación editados han sido aplicados para mejorar la detección de especies de bajo peso molecular en plasma sanguíneo (Van 2003) a través del uso de espectros de RMN editados de relajación 1D y 2D.

La secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) se utiliza para medir los tiempos de relajación T_2 .

La intensidad de las líneas con T_2 corto (líneas anchas) disminuye mucho más rápidamente que las líneas con T_2 largo (líneas finas), es decir, que esta secuencia se puede emplear como filtro T_2 eliminando señales que se relajan rápido en T_2 . La secuencia CPMG es por tanto, útil para aumentar la intensidad de las líneas finas en un espectro por supresión de los de las anchas.

DOSY (stebpgp1s191d/stebpgp1s19)

Otro acercamiento para reducir la complejidad del análisis son los experimentos de difusión, Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY), en los que las señales pueden ser separadas por la distinta velocidad de difusión de los compuestos. Para obtener estos espectros se utilizan los gradiente de campo pulsado eco estimulado, en los cuales, la difusión produce señales atenuadas.

Un gradiente de campo se define como un corto periodo de tiempo donde el campo magnético estático se hace especialmente no homogéneo en una dirección específica, normalmente el eje z.

De modo general, el término difusión hace referencia a los movimientos traslacionales aleatorios que las entidades químicas experimentan como consecuencia de su energía térmica. Estos dependen del denominado coeficiente de difusión, que a su vez está estrechamente relacionado con el tamaño y forma molecular molecular. Por lo tanto, este parámetro constituye una herramienta útil en la detección y caracterización de fenómenos de asociación, agregación e interacciones moleculares, en general.

Las medidas de difusión empleando RMN se basan, en última instancia, en la capacidad de los gradientes para etiquetar a los diferentes núcleos magnéticos de acuerdo con su posición en la muestra.

El efecto de la atenuación debida a la difusión será lógicamente, mayor para especies de menor tamaño, ya que difunden más rápidamente.

Este tipo de experimentos pueden emplearse para estudiar separadamente las señales provenientes de macromoléculas filtrando los metabolitos de bajo peso molecular y de mayor velocidad de difusión. También se puede emplear para el estudio de mezclas. En este caso, DOSY efectúa una separación virtual de los componentes de la muestra. Esta técnica de separación de componentes de una muestra tiene la ventaja frente a técnicas de separación física de componentes en que mantiene la muestra intacta y no requiere ningún hardware especial.

4.3. Condiciones de medida

Todos los espectros obtenidos se realizaron a una temperatura de trabajo constante de 298 K. Aunque otras temperaturas, como 292, 304 y 310 K también fueron probadas, se seleccionó 298 K para obtener una anchura de pico óptima y una estabilidad del espectro durante el tiempo de medida. La anchura espectral ^1H (sw) fue de 6009 Hz para el equipo de 11.75 T, 7183 Hz para el equipo de 14.1 T y 9615 Hz para el equipo de 18.8 T. El periodo de relajación (d1) fue 5s y a la FID se le realizó un rellenado de ceros (zero-filled) por un factor de 2 previo a la transformada de Fourier.

Diversos experimentos monodimensionales se obtuvieron para todas las muestras. La señal del agua fue atenuada usando presaturación (1H presat) y doble watergate (WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation). Un total de 64 adquisiciones (NS) fueron llevadas a cabo para cada uno de estos experimentos con una resolución (TD) de 16 K puntos. Para el tratamiento del espectro se aplicó un rellenado de 0 (SI=32 K) y una apodización usando función exponencial previa a la Transformada de Fourier. Se aplicó un ensanchamiento de línea de 0.3 Hz.

Además, varios experimentos bidimensionales se realizaron para ayudar en la asignación de las señales y en la identificación de los metabolitos en el líquido folicular. Los experimentos DQF-COSY (Double-Quantum Filtered- COrrrelation

SpectroscopY) con sensibilidad de fase y varios experimentos TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) con diferentes tiempos de mezcla (30 ms, 60 ms y 80 ms) se usaron para identificar los diferentes sistemas espin a través de la transferencia de magnetización por los enlaces químicos, y ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) proporcionó el desplazamiento químico del carbono de algunos grupos químicos, ya que proporciona correlaciones a través del acoplamiento entre el protón y el ^{13}C al que está unido. Para el experimento DQF-COSY los transitorios fueron adquiridos a 2048 puntos de datos con 16 adquisiciones por incremento, usando un total de 512 incrementos en el eje F1.

Los experimentos TOCSY se llevaron a cabo usando la secuencia de pulsos MLEV17 para el bloqueo de espin y 1024 puntos fueron recogidos en 512 incrementos con 16 adquisiciones por incremento

En el experimento ^1H - ^{13}C HSQC presat, 1024 puntos de dominio tiempo fueron obtenidos en 160 incrementos con 128 adquisiciones por incremento y rellenado de ceros a 512 puntos. A los datos se les realizó un rellenado de ceros y una apodización usando una función campana-sinusoide (sine-bell) en ambas dimensiones

Los espectros bidimensionales J-resolved se realizaron con 1024 puntos de datos en la dimensión dominio tiempo y 128 incrementos con 128 transitorios y una amplitud espectral de 60Hz en el dominio de acoplamiento escalar (J-coupling). Los datos fueron apodizados usando una función campana sinusoide y, después de ser transformado, un inclinado de 45° de las señales y un paso de simetrización proporcionan las dimensiones 2D ortogonales de desplazamiento químico y de acoplamiento escalar requeridos.

Los espectros CPMG spin-echo (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) fueron realizados con tiempo de eco total de 31 y 136 ms y 16 K puntos de datos. El tiempo de relajación T_2 fue determinado usando una serie de 16 espectros CPMG con tiempos de eco comprendidos entre 1 y 500 ms.

Por último se hicieron diferentes espectros de difusión monodimensionales, DOSY (Difussion-Ordered Spectroscopy) usando un eco estimulado con distintos tiempos de difusión (10ms, 200ms, 500ms y 1000ms).

La intensa señal del grupo metilo del lactato se usó para proporcionar picos de referencia, los valores de los desplazamientos químicos para las señales de ^1H y ^{13}C fueron 1.318 y 22.80 ppm, respectivamente.

5. ANÁLISIS DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA

Para la asignación de los picos e identificación de los metabolitos se empleó el programa SPARKY (Goddard TD SPARKY 3) (Fig. 22). En este programa se visualizan los espectros de RMN procesados. Las señales que aparecen en los espectros se pueden seleccionar, asignar e integrar usando una interface gráfica. Se puede trabajar con espectros de 2, 3 ó 4 dimensiones.

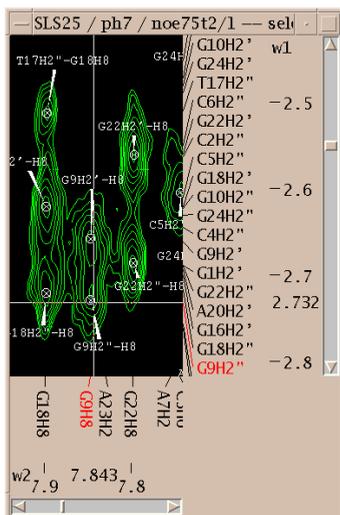
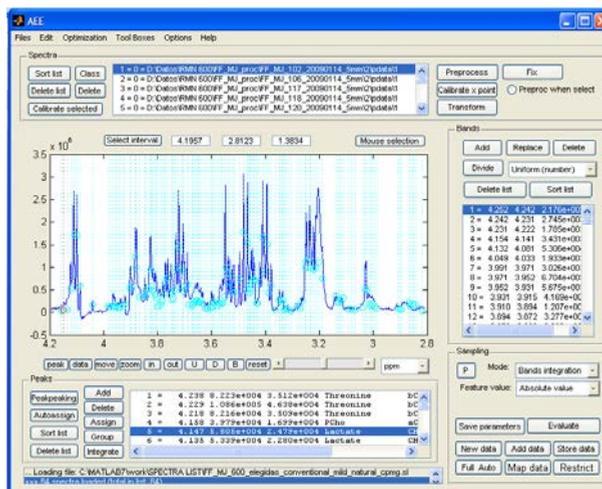


Figura 22.- Ventana del SPARKY con picos asignados

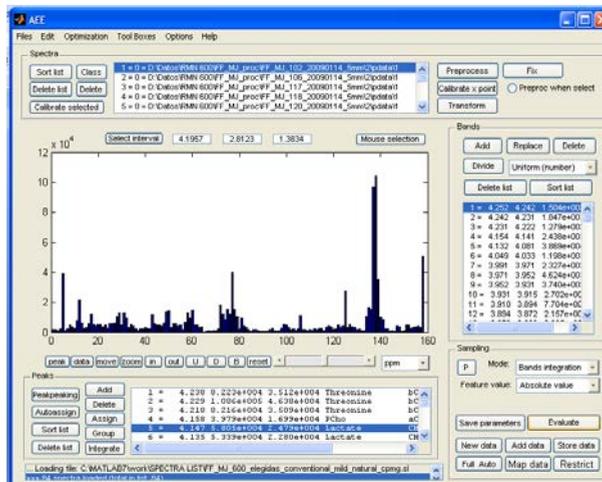
Otro de los programas utilizados para el análisis de los espectros de RMN fue el programa Abios (Esteve 2008), este programa permite la visualización de los espectros monodimensionales, la asignación de los picos que aparecen y la

integración de los mismos, el preprocesado de los espectros y dividir los espectros en bandas para su posterior análisis. También permite la estimación de las concentraciones de metabolitos identificados en los espectros y el análisis de los valores absolutos de los picos o bandas de espectros o normalizados con respecto a la suma total de picos o bandas o normalizados a un pico o banda seleccionada (Fig 23 A, B y C).

A



B



C

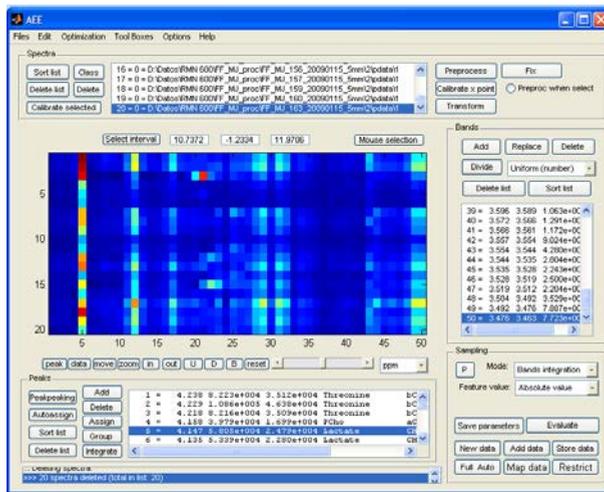


Figura 23 A, B y C.- Módulo de procesado de espectros Programa Abios

Una herramienta del programa permite la comparación visual de diversos espectros (Fig. 24).

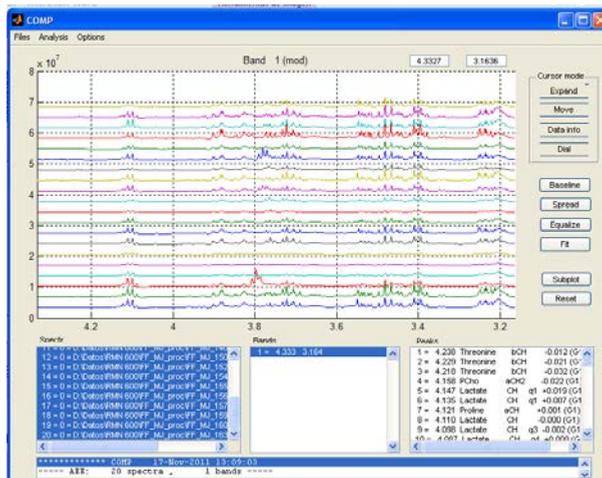


Figura 24.- Módulo de comparación de espectros programa Abios

Otra aplicación del programa permite el análisis estadísticos de los datos (Fig.25) (valor absoluto de intensidad de picos, integración de los picos o integración de las bandas o relativos a la suma total de bandas o picos relativo a un pico o banda seleccionado), pudiendo realizar análisis de jerarquía, PCA (Principal Component

Analysis), estudió de correlaciones lineales, análisis de distribución de datos, análisis multivariable de la varianza (MANOVA), análisis de la varianza (ANOVA),...

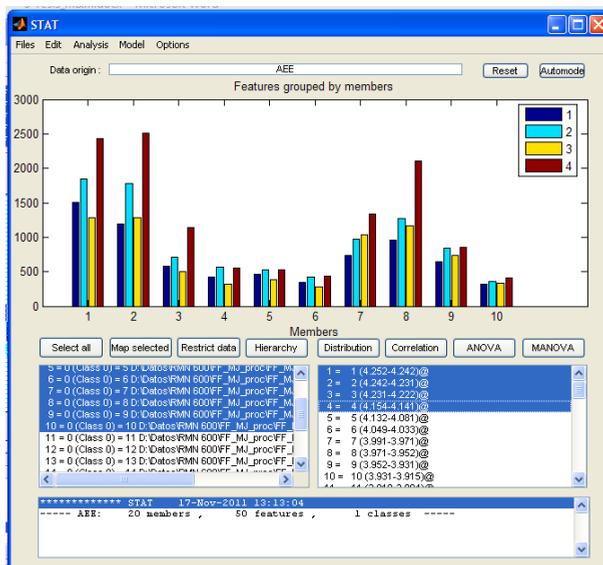


Figura 25.- Módulo de análisis estadístico programa Abios

Análisis de datos para la identificación de metabolitos presentes en el Líquido folicular

La asignación de los picos que aparecen en los espectros realizados al líquido folicular se llevo a cabo empleando el programa anteriormente mencionado SPARKY. Una vez localizados los picos con sus respectivos desplazamientos químicos en los espectros, estos se asignaban a un protón de un metabolito por comparación con trabajos publicados, especialmente, los realizados sobre fluidos corporales de composición similar (Fan 1996, Martínez-Bisbal 2004b, Nicholson 1995) o por búsquedas en bases de datos, BMRB: Biological Magnetic Resonance Data Bank , biomagresbank (Ulrich 2008) (<http://www.bmrwisc.edu>), HMDB: Human metabolome Database (Wishart 2007, Wishart 2009, Wishart 2013) (<http://www.hmdb.ca>)

Análisis de datos para la comparación de grupos de muestras

Los test de normalidad Kolmogorov–Smirnov y Lilliefors fueron aplicados para la estimación de la bondad de ajuste de los datos usando una distribución normal estándar. Los resultados de los test se consideraron estadísticamente significativos con un nivel del 5%.

Dos aproximaciones analíticas se usaron para la evaluación cuantitativa. Primero, el espectro fue dividido en bandas de anchuras variables que fueron independientemente integradas. Segundo, se midió la intensidad de una selección de picos. El valor absoluto y los valores normalizados (calculados dividiéndolos por la suma total) se usaron para calcular los parámetros estadísticos descriptivos y la correlación lineal entre los metabolitos y los factores característicos de las muestras.

Las concentraciones de lactato, glucosa, piruvato y β -Hidroxiutarato fueron determinadas en el espectro CPMG por ajuste de una combinación lineal del espectro de referencia obtenido de soluciones de concentración conocida de los metabolitos (todos los espectros CPMG fueron obtenidos en las mismas condiciones y el mismo orden de magnitud en las concentraciones).

Las correlaciones fueron calculadas dentro de cada grupo usando el test de probabilidad Student-t.

Los datos empleados para el estudio de las donantes se agruparon por:

A) Edad:

- Grupo A1, 16 muestras (<25 años)
- Grupo A2, 14 muestras (>27 años)

B) Rangos de fertilidad normalizada

- Grupo B1, 11 muestras (>60%)

- Grupo B2, 9 muestras (<50%)

Los rangos de fertilidad normalizada fueron calculados relativos al número total de ovocitos que fueron obtenidos tras la estimulación (independientemente de su estado de maduración).

C) Resultados de embarazo

- Grupo C1, 13 muestras (embarazo positivo)
- Grupo C2, 11 muestras (no embarazo o no transferencia del embrión)

Por otro lado, los datos usados en el estudio de los ciclos se agruparon:

A) Tipo de estimulación:

- Grupo Estimulación Convencional, 39 muestras
- Grupo Estimulación Natural, 29 muestras
- Grupo Estimulación Ligera, 16 muestras

B) En función de si eran pacientes o donantes:

- Grupo Donantes, 31 muestras
- Grupo Pacientes, 53 muestras

Estos dos últimos grupos se pueden subdividir a su vez en función de la estimulación:

- Grupo de donantes
 - Grupo Estimulación Convencional, 16 muestras

- Grupo Estimulación Natural junto con Ligera, 15 muestras

- Grupo de pacientes

- Grupo Estimulación Convencional 22 muestras
- Grupo Estimulación Natural junto con Ligera 28 muestras

El grupo de pacientes también se puede subdividir en función de:

- Si se ha producido desarrollo o no del embrión

- Grupo Con Desarrollo 12 muestras
- Grupo sin desarrollo 10 muestras

- En función de la edad:

- Grupo ≤ 35 Años 12 muestras
- Grupo > 35 Años 16 muestras

RESULTADOS

1. Estudio de los espectro de RMN para la identificación de los metabolitos del líquido folicular	102
2. Estudio de los espectros de RMN para la comparación de las muestras de líquido folicular de mujeres donantes de óvulos frente a las pacientes de tratamientos de fertilidad.....	117
2.1. Agrupacion Jerarquía y PCA	118
2.2. Análisis Multivarianza (MANOVA) y Análisis de la varianza (ANOVA).....	118
2.3. Correlaciones.....	120
2.4. Estimación de concentraciones de Glucosa, Lactato y Piruvato	121
3. Estudio de los espectros de RMN para la comparación de las muestras de líquido folicular de mujeres sometidas a diferentes ciclos de estimulación ovocitaria.....	122
3.1. Tabla edad e IMC	122
3.2. Jerarquía y PCA.....	123
3.3. MANOVA y ANOVA.....	124
3.4. Correlaciones.....	140
3.5. Estimación de concentraciones.....	145

La mayoría de los espectros obtenidos en las condiciones finalmente seleccionadas y descritas en el apartado Material y Métodos, mostraron una resolución y una relación señal/ruido adecuados. Los espectros con una deficiente resolución fueron eliminados del estudio.

1. ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DE RMN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS DEL LÍQUIDO FOLICULAR

El primer experimento realizado a todas las muestras fue un ^1H presat. Este es el espectro más completo y por lo tanto, el más complejo de los espectros monodimensionales de RMN realizados al líquido folicular. En la figura 26A, pueden apreciarse los numerosos picos, unos 200 aproximadamente, que aparecen en este tipo de espectros, especialmente en la región comprendida entre 3 y 4 ppm (Fig. 26C), además puede observarse un solapamiento considerable entre algunas de las señales procedentes de los metabolitos más abundantes que enmascaran a las señales de los metabolitos presentes en menor concentración. En la totalidad del espectro son patentes las alteraciones de la línea base producidas por moléculas o complejos macromoleculares cuyas señales son más anchas que las de los metabolitos de menor tamaño, estas modificaciones se observan especialmente en la región del espectro comprendida entre 0.4 y 2.4 ppm (Fig. 26B). Sin embargo, a pesar de ser espectros muy complejos, son los que más información contienen debido a que aparecen todas y cada una de las señales de los metabolitos del fluido estudiado, excepto la del agua.

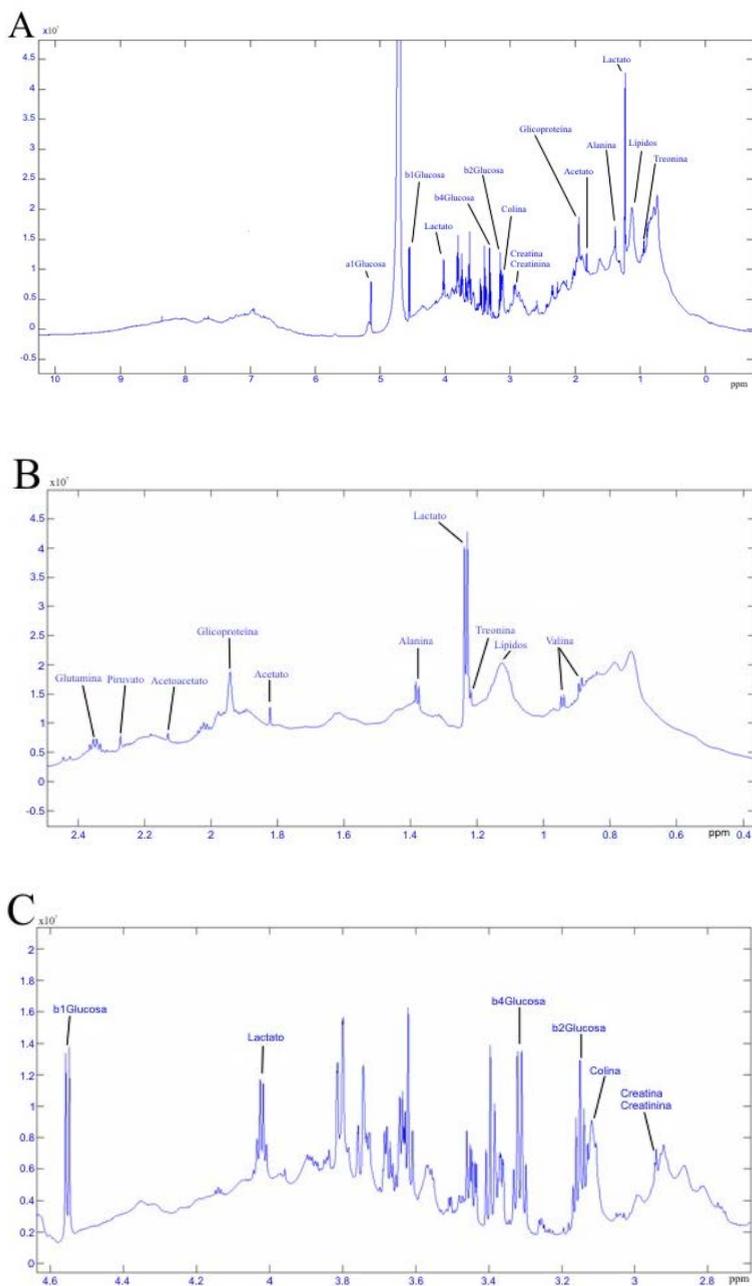


Figura 26.- Espectro de ^1H RMN 800MHz de líquido folicular medido a 298K con las asignaciones más significativas. A: Espectro 1D con supresión del agua mediante Presaturación.. B: Detalle del espectro de presaturación (δ 0.4 a 2.4ppm). C: Detalle del espectro de presaturación (δ 2.7 a 4.6ppm)

A continuación, se realizaron diversos experimentos monodimensionales que permitieron la simplificación del espectro eliminando algunas señales causantes de solapamientos, alteraciones de la línea base y multiplicidades de las señales. En la figura 27 se puede apreciar esta simplificación de los espectros (CPMG Fig. 27B y difusión Fig. 27C) al compararse con un espectro monodimensional con supresión del agua (Fig. 27A).

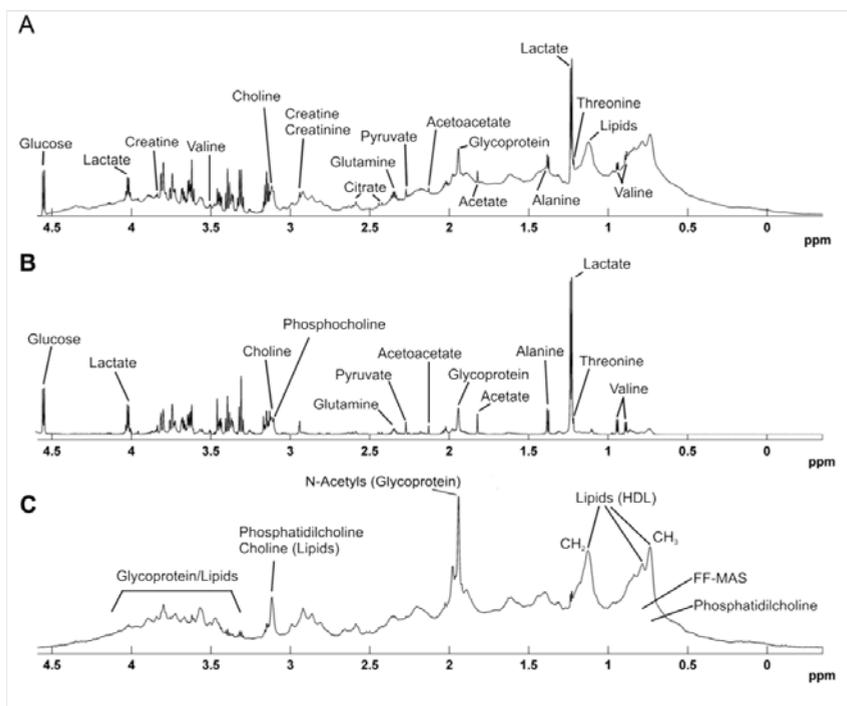


Figura 27.- Espectro de ^1H RMN 800MHz de líquido folicular medido a 298K. A: Región de los alifáticos (0 a 4.5 ppm) del espectro 1D con supresión del agua mediante Presaturación. B: Región de los alifáticos (0 a 4.5 ppm) del espectro CPMG. C: Región de los alifáticos (0 a 4.5 ppm) del espectro DOSY.

Los experimentos J-resolved (Fig. 28) que, como se ha descrito en el apartado material y métodos, permiten, mediante algunas manipulaciones matemáticas de giro y simetrización, desplazar a una segunda dimensión la multiplicidad de las señales causada por el acoplamiento homonuclear. La posterior proyección en una dimensión proporciona un espectro sin el acoplamiento de los núcleos obteniéndose

un espectro más sencillo, lo que contribuye también a la desaparición de algunas señales de macromoléculas por relajación durante el experimento.

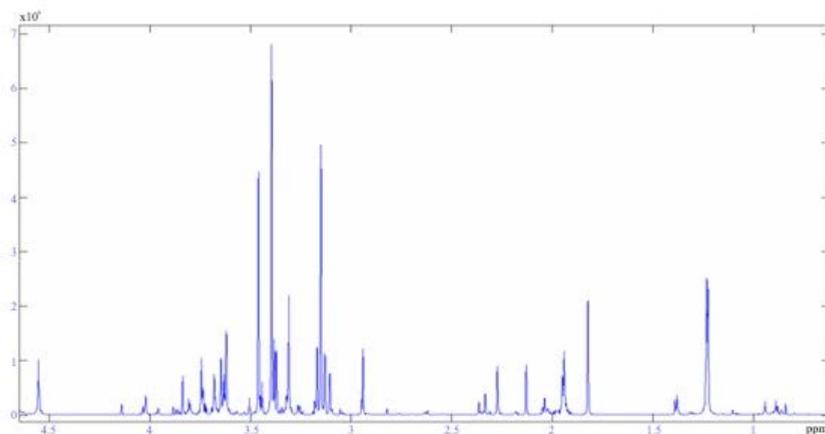


Figura 28. Proyección en una dimensión del espectro J-Resolved de ^1H RMN 800MHz de líquido folicular medido a 298K.

En el experimento CPMG de 136ms (Fig. 27B) se puede apreciar una mejora de la línea base debido a la supresión de las señales que poseen una menor movilidad, es decir con un T_2 bajo, que pertenecen a macromoléculas o asociaciones de metabolitos a proteínas. En este espectro únicamente se observan las señales de las moléculas más pequeñas, con grupos muy móviles o con tiempos de correlación muy elevados.

Por el contrario, con los experimentos de difusión 1D podemos seleccionar las señales de las moléculas que difunden más despacio, es decir, macromoléculas o complejos macromoleculares (Fig. 27C).

De los espectros monodimensionales podemos obtener los desplazamientos químicos del protón. Sin embargo el análisis exclusivo de los espectros 1D no da información suficiente para identificar los metabolitos que componen el fluido a estudiar debido a la complejidad de los espectros y a la variedad de metabolitos existentes con un desplazamiento químico similar. Por lo tanto, se han de emplear

espectros bidimensionales para separar los desplazamientos solapados en una dimensión y determinar la conectividad existente en sistemas de espín intramoleculares, tanto entre protones de carbonos contiguos (TOCSY y COSY) como entre un protón y su carbono (HSQC (Fig. 29)).

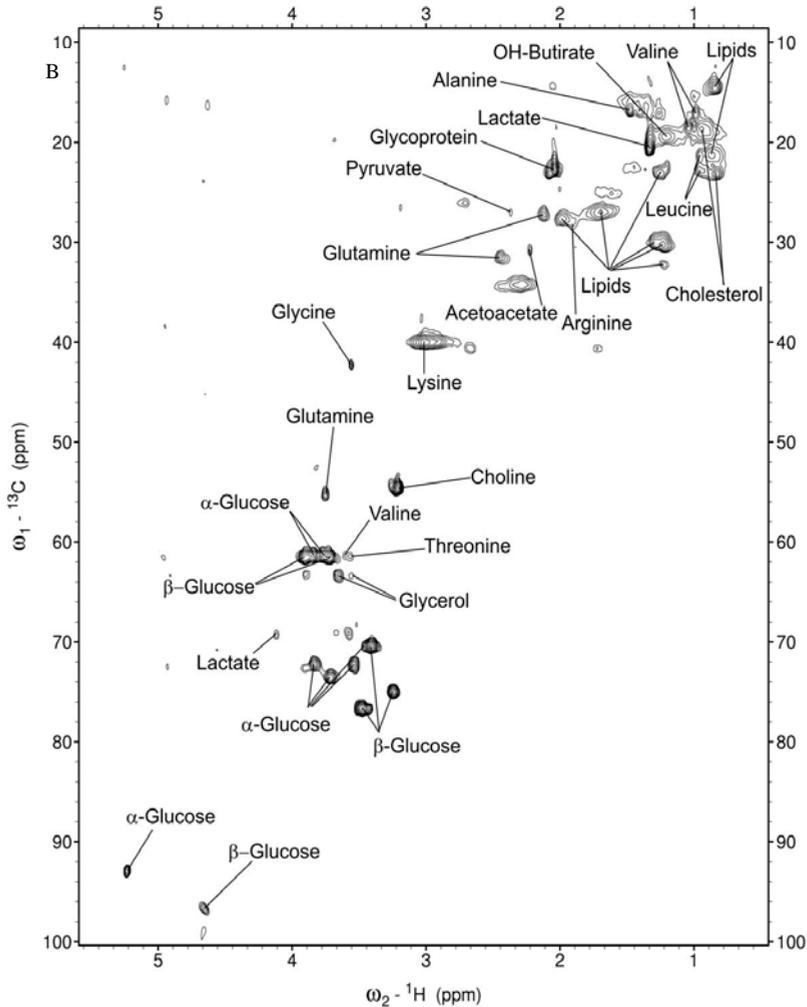


Figura 29.- Espectro 2D HSQC de ^1H RMN 500MHz de líquido folicular medido a 298K con las asignaciones más significativas.

La observación y el análisis de estos espectros permiten determinar los desplazamientos químicos del ^1H y el ^{13}C . Estos desplazamientos se pueden

comparar con los de sustancias conocidas, dando una primera idea de la composición metabólica de la muestra. Para este trabajo hemos utilizado los desplazamientos de las sustancias conocidas que aparecen en otros estudios realizados en gliomas, suero (Fan 1996, Martínez-Bisbal 2004b, Nicholson 1995) y soluciones patrón de metabolitos.

Finalmente, en la región comprendida entre 0.8 y 8.5 ppm se han determinado 131 desplazamientos químicos del ^1H de sustancias conocidas que aparecen listados en la Tabla 4 junto a los desplazamientos correspondientes de ^{13}C . Estos desplazamientos químicos pertenecen a un total de 41 metabolitos diferentes. Estos resultados fueron publicados en el artículo (Piñero-Sagredo 2010)

Tabla 4.- Desplazamientos químicos asignados a las señales y asignación a sus correspondientes grupos y metabolitos identificados

$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	Multiplicidad	Molécula	Grupo	Experimentos*
0,81	25,18	m	Colesterol	C26 and C27	1, 2, 6
0,82	16,62	-	Lípido	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$	1, 2, 4, 5, 6
0,87	20,91	-	Colesterol	C21	1, 6
0,93	20,98	-	Colesterol	C19	1, 6
0,93	23,55	d	Leucina	$\delta^2\text{H}$	6
0,95	24,85	d	Leucina	$\delta^1\text{H}$	4, 5, 6
0,98	19,32	d	Valina	$\gamma^1\text{H}$	1, 2, 3, 4, 5, 6
1,03	20,69	d	Valina	$\gamma^2\text{H}$	1, 2, 3, 4, 5, 6
1,11		d	Isobutirato	CH_3	4
1,18	21,48	d	β -Hidroxibutirato	γH	1, 2, 3, 4, 6
1,21	34,30	-	Lípido	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$	1, 2, 6
1,21	32,15	-	Lípido	$(\text{CH}_2)_n$	1, 2, 6
1,24	25,22	-	Lípido	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$	4, 5, 6
1,30	32,03	-	Lípido	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$	4, 5, 6
1,31	21,82	d	Treonina	γH	1, 2, 4, 5, 6
1,32	22,80	d	Lactato	βH	1, 2, 3, 4, 5, 6
1,45		m	Lisina	γH	4
1,46		-	Lípido	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$	4
1,47	18,93	d	Alanina	βH	1, 2, 3, 4, 5, 6
1,57	26,91	-	Lípido	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$	6

1,66		m	Arginina	γ H	4
1,70		m	Lisina	δ H	4
1,70	42,63	m	Leucina	β H γ H	4, 5, 6
1,88	32,70	m	Lisina	β H	4, 5, 6
1,89	30,38	m	Arginina	β H	4, 6
1,91	25,97	s	Acetato	β H	1, 2, 3, 4, 6
1,97	29,65	-	Lípido	CH=CHCH ₂	1, 5, 6
1,99	29,65	-	Lípido	CH=CHCH ₂	1, 4, 5, 6
2,00	26,48	m	Prolina	γ H	4, 5, 6
2,03		-	Lípido	CH ₂ CH=CH	1
2,03	24,84	s	Glicoproteína	Nac	1, 2, 3, 4, 6
2,04		m	Prolina	β 1H	4
2,08	29,79	m	Ácido Glutámico	β H	4, 6
2,11	29,08	m	Glutamina	β H	4, 5, 6
2,11	16,94	s	Metionina	SCH ₃	6
2,21	32,97	s	Acetoacetato	γ H	1, 2, 3, 4, 6
2,23	36,06	-	Lípido	CH ₂ CO	1, 6
2,25	31,90	m	Valina	β H	4, 5, 6
2,30		m	β -Hidroxibutirato	α 1H	4
2,33		m	Ácido Glutámico	γ H	4
2,34		m	Prolina	β 2H	4
2,35	28,98	s	Piruvato	β H	1, 2, 3, 4, 6
2,38		m	β -Hidroxibutirato	α 2H	4
2,43	33,51	m	Glutamina	γ H	1, 2, 3, 4, 5, 6
2,51		d	Citrato	α 2H γ 2H	1, 2, 3, 4, 5
2,53		s	Metilamina	CH ₃	4
2,65		d	Citrato	α 1H γ 1H	1, 2, 3, 4, 5
2,66		dd	Ácido Aspártico	β 1H	4
2,69	28,04	-	Lípido	CH=CHCH ₂ CH=CH	6
2,71		-	Sarcosina	NCH ₃	3
2,74	28,04	-	Lípido	CH=CHCH ₂ CH=CH	6
2,80		dd	Ácido Aspártico	β 2H	4, 5
2,81		s	Trimetilamina	CH ₃	4
2,83		dd	Asparagina	β 1H	4
2,92		dd	Asparagina	β 2H	4
3,01	41,95	t	Lisina	ϵ H	4, 6
3,02	39,48	s	Creatina	NCH	1, 2, 3, 6
3,03	32,85	s	Creatinina	NCH	1, 2, 3, 6

3,04		dd	Tirosina	β 1H	4, 5
3,09		dd	Fenilalanina	β 1H	4, 5
3,17	56,42	s	Colina	NCH3	6
3,18		dd	Tirosina	β 2H	4, 5
3,20		dd	Histidina	β H	4
3,20	56,50	s	Glicerofosfocolina	NH	1, 2, 6
3,20	56,50	s	Fosfocolina	NH	1, 2, 6
3,23	43,27	t	Arginina	δ H	4, 6
3,23	76,90	dd	β -Glucosa	H2	1, 2, 3, 4, 5, 6
3,23		t	Taurina	H2N	4, 5
3,27		-	Mio-inositol	H5	3
3,34		s	TMAO	CH3	4
3,35	48,84	m	Prolina	δ 1H	4, 5, 6
3,39	72,33	t	β -Glucosa	H4	1, 2, 3, 4, 5, 6
3,41	72,34	t	α -Glucosa	H4	1, 2, 3, 4, 6
3,41	38,10	t	Taurina	H2S	4, 6
3,41	48,84	m	Prolina	δ 2H	4, 5, 6
3,46	78,42	ddd	β -Glucosa	H5	1, 2, 3, 4, 6
3,48	78,51	t	β -Glucosa	H3	1, 2, 3, 4, 5, 6
3,51	70,05	m	Colina	β H	4, 6
3,53	74,23	dd	α -Glucosa	H2	1, 2, 3, 4, 6
3,53	74,01	ddd	α -Glucosa	H5	1, 2, 3, 6
3,54	44,24	s	Glicina	α H	1, 2, 3, 6
3,55	65,28	dd	Glicerol	1,3H α	4, 6
3,55	63,19	d	Treonina	α H	1, 2, 3, 4, 5, 6
3,59		-	Sarcosina	α H	3
3,60	63,21	d	Valina	α H	1, 2, 3, 4, 5, 6
3,64	65,28	dd	Glicerol	1,3H β	4, 6
3,65	69,07	m	Fosfocolina	β H	4, 6
3,67	68,49	m	Glicerofosfocolina	β H	6
3,70	75,39	t	α -Glucosa	H3	6
3,71	63,48	dd	β -Glucosa	H6	4, 6
3,71		dd	Leucina	α H	4
3,74	63,29	dd o m	α -Glucosa	H6	6
3,74		t	Lisina	α H	4, 5
3,74		t	Arginina	α H	4
3,74		m	Ácido Glutámico	α H	4
3,74	57,10	t	Glutamina	α H	4, 5, 6
3,76	74,52	m	Glicerol	H2	4, 6

3,77	53,16	q	Alanina	α H	4, 5, 6
3,79	54,55	dd	Ácido Aspártico	α H	4, 5, 6
3,82	63,29	dd o m	α -Glucosa	H6	6
3,82		dd	Serina	α H	4
3,83	74,10		α -Glucosa	H5	6
3,89	63,48	dd	β -Glucosa	H6	4, 6
3,92	56,49	s	Creatina	α H	6
3,92		dd	Tirosina	α H	4, 5
3,94		dd	Serina	β 2H	4
3,96		dd	Histidina	α H	4
3,96		dd	Fenilalanina	α H	4, 5
3,97		dd	Serina	β 1H	4
3,97		dd	Asparagina	α H	4
4,04	58,85	s	Creatinina	α H	1, 2, 6
4,06	58,31	m	Colina	α H	4, 6
4,10	71,13	q	Lactato	α H	1, 2, 3, 4, 5, 6
4,12	63,96	m	Prolina	α H	4, 6
4,15	67,91	m	β -Hidroxiacetato	β H	4, 6
4,23	68,87	m	Treonina	β H	4, 5, 6
4,28	61,89	m	Fosfocolina	α H	4, 6
4,32	61,95	m	Glicerofosfocolina	α H	6
4,64	98,77	d	β -Glucosa	H1	1, 2, 3, 4, 5, 6
5,23	94,89	d	α -Glucosa	H1	1, 2, 3, 4, 6
5,26		-	Lípido	CH=CHCH ₂ CH=CH	1, 5
5,29		-	Lípido	CH=CHCH ₂ CH=CH	1, 5
6,70		s	3-Metilhistidina	H4	4, 7
6,88		m	Tirosina	3,5H	1, 2, 3, 4, 5
7,03		s	Histidina	H4	1, 2, 3, 4
7,17		m	Tirosina	2,6H	1, 2, 3, 4, 5
7,31		m	Fenilalanina	H4	4
7,40		m	Fenilalanina	2,6H	4
7,60		s	3-Metilhistidina	H2	4
7,75		s	Histidina	H2	1, 2, 3, 4
8,45		s	Formiato	H	1, 2, 3, 4

*(1=1D, 2=CPMG, 3=JRES, 4=TOCSY, 5=COSY, 6=HSQC, 7=DOSY)

Los desplazamientos químicos de algunos metabolitos no aparecieron en los espectros anteriormente citados o se encontraban enmascarados debido al

solapamiento existente, sin embargo se pudieron observar en los espectros cuya complejidad había sido reducida en función de sus propiedades espectroscópicas, anteriormente mencionados (CPMG, J-resolved,...).

Otros experimentos llevados a cabo fueron series de experimentos CPMG a partir de los cuales se estimaron los tiempos de relajación T_2 (Fig. 30) de algunas señales relativamente aisladas mediante un ajuste del decaimiento de la señal a una función exponencial. De esta manera se puede determinar el grado de movilidad de los átomos constituyentes. Este experimento, además puede ayudar a determinar las asociaciones que se producen entre los metabolitos libres y las proteínas de la muestra. En el espectro se puede observar la desaparición gradual de los compuestos que poseen una menor movilidad conforme aumenta el tiempo de eco en cada espectro monodimensional. Se obtuvieron T_2 en el rango de 15-30 ms para los metabolitos de bajo peso molecular y de alrededor de 2 ms para las macromoléculas. Sin embargo, los ajustes no fueron lo suficientemente precisos para proporcionar unas medidas exactas de T_2 . Esto puede ser debido a la distorsión provocada por el solapamiento residual, particularmente el debido a macromoléculas, y a un comportamiento más complejo de la relajación, debido a interacciones entre metabolitos y macromoléculas.

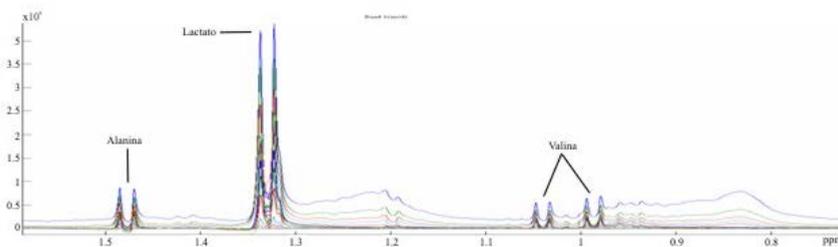


Figura 30.- Relajación T_2 de las señales analizadas mediante la serie de espectros de ^1H RMN 800MHz CPMG de líquido folicular medido a 298K (2-0.7 ppm).

Del mismo modo que para el CPMG, se realizaron series de experimentos de difusión DOSY en los que se modificaba la potencia de difusión. Estos espectros permiten determinar el grado de difusión de los componentes del líquido folicular y

calcular la constante de difusión. Además puede proporcionar una estimación acerca de la forma y el tamaño de estas moléculas. Estas series se han empleado para observar de manera cualitativa la movilidad relativa de los diferentes componentes moleculares de la muestra. En estas series de experimentos se observa la separación de las moléculas en función de su difusión, ya que las moléculas de mayor tamaño difunden más despacio

También se llevaron a cabo experimentos a diferentes temperaturas (Fig. 31). Los espectros obtenidos se calibraron utilizando el desplazamiento químico de la señal del lactato a 1.318 ppm. En estos espectros se observa que al aumentar la temperatura aumenta la resolución del espectro, especialmente de las moléculas más grandes.

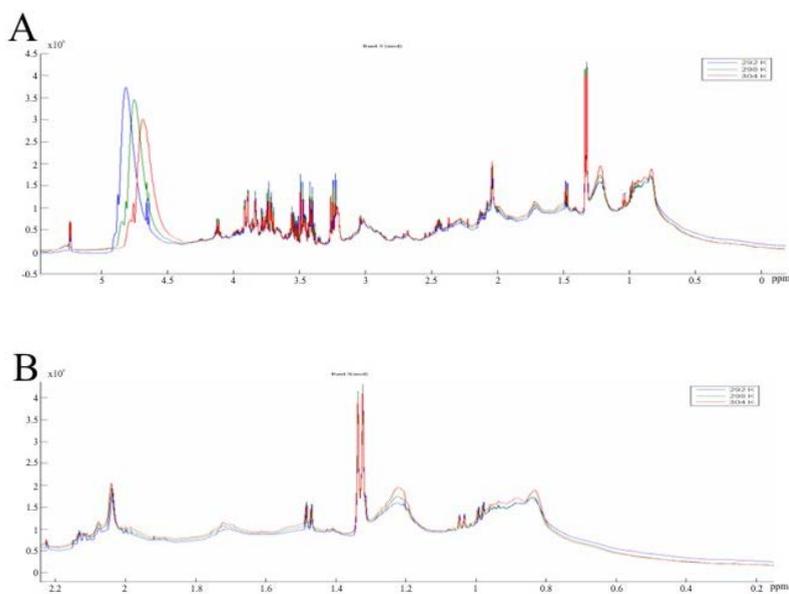


Figura 31.- Espectro ^1H RMN 800MHz. A: Espectro 1D con supresión de agua mediante Presaturación de la región comprendida entre 5.5 y 0 ppm a diferentes temperaturas: 292K, 298K y 304K. B: Detalle Espectro 1D con supresión de agua mediante Presaturación de la región comprendida entre 2.2 y 0.2 ppm a diferentes temperaturas: 292K, 298K y 304K.

Cuando los espectros de 30 muestras de donantes fueron comparados, no se apreció ninguna variación aparente en la posición de los picos. Sin embargo, se encontró un heterogéneo nivel de variación en las intensidades en las diferentes regiones del espectro. Para obtener una estimación más precisa de las variaciones intrínsecas de estos perfiles metabólicos, se emplearon 2 aproximaciones analíticas. Primero, el espectro fue dividido en bandas que fueron integradas independientemente. Segundo, se midió la intensidad de una selección de picos. En ambos casos, el valor absoluto no tuvo una distribución normal. Sin embargo, después de la normalización (dividiendo por la suma total de las bandas o picos seleccionados) los valores normalizados siguieron una distribución normal. La comparación del valor absoluto muestra que algunas muestras estaban más diluidas que otras, probablemente debido a las diferencias en el tamaño de los folículos recogidos en cada caso.

Las regiones espectrales fueron divididas en diferentes intervalos de bandas y un total de 118 bandas de anchuras variables fueron evaluadas. Las regiones más variables encontradas fueron las que correspondía a las bandas (en ppm): (3.55-3.26), (3.17-3.11), (2.91-2.71), (1.35-1.32) y (1.28-1.18). Estas regiones tuvieron un coeficiente de variación mayor del 10%. Las regiones con menos variaciones fueron (3.11-2.91), (2.07-1.37) y (1.13-0.88), las cuales tuvieron coeficientes de variación menores del 5%. Los picos que fueron analizados siguieron una variación que fue congruente con la de las bandas. Sin embargo, todos estos análisis fueron llevados a cabo en presencia de señales anchas de las macromoléculas, y por lo tanto, se espera un gran número de influencias, probablemente dominadas por el contenido de lípidos. Sin embargo, cuando se usa el espectro CPMG con TE (Tiempo de Echo) de 136ms las señales de las macromoléculas no fueron tan visibles y las variaciones debidas a los metabolitos de bajo peso molecular podrían ser estimadas independientemente. Los resultados de este análisis posterior mostraron una gran variación de las señales de bajo peso molecular tras la normalización, relativa al total de las 118 bandas integradas que fueron revisadas. Algunos metabolitos pudieron ser evaluados porque sus señales se separaron bien y sus multiplicidades fueron fácilmente identificables. Por ejemplo, Glucosa, Lactato y Alanina mostraron

un coeficiente de variación (cv) de 20%; Valina y Creatina, 25% y Formiato, Piruvato y β -Hidroxibutirato, 30%. El valor más bajo encontrado fue para el Glicerol, 10%. Todos estos metabolitos fueron compatibles con una distribución normal, excepto en el caso del Acetoacetato, el cual tuvo una alta variación (cv de 60%).

Un análisis sistemático de los espectros 1D, usando los espectros de presat y CPMG TE 136ms fue alcanzado por integración de todos los picos observados y calculando la correlación lineal con algunos factores, por ejemplo, la edad y el rango de fertilización de los ovocitos. No se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa.

Las correlaciones entre algunos intermediarios importantes en las rutas metabólicas del folículo fueron analizadas a través de la integración de picos con buena resolución en el espectro CPMG 136ms. Los datos de Glucosa, Lactato, Acetato, Acetoacetato, β -Hidroxibutirato y Piruvato fueron divididos en dos grupos de edad, bien separados y equilibrados: ≤ 25 años (grupo A1) y ≥ 27 años (grupo A2). Una correlación negativa se puede observar entre Glucosa con β -Hidroxibutirato, Lactato, Piruvato y Acetoacetato, mientras que la correlación entre Glucosa y Acetato es positiva.

Tabla 5.- Correlaciones Metabolito-Metabolito en el líquido folicular de mujeres donantes de óvulos de espectros CPMG (valores de probabilidad en paréntesis). Grupo A: agrupados por edad; Grupo A1: donantes ≤ 25 años; Grupo A2: donantes ≥ 27 años. Grupo B: agrupados por rangos de fertilización normalizada; Grupo B1: $>60\%$; Grupo B2: $<50\%$. Grupo C: agrupados por los resultados de FIV; Grupo C1: embarazo positivo; Grupo C2: no embarazo o no transferencia del embrión.

Correlación metabolito-metabolito	Grupo A1	Grupo A2
Glucosa- β -Hidroxiacetato	-0.68 (0.009)	-0.69 (0.008)
Glucosa-Lactato	-0.79 (0.004)	-0.84 (0.002)
Glucosa-Piruvato	-0.75 (0.004)	-0.83 (0.002)
Glucosa-Acetoacetato	-0.59 (0.027)	*
Glucosa-Acetato	0.59 (0.035)	0.58 (0.031)
Piruvato- β -Hidroxiacetato	0.82 (0.000)	0.75 (0.002)
Piruvato-Lactato	0.80 (0.000)	0.95 (0.000)
Piruvato-Acetoacetato	0.68 (0.007)	*
Piruvato-Acetato	-0.65 (0.012)	*
Acetoacetato- β -Hidroxiacetato	0.77 (0.001)	*
Acetoacetato-Lactato	0.75 (0.003)	*
Acetoacetato-Acetato	-0.73 (0.003)	*
Acetato-Lactato	-0.77 (0.002)	*
Lactato- β -Hidroxiacetato	0.69 (0.006)	0.66 (0.014)
Correlación metabolito-metabolito	Grupo B1	Grupo B2
Glucosa- β -Hidroxiacetato	-0.66 (0.027)	-0.75 (0.021)
Glucosa-Lactato	-0.87 (0.002)	-0.79 (0.017)
Glucosa-Piruvato	-0.84 (0.003)	-0.74 (0.025)
Glucosa-Acetoacetato	-0.61 (0.045)	*
Glucosa-Acetato	0.79 (0.004)	-0.69 (0.039)
Piruvato- β -Hidroxiacetato	0.76 (0.007)	0.92 (0.000)
Piruvato-Lactato	0.91 (0.000)	0.84 (0.007)
Piruvato-Acetoacetato	0.73 (0.010)	*
Piruvato-Acetato	-0.67 (0.025)	*
Acetoacetato- β -Hidroxiacetato	0.82 (0.002)	*
Acetoacetato-Lactato	0.70 (0.016)	*
Acetoacetato-Acetato	-0.71 (0.013)	*
Acetato-Lactato	0.60 (0.049)	0.85 (0.033)

Lactato-β-Hidroxibutirato	*	*
Correlación metabolito-metabolito	Grupo C1	Grupo C2
Glucosa-β-Hidroxibutirato	-0.70 (0.010)	-0.69 (0.021)
Glucosa-Lactato	-0.79 (0.004)	-0.90 (0.003)
Glucosa-Piruvato	-0.74 (0.002)	-0.83 (0.002)
Glucosa-Acetoacetato	-0.61 (0.029)	*
Glucosa-Acetato	0.76 (0.003)	0.66 (0.035)
Piruvato-β-Hidroxibutirato	0.81 (0.001)	0.71 (0.014)
Piruvato-Lactato	0.90 (0.000)	0.93 (0.000)
Piruvato-Acetoacetato	0.75 (0.003)	*
Piruvato-Acetato	-0.57 (0.042)	*
Acetoacetato-β-Hidroxibutirato	0.81 (0.001)	0.71 (0.014)
Acetoacetato-Lactato	0.70 (0.009)	*
Acetoacetato-Acetato	-0.64 (0.026)	-0.64 (0.037)
Acetato-Lactato	0.67 (0.013)	0.72 (0.012)
Lactato-β-Hidroxibutirato	*	*

*No se encontraron correlaciones significativas

Algunas de las correlaciones entre metabolitos fueron también encontradas cuando las muestras fueron agrupadas por las tasas de fertilización normalizada (grupo B1: >60%; grupo B2: <50%) o por los resultados de FIV (grupo C1: embarazo positivo; grupo C2: no embarazo o no transferencia del embrión).

Finalmente se realizó una estimación de las concentraciones de Lactato y Glucosa de estas muestras, obteniéndose unos resultados de 1.966 ± 0.750 mM y 4.499 ± 1.381 , respectivamente, de media entre las 30 muestras de donantes empleadas en este estudio.

2. ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DE RMN PARA LA COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LÍQUIDO FOLICULAR DE MUJERES DONANTES DE ÓVULOS FRENTE A LAS PACIENTES DE TRATAMIENTOS DE FERTILIDAD

Una vez se identificó la composición del líquido folicular, el siguiente paso fue la comparación entre muestras de donantes y de pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica para observar posibles alteraciones metabólicas en el grupo de las pacientes con la idea de proporcionar metabolitos que puedan actuar como posibles biomarcadores de problemas de la fertilidad.

Para el análisis de los datos en este estudio se emplearon los espectros de 52 muestras de líquido folicular, de las cuales 29 son donantes y 23 pacientes. Todas las donantes habían sido estimuladas mediante el mismo protocolo de estimulación ovárica (Agonistas Ciclo Largo ½ Dosis). Las pacientes en cambio, habían sido estimuladas con diferentes protocolos (Antagonistas Dosis diaria o Citrato de clomifeno) y todas ellas tenían baja respuesta a la estimulación.

Tabla 6.- Edad e Índice de Masa Corporal de las muestras empleadas para este estudio (media \pm desviación estándar)

	Edad (años)	IMC (kg/m²)
Donantes	24.8 \pm 3.6	22.0 \pm 3.0
Pacientes	33.4 \pm 1.4	24.1 \pm 3.5 (4 muestras sin datos)

La mayoría de los análisis se llevaron a cabo sobre los espectros CPMG por tener la línea base menos alterada

Los experimentos realizados a estas muestras de líquido folicular fueron dos espectros monodimensionales, por un lado un 1H 1D presat, para eliminar la señal del agua y observar mejor el resto de las señales del espectro y por otro un CPMG 136 ms que elimina las señales de las macromoléculas, mejorando así la línea base del espectro.

2.1. Agrupamiento jerárquico y PCA

Los análisis de jerarquía se realizaron para observar la tendencia de las muestras a agruparse entre sí. Este análisis se realizó empleando la intensidad de los picos (185 picos) relativo a la suma total de los picos. Además también se realizó el análisis relativo a un pico o banda seleccionada (creatina). Además se llevó a cabo una reducción de factores (donde se seleccionan las variables más diferentes de entre las bandas/picos más similares).

En el análisis de Jerarquía no se obtuvo ningún agrupamiento evidente entre los espectros clasificados en donantes y pacientes.

Empleando las mismas aproximaciones que en el estudio de jerarquía se realizó un análisis por PCA, donde tampoco se observa ninguna tendencia ni separación dentro de los grupos.

2.2. Análisis Multivariable de la varianza (MANOVA) y Análisis de la varianza (ANOVA)

Con el análisis multivarianza se pretendió encontrar posibles diferencias metabólicas que permitan identificar ambos grupos de muestras e identificar variables individuales, mediante ANOVA, cuyas medias sean diferentes en ambos grupos.

Un análisis multivarianza (MANOVA) de la intensidad de los picos se llevó a cabo referenciando los datos a la suma total de picos (185 picos). En el análisis multivarianza de todos los grupos de picos del espectro (8.447-3.819 ppm /3.809-3.337 ppm /3.324-2.573 ppm /2.566-0.828 ppm) se observa la separación de las muestras en las dos poblaciones definidas.

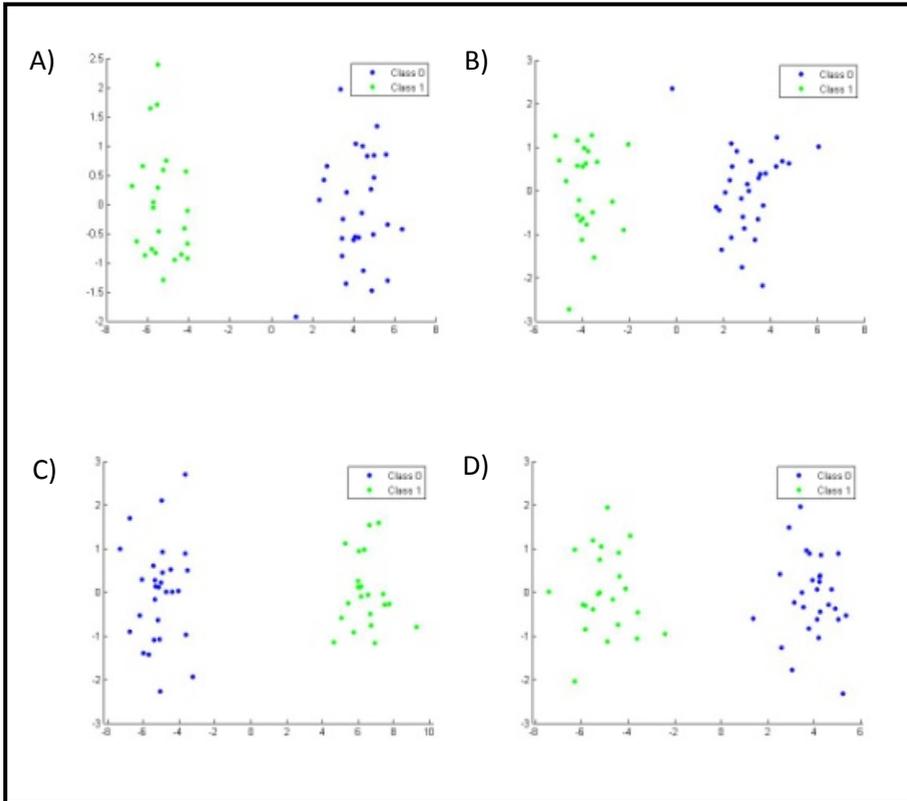


Figura 32.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1-47 (8.447-3.819 ppm) Mean dimension 1 (0.0007) B) MANOVA PICOS 48-94 (3.809-3.337 ppm) Mean dimension 1 (0.0221) C) MANOVA PICOS 95-141 (3.324-2.573 ppm) Mean dimension 1 (0.0001) D) MANOVA PICOS 142-185 (2.566-0.828 ppm) Mean dimension 1 (0.0002). Class 0: Donantes (azul); Class 1: Pacientes (verde).

También se realizó un análisis de las variables de manera individual. Únicamente dos picos identificados como colina (3.189 ppm) y creatina (3.028 ppm) proporcionaron medias diferentes para ambos grupos de manera estadísticamente significativa (ANOVA <0.05). Los valores de estos picos se solapan pero las medias de cada grupo son significativamente diferentes siendo, la media de las muestras donantes inferior a la media de las muestras de pacientes.

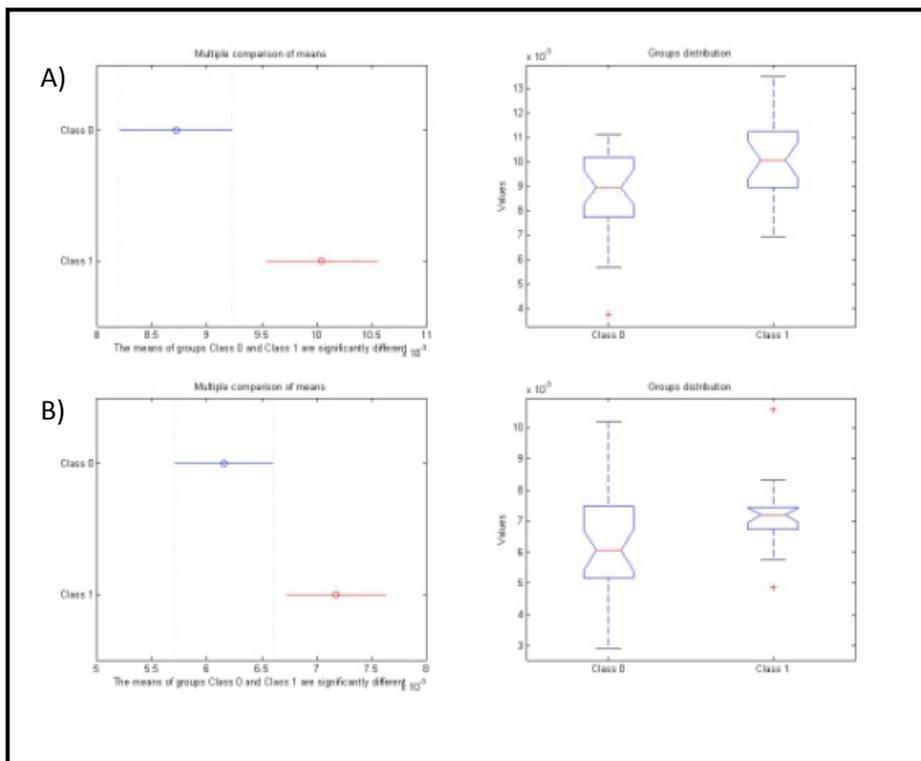


Figura 33.- Metabolitos con ANOVA < 0.05 : A) Colina: Pico 3.189 ppm (Colina NCH3) Anova: 0.012 Kruskal-Wallis: 0.030 B) Creatina: Pico 3.028 ppm (Creatina NCH) Anova: 0.026 Kruskal-Wallis: 0.020.

Class 0: Donantes; Class 1: Pacientes.

2.3. Correlaciones

Se estudiaron las correlaciones entre los intermediarios más importantes en las rutas metabólicas identificados en los espectros monodimensionales del líquido folicular. Para ello se empleó la intensidad de los picos de cada metabolito relativo a la suma total de los picos. Las correlaciones se obtuvieron en ambos grupos de muestras, permitiendo la comparación entre ellos para detectar posibles diferencias entre las correlaciones internas en los dos grupos. También permite estudiar las relaciones metabólicas entre los distintos metabolitos y observar posibles alteraciones de las rutas energéticas en las que están implicados estos metabolitos.

En la siguiente tabla se observan los valores obtenidos.

Tabla 7. Valores de correlaciones lineales entre determinados metabolitos obtenidos en los distintos grupos (probabilidad entre paréntesis)

Correlaciones metabolito-metabolito	Donantes	Pacientes
Lactato-Glucosa	- 0.6201 (0.0052)	-0.6061 (0.0007)
Lactato-Piruvato	-	0.5775 (0.0063)
Glucosa-Acetato	0.4445 (0.0224)	-
Piruvato- Acetato	0.4062 (0.0288)	-
Acetoacetato-Acetato	-	0.4740 (0.0223)
Acetoacetato-Lípidos	0.6518 (0.0001)	-

2.4. Estimación de concentraciones de Glucosa, Lactato y Piruvato

Se estimaron las concentraciones de tres importantes metabolitos intermediarios de las rutas energéticas y sus respectivas desviaciones estándar mostrándose los resultados en la siguiente tabla.

Tabla 8. Valores de las medias de las concentraciones estimaciones de Glucosa, Lactato y Piruvato y sus respectivas desviaciones estándar.

	Donantes		Pacientes	
	Media	DS	Media	DS
Glucosa (mM)	6.2237	5.1600	6.0233	6.4812
Lactato (mM)	2.0700	2.0492	1.6563	1.7524
Piruvato (mM)	0.1461	0.1571	0.1697	0.2064

Se observa que las desviaciones estándar de los tres metabolitos en ambos grupos son muy grandes, solapándose los datos de las concentraciones de los dos grupos.

3. ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DE RMN PARA LA COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE LÍQUIDO FOLICULAR DE MUJERES SOMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE ESTIMULACIÓN OVOCITARIA

Del total de muestras analizadas, 84 espectros fueron las que finalmente se emplearon para el análisis, descartando los espectros con peor resolución y relación señal/ruido.

3.1. Tabla edad e IMC

Tabla 9.- Valores de las medias y desviaciones estándar de la edad y el IMC para cada uno de los grupos estudiados (media \pm desviación estándar)

	Nº de muestras	EDAD (años)	Rango edad (años)	IMC (kg/m ²)	Rango IMC (kg/m ²)
TOTAL	84 muestras	32,5 \pm 6,7	18-45	23,8 \pm 2,8	17,85-34,9
PACIENTES	53 muestras	36,7 \pm 3,6	29-45	23,8 \pm 4,5	17,85-34,9
Pacientes E. Ligera + Natural	30 muestras	37,3 \pm 4,0	31-45	24,6 \pm 4,8	19,2-34,37
Pacientes E. Convencional	23 muestras	35,9 \pm 2,8	29-40	22,8 \pm 4,1	17,85-34,9
DONANTES	31 muestras	25,3 \pm 4,3	18-34	22,4 \pm 2,6	17,9-30,5
Donantes E. Ligera + Natural	15 muestras	25,5 \pm 4,5	18-33	21,8 \pm 2,1	17,9-25,9
Donantes E. Convencional	16 muestras	25,0 \pm 4,1	18-34	23,0 \pm 2,9	19,2-30,5
ESTIMULACIÓN CONVENCIONAL	39 muestras	31,4 \pm 6,4	18-40	22,9 \pm 3,6	17,85-34,9
ESTIMULACIÓN LIGERA + NATURAL	45 muestras	33,3 \pm 6,9	18-45	23,6 \pm 4,2	17,9-34,37

La edad media de todas las muestras fue de 32 años.

La edad de las muestras varía entre los 18 y los 45 años, estando limitado en el grupo de las donantes entre 18-34 años por las características intrínsecas de dicho

grupo. La edad de las pacientes comienza mucho después debido a la espera que se produce en las mujeres para tener el primer hijo y en sospechar de un problema en su fertilidad. La edad media de las pacientes (36.7 años) fue mayor que la de las donantes (25.3 años).

La edad media de las mujeres sometidas a ciclos de estimulación convencional fue similar a la de las mujeres con ciclos de Estimulación Natural (junto con Estimulación Ligera).

El IMC medio de todos los grupos estaba dentro de la normalidad (18.5-24.99 kg/m²)

De las 31 muestras de líquido folicular de mujeres donantes, 16 pertenecen a mujeres donantes sometidas a Estimulación Convencional y 15 a muestras de líquido folicular de mujeres sometidas a Estimulación Natural (junto con las muestras de Estimulación Ligera)

De la misma manera, las 53 muestras de líquido folicular de pacientes fueron separadas en función del tipo de estimulación al que fueron sometidas: 23 muestras de líquido folicular de mujeres pacientes sometidas a Estimulación Convencional y 30 muestras de líquido folicular de mujeres pacientes sometidas a Estimulación Natural (+ E. Ligera)

3.2. Jerarquía y PCA

Los análisis de jerarquía se realizaron para observar la tendencia de las muestras a agruparse entre sí. Este análisis se realizó empleando por un lado, el valor absoluto de los picos (172 picos) y por otro lado, el valor absoluto de la integración de las bandas (201 bandas uniformes de 0.06 ppm de tamaño ó 507 bandas uniformes de aproximadamente 0.024 ppm). Además del valor absoluto también se realizaron el análisis relativo a la suma total de picos y bandas. Además se llevó a cabo una reducción de factores (donde se seleccionan las 10 variables más diferentes de entre las 20 más similares).

En el análisis de Jerarquía no se obtuvo ninguna separación entre los espectros clasificados en mujeres con Estimulación Convencional y mujeres con Estimulación Natural (+ E. Ligera). Tampoco se observó ninguna tendencia entre las muestras de donantes y pacientes, ni dentro de cada uno de estos grupos clasificados por el tipo de ciclo empleado (Estimulación Convencional y mujeres con Estimulación Natural (+ E. Ligera))

Empleando las mismas aproximaciones que en el estudio de jerarquía se realizó un análisis por PCA, donde tampoco se observa ninguna tendencia ni clasificación dentro de los grupos.

En el análisis de jerarquía y PCA de las donantes clasificadas en función de si se ha producido desarrollo del embrión o no y de las pacientes clasificadas en función de la edad (\leq y $>$ 35 años) tampoco proporcionó una clasificación significativa.

3.3. MANOVA y ANOVA

Estos análisis se emplearon para identificar posibles metabolitos que permitan diferenciar los tipos de estimulación utilizados y, así tratar de comprender la implicación de estos protocolos de estimulación en el metabolismo del folículo y de esta manera intentar seleccionar la mejor opción para estimular a las mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida.

Se eliminaron de este análisis 4 muestras en las que se observó un perfil diferente al general obtenido en las muestras estudiadas para evitar que estas diferencias influyeran en el análisis estadístico de los resultados. Al estudiar las características de estas muestras no se observó ninguna similitud que haga pensar en una situación determinada que modifique el espectro de este modo. En la siguiente figura (Fig. 34) se observa el espectro de una de las muestras aceptadas (verde) y una rechazada (azul). En la imagen se puede apreciar que las zonas de mayor diversidad entre ambos espectros están comprendidas en las regiones de 3.74-3.62 ppm y 1.19-1.12 ppm, que podría corresponder con algún tipo de contaminación externa durante la toma o preparación de la muestra.

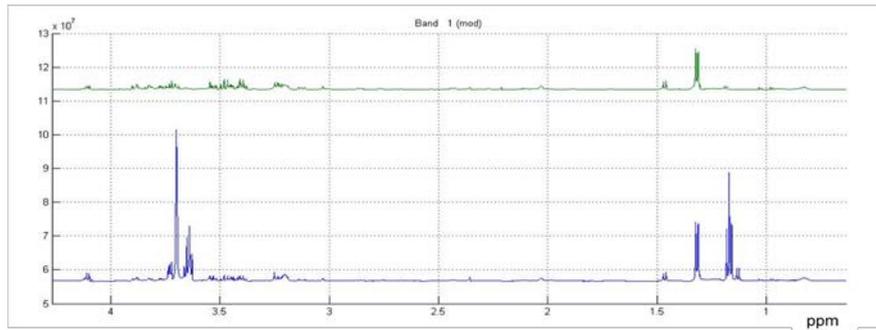


Figura 34.- Espectros de RMN 600 MHz de experimentos CPMG 136ms de una muestra aceptada para el estudio (verde) y una muestra eliminada (azul)

Estimulación Convencional (Class 0: 38 muestras) vs Estimulación Natural + Ligera (Class 1: 42 muestras)

El análisis MANOVA de 80 muestras usando la intensidad de picos relativo a la suma total de picos (221 picos) proporciona tres intervalos de picos (4.238-3.532 ppm / 3.522-2.592 ppm / 2.540-0.826 ppm) que separan el grupo de estimulación convencional del grupo de estimulación natural con una probabilidad <0.05 (0.0000/0.0002/0.0001 respectivamente).

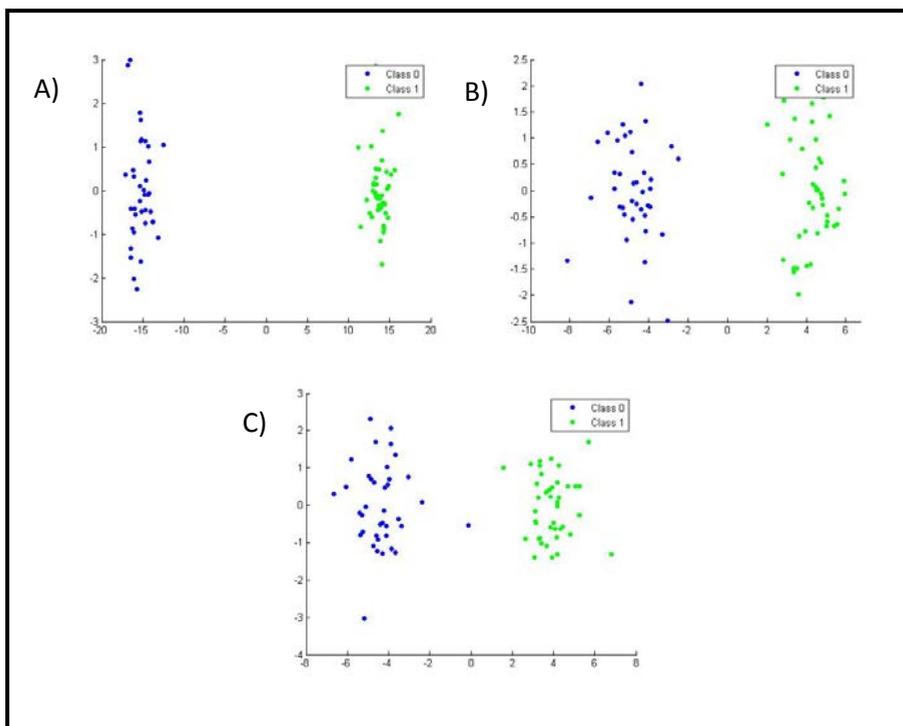
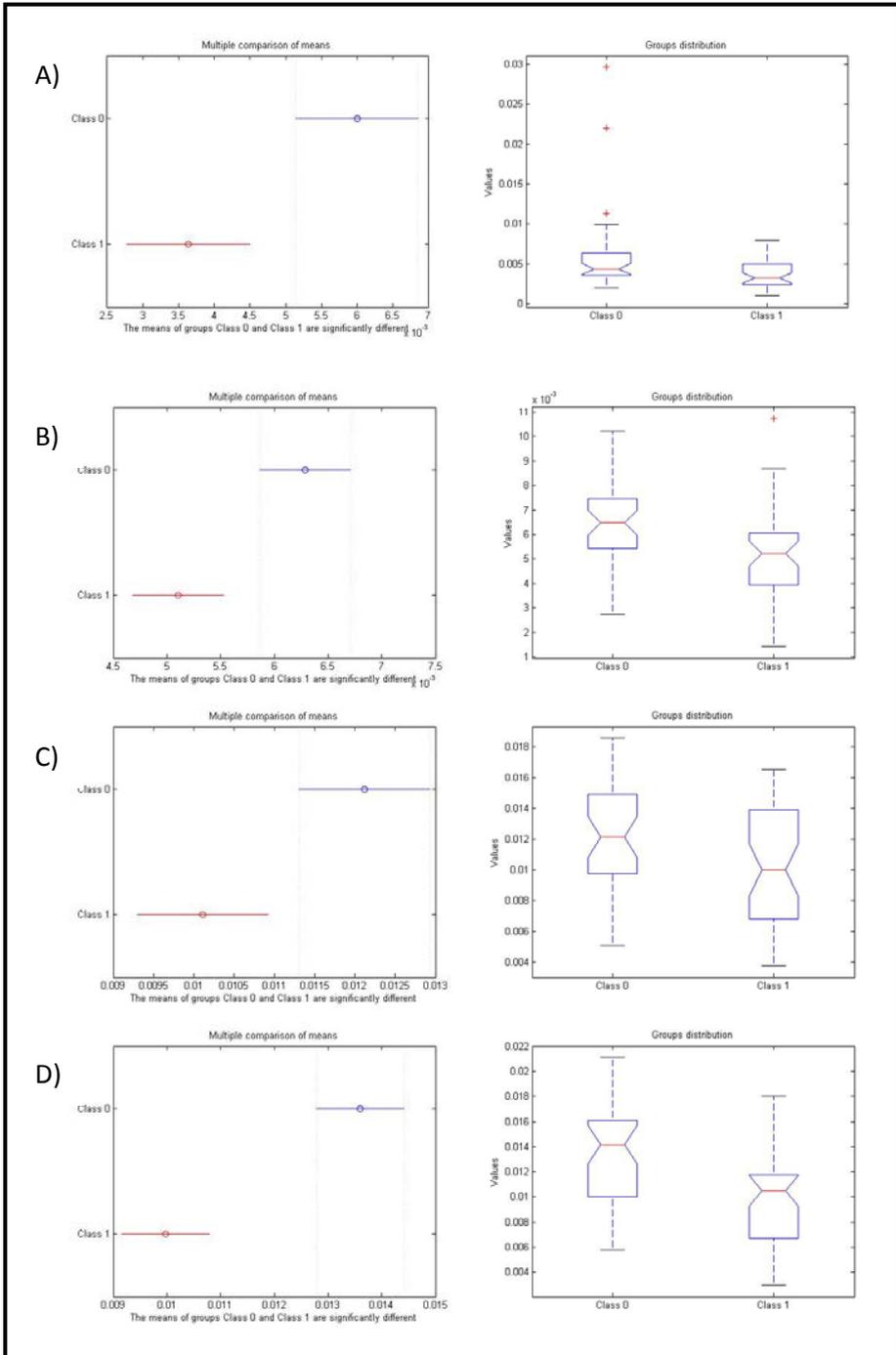
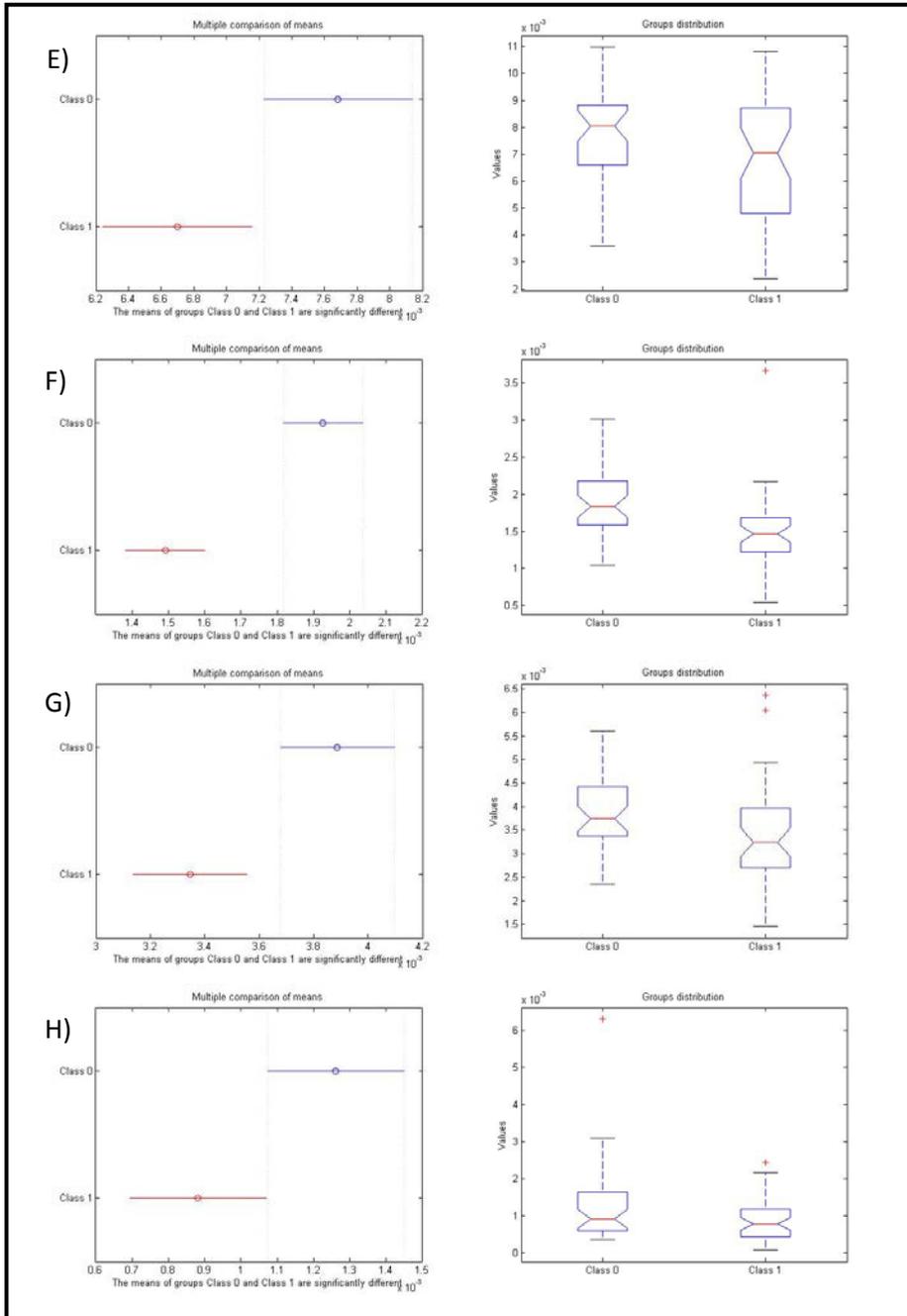


Figura 35.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1 a 75 (4.238-3.532 ppm) Mean dimension 1 (0.0000) B) MANOVA PICOS 76 a 150 (3.522-2.592 ppm) Mean dimension 1 (0.0002) C) MANOVA PICOS 151 a 221 (2.540-0.826 ppm) Mean dimension 1 (0.0001). Class 0: Estimulación Convencional (azul); Class 1: Estimulación Natural + Ligera (verde).

El análisis de varianza ANOVA proporciona una serie de picos con medias diferentes entre ambos grupos de muestras con una probabilidad menor de 0.05. En todos ellos, la media para la Estimulación Natural (+E. Ligera) es menor que para la Estimulación Convencional. Estos picos corresponden a los metabolitos b-Hidroxibutirato, Glicerofosfocolina, Fosfocolina, Colina, Creatina, Citrato, Piruvato, Acetoacetato, Glicoproteína y Lípidos.





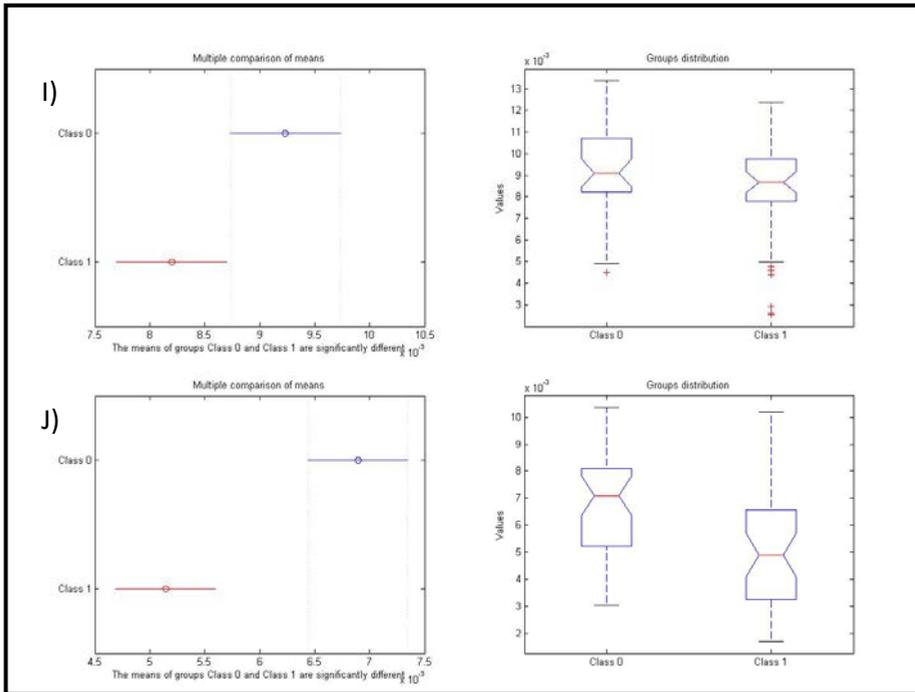


Figura 36.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 1.192 ppm (β -Hidroxibutirato γ H) Anova: 0.008 Kruskal-Wallis: 0.003 B) Pico 3.027 ppm (Creatina NCH) Anova: 0.007 Kruskal-Wallis: 0.004 C) Pico 3.213 ppm (Glicerofosocolina NH) Anova: 0.016 Kruskal-Wallis: 0.027 D) Pico 3.202 ppm (Fosocolina NH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 E) Pico 3.189 ppm (Colina NCH3) Anova: 0.034 Kruskal-Wallis: 0.050 F) Pico 2.669 ppm (Citrato α 1H γ 1H) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 G) Pico 2.359 ppm (Piruvato β H) Anova: 0.012 Kruskal-Wallis: 0.005 H) Pico 2.217 ppm (Acetoacetato γ H) Anova: 0.048 Kruskal-Wallis: 0.059 I) Pico 2.027 ppm (Glicoproteína Nac) Anova: 0.044 Kruskal-Wallis: 0.081 J) Pico 0.826 ppm (Lípido CH₃(CH₂)_n) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000. Class 0: Estimulación Convencional; Class 1: Estimulación Natural + Ligera.

Estimulación Convencional (Class 0: 38 muestras) vs Estimulación Ligera (Class 1: 14 muestras) vs Estimulación Natural (Class 2: 28 muestras)

El análisis MANOVA de los 75 picos presentes en cada intervalo de picos proporciona diferentes resultados: en el intervalo 4.238-3.532 ppm se separa el grupo de Estimulación Ligera de Estimulación Natural y ambos del grupo de Estimulación Convencional (Mean dimension 2 (0.0000 0.0000)). En el intervalo de 75 picos que va desde 3.522-2.592 ppm se separa el grupo de Estimulación Ligera

de Estimulación Convencional y ambos del grupo de Estimulación Natural (Mean dimension 2 (0.0010 0.0255)). Finalmente el análisis MANOVA de los 71 picos presentes en el intervalo 2.540-0.826 ppm separa el grupo de Estimulación Ligera de Estimulación Natural pero no separa a estos dos grupos del grupo de Estimulación Convencional (Mean dimension 1 (0.0020 0.4504)).

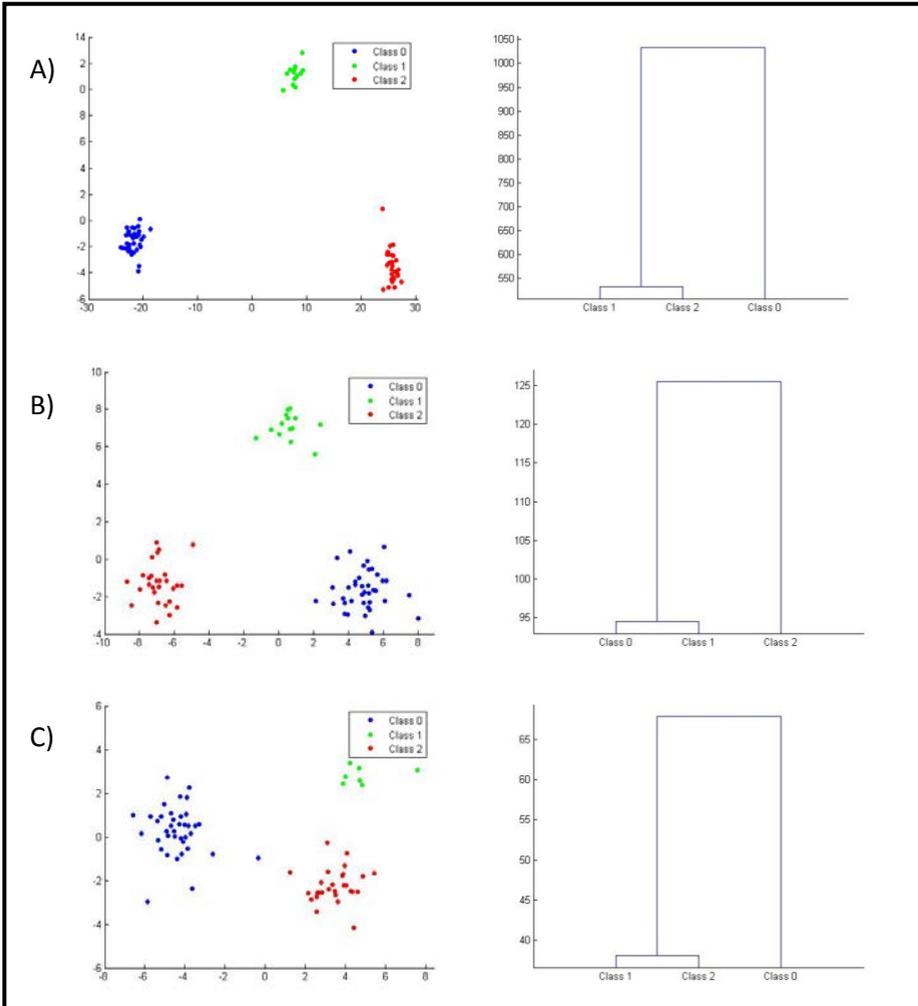
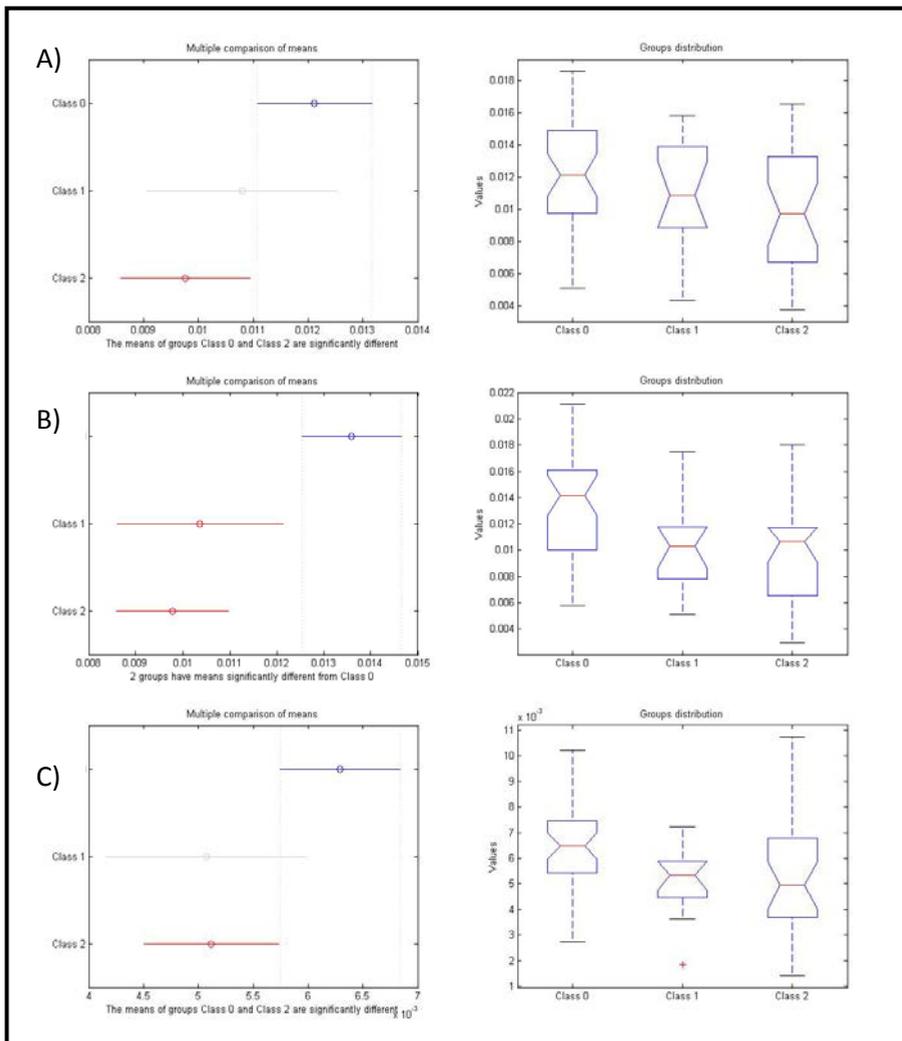
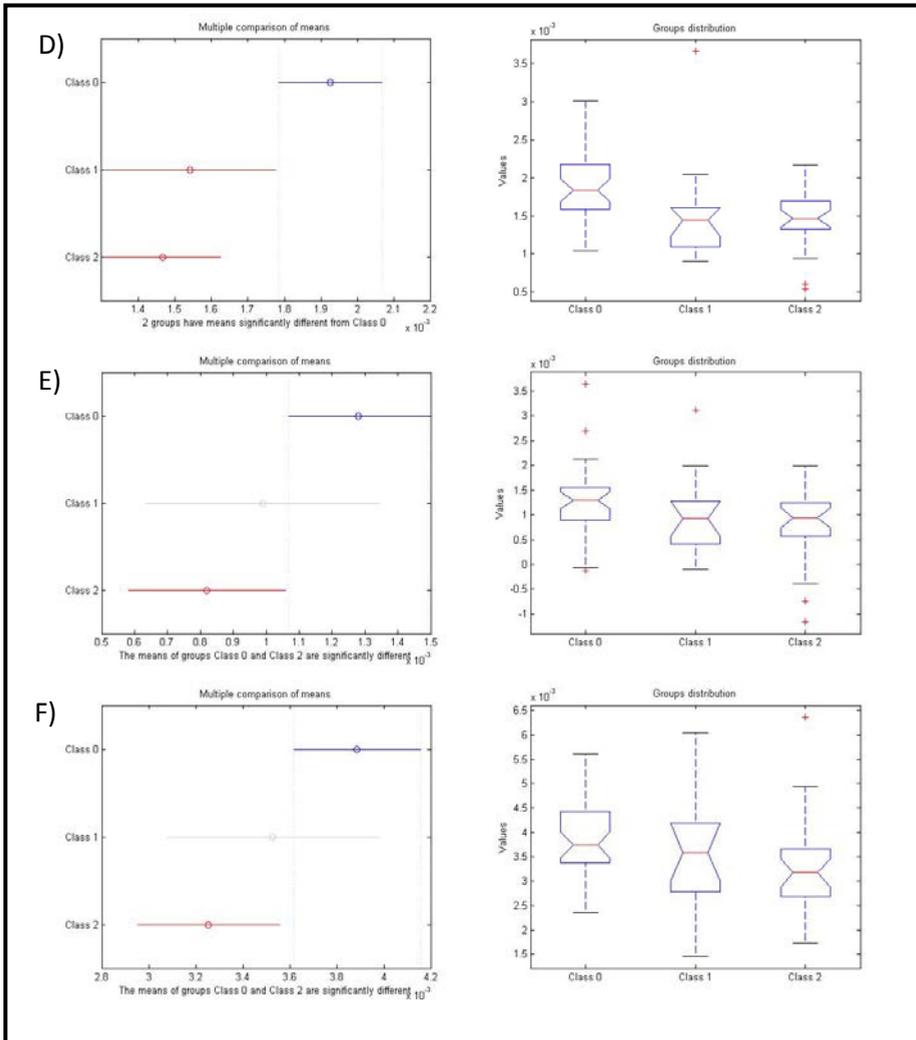


Figura 37.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) 75 picos en el intervalo 4.238-3.532 ppm (Mean dimension 2 (0.0000 0.0000)). B) 75 picos en el intervalo 3.522-2.592 ppm (Mean dimension 2 (0.0010 0.0255)). C) 71 picos en el intervalo 2.540-0.826 ppm (Mean dimension 1 (0.0020 0.4504)). Class 0: Estimulación Convencional (azul); Class 1: Estimulación Ligera (verde); Class 2: Estimulación Natural (rojo).

- Picos que proporcionan un análisis de la varianza (ANOVA) con una probabilidad menor del 0.05.
- Las medias de los grupos de Estimulación Convencional y Natural de ciertos metabolitos son significativamente diferentes. Siendo, en todos ellos, la media para la Estimulación Natural menor que para la Estimulación Convencional. Estos metabolitos son la Glicerofosocolina, Fosfocolina, Creatina, Citrato, b-Hidroxibutirato, Piruvato y Lípidos.





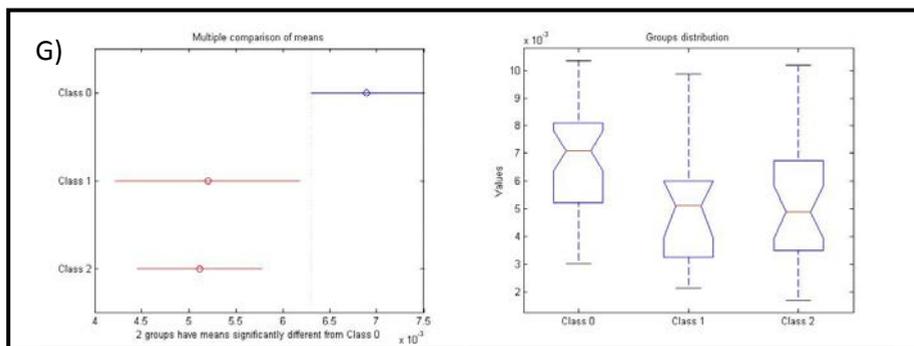


Figura 38. Metabolitos con ANOVA < 0.05 : A) Pico 3.213 ppm (Glicerofosocolina NH) Anova: 0.038 Kruskal-Wallis: > 0.05 B) Pico 3.202 ppm (Fosocolina NH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.001 C) Pico 3.027 ppm (Creatina NCH) Anova: 0.025 Kruskal-Wallis: 0.015 D) Pico 2.669 ppm (Citrato α 1H γ 1H) Anova: 0.001 Kruskal-Wallis: 0.000 E) Pico 1.192 ppm (β -Hidroxiutirato γ H) Anova: 0.029 Kruskal-Wallis: 0.010 F) Pico 2.359 ppm (Piruvato β H) Anova: 0.029 Kruskal-Wallis: 0.011 G) Pico 0.826 ppm (Lípido CH₃(CH₂)_n) Anova: 0.001 Kruskal-Wallis: 0.002. Class 0: Estimulación Convencional; Class 1: Estimulación Ligera; Class 2: Estimulación Natural.

Donantes (Class 0: 30 muestras) vs Pacientes (Class 1: 50 muestras)

- El análisis MANOVA de 80 muestras usando la Intensidad de picos relativo a la suma total de picos proporciona tres intervalos de picos (4.238-3.532 ppm / 3.522-2.592 ppm / 2.540-0.826 ppm) que separa el grupo de donantes del de pacientes con una probabilidad < 0.05 (0.0000/0.0000/0.0438 respectivamente).

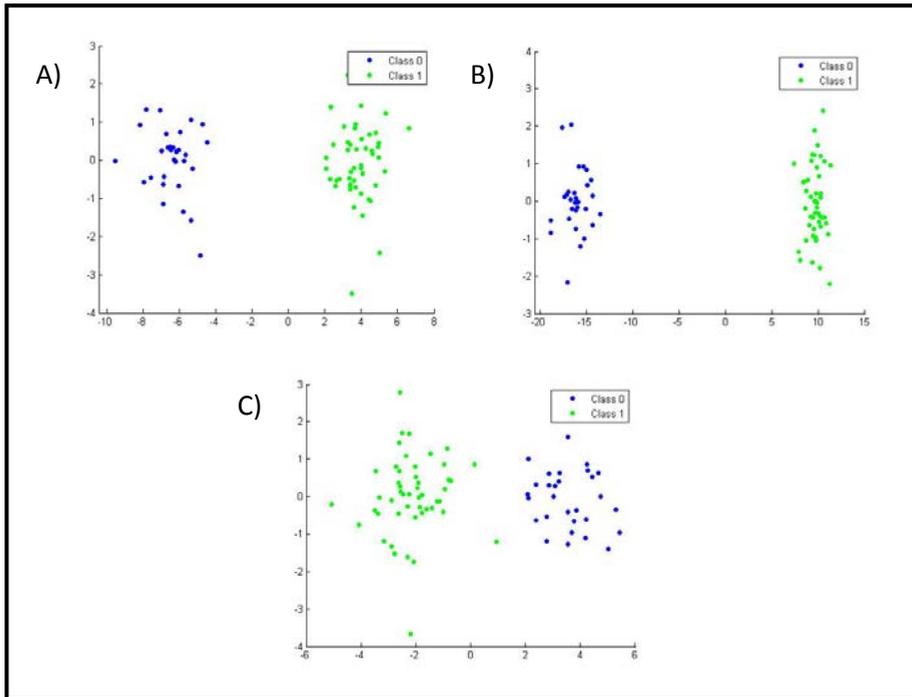


Figura 39.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1-75 (4.238-3.532 ppm) Mean dimension 1 (0.0000) B) MANOVA PICOS 76-150 (3.522-2.592 ppm) Mean dimension 1 (0.0000) C) MANOVA PICOS 151-221 (2.540-0.826 ppm) Mean dimension 1 (0.0438). Class 0: Donantes (azul); Class 1: Pacientes (verde).

- Picos que proporcionan un análisis de la varianza (ANOVA) con una probabilidad menor del 0.05.

Análisis de la intensidad de picos relativo a la suman total: Lactato y Colina parecen tener medias significativamente diferentes entre ambos grupos de muestras. La media en el grupo de las pacientes es mayor que en el grupo de las donantes.

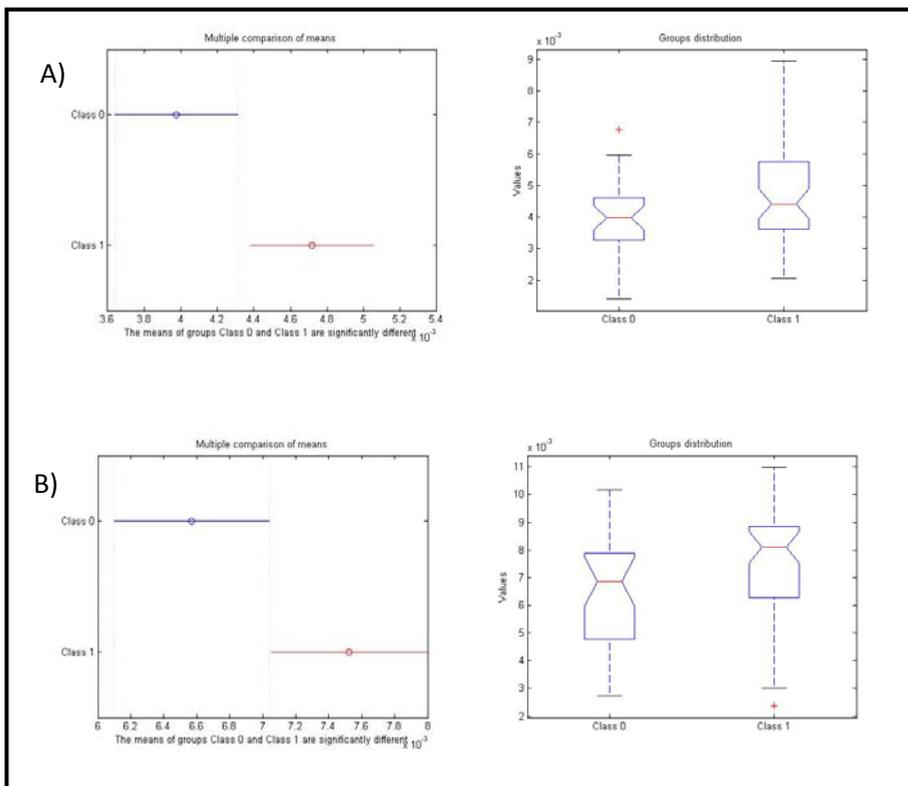


Figura 40.- Metabolitos con ANOVA <math>< 0.05</math>: A) Pico 4.121 ppm (Lactato α H) Anova: 0.031 Kruskal-Wallis: >0.05 B) Pico 3.189 ppm (Colina NCH3) Anova: 0.047 Kruskal-Wallis: 0.043. Class 0: Donantes; Class 1: Pacientes.

Donantes: Estimulación Convencional (Class 0: 16 muestras) vs Estimulación Natural + Ligera (Class 1: 14 muestras)

El análisis MANOVA de 30 muestras usando la Intensidad de picos relativo a la suma total de picos proporcionó cinco intervalos de picos del espectro, 3.522-3.335 ppm / 3.329-3.030 ppm / 3.027-2.592 ppm / 2.540-2.133 ppm / 2.123-1.711 ppm, que separan el grupo de estimulación convencional de estimulación natural (probabilidad 0.0049 / 0.0074 / 0.0388 / 0.0004 / 0.0324 respectivamente).

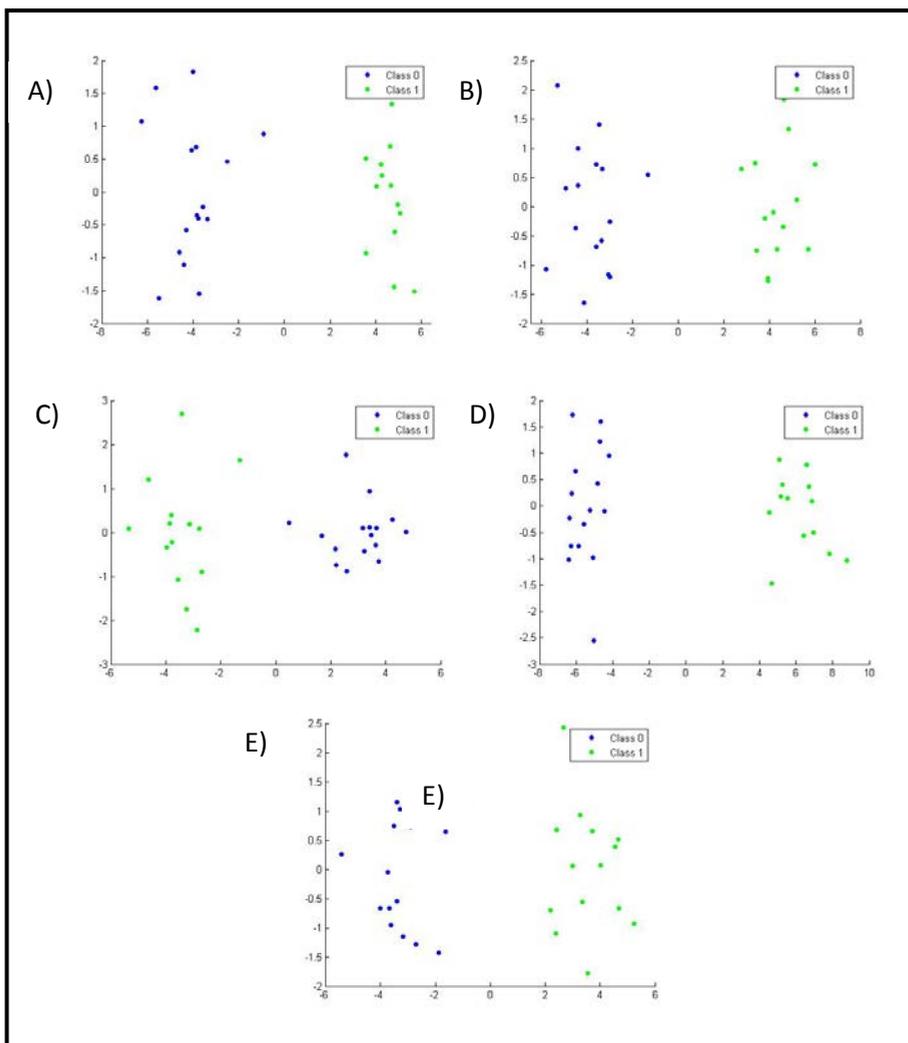


Figura 41.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 76-100 (3.522-3.335 ppm) Means dimension 1 (0.0049) B) MANOVA PICOS 101-125 (3.329-3.030 ppm) Means dimension 1 (0.0074) C) MANOVA PICOS 126-150 (3.027-2.592 ppm) Means dimension 1 (0.0388) D) MANOVA PICOS 151-175 (2.540-2.133 ppm) Means dimension 1 (0.0004) E) MANOVA PICOS 176-200 (2.123-1.711 ppm) Means dimension 1 (0.0324). Class 0: Donantes Estimulación Convencional (azul); Class 1: Donantes Estimulación Natural + Ligera (verde)

Picos que proporcionan un análisis de la varianza (ANOVA) con una probabilidad menor del 0.05: Únicamente la media del piruvato fue diferente entre ambos grupos

siendo la media de las muestras de donantes con estimulación convencional mayor que la media de las donantes con estimulación natural.

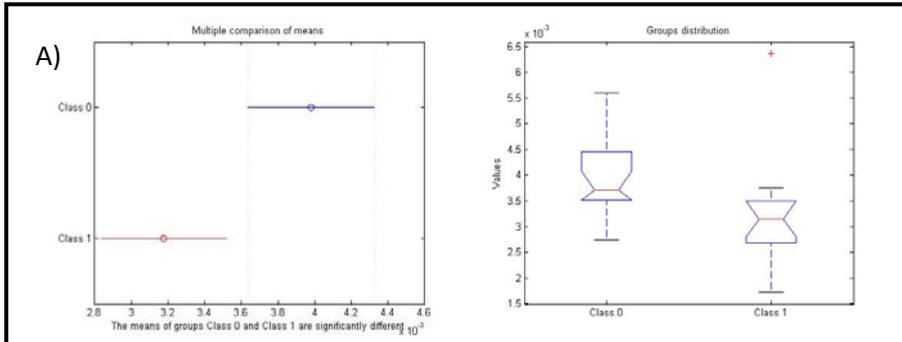


Figura 42. Metabolitos con ANOVA < 0.05 : A) Pico 2.359 (Piruvato β H) Anova: 0.024 Kruskal-Wallis: 0.002. Class 0: Donantes Estimulación Convencional; Class 1: Donantes Estimulación Natural + Ligera.

Pacientes: Estimulación Convencional (Class 0: 22 muestras) vs Estimulación Natural + Ligera (Class 1: 28 muestras)

El análisis MANOVA de 50 muestras usando la Intensidad de picos relativo a la suma total de picos proporcionó cuatro intervalos de picos 4.238-3.722 ppm / 3.711-3.420 ppm / 3.410-2.869 ppm / 2.087-0.826 ppm que separan el grupo de estimulación convencional de estimulación natural con una probabilidad menor del 0.05 (0.0018/0.0179/0.0038/0.0083 respectivamente).

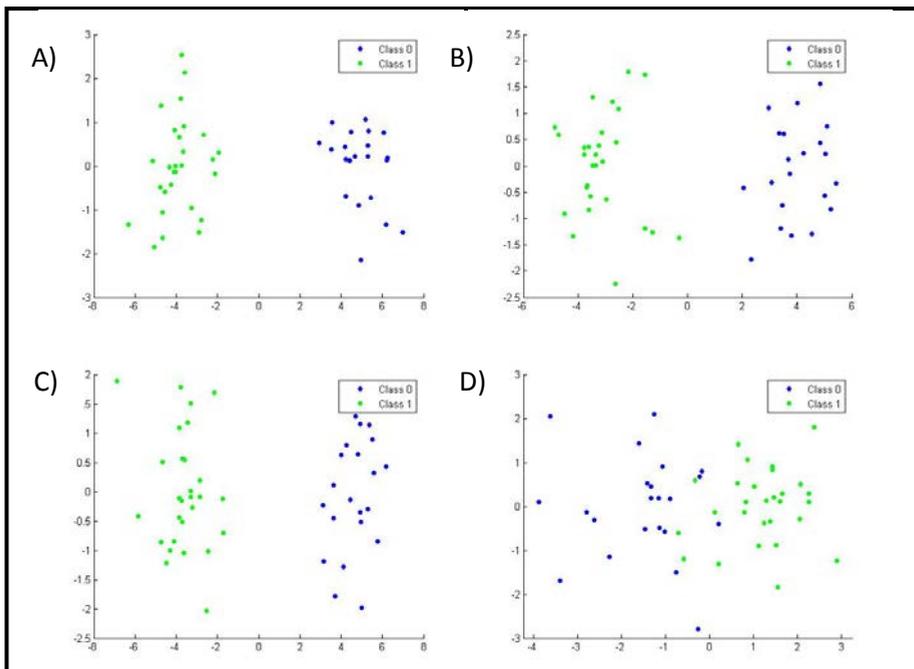
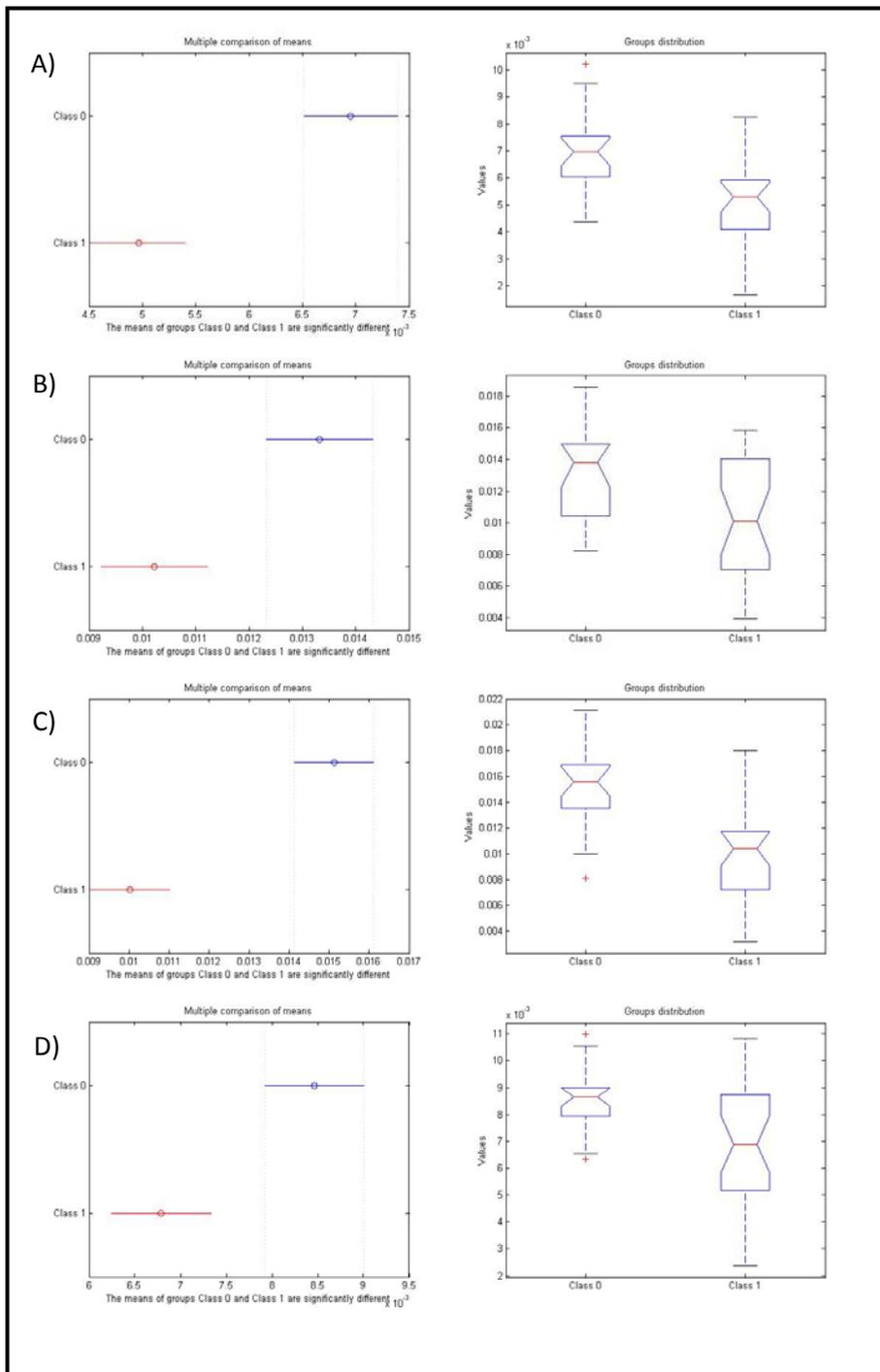


Figura 43.- Manova de los diferentes intervalos de picos: A) MANOVA PICOS 1-45 (4.238-3.722 ppm) Means dimension 1 (0.0018) B) MANOVA PICOS 46-90 (3.711-3.420 ppm) Means dimension 1 (0.0179) C) MANOVA PICOS 91-135 (3.410-2.869 ppm) Means dimension 1 (0.0038) D) MANOVA PICOS 181-221 (2.087-0.826 ppm) Means dimension 1 (0.0083). Class 0: Pacientes Estimulación Convencional; Class 1: Pacientes Estimulación Natural + Ligera.

Picos que proporcionan un análisis de la varianza (ANOVA) con una probabilidad menor del 0.05.

- En el Análisis relativo a la suma total las medias de Creatina, Creatinina, Glicerofosocolina, Fosfocolina, Colina, Citrato, β -Hidroxibutirato y Lípidos fueron diferentes entre ambos grupos siendo la media de las muestras de pacientes con estimulación natural menor que la media de las pacientes con estimulación convencional.



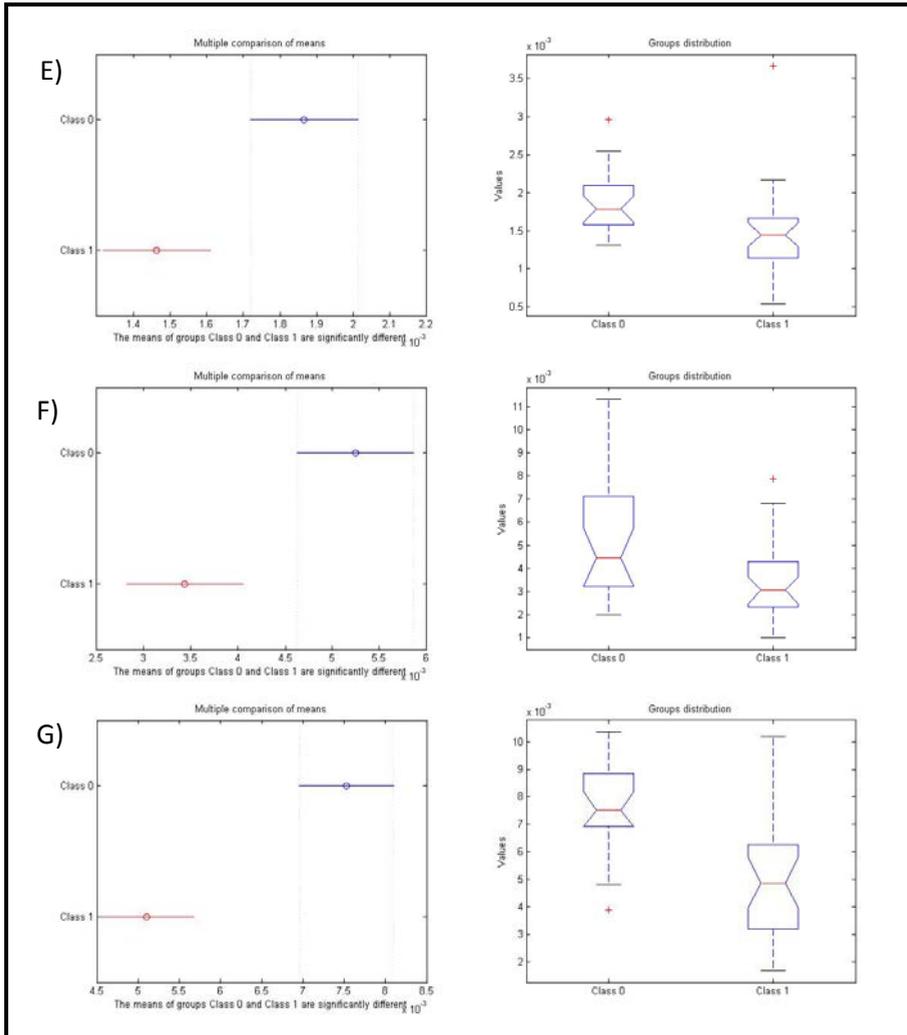


Figura 44.- Metabolitos con ANOVA < 0.05: A) Pico 3.027 ppm (Creatina NCH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 B) Pico 3.213 ppm (Glicerofosfolina NH) Anova: 0.003 Kruskal-Wallis: 0.011 C) Pico 3.202 ppm (Fosfolina NH) Anova: 0.000 Kruskal-Wallis: 0.000 D) Pico 3.189 ppm (Colina NCH3) Anova: 0.003 Kruskal-Wallis: 0.012 E) Pico 2.669 ppm (Citrato α 1H γ 1H) Anova: 0.008 Kruskal-Wallis: 0.001 F) Pico 1.192 ppm (β -Hidroibutirato γ H) Anova: 0.028 Kruskal-Wallis: 0.017 G) Pico 0.826 ppm (Lípido CH3(CH2)n) Anova: 0.028 Kruskal-Wallis: 0.017. Class 0: Pacientes Estimulación Convencional; Class 1: Pacientes Estimulación Natural + Ligera.

3.4. Correlaciones

Este análisis se llevo a cabo para estudiar el comportamiento de algunos de los metabolitos más importantes de las rutas energéticas y las interacciones y relaciones entre ellos dentro de los grupos de muestras.

En la siguiente tabla (Tabla 10) se muestran las correlaciones que aparecen entre metabolitos intermediarios más importantes de rutas energéticas (Glucosa / Lactato / Piruvato / Acetato / Acetoacetato / β -Hidroxiacetato). El análisis de correlaciones se llevó a cabo analizando la intensidad de los picos relativo a la suma total de los picos.

Los grupos de muestras donde se llevaron a cabo estos análisis fueron: Estimulación Convencional frente a Estimulación Natural (+ Ligera), Donantes frente a Pacientes, Donantes con Estimulación Convencional frente a Donantes con Estimulación Natural (+ Ligera), Pacientes con Estimulación Convencional frente a Pacientes con Estimulación Natural (+ Ligera), Donantes con desarrollo del óvulo fecundado frente a Donantes sin desarrollo del óvulo.

En los casos donde no aparece correlación se debe a que la probabilidad era muy baja ($p > 0.05$) o a que no todos los picos del metabolito mostraba la correlación.

En todos o casi todos los grupos se observa una correlación negativa entre glucosa y lactato y positiva entre Acetoacetato- β -Hidroxiacetato y Glucosa-Acetato.

Aparece una diferencia entre las correlaciones de Lactato y Piruvato en los grupos de Estimulación Convencional (positiva) y E. Natural + E. Ligera (negativa) y entre Glucosa y Piruvato en los grupos de pacientes con Estimulación Convencional (negativa) y pacientes con Estimulación Natural + E. Ligera (positiva). Esta última correlación únicamente aparece en el grupo de donantes con estimulación natural (+ ligera) siendo positiva al igual que en pacientes.

Tabla 10.- Valores de coeficientes de correlación lineal (probabilidad) entre diferentes metabolitos en diferentes grupos de muestras

Resumen correlaciones											
	E. Comv.	E. Nat.	Don.	Pac.	Don. E. Conv.	Don. E. Nat.	Pac. E. Conv.	Pac. E. Nat.	Don Desarr. OK	Don Desarr. NO OK	
Lac-Glu	-0.5662 (0.0024)	-0.6141 (0.0009)	-0.4866 (0.0117)	-0.6719 (0.0008)	-0.7196 (0.0071)	—	-0.6806 (0.0048)	-0.7365 (0.0014)	-0.7646 (0.0085)	-0.9386 (0.0201)	
Lac-Pir	+0.4295 (0.0121)	-0.4122 (0.0084)	—	—	—	—	+0.8280 (0.0000)	—	—	—	
Lac-Acetoac	—	—	—	-0.3091 (0.0262)	—	—	—	-0.4624 (0.0158)	—	—	
Lac-Ac	—	-0.5988 (0.0001)	—	-0.4835 (0.0060)	—	—	—	-0.6282 (0.0028)	—	—	
Lac-bOHbut	—	-0.3506 (0.0208)	—	—	—	—	—	—	—	—	
Glu-Pir	—	+0.5026 (0.0012)	+0.4109 (0.0285)	—	—	+0.5643 (0.0297)	-0.5207 (0.0177)	-0.4358 (0.0233)	—	—	
Glu-Acetoac	—	+0.3166 (0.0364)	—	—	—	—	—	+0.4310 (0.0253)	—	—	
Glu-Ac	—	+0.6742 (0.0007)	+0.5298 (0.0037)	-0.4338 (0.0037)	+0.5508 (0.0286)	+0.7049 (0.0049)	—	+0.6521 (0.0029)	+0.6428 (0.0207)	-0.9295 (0.0240)	
Glu-bOHbut	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Pir - Acetoac	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Pir-Ac	—	+0.5030 (0.0004)	—	+0.4259 (0.0015)	—	+0.5189 (0.0475)	—	+0.4262 (0.0237)	—	—	
Pir-bOHbut	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Acetoac-Ac	—	+0.3714 (0.0120)	—	-0.4494 (0.0007)	—	—	—	+0.5135 (0.0052)	—	—	
Acetoac-bOHbut	—	+0.6831 (0.0000)	+0.6385 (0.0214)	-0.7533 (0.0000)	+0.9394 (0.0000)	-0.8330 (0.0001)	-0.8210 (0.0000)	-0.5469 (0.0026)	-0.8074 (0.0009)	-0.9741 (0.0050)	
Ac-bOHbut	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

En referencia a la correlación entre acetoacetato y β -Hidroxiacetato en donantes con estimulación natural, únicamente aparece dicha correlación entre el pico del acetoacetato y uno de los picos del doblete del β -Hidroxiacetato (Fig. 45). Esto podría deberse a la posible influencia de una señal de lípidos próxima al β -Hidroxiacetato que podría interferir en la correlación entre el acetoacetato y cada uno de los picos del β -Hidroxiacetato. Por el contrario, tanto en donantes como en pacientes con estimulación convencional, la correlación aparece en ambos picos del doblete, por lo que esta influencia lipídica no estaría produciéndose con tanta intensidad.

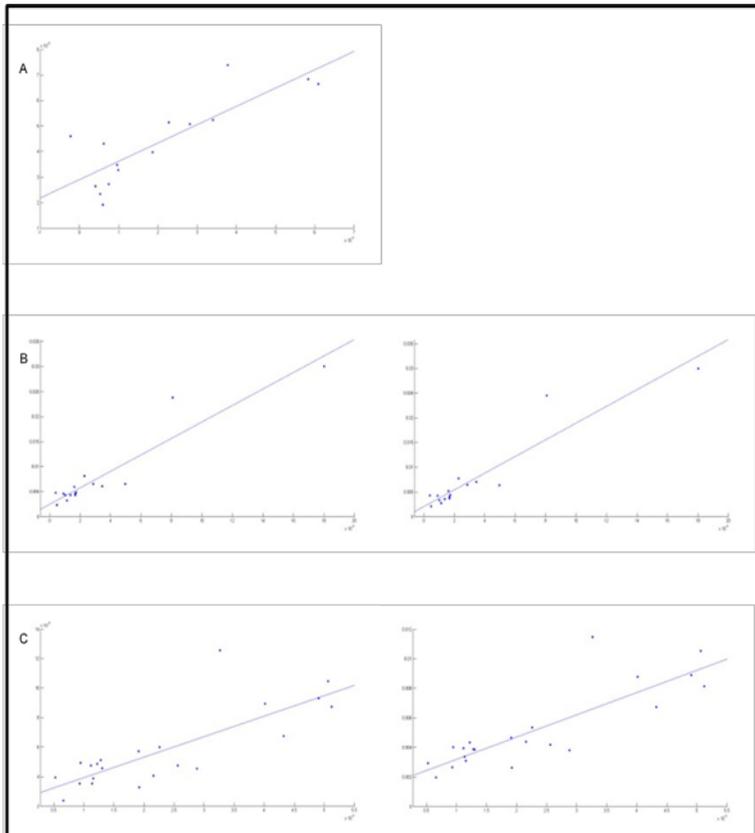


Figura 45.- Correlación Acetoacetato- β -Hidroxiacetato en A) Donantes E. Natural (+ Ligera). B) Donantes E. Convencional C) Pacientes E. Convencional

Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto a la edad

Se ha realizado un análisis de correlaciones de todos los picos con respecto a la edad en los dos tipos de protocolos de estimulación. Únicamente han aparecido correlaciones limitadas de la edad con algunos metabolitos (Tabla 11) en muestras de estimulación convencional, independientemente de si son donantes o pacientes.

Tabla 11.-Valores de los coeficientes de correlación y probabilidad entre determinados metabolitos y la edad en diferentes grupos de muestras

	Coefficiente correlación	Probabilidad
Muestras de E. Convencional (38 muestras)		
β -Hidroxibutirato	-0,3467	0,0338
Creatina	0,3478	0,0324
Glicerofosfocolina/Fosfocolina/Colina	0,3503	0,0329
Glicina	0,3966	0,0137
Glutamina/Glutamato/Prolina	0,3899	0,0195
Alanina	0,4436	0,0053
Muestras E. Natural + E. Ligeras (41 muestras)		
No aparece ninguna correlación entre metabolitos y la edad		

Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto al Índice de Masa Corporal (IMC)

Se ha realizado un análisis de correlaciones de todos los picos con respecto al IMC. Al igual que con la edad, se han determinado correlaciones del IMC con la glucosa con un bajo coeficiente en estimulación convencional, independientemente de si son donantes o pacientes. En el caso de la estimulación natural y ligera, las correlaciones han aparecido con la alanina y valina.

Tabla 12.-Valores de los coeficientes de correlación y probabilidad entre determinados metabolitos y el IMC en diferentes grupos de muestras

	Coefficiente correlación	Probabilidad
Muestras E. Convencional (38 muestras)		
Glucosa	0,3639	0,0263
Muestras E. Natural + E. Ligeras (41 muestras)		
Alanina	0,4229	0,0060
Valina	0,3534	0,0242

* La razón por la que aparecen 79 muestras totales (38 E. convencional + 41 E. natural (+ ligeras)) tanto en el estudio con respecto a la edad como al IMC se debe a que se desconocían los valores de los datos en esas pacientes.

3.5 Estimación de concentraciones

Se han estimado las concentraciones de tres compuestos, Glucosa, lactato y piruvato, directamente implicados en varios ciclos metabólicos importantes, en todas las muestras, juntas y separándolas en los diferentes grupos de muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Valores de las medias de las concentraciones estimaciones de Glucosa, Lactato y Piruvato y sus respectivas desviaciones estándar.

Metabolito	Grupos de muestras	Media \pm Desviación estandar
GLUCOSA (mM)	Total	7,5710 \pm 3,2968
	Donante estimuladas	6,5261 \pm 2,0643
	Donantes naturales	9,1329 \pm 4,4317
	Pacientes estimuladas	6,7467 \pm 3,5268
	Pacientes naturales	7,8784 \pm 3,1644
LACTATO (mM)	Total	8,1735 \pm 4,7582
	Donante estimuladas	7,8618 \pm 4,0815
	Donantes naturales	8,6621 \pm 4,8732
	Pacientes estimuladas	7,3601 \pm 3,2198
	Pacientes naturales	8,8101 \pm 6,8582
PIRUVATO (mM)	Total	0,4808 \pm 0,2329
	Donante estimuladas	0,4369 \pm 0,2139
	Donantes naturales	0,4686 \pm 0,2084
	Pacientes estimuladas	0,5285 \pm 0,2757
	Pacientes naturales	0,4891 \pm 0,2336

DISCUSIÓN

1. Determinación de la composición del líquido folicular	148
1.1. Aminoácidos	149
1.2. Otros intermediarios de rutas energéticas: Glucosa, Lactato y Piruvato	153
1.3. Mío-inositol	156
1.4. Colina, Fosfocolina y Glicerofosfocolina	156
1.5. Cuerpos cetónicos	157
1.6. Acetato	159
1.7. Lípidos	160
1.8. Medida del tiempo de relajación T ₂	162
2. Estudio comparativo entre mujeres donantes de ovocitos y pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica.....	163
2.1. MANOVA y ANOVA	165
2.2. Correlaciones entre metabolitos	167
2.3. Estimación de concentraciones	169
3. Estudio comparativo de los ciclos de estimulación.....	169
3.1. Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto a la edad	169
3.2. Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto al Índice de Masa Corporal (IMC)	171
3.3. Estudio comparativo de los ciclos de estimulación	172
3.4. Colina, Fosfocolina y Glicerofosfocolina	177
3.5. Creatina	179
3.6. Citrato	180
3.7. Cuerpos cetónicos: β-Hidroxibutirato y Acetoacetato	182
3.8. Piruvato	185
3.9. Lípidos	187
3.10. Elección del tipo de estimulación	189

1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO FOLICULAR

El LF es el medio del interior del folículo en el que se encuentra el ovocito durante su maduración *in vivo*. Su formación y acumulación comienza en la fase antral de la maduración del folículo, donde el líquido se acumula en pequeñas lagunas entre las células granulosas que finalmente se fusionan, originando el antro folicular que va creciendo conforme se acumula líquido en su interior. El líquido folicular se ha descrito como un derivado de plasma sanguíneo de los capilares de la teca y secreciones sintetizadas en la pared del folículo (Edwards 1974) cuya composición podría reflejar cambios en los procesos secretorios de la capa granulosa y de la teca interna y alteraciones en los componentes del plasma debidos a procesos fisiológicos o patológicos.

La composición del líquido folicular es similar al suero con respecto a los componentes de bajo peso molecular (Gosden 1988, Shalgi 1972). Sin embargo, debido a la probable existencia de una barrera hemato-folicular para tamaños mayores de 100 kDa (Clarke 2006) las proteínas plasmáticas se encuentran progresivamente en menores concentraciones que en plasma (Andersen 1976). De la misma manera, moléculas grandes producidas por el ovocito o por las células de la granulosa tampoco podrían atravesar la membrana de la granulosa o la lámina basal folicular.

La comunicación bidireccional entre el ovocito y las células granulosas en el folículo ocurre vía paracrina y por uniones GAP (Fig 46) (Sutton 2003).

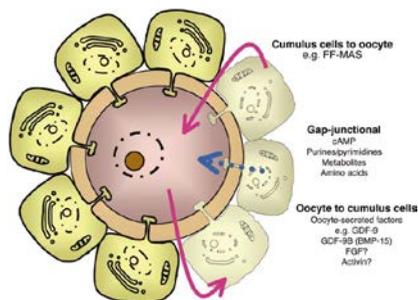


Figura 46.- Comunicación ovocito-células del cúmulo (Sutton 2003).

Se han publicado diversos estudios realizados principalmente en animales (Gerard 2002, Chang 1976, Gosden 1990, Leroy 2004, Orsi 2005, Renaville 2010, Nandi 2007) en los que se determinan una serie de metabolitos específicos y compuestos presentes en el líquido folicular de folículos de distintos tamaños y estados. Sin embargo, el número de estudios encontrados que tratan de determinar la composición del líquido folicular en humanos ha sido relativamente bajo.

El trabajo de investigación de esta tesis ha permitido la asignación de un total de 131 resonancias en los distintos espectros realizados que han conducido a la identificación de 41 metabolitos presentes en el líquido folicular humano (Tabla 14) además de diversos lípidos y colesterol.

Tabla 14.- Metabolitos identificados en el líquido folicular humano

Alanina	Acetato	Acetoacetato	Arginina	Asparagina	Aspartato
Citrato	Colina	Creatina	Creatinina	Fenilalanina	Formiato
Fosfocolina	Glicina	Glicerofosfocolina	Glicerol	Glicoproteína	Glucosa
Glutamato	Glutamina	β -Hidroxibutirato	Histidina	Isobutirato	Isoleucina
Lactato	Leucina	Lisina	Metilamina	3-Metilhistidina	Metionina
Mio-inositol	Piruvato	Prolina	Sarcosina	Serina	Taurina
Tirosina	Treonina	Trimetilamina	TMAO	Valina	

1.1. Aminoácidos

El análisis exhaustivo de los diferentes espectros de RMN ha permitido determinar la presencia en líquido folicular de 17 de los 20 aminoácidos naturales, 10 de ellos corresponden al grupo clasificado como aminoácidos esenciales, que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser incorporados con la dieta. Estos aminoácidos son Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Tirosina, Metionina, Treonina, Lisina, Arginina e Histidina. De la misma manera, se identificaron algunos derivados metabólicos de estos metabolitos naturales, como es el caso de la 3-Metilhistidina y otros aminoácidos no proteicos como la taurina. Todos los

aminoácidos determinados en este trabajo se han identificado en otros estudios (Chang 1976, Gerard 2002 Orsi 2005, Jozwik 2006).

El primer estudio en dar una relación de los aminoácidos que aparecen en el LF fue publicado en 1976 (Chang 1976). En este estudio se determina la composición química (electrolitos, glucosa, ácido úrico, enzimas, aminoácidos, lípidos, esteroides y AMPc) en muestras de LF porcino en diferentes estadios de desarrollo de los folículos y se compara con muestras de plasma porcino. Para el análisis de los aminoácidos se empleó un analizador de aminoácidos Beckman 120B en el que los aminoácidos se separaban mediante cromatografía. En este caso los metabolitos con mayor concentración en los tres estadios de desarrollo propuestos fueron Glicina, Alanina y Asparagina+Glutamina.

Un estudio realizado en 2002 (Gerard 2002) propone un análisis de las variaciones de la composición del Líquido folicular durante el crecimiento y maduración en yeguas usando Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H RMN). En este caso únicamente se determinaron mediante esta técnica los aminoácidos Glutamato/Glutamina y Alanina.

Orsi (Orsi 2005) también observó las alteraciones en la composición del LF durante el ciclo reproductor en bovinos mediante HPLC en fase reversa. En este caso, la mayoría de las concentraciones de aminoácidos determinadas en folículos dominantes mostraron alteraciones durante todo el ciclo, sólo los niveles de Glutamato, Alanina, Leucina y Lisina fluctuaron en LF no dominante.

Jozwik (Jozwik 2006), determina la concentración de aminoácidos, amonio y urea en el líquido folicular humano y lo compara con las concentraciones determinadas en plasma sanguíneo. El metabolito con mayor concentración, en este estudio, correspondería a la Glutamina seguida de Alanina, Glicina, Prolina, Valina, Treonina y Lisina.

La ventaja que presenta nuestro trabajo con respecto a estos otros es que se han identificado todos estos aminoácidos en un mismo trabajo y con la misma técnica,

Por el contrario, en los trabajos encontrados en bibliografía sólo se identifica un pequeño número de aminoácidos en cada uno y para su determinación se emplean diferentes métodos de análisis.

Cabe señalar que, en estos estudios se han encontrado una serie de aminoácidos que no se han detectado mediante RMN como es el caso de la Fosfoserina, Citrulina, Ornitona, Cisteina (Chang 1976, Jozwik 2006), Fosfoetanolamina, Ácido α -aminoadípico, Ácido α -n-aminobutírico, Carnosina (Chang 1976), Hidroxiprolina (Jozwik 2006) y Triptófano (Orsi 2005, Jozwik 2006).

En general, los aminoácidos juegan un papel importante en la regulación de la osmolaridad, como tampones intracelulares, quelantes de metales pesados y sustratos energéticos. Además, actúan como precursores de proteínas y ácidos nucleicos (Hong 2004). También pueden actuar como neurotransmisores, moduladores sinápticos, transductores de señal y reguladores intracelulares de pH (Zheng 2007).

En roedores, animales domésticos y humanos el tipo de aminoácidos presentes en el medio de cultivo usado en la maduración *in vitro* de los ovocitos, puede influir profundamente en la maduración de estos y en el posterior desarrollo del embrión. El efecto de los aminoácidos depende del estadio de desarrollo examinado, así como de la presencia o ausencia de otros aminoácidos, reflejando un requerimiento estado-específico para aminoácidos durante el desarrollo y la complejidad de las interacciones entre aminoácidos (Zheng 2007).

En la figura 47 se muestra como los aminoácidos se incorporan en las rutas metabólicas desarrollando su función como sustratos energéticos. El primer paso para el metabolismo de los aminoácidos consiste en la separación del grupo amino. Los aminoácidos al degradarse convergen como metabolitos intermediarios de las rutas energéticas. Los aminoácidos Alanina, Treonina, Glicina y Serina dan lugar a Piruvato. Fenilalanina, Tirosina, Leucina y Lisina producen Acetoacetyl-CoA o Acetyl-CoA. Tanto el Piruvato como el Acetoacetyl-CoA se transforman a Acetyl-

CoA entrando a formar parte del Ciclo de Krebs. Arginina, Histidina, Glutamina y Prolina han de transformarse en Glutamato que entrará directamente a formar parte del ciclo de Krebs al convertirse en α -Cetoglutarato. Otros metabolitos que entran directamente en el ciclo del Ácido Cítrico son Isoleucina, Metionina y Valina que se introducen en el ciclo como Succinil-CoA; Fenilalanina y Tirosina que entran como Fumarato; y Aspartato y Asparagina como Oxalacetato.

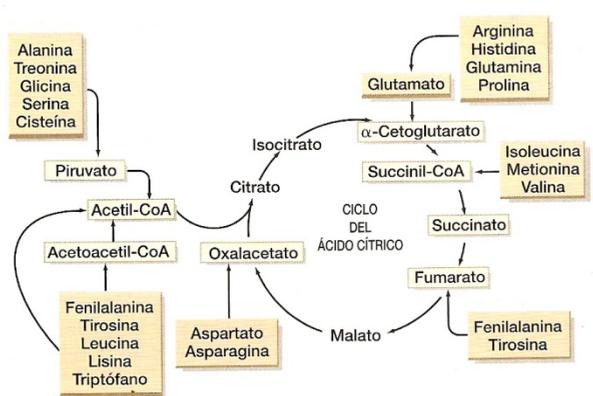


Figura 47.- Introducción de los aminoácidos en las rutas metabólicas como sustratos energéticos.

El metabolismo de los aminoácidos podría estar implicado en el proceso de maduración de los gametos, ya que se ha observado que la actividad de ciertos enzimas y el uso de sustratos oxidativos denotan una mayor participación de transaminaciones y del Ciclo del Ácido Tricarboxílico en la maduración del ovocito en bovinos (Cetica 2003).

Se han publicado resultados contradictorios acerca de la relación entre la cantidad de aminoácidos en el líquido folicular y en plasma sanguíneo (Velázquez 1977). Uno de estos estudios (Jozwik 2006) publica que todos los aminoácidos esenciales y la mayoría de los no esenciales tuvieron concentraciones significativamente menores en el LF que en plasma, con la excepción particular del glutamato, que es mayor (alrededor del triple) en el LF. Curiosamente, el L-glutamato se usa en las fases más tempranas del desarrollo del embrión, y se ha sugerido que puede actuar como agente protector contra el estrés oxidativo (Van Winkle 1992, Gardner 1996). La

baja concentración de los aminoácidos, relativo a plasma, podría reflejar la utilización de estos aminoácidos por el ovocito y/o por las células foliculares, o ser consecuencia del transporte selectivo a través de esas células. En el caso del aminoácido glutamina, se ha publicado que su concentración se correlaciona negativamente con la diferencia en la concentración de glutamato entre plasma y líquido folicular, y esto se ha interpretado como apoyo a la idea de la transformación de glutamina a glutamato y amonio en las células del folículo (Jozwik 2006). Esta reacción podría ser importante en la síntesis de las bases nitrogenadas constituyentes de los ácidos nucleicos que son requeridas para la finalización de la meiosis en la maduración del ovocito (Devlin 2006).

1.2. Otros intermediarios de rutas energéticas: Glucosa, Lactato y Piruvato

Muchos de los intermediarios importantes en las rutas energéticas del folículo muestran una estrecha relación entre sí (Fig. 48). La Glucosa es metabolizada a Acetil-CoA (la forma activa del acetato) por la vía glucolítica produciendo un intermediario, piruvato, que, a su vez, puede generar lactato en la degradación anaerobia produciendo energía. En condiciones aerobias, el acetil-CoA generado se puede incorporar al ciclo de Krebs con la consiguiente producción de energía.

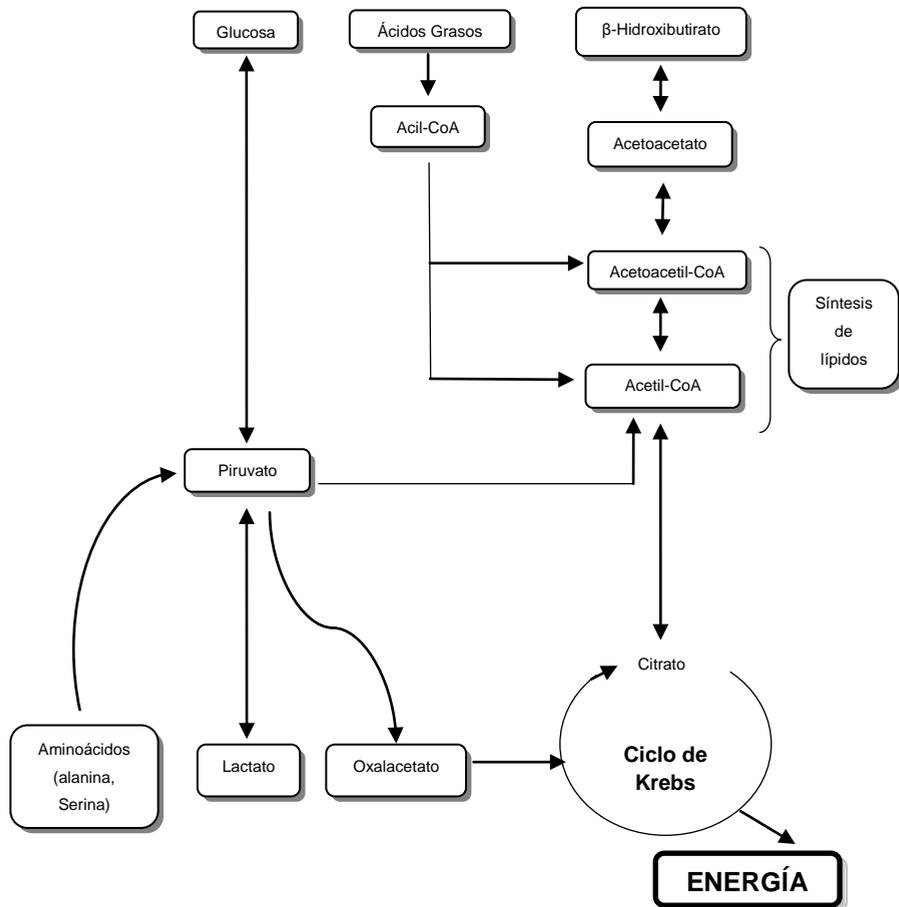


Figura 48.- Conexiones entre los intermediarios más importantes de las rutas energéticas metabólicas en el folículo

Una de las señales más intensas que aparece en los espectros monodimensionales de todas las muestras analizadas corresponde al lactato, cuyos desplazamientos químicos del ^1H y del ^{13}C α aparecen a 1.32 y 22.80 ppm respectivamente. Estos valores de desplazamientos químicos fueron usados para calibrar el resto de espectros, ya que esta señal aparece en todos los espectros obtenidos, tanto 1D como 2D.

Hay estudios contradictorios en la relación de proporción entre glucosa y lactato: algunos autores afirman que la relación de proporción es 2:1 (Leese 1990), mientras que otros determinan la concentración en 3.39 mM para la glucosa y 3.17 mM para el lactato, siendo la relación de proporción en torno a 1:1 (Gull 1999). Además se observa una correlación negativa entre ambos metabolitos en los dos estudios.

En este trabajo, se ha estimado la concentración de algunos de los metabolitos identificados, mediante el ajuste de los espectros con un patrón, como se ha descrito en la metodología (Análisis de datos para la comparación de grupos de muestras). Específicamente, las concentraciones de lactato y glucosa, como se ha mencionado anteriormente en el apartado 1 de resultados, son aproximadamente 5 mM y 2 mM, respectivamente. Es decir, que estos resultados se aproximan a la relación de proporción 2:1 propuesta por los primeros autores (Leese 1990). Además, el coeficiente de correlación entre glucosa y lactato fue -0.80 ($p < 0.0001$) (Tabla 5). Este resultado apoya la presencia de un importante metabolismo anaerobio, como ya se ha propuesto en estudios con folículos hiperestimulados (Gull 1999). De hecho, se ha publicado que conforme crecen los ovocitos la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa-1 aumenta significativamente, estabilizándose en los folículos de tamaño medio (Sutton 2003).

La alta correlación encontrada entre la concentración de glucosa, lactato y piruvato (Tabla 5) parece indicar que el LF podría jugar un papel como fuente de energía proporcionando lactato y piruvato. Los primeros estudios determinaron al piruvato como principal fuente de energía de apoyo en la maduración del ovocito, al menos *in vitro* (Biggers 1967). Por otro lado, la concentración de lactato es muy alta en el LF y secreciones de las trompas de Falopio. De este modo, el lactato podría proporcionar un suministro de energía (quizá vía transformación a piruvato por las células de la granulosa) en la maduración del ovocito en el folículo y en los primeros momentos tras la ovulación. Este balance metabólico y la actividad glicolítica específica parece ser importante no sólo desde el punto de vista energético, sino también para las condiciones de señalización de la maduración, probablemente a través del potencial de reducción (glutión, NADH y NADPH) (Krisher 2004).

1.3. Mio-Inositol

Otro intermediario metabólico identificado es el mio-inositol, precursor de 2º mensajeros, que juegan un papel importante en la morfogénesis y citogénesis de las células, síntesis de lípidos, estructura de las membranas celulares y crecimiento celular (Berridge 1987, Downes 1989). En un estudio anterior se determinó la concentración de mio-inositol en LF a partir de un análisis empleando ensayos enzimáticos (Chiu 2002) indicándose que la concentración de mio-inositol es superior en el LF de ovocitos de buena calidad que en el LF con ovocitos de una baja calidad. Sin embargo en nuestros espectros la señal de mio-inositol (3,27 ppm) no ha sido muy elevada, de hecho únicamente se ha determinado en el espectro J-resolved. Por esta razón no se ha podido determinar la concentración de este metabolito para compararlo posteriormente entre los distintos grupos empleados.

1.4. Colina, Fosfocolina y Glicerofosfocolina

Otro grupo de metabolitos identificado es la colina y sus derivados fosfocolina y glicerofosfocolina. En los espectros 1D obtenidos se observa una señal claramente identificable de estos metabolitos entre 318-3,22 ppm (Fig. 49).

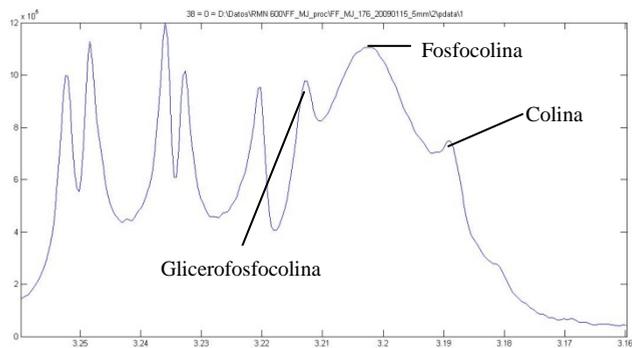


Figura 49.- Espectro monodimensional de ^1H RMN CPMG 600MHz de líquido folicular medido 298K

La colina es esencial para el normal funcionamiento de las células. Este compuesto, o sus metabolitos, garantizan la integridad estructural y funciones de señalización de las membranas celulares ya que tanto la colina como la fosfocolina son precursores para los fosfolípidos fosfatidilcolina y esfingomiélinea, componentes clave de las membranas biológicas. Otro de los metabolitos de la colina, betaina, participa en la metilación de la homocisteína a la forma metionina, metabolito identificado en este estudio (Tabla 4). Además afecta directamente a la neurotransmisión colinérgica y al transporte de lípidos desde el hígado (Zeisel 1994).

El papel de la glicerofosfocolina es actuar como fuente de colina.

No se ha encontrado bibliografía que identifique las funciones concretas de estos metabolitos en el ovocito o folículo. Sin embargo, se ha determinado que la colina es crítica durante el desarrollo fetal, influyendo en la proliferación y apoptosis de células madre, alterando, de ese modo, la estructura y función del cerebro (Albright 1999, Craciunescu 2003, Loy 1991, Meck 2003, Mellot 2004). De manera similar, influye en el desarrollo del tubo neural (Fischer 2001, Shaw 2004).

1.5. Cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos, identificados en nuestro trabajo han sido acetoacetato y β -hidroxibutirato. La señal de acetoacetato se ha localizado en diferentes espectros (1D, CPMG, JRES, TOCDY y HSQC) a 2,21 ppm (Fig. 27 A y B). Del mismo modo, las señales de diferentes protones del β -hidroxibutirato se han determinado en diferentes espectros tanto monodimensionales como bidimensionales, fundamentalmente en los espectros TOCSY.

Acetoacetato y β -hidroxibutirato pueden ser sintetizados a partir de Acetil-CoA por el metabolismo de los ácidos grasos. A su vez, estos cuerpos cetónicos pueden ser oxidados a Acetil-CoA que sirve de fuente de combustible del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) proporcionando energía en situaciones de déficit de glucosa.

En la bibliografía se han encontrado diversos estudios que identifican β -hidroxibutirato en el LF de diferentes animales, cerdo (Gosden 1990), vaca (Gosden 1990, Leroy 2004a) y ovejas (Gosden 1990).

Se ha observado en estudios in vitro que ciertos metabolitos, como el Acetoacetato y β -hidroxibutirato entre otros, podrían influir en la competencia de la maduración de los ovocitos y tras su fertilización, del crecimiento al estadio de blastocisto (Gomez 1997).

Una fuerte correlación entre los niveles de β -hidroxibutirato en el LF de diferentes tamaños de folículos y suero, sugieren que niveles elevados en suero de vacas lecheras podrían causar cambios similares en el LF. El importante aumento de β -hidroxibutirato de folículos pequeños a grandes es posiblemente causado por la secreción local de este cuerpo cetónico por las células foliculares (Leroy 2004a, Leroy 2004b).

Se ha observado que el β -hidroxibutirato puede ser usado o convertido por el ovario de vacas y ovejas a otros sustratos como acetoacetato, que proporciona energía al ovario in vivo. (Rabiee 1997a, Rabiee 1997b).

Finalmente, en este estudio se ha observado una alta correlación entre la concentración de acetoacetato y β -hidroxibutirato con otros metabolitos de las rutas glicolíticas. Estas correlaciones podrían ser el resultado de una fuerte conexión entre la degradación aeróbica y el metabolismo de los ácidos grasos. Estos cuerpos cetónicos podrían ser una fuente adicional de grupos acetilo que son fácilmente transportados a través de las membranas celulares al interior del ovocito. Además, se ha obtenido una correlación negativa entre los metabolitos glucosa y β -hidroxibutirato que podría sugerir que este metabolito es un buen indicador de hipoglucemia (Leroy 2004b).

1.6. Acetato

El acetato (1,91 ppm) (Fig. 27 A y B) es una molécula cuya forma activa es el acetil-CoA. Las principales fuentes del acetil-CoA son:

- El piruvato procedente del metabolismo de la glucosa (Glucólisis). El piruvato reacciona con la Coenzima A mediante una descarboxilación oxidativa (Piruvato deshidrogenasa).
- Los ácidos grasos libres producidos en la lipólisis que generan acetil-CoA en la β -oxidación.
- Los aminoácidos que sufren desaminación y oxidación.

El acetato, además, es el producto del metabolismo del etanol que incluye dos pasos; de etanol a acetaldehído (Alcohol deshidrogenasa) y de acetaldehído a acetato (acetaldehído deshidrogenasa).

El Acetil-CoA se introduce en el ciclo de Krebs incorporándose al Oxalacetato y dando lugar al Cítrato que continuará con el ciclo produciendo energía. El Acetil-CoA también actúa de precursor en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y esteroides y puede llevar a la formación de cuerpos cetónicos (Acetoacetato y β -Hidroxibutirato).

El acetato es, en última instancia, el precursor del colesterol. En 1965, Bloch identificó la secuencia de eventos que ocurren en la síntesis de colesterol (Bloch 1965).

No se ha encontrado en la bibliografía trabajos que traten de explicar las funciones del acetato en el líquido folicular u ovocito. Únicamente se ha determinado que la concentración de un intermediario normal de esta síntesis de colesterol a partir de acetato, el 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trien-3-ol, sufre un marcado aumento en el líquido folicular (Baltsen 1999). A nivel micromolar, este compuesto activa la

meiosis en la maduración del ovocito (FF_MAS, Follicular Fluid Meiosis Activating Sterol). La presencia de acetato en el líquido folicular podría indicar una activación de la meiosis a través del intermediario anteriormente mencionado.

1.7. Lípidos

Un alto contenido en lípidos está presente en el LF como se puede observar en la alteración de la línea base (Fig. 26). Además se asignaron ciertos desplazamientos químicos a grupos pertenecientes tanto al colesterol como a ácidos grasos (Tabla 4).

El colesterol se ha determinado en estudios anteriores en el líquido folicular de humanos (Ghiafeh-Davoodi 2005) y de diversas especies como cerdo (Chang 1976), vaca (Leroy 2004a) y oveja (Nandi 2007). El colesterol, además de su función estructural formando parte de las membranas plasmáticas de las células, tiene una gran importancia en la reproducción sexual debido, fundamentalmente, a que es el precursor básico de las hormonas sexuales sintetizadas en el ovario: estrógenos, andrógenos y progestágenos. Los estrógenos, con el estradiol como hormona más importante, son los causantes principales del desarrollo de las características sexuales secundarias de la mujer. Además inducen proliferación, crecimiento y aumento del trofismo sobre órganos genitales (epitelio vaginal, moco cervical, endometrio, contractilidad miometrial, mama) y también tienen funciones a nivel de piel, del metabolismo, del tono simpático y de la atracción sexual. Los andrógenos, son los precursores de los estrógenos mediante la esteroidogénesis. Las funciones de la progesterona, del grupo de los progestágenos, son transformar los epitelios proliferados y detener su crecimiento. En el endometrio, induce los cambios secretorios y lo prepara para la implantación y anidación; en el endocérvix: transforma el moco y contrae los orificios cervicales; en el miometrio, induce relajación y disminuye la contractilidad. Finalmente, induce hiperemia y congestión mamaria. A nivel general produce relajación de la fibra muscular lisa (intestino, tono muscular) y puede ejercer acción anabólica. Aumenta la temperatura basal y disminuye la atracción sexual.

Hay tres posibles fuentes de colesterol para su uso inmediato en la producción de progesterona en las células preovulatorias de la granulosa humanas: i) por un lado están las Lipoproteínas de alta densidad (HDL), ii) la síntesis de novo de colesterol y iii) los almacenes intracelulares de ésteres de colesterol. En un estudio publicado en 1990 se sugirió que estos últimos podrían proporcionar el colesterol libre necesario para la producción de progesterona (Endresen 1990).

Por otro lado, se han determinado las cantidades de diversos ácidos grasos (A. Palmítico, A. Esteárico, A. Oleico, A. Linoleico, C20:3n6, A. Araquidónico y A. Docosapentanoico) en el líquido folicular y plasma de vaca (Renaville 2007). Estos ácidos grasos muestran diferentes funciones: el A. Palmítico inhibe la proliferación in vitro de las células de la granulosa por inducción de la apoptosis, y estimula la producción de estrógenos (Vanholder 2005). Por el contrario, el A. Araquidónico protege a las células de la granulosa del ácido palmítico y esteárico, inductores de apoptosis (Mu 2001). Finalmente, los ácidos grasos podrían ejercer sus efectos afectando a la estabilidad de la membrana, la disminución de los ácidos grasos saturados y un aumento de los insaturados favorecen la fluidez de la membrana (MacDonald 1988). La fluidez de la membrana afecta a la actividad de los enzimas anclados en la membrana envueltos en la ruta de síntesis de los estrógenos (Conley 2001).

Además se ha detectado un alto metabolismo lipídico en ovocitos de cerdo en maduración (Sturmeý 2003) probablemente estos lípidos proporcionarían una importante fuente de energía para los ovocitos en desarrollo. La degradación aeróbica del exceso de ácidos grasos está limitada por la disponibilidad de oxalacetato, y esto eventualmente producirá una cantidad proporcional de cuerpos cetónicos (como ocurre bajo condiciones de inanición o en diabetes).

Por lo tanto, la presencia de lípidos y colesterol en el líquido folicular es determinante debido a sus importantes funciones a nivel energético, estructural, en la formación de hormonas sexuales entre otras.

1.8. Medida del tiempo de relajación T_2

Los experimentos CPMG fueron usados para evaluar los tiempos de relajación para algunas señales relativamente aisladas. El decaimiento de las señales fue ajustado a una función exponencial o biexponencial. Los valores de T_2 de las moléculas de bajo peso molecular se encontraban en el rango de 15-50 ms, y los valores para macromoléculas estuvieron entre 1 y 2 ms. El ajuste permitió obtener solo valores aproximados de T_2 . En general, los metabolitos parecen seguir un complejo comportamiento. Cuando se empleó una función biexponencial, se obtuvo un mejor ajuste y se encontró para metabolitos de alto peso molecular un componente T_2 cerca de 1.5 ms. Esto podría ser debido a la distorsión causada por los solapamientos residuales (particularmente en el caso de macromoléculas) y al complejo comportamiento de relajación causado por las interacciones entre los metabolitos y las macromoléculas.

La señal de lípidos a 0.83 ppm también mostró un mayor ajuste en un decaimiento biexponencial con valores de T_2 de 0.9 y 6.4 ms. Esto podría ser relacionado con el tamaño heterogéneo de las partículas de HDL o a diferentes asociaciones entre los componentes lipídicos. No se puede descartar la contribución de las proteínas.

En general, los desplazamientos de muchas de las señales que se obtuvieron fueron similares a los desplazamientos determinados para el plasma sanguíneo (Nicholson 1995, Wevers 1994). Esto apoyaría la idea de que el líquido folicular es un exudado del plasma sanguíneo (Edwards, 1974). Algunas de las señales identificadas en suero no fueron localizadas en los espectros realizados al líquido folicular, quizás, por la baja concentración de los correspondientes metabolitos o por estar enmascarados por metabolitos de moléculas presentes en mayor proporción.

El análisis de la composición del líquido folicular es una etapa esencial que crea una base sólida para la búsqueda de los biomarcadores de calidad del ovocito encaminado a la mejora de las tasas de embarazo en tratamientos de fecundación *in vitro*.

2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE MUJERES DONANTES DE OVOCITOS Y PACIENTES CON BAJA RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA

El ambiente folicular es un determinante importante del desarrollo y maduración del ovocito (Chiu 2002) y como consecuencia es un factor influyente en el futuro desarrollo del embrión. Actualmente, la evaluación morfológica sigue siendo el principal método de evaluación de embriones durante los ciclos de fecundación in vitro (Alikani 2002), pero esta evaluación está restringida por su limitado poder predictivo y su inherente variabilidad inter e intra-observador (Sakkas 2005; Merton 2002). Además, esta evaluación es más un indicador de la calidad "negativa" de ovocitos que un factor de predicción de la calidad "positiva" de ovocitos (Revelli 2009).

Los metabolitos de bajo peso molecular representan los productos finales de los procesos celulares reguladores y, por lo tanto, revelan la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas o ambientales. El LF contiene sustancias relacionadas con la actividad metabólica de las células ováricas y con la maduración y fertilización del ovocito. Además también contiene moléculas implicadas en la proliferación y diferenciación de las células foliculares (Tsafiriri 1988; Adashi 1994). La composición del líquido folicular podría implicar alteraciones en las secreciones por parte de las células del folículo o alteraciones en los componentes del plasma debidos a procesos fisiológicos o patológicos. Por lo tanto, es de suponer, que alteraciones en el líquido folicular podrían explicar y predecir problemas fisiológicos en el folículo que sean causantes de una mayor dificultad para la fecundación del ovocito y su posterior desarrollo a embrión.

De todo ello se deduce que la cuantificación de mínima invasividad del metabolismo de los ovocitos y embriones, a partir de los análisis de líquido folicular o de medios de cultivo, puede ser útil para predecir resultados de embarazo tras la transferencia de embriones, un potencial apoyado por estudios clínicos recientes con clases

específicas de tales metabolitos como intermedios glicolíticos y aminoácidos (Singh 2007).

En un estudio realizado en 2007 cuyo objetivo era determinar si los perfiles metabolómicos de los medios de cultivo de embriones se correlacionan con la capacidad de reproducción de embriones individuales utilizando espectroscopia de Raman y / o del infrarrojo cercano, se obtuvo que los índices de viabilidad calculado por estas técnicas fueron más altos para los embriones implantados y que dieron lugar a un parto, en comparación con aquellos que no se implantaron. La espectroscopia Raman predijo viabilidad de los embriones individuales con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 76,5%; infrarrojo cercano con una sensibilidad de 75% y una especificidad del 83,3%. (Seli 2007).

Otro estudio en el que se demuestra que los perfiles metabolómicos de los medios de cultivo de ovocitos está relacionada con la madurez nuclear, fue realizado en 2009. En este caso el objetivo fue evaluar si los datos metabolómicos generados por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) obtenidos de muestras de cultivo de ovocitos se correlacionan con el estado de madurez nuclear y el desarrollo del embrión derivado (Nagy 2009).

En el caso del líquido folicular se ha observado que concentraciones de ciertos metabolitos en el LF puede explicar las diferencias de fecundidad en determinados animales, como por ejemplo entre novillas y vacas en periodo de lactancia (Bender 2010).

Sin embargo, existen estudios destinados a encontrar un buen marcador molecular de calidad ovocitaria en líquido folicular que no fueron capaces de identificar las sustancias que podrían ser utilizados como marcadores fiables de la competencia del ovocito para el desarrollo de embriones. En los últimos años, se ha observado una tendencia bien definida de la investigación de marcadores moleculares individuales hacia técnicas más complejas que estudian todos los metabolitos del líquido folicular (Revelli 2009).

Se han encontrado biomarcadores individuales al explicar la calidad del ovocito en términos de rutas energéticas metabólicas considerando sus intermediarios. Por ejemplo, se ha determinado una menor disponibilidad de glucosa en los ovocitos y las células foliculares en el síndrome de ovario poliquístico (SOP) causadas por un defecto de transporte de la glucosa. Esto inicia vías alternativas para utilizar ácidos grasos, aminoácidos, etc. como un mecanismo de compensación para hacer frente a los requerimientos de energía. Estas compensaciones pueden ser reflejadas por los niveles alterados de diversas biomoléculas en el líquido folicular (por ejemplo, cuerpos cetónicos, lípidos, aminoácidos, lactato, piruvato, etc.) (Arya 2012).

Por lo tanto, existe una serie de trabajos que afirman que es posible la búsqueda de biomarcadores de calidad ovocitaria en líquido folicular. De esta manera, mediante la comparación entre los perfiles metabólicos, obtenidos por RMN, de mujeres supuestamente sanas y mujeres con problemas de fertilidad y con baja respuesta estimuladora se pretende encontrar las posibles alteraciones en el líquido folicular que proporcionen información metabólica que ayude a explicar o predecir dichos problemas.

Para poder determinar y estudiar posibles diferencias presentes en los perfiles metabólicos entre donantes y pacientes y hallar, de esta manera, posibles biomarcadores de calidad ovocitaria se han realizado una serie de análisis estadísticos.

2.1. MANOVA y ANOVA

Al realizar el análisis multivarianza de los intervalos de picos (8.447-3.819 ppm / 3.809-3.337 ppm / 3.324-2.573 ppm / 2.566-0.828 ppm), se ha observado la separación de ambos grupos, donantes y pacientes, lo que indicaría la existencia de posibles diferencias en los perfiles metabólicos de ambos grupos (Fig. 32).

Sin embargo, un análisis ANOVA únicamente proporciona dos picos identificados como colina (3.189 ppm) (Fig. 33A) y creatina (3.028) (Fig. 33B) con medias diferentes para ambos grupos de manera estadísticamente significativa. Los valores

de estos picos se solapan pero las medias de cada grupo son significativamente diferentes siendo, la media de las muestras donantes inferior a la media de las muestras de pacientes.

No se ha encontrado en bibliografía datos claros acerca de la cantidad de creatina y colina en líquido folicular humano, una aproximación sería la encontrada para creatina en equino, menor de 2000 μM (Gérard 2002) y para colina-fosfocolina humana de 2470-2790 μM (Wallace 2012). En cambio, en sangre si se han determinado las concentraciones de estos dos metabolitos en humanos siendo de 36,7 μM para creatina y 14,5 μM para la colina (Psychoglos 2011).

La creatina se sintetiza de forma natural en el hígado, el páncreas y en los riñones o se incorpora a través de la dieta. La colina también puede obtenerse a partir de la metilación de fosfatidiletanolamina para formar fosfatidilcolina en el hígado o a través de la dieta. Ambas moléculas se transportan posteriormente por la sangre pudiendo atravesar la barrera hemato-folicular por ser inferiores a 100 KDa apareciendo en el líquido folicular. Ambas moléculas podrían incorporarse en el ovocito y células de la granulosa para ser empleadas en el crecimiento y maduración del folículo.

Las concentraciones de estos metabolitos podrían estar alteradas en el grupo de pacientes debido a un posible trastorno en su transporte desde la sangre al líquido folicular o por deficiencias o excesos en la dieta. También se ha observado que las condiciones del hígado podrían cambiar las características del plasma y el líquido folicular afectando así a la calidad del ovocito (Tanaka 2013), de esta forma, un daño hepático podría afectar a la formación de estas sustancias. Otra posible explicación para estas diferencias encontradas en el líquido folicular entre donantes y pacientes sería una posible alteración en la utilización de estos metabolitos por parte del ovocito y las células de la granulosa.

La colina es una molécula precursora de los fosfolípidos, componentes clave de las membranas biológicas, siendo muy importante en el desarrollo fetal (Albright 1999,

Craciunescu 2003, Loy 1991, Meck 2003, Mellot 2004, Fischer 2001, Shaw 2004) y del folículo (Gunter 2007, Wallace 2012) y la creatina, a su vez, tiene la función de almacenar energía ya que constituye la fuente inmediata y directa para regenerar ATP. Debido a que ambas moléculas poseen funciones importantes a nivel estructural y energético, la acumulación de estas sustancias en el grupo de pacientes podría mostrar la existencia de posibles trastornos a estos niveles, es decir, que la colina no se estaría empleando para la formación de los fosfolípidos y por tanto las membranas plasmáticas se verían alteradas. Y por otro lado, la creatina no estaría metabolizándose para la producción de energía. Estas modificaciones podrían alterar la correcta formación del folículo proporcionando ovocitos de menor calidad para la fecundación.

2.2. Correlaciones entre metabolitos

El análisis de las correlaciones existentes entre los metabolitos en cada uno de los grupos estudiados (Tabla 7) nos permite observar una serie de características de las rutas energéticas utilizadas en cada caso.

Para la discusión de los resultados de las correlaciones hemos considerado que las variaciones de glucosa podrían deberse a dos posibles situaciones; por un lado, se podría estar produciendo una menor incorporación de este metabolito desde la sangre al folículo. Y por otro lado, las variaciones de glucosa se podrían deber a una alteración en la utilización de la glucosa por parte del ovocito o de las células foliculares. En el caso de las variaciones que se pudieran producir en el resto de metabolitos hemos considerado que estas se podrían deber a alteraciones en las rutas energéticas del folículo y ovocito.

En donantes existe una correlación negativa significativa entre glucosa y lactato (-0.6201), es decir, cuanta mayor es la cantidad de glucosa menor es la cantidad de lactato detectada y viceversa. Esta correlación negativa podría indicar que la vía glicolítica está favorecida sobre el flujo de los carbohidratos desde el plasma (Leese 1990), y que en situaciones de déficit de glucosa se podría estar produciendo una

mayor cantidad de lactato por la ruta anaerobia del metabolismo de la glucosa. Por el contrario, en situaciones donde hay mayor cantidad de glucosa predominaría la ruta aerobia de la glicólisis. También podría suponer que el lactato se estaría metabolizando por las células de la granulosa o del ovocito

Se obtuvieron otras correlaciones como son las correlaciones positivas entre glucosa-acetato (+0.4445) y piruvato-acetato (+0.4062). Cuanta mayor es la cantidad de glucosa que aparece en el folículo mayor es la cantidad de piruvato y seguidamente mayor es la cantidad de acetato que se produce. Estos resultados se podrían deber a un aumento en la formación de estos metabolitos por sus diferentes vías de formación o una disminución de su utilización por parte de las células del folículo y por el ovocito

Finalmente, a partir de estas correlaciones, se podría concluir que la glucosa es la principal fuente de energía del folículo.

Por otro lado, la correlación positiva entre lípidos y acetoacetato (+0.6518) podría indicar que los lípidos están empleándose para la síntesis de cuerpos cetónicos, fuente de combustible del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) proporcionando energía en situaciones de déficit de glucosa.

En pacientes también aparece la correlación negativa entre glucosa y lactato (-0.6061) Sin embargo aparece una correlación positiva entre piruvato y lactato (+0.5775). Esta última correlación no aparece en el caso de las donantes. En pacientes, el lactato podría proporcionar un suministro de energía, transformándose a piruvato por las células de la granulosa. Existen estudios que definen el piruvato como principal fuente de energía de apoyo en la maduración del ovocito, al menos *in vitro* (Biggers 1967), de hecho el piruvato es un componente imprescindible en los medios de cultivo de ovocitos. En este caso, además de la glucosa, otros metabolitos, como son el lactato y el piruvato, son importantes componentes del líquido folicular que suministrarían energía al ovocito en situaciones de déficit de glucosa

También se observa una correlación positiva entre acetoacetato y acetato (0.4740) que indicaría que los cuerpos cetónicos, fundamentalmente el acetoacetato, se están metabolizando a acetato para la posterior conversión a energía.

2.3. Estimación de concentraciones

Las medias de las concentraciones estimadas en cada grupo de muestras de los 3 importantes metabolitos, glucosa, lactato y piruvato (Tabla 8), no proporcionaron diferencias significativas, siendo además sus desviaciones estándar muy elevadas indicando una gran variabilidad en las concentraciones de los metabolitos en las muestras de cada grupo.

La glucosa sigue siendo el metabolito más abundante seguido del lactato y del piruvato, indicando la importancia de este hidrato de carbono como fuente de energía principal del folículo.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS CICLOS DE ESTIMULACIÓN

3.1. Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto a la edad

En la sociedad actual, la edad de concepción del primer hijo ha sufrido un aumento considerable debido, fundamentalmente, a la incorporación de la mujer a la vida laboral. Este aumento en la edad de concepción puede traducirse en una mayor frecuencia de padecer eventos reproductivos adversos relacionados con la reproducción: infertilidad, abortos espontáneos, complicaciones en el embarazo, anormalidades congénitas, mortalidad materna y mortalidad perinatal (Schwartz 1982; Newcomb 1991; Nyboe Andersen 2000, Djahanbakhch 2007). Los intervalos de fertilidad en la mujer permanecen relativamente estables hasta la edad de 30-32 años, a partir de esta edad comienzan a disminuir y a partir de los 35 años estos intervalos decrecen con mayor intensidad (Menken 1986, Leridon 2004). Este descenso en la fertilidad podría deberse a una disminución en la calidad del ovocito causada, en parte, por una función metabólica de ovocito reducida (Bartmann 2004, Eichenlaub-Ritter 2004).

Los resultados de un estudio realizado en 2012 establecieron que los niveles de algunos hidratos de carbono (como glucosa, lactato y piruvato) y algunas hormonas (progesterona, estrógeno y hormona sérica antimuleriana) están alterados en el líquido folicular de mujeres con reserva ovárica reducida o edad maternal avanzada. Concluyendo que este ambiente folicular perturbado podría ser el responsable de esta alteración en la competencia del desarrollo del ovocito y la posterior alteración del desarrollo del embrión (Pacella 2012).

En otros estudios se sugieren otras moléculas como posible explicación de la disminución del potencial de fertilidad con respecto al aumento en la edad de la mujer. Algunas de estas moléculas son apolipoproteínas o partículas de colesterol (Von Wald 2010) y el ácido D-Aspártico, siendo mayor en mujeres jóvenes que en mujeres de mayor edad (D'Aniello 2007).

Sin embargo, en este trabajo (Ver tabla 11), no aparece ninguna correlación de la edad con ningún metabolito en el grupo de mujeres con ciclos naturales (18-45 años). En cambio, en las muestras sometidas a estimulación convencional (18-40 años) aparecen correlaciones limitadas con algunos metabolitos pero sus valores son tan pequeños que no se puede considerar que estos metabolitos aumenten o disminuyan con la edad. Estos resultados coincidirían con los trabajos en los que no se aprecian diferencias entre los líquidos foliculares en función de la edad, por ejemplo, un estudio concluye que la función de la cadena respiratoria en mitocondrias de las células del líquido folicular es constante y no está afectada ni por la edad ni por la respuesta del ovario (Shufaro 2012). Por lo tanto las partículas implicadas en este metabolismo no sufrirían ningún tipo de alteración con respecto a la distribución de edades en este estudio.

3.2. Estudio de las correlaciones de los metabolitos con respecto al Índice de Masa Corporal (IMC)

La obesidad es otro de los problemas que está aumentando rápidamente en los últimos años, (Haslam 2005) y que se relaciona con bajas tasas de embarazos e infertilidad (Van der Steeg, 2008, Norman and Clark, 1998; Moran, 1999, Nelson y Fleming, 2007).

Existen estudios que relacionan el IMC con la composición metabólica del líquido folicular y sus posibles consecuencias con la calidad ovocitaria y embrionaria.

En un primer estudio, las mujeres obesas mostraron un ambiente folicular alterado. Particularmente, aparecieron incrementados metabolitos como la insulina, el lactato y los triglicéridos, la proteína C-reactiva y los niveles de actividad estrogénica, los cuales podrían estar asociados con resultados reproductivos peores típicamente observados en estos pacientes (Robker 2009).

En un estudio más actual se ha mostrado que alteraciones metabólicas en el suero son reflejadas en el líquido folicular y que algunas de estas alteraciones podrían afectar a la calidad del ovocito, independientemente del IMC de las mujeres (Valckx 2012).

Sin embargo, de la misma manera que con la edad, las correlaciones (Tabla 12) que se han obtenido en los análisis realizados a las muestras en este trabajo, y cuyo IMC variaba entre 17,85-34,9 (Tabla 9), son tan pequeñas que no se puede asegurar que estas moléculas estén alteradas por el IMC y que este influya en el perfil metabólico del líquido folicular.

Al comprobar que no existen correlaciones importantes entre los metabolitos identificados en el líquido folicular y la edad y el IMC, podemos concluir que los metabolitos de este fluido no se verán influenciados significativamente por estas 2 características. Por lo tanto, no será necesario tener en cuenta estos factores para los siguientes análisis.

3.3. Estudio comparativo de los ciclos de estimulación

En las técnicas de reproducción asistida, los resultados son siempre mejores si provocamos un desarrollo folicular múltiple mediante una estimulación ovárica (The ESHRE Capri Workshop Group 2009) que permite el aumento del nº de ovocitos, aumentando, de esta manera, las tasas de embarazo.

Sin embargo, debido a una serie de inconvenientes, riesgo de gestación múltiple y riesgo de sufrir síndrome de hiperestimulación ovárica, se está proponiendo el uso de los ciclos naturales y de los ciclos de estimulación ligera. Además, todavía se desconocen los efectos del tratamiento hormonal a largo plazo (Brinton 2005) como podría ser el cáncer de mama y ovario (Bristow 1996) y su posible efecto negativo sobre la calidad ovocitaria (Soares 2003, Baart 2007) ya que podría influir en el ambiente folicular, la fisiología del ovocito y, finalmente, en la calidad de los embriones obtenidos a partir de éstos.

Por lo tanto, un conocimiento más detallado de la composición metabólica del líquido folicular de los folículos obtenidos en ciclos naturales y ligeros y en ciclos estimulados nos podría ayudar a distinguir en qué medida la estimulación está afectando al ambiente folicular. Para ello se han llevado a cabo estudios de correlaciones entre los metabolitos más importantes de las rutas energéticas y herramientas estadísticas como análisis multivariable (MANOVA) o de una única variable (ANOVA).

Estimación de concentraciones y correlaciones metabólicas

Para la interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de las correlaciones entre metabolitos se se podría considerar una compartimentación del folículo. Como se ha explicado en la introducción, el ovocito está rodeado del líquido folicular y este se encuentra contenido dentro del folículo. La composición del líquido folicular depende del plasma, ya que su origen es un exudado que atraviesa la pared folicular, que puede variar en función de la actividad metabólica del ovocito y de las células granulosas. Además se ha sugerido la existencia de una barrera hemato-folicular que

impediría el transporte de sustancias de determinado tamaño de un lado al otro de la barrera. De manera detallada, la concentración de glucosa que se ha estimado en este estudio ha dado un valor de $7,57 \pm 3,3$ mM. Las medias de las concentraciones en los grupos de donantes y pacientes con ciclos naturales fueron un poco mayor que los valores para los grupos con estimulación convencional (Tabla 13). Además, estos valores fueron superiores a los encontrados en la bibliografía para suero ($4,9 \pm 0,3$ mM) (Psychoglos 2011). Estos datos podrían sugerir que la glucosa incorporada desde la sangre al folículo no está siendo utilizada en su totalidad por el ovocito y las células de la granulosa y se podría estar acumulando en el líquido folicular, y que en presencia de estimulación convencional se están empleando otros sustratos energéticos para la obtención de energía. Por otro lado, hemos observado que la concentración de lactato ($8,17 \pm 4,76$ mM) (Tabla 13) también estaría aumentada con respecto al valor encontrado en la bibliografía para suero ($1,5 \pm 0,4$ mM) (Psychoglos 2011). Al igual que ocurre con la glucosa, los valores en ciclos naturales son mayores que en ciclos estimulados. En este caso, el lactato podría proceder tanto del exudado de plasma que atraviesa la pared del folículo como de un aumento en la ruta anaerobia de la glucosa junto a una disminución de la utilización del lactato como fuente de energía por parte del ovocito y células de la granulosa, fundamentalmente en el grupo de los ciclos naturales. Finalmente, la cantidad de piruvato estimada en todos los grupo analizados ($0,48 \pm 0,23$ mM) (Tabla 13) sería bastante similar a la encontrada en la bibliografía para suero ($0,3 \pm 0,2$ mM) (Psychoglos 2011). Además no se ve una diferencia clara entre los grupos de ciclos naturales y de estimulación convencional. Referente a las correlaciones entre metabolitos determinadas, nuestros resultados han mostrado que en todos o casi todos los grupos se observa una correlación negativa entre glucosa y lactato (Tabla 10). Esta correlación se ha observado en otros trabajos anteriores (Orsi 2005, Leese 1990), lo que podría significar la existencia de una superposición de la glicólisis sobre el flujo de los hidrato de carbono desde el plasma (Leese 1990). Por lo tanto, podríamos suponer que en presencia de altas cantidades de glucosa la ruta aerobia estaría favorecida, disminuyéndose la ruta anaerobia, en la que a partir de glucosa se

obtiene lactato para la producción de energía. También podría suponer que el lactato se estaría metabolizando por las células de la granulosa o del ovocito

Por otro lado, existe una correlación lineal positiva entre la glucosa y el acetato, es decir que a mayor concentración de glucosa en el líquido folicular habrá mayor concentración de acetato. Este acetato puede proceder del metabolismo de la glucosa en el ovocito o células de la granulosa ya que la forma activa de este metabolito es el acetil-CoA, intermediario clave en el metabolismo aeróbico de la glucosa o de su incorporación desde el plasma. Otras posibles fuentes de acetil-CoA son los ácidos grasos y los aminoácidos. Por lo tanto, este aumento de acetato podría deberse a un incremento en las rutas de formación de este metabolito o una disminución en su utilización por parte de las células granulosas y ovocito.

En la correlación lineal entre lactato y piruvato, no se obtienen unos valores muy significativos, sin embargo aparece un cambio en el sentido de la correlación en función del tipo de estimulación aplicada. En el caso de la estimulación convencional se observa una correlación positiva (Coeficiente de correlación +0.4295) entre estos dos metabolitos, es decir, que conforme aumenta el piruvato, aumenta el lactato y viceversa. Esta correlación también se ha observado en un trabajo anterior (Orsi 2005) aunque el resultado no fue estadísticamente significativo. Esta correlación podría significar que en esta situación el lactato podría servir como fuente de energía alternativa a la glucosa. Sin embargo, en el caso de la estimulación natural y ligera la correlación aparece negativa (Coeficiente de correlación -0.4122), es decir que o no se está produciendo suficiente lactato o este no se está transformando en Piruvato

También se observa una diferencia de las correlaciones entre Glucosa y Piruvato en los grupos de pacientes con estimulación convencional (negativa) (Orsi 2005) y pacientes con estimulación natural (positiva). Es decir, que cuando se aplica una estimulación convencional, en presencia de cantidades importantes de glucosa la proporción que aparece de piruvato es menor, esto podría deberse a un aumento en la utilización de este último metabolito en las diversas rutas metabólicas. Por el

contrario, en la estimulación natural, este metabolito se estaría acumulando en el líquido folicular.

Del mismo modo, se observa una correlación lineal positiva entre dos cuerpos cetónicos, acetoacetato y β -Hidroxibutirato, siendo muy significativa en algunos de los grupos estudiados (Donantes con estimulación convencional, Donantes con estimulación natural y Ligera y Pacientes con estimulación convencional (tabla 10)). Acetoacetato y β -hidroxibutirato (cuerpos cetónicos) pueden ser sintetizados en la cetogénesis. Los ácidos grasos son metabolizados en la β -oxidación a acetyl-CoA que, a su vez, origina acetoacetato en la cetogénesis. El Acetoacetato se metaboliza a β -Hidroxibutirato y acetona. Los cuerpos cetónicos pueden ser oxidados a Acetyl-CoA que sirve de fuente de combustible del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) proporcionando energía en situaciones de déficit de glucosa.

En un estudio publicado en 2004 se obtuvo una correlación negativa entre los metabolitos glucosa y β -hidroxibutirato que podría sugerir que este metabolito es un buen indicador de hipoglucemia (Leroy 2004b). En este estudio se ha observado dichacorrelación, aunque sin significación estadística.

MANOVA y ANOVA

Por otro lado, el análisis multivarianza realizado a las muestras, dividiendo el espectro en diversas regiones, condujo en la mayoría de los casos a la separación de los grupos inicialmente definidos: Estimulación Convencional frente a Estimulación Natural (+ Ligera) (Fig. 35), Estimulación Convencional frente a Estimulación Natural y frente a Estimulación Ligera (Fig. 37), Donantes frente a Pacientes (Fig. 39), Donantes con Estimulación Convencional frente a Donantes con Estimulación Natural (+ Ligera) (Fig. 41), Pacientes con Estimulación Convencional frente a Pacientes con Estimulación Natural (+ Ligera) (Fig. 43). Estas separaciones de los grupos mediante MANOVA podrían indicar que los perfiles metabólicos de estos grupos serían diferentes entre sí.

Cuando se realiza un análisis de varianza (ANOVA), en una serie de metabolitos se observa que las medias son significativamente diferentes ($A < 0.05$). Glicerofosfolina, Fosfolina, Colina, Creatina, Citrato, b-Hidroxibutirato, piruvato y lípidos son algunos de estos metabolitos que tienen medias diferentes. En mujeres con estimulación convencional la media es mayor que en mujeres con estimulación natural y ligera. Además aparecen dos metabolitos nuevos con diferencias en sus medias, acetoacetato y glicoproteína (Fig. 36). En el caso de las donantes separadas en función del tipo de estimulación únicamente piruvato mostró esa diferencia (Fig. 42). Por otro lado, cuando las muestras son divididas en función de los tres tipos de estimulación las medias de los grupos de estimulación convencional y natural son significativamente diferentes ($A < 0.05$), observándose nuevamente la media para la estimulación convencional mayor que para la estimulación natural, sin embargo, la media del grupo de estimulación ligera no muestra diferencias significativas con los otros dos grupos estando su media aproximadamente entre las medias de estimulación convencional y ligera (Fig. 38). Al separar las muestras en función de si pertenecen al grupo de pacientes o de donantes la colina vuelve a aparecer con medias significativamente diferentes entre ambos grupos (Fig. 40), al igual que ha ocurrido en el estudio anterior donde las muestras con características determinadas se separaban en estos dos grupos. De igual manera la media de la colina vuelve a ser mayor en el caso de las pacientes que el de las donantes, esta acumulación en pacientes implicaría que la colina no se estaría empleando para la formación de los fosfolípidos y por tanto las membranas plasmáticas se podrían alterar, afectando al correcto crecimiento del folículo. También aparece una media superior de lactato en las pacientes posiblemente por un aumento en la ruta anaerobia donde la glucosa se transforma en lactato produciendo energía.

Los metabolitos cuyas medias se han mostrado diferentes en ambos grupos están implicados en algunas de las rutas energéticas importantes de las células. A continuación se describirán las implicaciones de cada uno de los metabolitos observados en el análisis ANOVA en la reproducción.

3.4. Colina, fosfocolina y Glicerofosfocolina

El papel principal de los metabolitos colina, fosfocolina y glicerofosfocolina (fuente de colina) es que son precursores de los fosfolípidos, fosfatidilcolina y esfingomiélin (Fig. 50), componentes clave de las membranas biológicas.

A nivel embrionario y folicular, la colina, es crítica durante el desarrollo fetal (Albright 1999, Craciunescu 2004, Loy 1991, Meck 2003, Mellot 2004, Fischer 2001, Shaw 2004). Además, la alteración o interrupción de la ruta de producción de la fosfatidilcolina en ratones hembra transgénicos compromete el desarrollo del folículo ovárico y la maduración del ovocito (Gunter 2007).

Las medias de estos metabolitos fueron diferentes en los grupos de estimulación convencional y natural (+ Liger), siendo mayor su media en el grupo de la estimulación convencional. Por lo tanto, una mayor cantidad de estos metabolitos podría implicar mejores resultados en la fertilización y posterior desarrollo del embrión ya que también se ha observado una disminución de la colina y sus metabolitos relacionados, glicerofosfocolina y fosfocolina, en el líquido folicular de folículos cuyo ovocito fertilizado sufrió un fallo en la división celular (Wallace 2012)

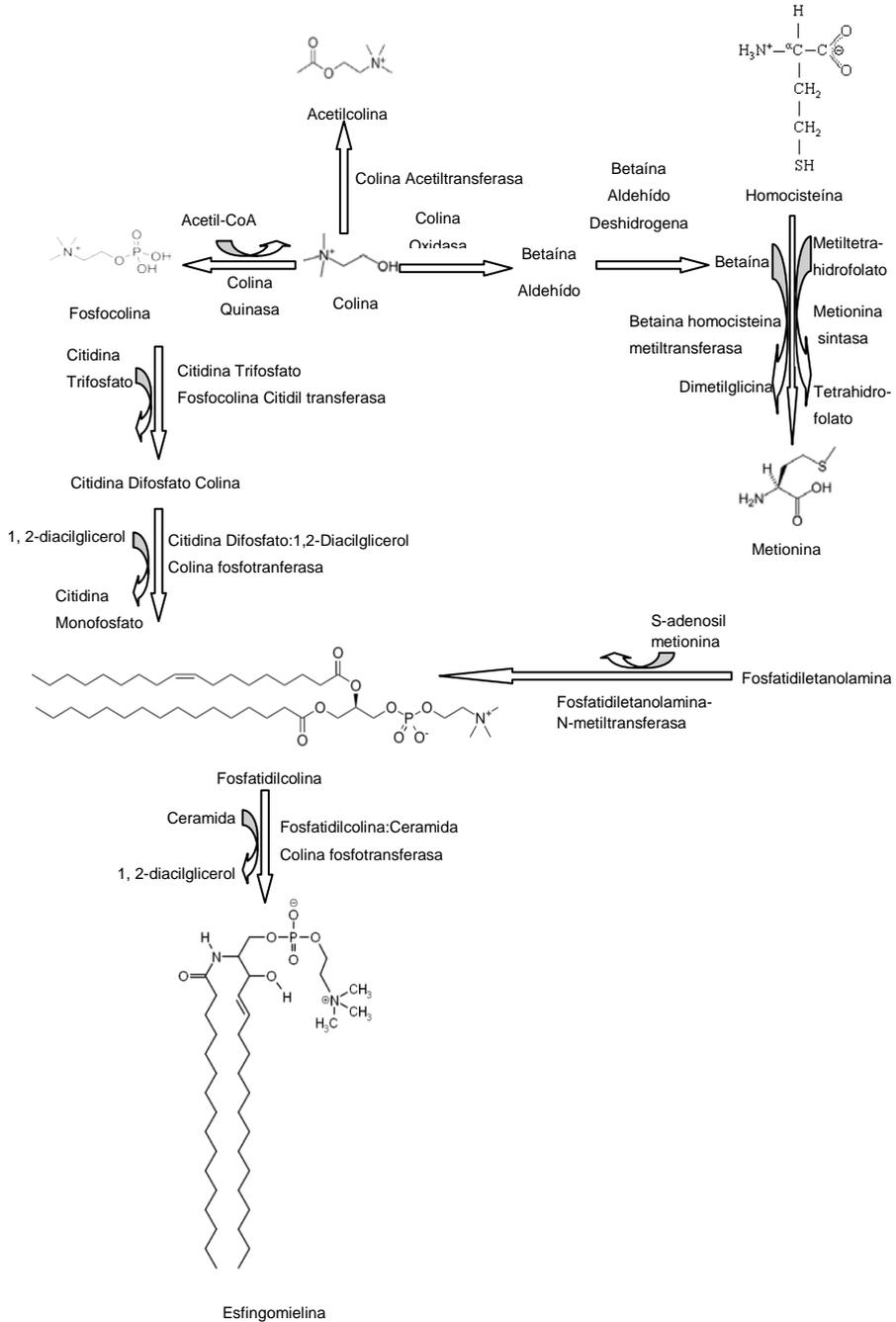


Figura 50.- Metabolismo de la Colina,

3.5. Creatina

La creatina es un derivado de aminoácidos que se sintetiza de forma natural en el hígado, el páncreas y en los riñones a partir de aminoácidos como la arginina, la glicina y la metionina y posteriormente se transporta por la sangre (Fig. 51). La creatina tiene la función de almacenar energía. La creatina constituye la fuente inmediata y directa para regenerar ATP.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una diferencia entre las medias de los grupos de estimulación convencional y estimulación natural (+ligera), siendo la media mayor en el caso de la estimulación convencional. Por lo tanto, una mayor cantidad de creatina en el líquido folicular implicaría una mayor reserva energética, es decir, una mayor capacidad para regenerar el ATP y obtener energía.

De hecho, se han encontrado estudios que demuestran la importancia de la creatina en el desarrollo del ovocito (Lee 2010) y para las actividades neosintéticas del embrión del embrión.

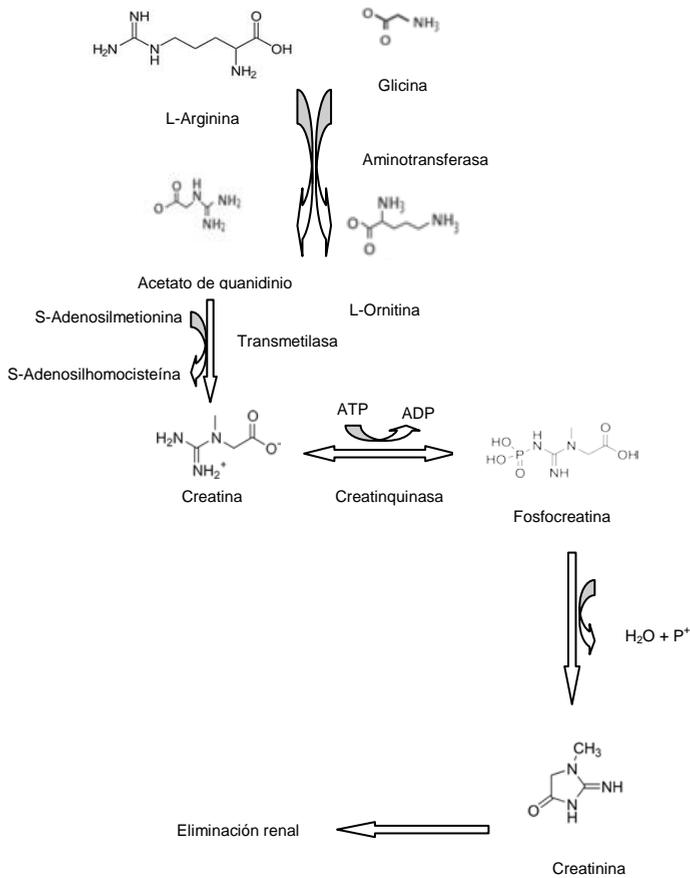


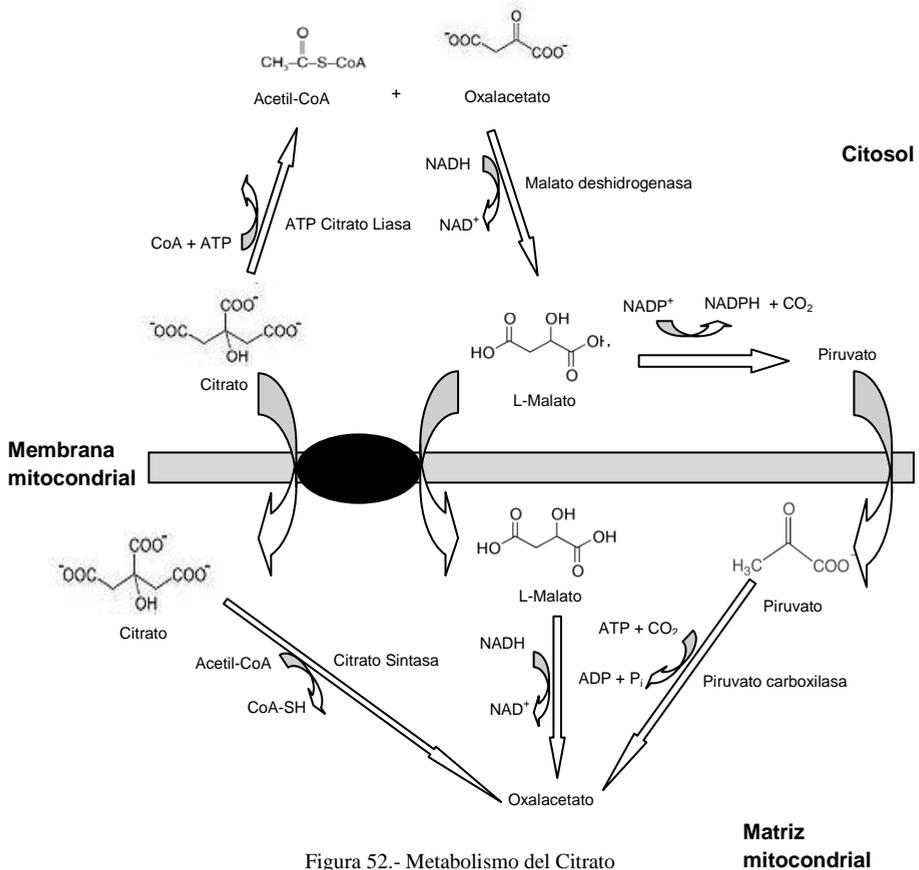
Figura 51.- Metabolismo de la Creatina

3.6. Citrato

El citrato es el primer intermediario que aparece en el ciclo de Krebs. Se forma cuando el Acetil-CoA procedente de distintas rutas catabólicas se incorpora al ciclo. La reacción del citrato sintasa implica la condensación del acetilo con la función α -ceto de ácido dicarboxílico oxalacetato. Posteriormente, el citrato se convierte en isocitrato en una reacción reversible catalizada por la aconitasa. Esta conversión

tiene lugar en la superficie del enzima sin que se libere el supuesto intermediario cis-aconitato (Fig. 52).

El citrato también funciona como transportador del grupo acetilo fuera de la mitocondria ya que la membrana mitocondrial interna es impermeable para este último. Cuando hay un exceso de citrato proveniente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el citrato se exporta al citosol mediante un transportador de de tricarbóxilato, a cambio de un ácido dicarbóxico como, por ejemplo, el malato. El citrato citosólico se escinde a continuación formando acetil-CoA y oxalacetato a expensas de una molécula de ATP en la reacción de la ATP:citrato liasa.



No se ha encontrado en la bibliografía ninguna correspondencia entre este metabolito y la maduración ovocitaria o el desarrollo embrionario. Sin embargo, en este trabajo se ha observado una mayor media de este metabolito en el grupo de estimulación convencional frente a estimulación natural (+ ligera), particularmente dentro del grupo de las pacientes. Esta acumulación en el grupo de estimulación convencional podría implicar un aumento en la producción de este metabolito para su posterior metabolización para la producción de energía a través del ciclo de krebs.

3.7. Cuerpos cetónicos: β -Hidroxiacetato y Acetoacetato

Los cuerpos cetónicos son pequeñas moléculas hidrosolubles que constituyen una fuente de energía basada en los lípidos. El β -hidroxiacetato es el producto de la reducción del acetoacetato.

Acetoacetato y β -hidroxiacetato se forman a partir de Acetil-CoA durante el metabolismo de los ácidos grasos (Fig. 53). A su vez, estos cuerpos cetónicos constituyen un excelente combustible cuando el aporte de glucosa es limitado o su utilización ineficiente. En estas condiciones se pueden utilizar los ácidos grasos como fuente de energía.

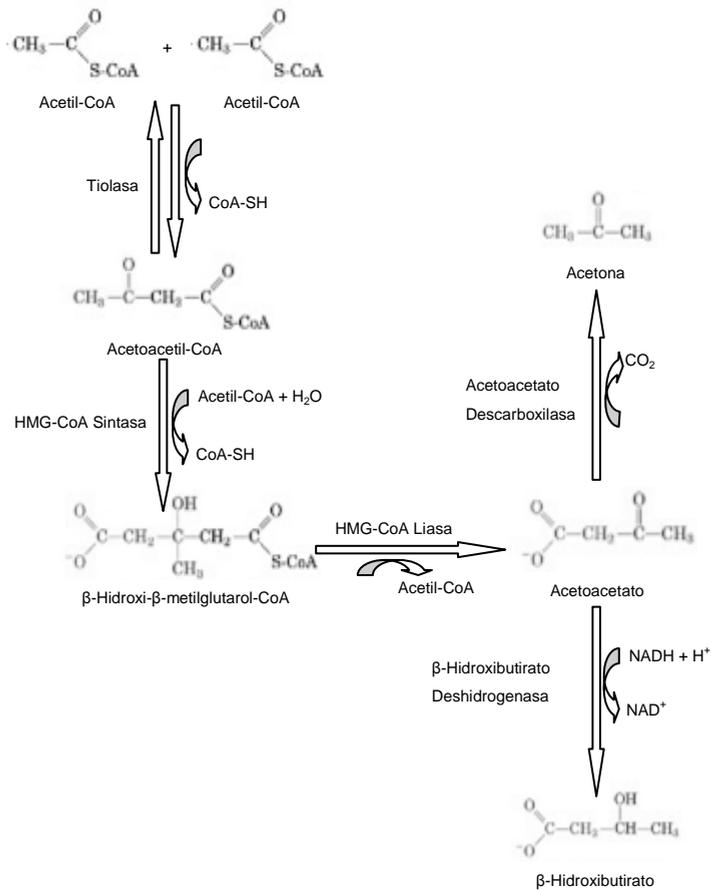
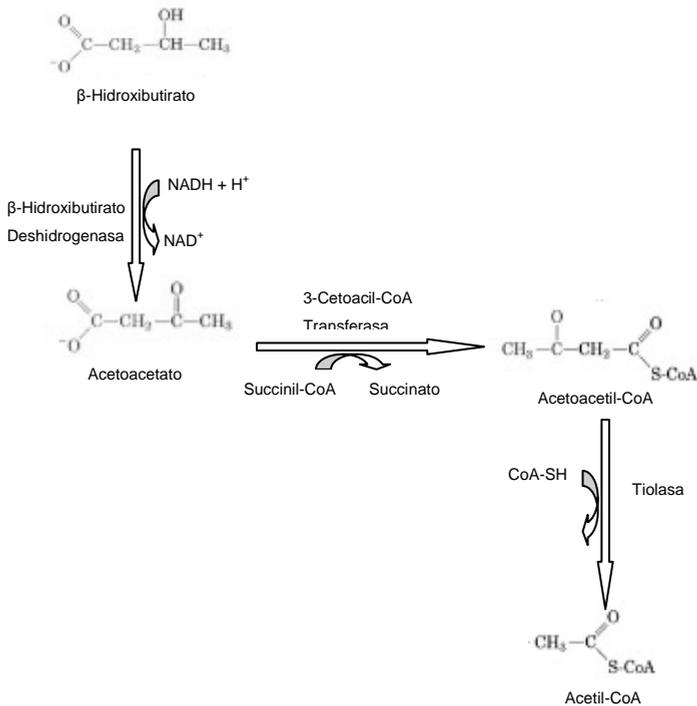


Figura 53.- Formación de los cuerpos cetónicos a partir de Acetil-CoA

En el ovario de vacas y ovejas, el β -hidroxibutirato, puede ser reconvertido a otros sustratos como el acetoacetato (Rabiee 1997a, Rabiee, 1997b) y ser oxidados a Acetil-CoA, incorporándose al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) proporcionando energía en situaciones de déficit de glucosa (Fig 54).

Figura 54.- Reconversión de β -Hidroxibutirato a Acetil-CoA

En este estudio, en el grupo de mujeres sometidas a estimulación convencional se observa una media de β -hidroxibutirato mayor que en el grupo de ciclos naturales (Fig. 36 y 38). Estos resultados podrían ser explicados por un estudio previo en el que se observaron cambios en las concentraciones séricas de lípidos y cuerpos cetónicos cuando se aplican gonadotropinas para la estimulación. Este aumento parece ser debido al incremento del estradiol producido por las hormonas durante la estimulación ovárica (Hammadeh 2004). Esta alteración del nivel de β -hidroxibutirato en sangre podría causar cambios similares en el LF, ya que se ha determinado una importante correlación entre los niveles de β -hidroxibutirato en el LF de diferentes tamaños de folículos y suero. El aumento de β -hidroxibutirato de folículos pequeños a grandes es posiblemente causado por la secreción local de este compuesto por las células foliculares (Leroy 2004a, Leroy 2004b).

Por otro lado, esta diferencia de las medias de β -hidroxibutirato entre el grupo de estimulación convencional y el grupo de los ciclos naturales podría ser importante ya que Acetoacetato y β -hidroxibutirato entre otros, podrían influir en la competencia de la maduración de los ovocitos y tras su fertilización, del crecimiento al estadio de blastocisto (Gomez 1997).

Además, en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa, el β -hidroxibutirato puede modular la función de las células granulosas in vitro pero no de las células de la teca. Esto podría ser atribuido al uso del β -hidroxibutirato como una fuente de energía alternativa. (Vanholder 2006)

Se ha demostrado que el tratamiento con β -hidroxibutirato puede producir un mayor número de células granulosa (Veech 2004). Sin embargo la esteroidogénesis de las células de la granulosa se redujo durante estos tratamientos ya que aunque las cetonas generan energía a través de la metabolización en el ciclo de krebs, no pueden ser usadas, como la glucosa, en la vía de las pentosas fosfato (Nehlig 2004). Esta vía produce NADPH, que es requerido para la producción de esteroides (Stryer 1995).

Finalmente, es conocido que durante el periodo neonatal, el acetoacetato y el β -hidroxibutirato actúan como importantes precursores de la síntesis cerebral de lípidos (Devlin 2006).

3.8. Piruvato

El piruvato es otro compuesto clave en el metabolismo energético de las células.

Durante la glucólisis, la glucosa u otros monosacáridos se escinden en dos moléculas en piruvato, producto final de esta vía citosólica, originándose dos moléculas de ATP.

A continuación, en presencia de oxígeno, se produce la descarboxilación oxidativa del piruvato en la matriz de la mitocondria para dar acetil-CoA y CO₂ mediante el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (Fig 55).

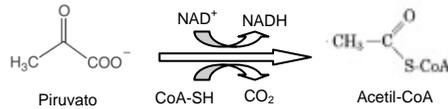


Figura 55.- Formación del Acetil-CoA a partir de piruvato

Si no hay suficiente cantidad de oxígeno disponible o el organismo es incapaz de continuar con el proceso oxidativo, el piruvato sigue la ruta anaeróbica. En esta vía, el piruvato se reduce, dando lugar al lactato, interviniendo para ello la enzima lactato deshidrogenasa (Fig 56).

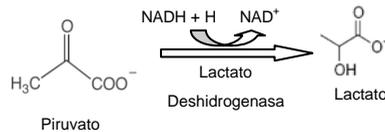


Figura 56.- Formación del Lactato a partir de Piruvato

Por otro lado, se puede producir una carboxilación del piruvato para dar oxalacetato mediante la piruvato carboxilasa. Esta reacción es necesaria para restablecer los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos y mantener el ciclo funcional y en la gluconeogénesis y requiere un gasto de ATP (Fig 57).

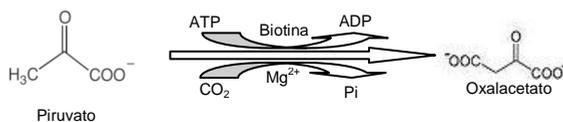


Figura 57.- Formación del Oxalacetato a partir de Piruvato

El piruvato puede generar aminoácidos como la alanina o la serina por transaminación (Fig 58).

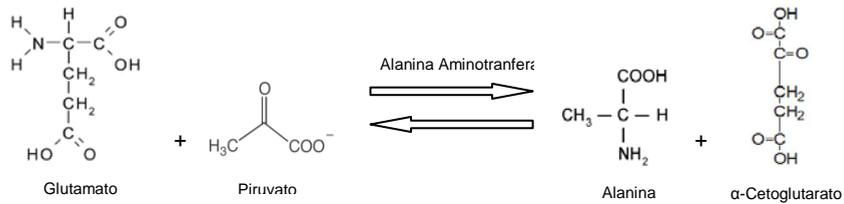


Figura 58.- Formación del aminoácidos a partir de Piruvato

En nuestros resultados comparando los diferentes tipos de estimulación se ha observado una diferencia entre las medias de estimulación convencional y natural, siendo mayor la media del primer grupo. Este piruvato podría ser esencial para la correcta finalización de la ovogénesis. En un estudio anterior se consideró al piruvato como fuente vital de energía durante la maduración meiótica in vivo en ovocitos de murino, aunque en estadios tempranos de la ovogénesis esta ruta metabólica podría no ser necesaria por la compensación metabólica de las células de la granulosa (Johnson 2007).

Algunos estudios han destacado el papel del piruvato en la maduración del ovocito de cerdo in vitro, indicando una doble función como sustrato energético y como un protector antioxidante contra el estrés oxidativo del ambiente in vitro (Gonzales-Figueroa 2005).

También se ha determinado que ovocitos y embriones en degeneración mostraban menores tasas de consumo de piruvato (Leese 1986).

Un estudio realizado en 2009 concluyó que el piruvato en el medio de cultivo puede prevenir parcialmente el envejecimiento de los ovocitos de ratón (Liu 2009).

3.9. Lípidos

En todas las muestras de LF se aprecia un alto contenido en lípidos que produce una alteración de la línea base en los espectros de RMN obtenidos (Fig 27). Una fuente importante de ácidos grasos es la biosíntesis a partir de intermediarios de pequeño

tamaño procedentes de la degradación metabólica del azúcar, de algunos aminoácidos y de otros ácidos grasos. En primer lugar se sintetiza el palmitato a partir del acetil-CoA. En estudios anteriores se ha observado que el ácido palmítico es un ácido graso muy abundante en el líquido folicular de vaca junto con el linoleico, oleico y esteárico (Renaville 2010) y que el palmitato sirve de precursor para el resto de ácidos grasos.

La elevada presencia de estos compuestos se podría explicar porque proporcionan una importante fuente de energía para los ovocitos en desarrollo ya que se ha determinado un alto metabolismo lipídico en ovocitos de cerdo en maduración (Sturmey 2003). El metabolismo de los ácidos grasos tiene lugar a través de la β -oxidación, que es el principal proceso productor de energía. Esta ruta finaliza con la formación de acetil-CoA que puede incorporarse al ciclo de Krebs o continuar con la formación de los cuerpos cetónicos.

Además de la función energética los lípidos tienen otras funciones como la función estructural. Los fosfolípidos, glucolípidos y el colesterol forman las bicapas lipídicas de las membranas celulares y reguladora ya que son precursores de muchas moléculas de señalización y hormonas.

Se ha observado una media mayor en el grupo de estimulación convencional cuando se realiza un estudio ANOVA a las muestras de este estudio (Fig 36 y 38). Esta variación en los grupos estudiados podría deberse a que los folículos poseen su propio metabolismo lipídico local ya que los perfiles de ácidos grasos en LF y suero fueron diferentes. Este metabolismo podría modular la fertilidad ya que los ácidos grasos podrían afectar al desarrollo folicular normal y la ovulación a través de mecanismos incluyendo prostaglandinas, apoptosis, estabilidad de las membranas y receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (Renaville 2010) Además, se ha demostrado que los perfiles de ácidos grasos del LF están influidos por la actividad estrogénica del folículo (Renaville 2007).

3.10. Elección del tipo de estimulación

Desde la introducción de los tratamientos de FIV (Stephoe 1978), los ciclos naturales han sido en gran parte reemplazados por la estimulación ovárica. A pesar de que los ciclos naturales tienen muchas ventajas (menor riesgo de embarazo múltiple y de síndrome de hiperestimulación ovárica, consume menos tiempo, físicamente y emocionalmente es menos exigente para las pacientes y es más económico que el estimulado) es menos efectivo. Debido al alto rango de cancelación por el aumento prematuro de LH y por ovulaciones prematuras (Pelinck 2002).

Sin embargo en los últimos años han aparecido una serie de publicaciones en las que se recomienda el ciclo natural como tratamiento alternativo.

Algunos estudios proporcionan tasas acumuladas de embarazo y recién nacido vivo tras cuatro ciclos consecutivos muy aceptables, del 46% y 32% respectivamente (Nargund 2001). Otros estudios que comparan los resultados de ambos tipos de estrategias observan tasas de implantación y recién nacido vivo por ciclo iniciado similares entre ellas (Lukassen 2003). La combinación del ciclo natural de FIV y el cultivo prolongado in vitro de embriones hasta estadio de blastocisto (Día 5 ó 6) mejora las tasas de implantación de los ciclos, consiguiendo resultados de alrededor del 53% (Trokoudes 2005).

Se ha demostrado que el ciclo natural en IVF/IVM podría ser un tratamiento alternativo razonable y eficiente para pacientes bajas respondedoras cuando el ciclo estimulado ha fallado (Li 2011; Bassil 1999).

También se ha observado que los ciclos de inducción de la ovulación podrían alcanzar tasas de embarazo mayores que los ciclos naturales en inseminación intrauterina, particularmente en pacientes infértiles por debajo de 35 años. Pero los ciclos naturales son preferibles para pacientes mayores o iguales a 35 años (Chen 2009).

Otro estudio concluye que no hay diferencias significativas en los intervalos de partos en ciclos naturales frente a ciclos programados usando para la transferencia de embriones tanto embriones propios como embriones de donantes de óvulos. (Givens 2009).

Según algunos autores, la hiperestimulación ovárica controlada en combinación con la inseminación intrauterina ha dado como resultado tasas de embarazo significativamente altas comparado con la inseminación intrauterina no estimulada (ciclos naturales). Pero esto puede que no sea cierto en todas las edades. La hiperestimulación ovárica controlada fue asociada con un menor rango de nacidos vivos en mujeres de edad avanzada, independientemente del agente usado, parece ser peor cuando el citrato de clomifeno fue usado para la hiperestimulación. Las mujeres de mayor edad podrían beneficiarse más de los ciclos naturales (Kalu 2007).

Entre nuestras muestras no se han observado diferencias en los porcentajes de fecundación o gestación entre los dos grupos de muestras, ciclo natural o estimulado. Por lo tanto cabría pensar que como en las publicaciones anteriormente citadas (Bassil 1999, Nargund 2001, Lukassen 2003, Trokoudes 2005, Kalu 2007, Chen 2009, Givens 2009, Li 2011) el ciclo natural sería un alternativa adecuada a los ciclos estimulados.

Sin embargo, en las muestras con estimulación convencional se observa una media aumentada en moléculas importantes en funciones estructurales (colina, fosfocolina y glicerofosfocolina) y energéticas como son la creatina (reserva energética), citrato (intermediario en el ciclo de krebs), Piruvato (intermediario en glicólisis) y lípidos y cuerpos cetónicos (fuente de energía alternativa). Por lo tanto las muestras sometidas a estimulación convencional podrían tener una mayor capacidad estructural y energética que podría estar implicado en el crecimiento más rápido de los folículos en este tipo de terapias que se observó en una publicación de 2009 (Baerwald 2009).

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se han asignado un total de 131 resonancias en los distintos espectros realizados que han conducido a la identificación de 41 metabolitos presentes en el líquido folicular además de diversos lípidos y colesterol. Entre los metabolitos más importantes encontramos: diversos aminoácidos, Glucosa, Lactato, Piruvato, Acetato, Colina, fosfocolina, Glicerofosfocolina, Acetoacetato y β -hidroxibutirato, Lípidos y colesterol. Estos metabolitos tienen importantes funciones energéticas, como en el caso de Glucosa, Lactato, Piruvato, Acetato, Acetoacetato y β -hidroxibutirato y estructurales Colina, fosfocolina, Glicerofosfocolina, Lípidos y colesterol. Este último, además, tiene una gran relevancia en la reproducción sexual debido, fundamentalmente, a que es el precursor básico de las hormonas sexuales, estrógenos, andrógenos y progestágenos. Los aminoácidos, por su parte pueden formar parte de proteínas y servir como fuente de energía.
2. Los experimentos CPMG usados para evaluar los tiempos de relajación para algunas señales relativamente aisladas permitieron ajustar el decaimiento de las señales a una función biexponencial. Donde los valores de T_2 de las moléculas de bajo peso molecular se encontraban en el rango de 15-50 ms, y los valores para macromoléculas estuvieron sobre 1–2 ms. Esto podría ser debido a la distorsión causada por los solapamientos residuales (particularmente en el caso de macromoléculas) y al complejo comportamiento de relajación causado por las interacciones entre los metabolitos y las macromoléculas.
3. El análisis de las correlaciones existentes entre los metabolitos en cada uno de los grupos estudiados (donantes y pacientes) nos permite observar una serie de características de las rutas energéticas utilizadas en cada caso. En el caso de las donantes, la principal fuente de energía para el ovocito y las células de la granulosa sería la Glucosa. En el caso del grupo de pacientes

el lactato se podría transformar en piruvato en las células de la granulosa, sirviendo de fuente de energía de apoyo en la maduración del ovocito en situaciones de déficit de glucosa. Otra posible fuente de energía alternativa para el ovocito y las células de la granulosa serían los cuerpos cetónicos.

4. Se han encontrado diferencias importantes en los perfiles metabólicos tras el análisis multivariable de la varianza que separan el grupo de donantes del grupo de pacientes con baja respuesta a la estimulación.

Sin embargo, el análisis ANOVA únicamente proporciona dos picos identificados como colina (3.189 ppm) y creatina (3.028 ppm) con medias diferentes para ambos grupos de manera estadísticamente significativa, siendo la media de las muestras donantes inferior a la media de las muestras de pacientes. La acumulación de estos dos metabolitos, con funciones importantes a nivel estructural y energético, en el grupo de pacientes podría implicar una alteración en su transporte desde la sangre al líquido folicular, modificaciones en la dieta, trastornos a nivel de los órganos generadores de estas moléculas o una disminución en su utilización por parte de ovocito y células de la granulosa. La posible consecuencia de esta acumulación podría ser una variación en la formación de las membranas plasmáticas y en la generación de energía, modificando la correcta formación del folículo.

5. No existen correlaciones importantes entre los metabolitos identificados en el líquido folicular y la edad o el IMC, es decir, los metabolitos de este fluido no se verán influenciados por estas 2 características.
6. En la comparación de los tipos de estimulación ovárica, las concentraciones en líquido folicular de glucosa y lactato sufren un aumento con respecto al suero, especialmente en los grupos de ciclos naturales. Estos datos podrían sugerir que la glucosa incorporada desde la sangre al folículo no está siendo utilizada en su totalidad por el ovocito y las células de la granulosa y se podría estar acumulando en el líquido folicular y que en presencia de estimulación convencional se están empleando otros sustratos energéticos

para la obtención de energía. El lactato, a su vez, podría proceder tanto del exudado de plasma que atraviesa la pared del folículo como de un aumento en la ruta anaerobia de la glucosa, fundamentalmente en el grupo de los ciclos naturales.

7. La correlación lineal negativa entre glucosa y lactato en los distintos tipos de estimulación podrían sugerir la existencia de una superposición de la glicólisis sobre el flujo de los hidrato de carbono desde el plasma, además de que en presencia de glucosa la ruta aerobia estará favorecida, disminuyéndose la ruta anaerobia. En las correlaciones lineales entre lactato y piruvato y entre glucosa y piruvato, no se obtienen unos valores muy significativos, sin embargo aparece un cambio en el sentido de las correlaciones en función del tipo de estimulación aplicada. En el caso de la estimulación convencional el lactato podría estar actuando como fuente alternativa a la glucosa y que en presencia de grandes cantidades de glucosa el piruvato se estaría metabolizando por diversas rutas energéticas.
8. No se han observado diferencias en los porcentajes de fecundación o gestación entre los dos grupos de muestras, ciclo natural o estimulado. Sin embargo, las muestras sometidas a estimulación convencional podrían tener una mayor capacidad estructural y energética que podría estar implicado en el crecimiento más rápido de los folículos en este tipo de terapias, ya que se observa una media aumentada en moléculas importantes en funciones estructurales (colina, fosfocolina y glicerofosfocolina) y energéticas como son la creatina, citrato, Piruvato y lípidos y cuerpos cetónicos.

ANEXO I

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

CÓDIGO Y TÍTULO DEL ESTUDIO: Factores del folículo que influyen en la fertilidad y posterior desarrollo del embrión

INVESTIGADOR PRINCIPAL

- Nombre y Apellidos:
- b) Filiación:
- c) Email:
- d) Teléfono / Fax:

PROMOTOR: Universitat de València

CENTRO: IVI Valencia. Fundación IVI (Valencia). IVI Lisboa

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente, de acuerdo a la legislación vigente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Análisis mediante RMN de los líquidos foliculares: El perfil de biomoléculas mediante el uso de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) se está utilizando para poder encontrar biomarcadores en el líquido folicular que sean indicativos de la calidad ovocitaria y embrionaria. Para llevar a cabo el perfil de RMN del líquido folicular se procederá a descongelar 600 µl de líquido folicular se centrifugará a 10000 rpm durante 5min y el sobrenadante se mezclará con 60µl de D2O.

Los espectros de RMN se realizarán principalmente a 500MHz (11.75T) en un espectrómetro Bruker Avance DRX equipado con una crio-sonda TXI de 5mm $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ a una temperatura de 298 K.

Se realizarán experimentos de una dimensión en las muestras de líquido folicular como 1D NOESY, presaturación (presat) y doble Watergate.

Se llevarán a cabo varios experimentos bidimensionales para poder asignar las señales e identificar los metabolitos en el líquido folicular. Se realizarán experimentos DQF-COSY y TOCSY con diferentes tiempos de mezcla (30ms, 60ms y 80ms) y 1H-13C HSQC que proporciona los desplazamientos químicos de los enlaces de carbón de algunos grupos químicos característicos. Se realizará una cuantificación de las concentraciones de algunos de los metabolitos para ello se empleará una señal artificial de intensidad controlada creada electrónicamente como patrón de referencia en el espectro (ERETIC).

Los datos obtenidos se correlacionarán con la morfología ovocitaria, la fecundación y desarrollo embrionario de los ovocitos asociados a los folículos obtenidos.

Se harán estudios de microimagen de los ovocitos por RMN en alto campo en un equipo Bruker Avance operando a 600MHz.

El análisis por RMN del plasma sanguíneo nos proporcionará el origen de los biomarcadores obtenidos en el análisis anterior

El **objetivo** del presente proyecto es el estudio del folículo para la identificación de biomarcadores que nos permitan definir la idoneidad de los ovocitos empleados en FIV y del medio utilizado para su mantenimiento en estos tratamientos, aumentando las tasas de embarazo en FIV y favorecer el correcto desarrollo del embrión.

Para llevar a cabo el estudio será necesaria la participación de mujeres sometidas a tratamientos de FIV/ICSI y mujeres donantes de óvulos.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Los resultados de las investigaciones que se van a llevar a cabo en el presente proyecto pueden suponer una mejora en los tratamientos de FIV/ICSI debido a un aumento en los rangos de embarazo en mujeres sometidas a estos tratamientos ya que la identificación de biomarcadores del estado de maduración del folículo permite la selección de ovocitos con mayor capacidad de fertilización.

No existe ningún inconveniente ni riesgo para la paciente, como consecuencia del estudio.

SEGURO

El Promotor del estudio dispone de una póliza de seguros que se ajusta a la legislación vigente y que le proporcionará la compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse en relación con su participación en el estudio.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador o su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El Investigador del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo.

El paciente no recibirá remuneración alguna, si bien no tendrá que abonar ninguna cantidad por la analítica a realizar. Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto adicional al tratamiento que se le practica en la clínica.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información relevante referente al estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor los investigadores del estudio lo consideran oportuno. Usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

CÓDIGO/NOMBRE DEL ESTUDIO: Factores del folículo que influyen en la fertilidad y posterior desarrollo del embrión

Yo (nombre y apellidos).....
Nº Historia:
He leído la hoja de información que se me ha entregado:.....
He podido hacer preguntas sobre el estudio:.....
He recibido suficiente información sobre el estudio:.....
He hablado con (nombre del investigador/Médico):
Comprendo que mi participación es voluntaria:.....
Comprendo que puedo retirarme del estudio:.....
1º Cuando quiera:.....
2º Sin tener que dar explicaciones:.....
3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos:.....
Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.
Accedo a que las muestras de sangre o tejidos obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con la enfermedad o fármacos del estudio no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio): SI NO

Firma de la paciente:

Nombre:

Fecha:

Firma del médico/investigador:

Nombre: Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

ANEXO II

PROGRAMAS DE PULSOS

Presaturación

;zgpr

;1D sequence with f1 presaturation

"d12=20u"

"d13=3u"

1 ze

2 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

p1 ph1

go=2 ph31

wr #0

exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1

ph29=0

ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)

;pl9 : f1 channel - power level for presaturation

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

;d1 : relaxation delay; $1-5 * T1$

;d12: delay for power switching [20 usec]

;d13: short delay [3 usec]

Watergate

;zgppw5

;1D sequence water suppression using watergate W5 pulse sequence with gradients using double echo: M. ;Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J.K. Nicholson & J.C. Lindon, J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)

1 ze

2 d1 pl1:f1

p1 ph1

50u setnmr2|0 setnmr0|34|32|33

p16:gp1

d16 pl18:f1

p27*0.087 ph3

d19*2

p27*0.206 ph3

d19*2

p27*0.413 ph3

d19*2

p27*0.778 ph3

d19*2

p27*1.491 ph3

d19*2

p27*1.491 ph4

d19*2

p27*0.778 ph4

d19*2

p27*0.413 ph4

d19*2

p27*0.206 ph4

d19*2

p27*0.087 ph4

50u
p16:gp1
d16
4u
p16:gp2
d16
p27*0.087 ph5
d19*2
p27*0.206 ph5
d19*2
p27*0.413 ph5
d19*2
p27*0.778 ph5
d19*2
p27*1.491 ph5
d19*2
p27*1.491 ph6
d19*2
p27*0.778 ph6
d19*2
p27*0.413 ph6
d19*2
p27*0.206 ph6
d19*2
p27*0.087 ph6
p16:gp2
d16
4u setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
go=2 ph31
wr #0
exit

```
ph1=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph5=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
    2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph6=2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
    0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;NS: 8 * n
;DS: 4
;use gradient ratio:  gp 1 : gp 2
;                   34 : 22
;for z-only gradients:
;gpz1: 34%
;gpz2: 22%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
```

J-resolved

;jrespr.ven from Bruker jres

;homonuclear J-resolved 2D correlation

"p2=p1*2"

"d0=3u"

"d11=30m"

"d12=20u"

"d13=3u"

1 ze

2 d12 pl9:f1

 d1 cw:f1 ph29

 d13 do:f1

 d12 pl1:f1

3 p1 ph1

 d0

 p2 ph2

 d0

 go=2 ph31

 d11 wr #0 if #0 id0 zd

 lo to 2 times td1

exit

ph1=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3

ph2=0 2 1 3 1 3 2 0 1 3 2 0 2 0 3 1

ph29=0

ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)

;pl9 : f1 channel - power level for presaturation

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; $1-5 * T1$
;d11: delay for disk I/O
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [3 usec]
;in0: $1/(2 * w)$, $w = \text{max. width of multiplet}$
;nd0: 2
;NS: $4 * n$
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: QF

DQF-Experimento homonuclear COSY

;cosydfgpst19

;2D homonuclear shift correlation with double quantum filter phase sensitive using States-TPPI method water ;suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients allowing for presaturation during relaxation delay in ;cases of radiation damping phasecycle: A. Derome & M. Williamson, J. Magn. Reson. 88, 177 - 185 (1990)
; Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions: M. Piotto, V. ;Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 665 (1992)

;"d0=3u"

;"d11=30m"

;"d12=20u"

;"d13=4u"

"l3=(td1/2)"

1 ze

2 d11

3m

3 d11

4 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

p1 ph1

d0

p1 ph2

d13

p1 ph3

50u pl18:f1 setnmr2|0 setnmr0|34|32|33

p16:gp1

d16

p28*0.231 ph4

```
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p0*0.231 ph5
46u
p16:gp2
d16
4u setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 ip1 zd
3m ip29
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times l3
exit

ph1=1 1 1 1 0 0 0 0
ph2=0 0 0 0 1 1 1 1
ph3=1 2 3 0 2 3 0 1
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1
ph5=2 2 2 2 3 3 3 3
ph29=0 0 0 0 1 1 1 1
ph31=0 1 2 3 3 0 1 2

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
```

```
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;      use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d12: delay for power switching        [20 usec]
;d13: short delay                       [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: l3 = td1/2
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2    30 : 30
;for z-only gradients:
;gpz1: 30%
;gpz2: 30%
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;set p19 to 120dB when presaturation is not required
; use 75 - 80dB to reduce radiation damping
```

TOCSY

```
;mlevgpstw5
```

```
;homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence for mixing using
two power levels for ;excitation and spinlock phase sensitive using States-TPPI
method: A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
```

```
;water suppression using wtergate W5 pulse sequence with gradients using double
echo: M. Liu, X. Mao, C. ;He, H. Huang, J.K. Nicholson & J.C. Lindon, J. Magn.
Reson. 132, 125 - 129 (1998)
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"p5=p6*.667"
```

```
"p7=p6*2"
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d12=20u"
```

```
"DELTA=d0+d12-p1*2/3.1416"
```

```
"SCALEF=p7*2/p5+0.5"
```

```
"FACTOR1=((d9-p17*2)/(p6*64+p5))/SCALEF+0.5"
```

```
"I1=FACTOR1*SCALEF"
```

```
"I3=(td1/2)"
```

```
1 ze
```

```
2 d1
```

```
3m
```

```
3 d11
```

```
4 d12 pl1:f1
```

```
p1 ph1
```

```
DELTA
```

```
p2 ph2
```

```
d0
```

```
d12 pl10:f1
```

(p17 ph26)

5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)

(p5 ph23)

lo to 5 times l1

(p17 ph26)

50u p118:f1 setnmr2|0 setnmr0|34|32|33

p16:gp1

d16

p28*0.087 ph3

d19*2

p28*0.206 ph3

d19*2

p28*0.413 ph3

d19*2

p28*0.778 ph3

d19*2

p28*1.491 ph3

d19*2

p28*1.491 ph4

d19*2

p28*0.778 ph4

d19*2

p28*0.413 ph4

d19*2

p28*0.206 ph4

d19*2

p28*0.087 ph4

50u

p16:gp1

d16

4u

p16:gp2

d16

p28*0.087 ph5

d19*2

p28*0.206 ph5

d19*2

p28*0.413 ph5

d19*2

p28*0.778 ph5

d19*2

p28*1.491 ph5

d19*2

p28*1.491 ph6

d19*2

p28*0.778 ph6

d19*2

p28*0.413 ph6
d19*2
p28*0.206 ph6
d19*2
p28*0.087 ph6
p16:gp2
d16
4u setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 ip1 zd
3m ip2
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times l3
exit

ph1=0 2
ph2=1 3
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph5=0
ph6=2
ph22=3
ph23=0
ph24=1
ph25=2
ph26=0
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)

;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock

```
;p118: f1 channel - power level for W5-pulse (watergate)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse           [2.5 msec]
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d9 : TOCSY mixing time
;d11: delay for disk I/O                [30 msec]
;d12: delay for power switching         [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;l1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * l1) + (p17*2) = mixing time
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: l3 = td1/2
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2
;                          34 : 22
;for z-only gradients:
;gpz1: 34%
;gpz2: 22%
;use gradient files:
```

;gpnam1: SINE.100

;gpnam2: SINE.100

HSQC

```
;inv4prst
```

```
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum coherence phase
sensitive using States-;TPPI method with decoupling during acquisition: A. Bax,
R.H. Griffey & B.L. Hawkins, J. Magn. Reson. 55, ;301 (1983)
```

```
;;"p2=p1*2"
```

```
;;"d0=3u"
```

```
;;"d2=1s/(cnst2*2)"
```

```
;;"d11=30m"
```

```
;;"d12=20u"
```

```
;;"d13=3u"
```

```
"l3=(td1/2)"
```

```
1 ze
```

```
2 d11 do:f2
```

```
3m
```

```
3 d11
```

```
4 d12 p19:f1
```

```
d1 cw:f1 ph29
```

```
d13 do:f1
```

```
d12 p11:f1
```

```
p1 ph1
```

```
d2 p12:f2
```

```
p3:f2 ph3
```

```
d0
```

```
p2 ph2
```

```
d0
```

```
p3:f2 ph4
```

```
d13
```

```
d2 p112:f2
```

```

go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 ip3 zd
3m ip29
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times l3
exit

```

```

ph1=0
ph2=0
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph29=0
ph31=0 2 2 0

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D)           [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J)XH
;d11: delay for disk I/O               [30 msec]
;d12: delay for power switching        [20 usec]
;d13: short delay                      [3 usec]
;cnst2: = J(XH)
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: l3 = td1/2
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)

```

;nd0: 2

;NS: 4 * n

;DS: 16

;td1: number of experiments

;MC2: States-TPPI

;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2

;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

CPMG

CPMG 1D

;spinechoNpr.vem

;a partir de cpmg avance-version

"p2=p1*2"

"d12=20u"

"d13=3u"

"d30=(d12*4+d13*2+p2+d20*2)*11"

1 ze

2 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

p1 ph1

3 d12 pl9:f1

d20 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

p2 ph2

d12 pl9:f1

d20 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12

lo to 3 times l1

go=2 ph31

wr #0

exit

"d30=0u"

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3

ph2=1 3 1 3 0 2 0 2

ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

ph29=0

;p1: power level for p1 (1H)

;p19: power level for cw (1H presat)

;p1 : (1H) 90 degree high power pulse

;p2 : (1H) 180 degree high power pulse

;d1 : relaxation delay; $1-5 * T1$

;d12: delay for power switching [20 usec]

;d13: short delay [3 usec]

;d20: fixed echo time $\ll 1/J$, but $> (50 * P2)$

; to allow elimination of diffusion and J-mod. effects

;d30: tiempo de spin-echo total

;l1: number of echoes

;(d12*4+d13*2+p2+d20*2)*l1

;NS: $8 * n$

;DS: 16

CPMG 2D

;cpmgpr.vem

; from cpmg avance-version (00/02/07)

; T2 measurement using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence

"p2=p1*2"

"d11=30m"

"d12=20u"

"d13=3u"

1 ze

2 d12 p19:f1

d1

d3 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 p11:f1

p1 ph1

3 d20

p2 ph2

d20

lo to 3 times c

go=2 ph31

d11 wr #0 if #0 ivc

lo to 1 times td1

exit

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3

ph2=1 3 1 3 0 2 0 2

ph29=0

ph31=0 0 2 2 1 1 3 3

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)

;p19 : f1 channel - power level for presaturation

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse

;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse

;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1

;d3 : presaturation time

;d11: delay for disk I/O [30 msec]

;d20: fixed echo time << 1/J ,but > (50 * P2)

```
; to allow elimination of diffusion and J-mod. effects
;vc : variable loop counter, taken from vc-list
; vc should contain even numbers to provide
; for cancellation of 180 degree pulse errors
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments = number of values in vc-list
;define VCLIST
;this pulse program produces a ser-file (PARMOD = 2D)
```

DOSY***DOSY 1D***

```
;stebpgp1s191d
```

```
;1D sequence for diffusion measurement using stimulated echo using bipolar
gradient pulses for diffusion using 1 spoil gradient water suppression using 3-9-19
pulse sequence with gradients
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"DELTA1=d20-p1*2-p2-p30*2-d16*3-p19"
```

```
1 ze
```

```
2 d1 setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
```

```
3 50u p11:f1 setnmr2|0 setnmr0|34|32|33
```

```
p1 ph1
```

```
p30:gp6
```

```
d16
```

```
p2 ph2
```

```
p30:gp6*-1
```

```
d16
```

```
p1 ph3
```

```
p19:gp7
```

```
d16
```

```
DELTA1
```

```
p1 ph4
```

```
p30:gp6
```

```
d16
```

```
p2 ph2
```

```
p30:gp6*-1
```

```
d16
```

```
p16:gp1
```

```
d16 p118:f1
```

```

p27*0.231 ph5
d19*2
p27*0.692 ph5
d19*2
p27*1.462 ph5
d19*2
p27*1.462 ph6
d19*2
p27*0.692 ph6
d19*2
p0*0.231 ph6
4u
p16:gp1
d16
4u setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
go=2 ph31
wr #0
exit

ph1= 0
ph2= 0 0 0 0 2 2 2 2
ph3= 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph4= 0 1 2 3
ph5= 0
ph6= 2
ph31=0 1 2 3 0 1 2 3 2 3 0 1 2 3 0 1

;p11: f1 channel - power level for pulse (default)
;p18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
;          use for fine adjustment

```

```

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: gradient pulse (WATERGATE)
;p19: gradient pulse 2 (spoil gradient)
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;p30: gradient pulse (little DELTA * 0.5)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d20: diffusion time (big DELTA)
;NS : 8 * n
;DS : 4 * m
;use gradient ratio:  gp 1 : gp 6 : gp7
;                   -20 : var : -17.13
;for z-only gradients:
;gpz1: -20%
;gpz6: 1-100%
;gpz7: -17.13% (spoil)
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.100

```

DOSY 2D

```

;stebpgp1s19

```

;2D sequence for diffusion measurement using stimulated echo using bipolar gradient pulses for diffusion using 1 spoil gradient water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients

```

"p2=p1*2"

```

"DELTA1=d20-p1*2-p2-p30*2-d16*3-p19"

1 ze

1 "mc_line 25 file /u/exp/stan/nmr/lists/pp/stebpgp1s19 expanding start label for mc command"

2 MCWRK setnmr2^0 setnmr0^34^32^33

LBLF1, MCREST

26 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/stebpgp1s19"

3 50u p1:f1 setnmr2|0 setnmr0|34|32|33

p1 ph1

p30:gp6*diff

d16

p2 ph2

p30:gp6*-1*diff

d16

p1 ph3

p19:gp7

d16

DELTA1

p1 ph4

p30:gp6*diff

d16

p2 ph2

p30:gp6*-1*diff

d16

p16:gp1

d16 p18:f1

p27*0.231 ph5

d19*2

p27*0.692 ph5

d19*2

```

p27*1.462 ph5
d19*2
p27*1.462 ph6
d19*2
p27*0.692 ph6
d19*2
p0*0.231 ph6
4u
p16:gp1
d16
4u setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
go=2 ph31
# 1 "mc_line 61 file /u/exp/stan/nmr/lists/pp/stebppg1s19 expanding mc command
in line "
  MCWRK wr #0 if #0 zd igrad diff
  lo to LBLF1 times td1
# 62 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/stebppg1s19"
exit

ph1= 0
ph2= 0 0 0 0 2 2 2 2
ph3= 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph4= 0 1 2 3
ph5= 0
ph6= 2
ph31=0 1 2 3 0 1 2 3 2 3 0 1 2 3 0 1

;p11: f1 channel - power level for pulse (default)
;p18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p18
;          use for fine adjustment

```

```
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: gradient pulse (WATERGATE)
;p19: gradient pulse 2 (spoil gradient)
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p18
;p30: gradient pulse (little DELTA * 0.5)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d20: diffusion time (big DELTA)
;NS : 8 * n
;DS : 4 * m
;td1: number of experiments
;FnMODE: QF
;   use xf2 and DOSY processing
;use gradient ratio:  gp 1 : gp 6 : gp7
;                   -20 : 100 : -17.13
;for z-only gradients:
;gpz1: -20%
;gpz6: 100%
;gpz7: -17.13% (spoil)
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.100
;use AU-program dosy to calculate gradient-file Difframp
```

BIBLIOGRAFÍA

Abdalla HI, Baber R, Kirkland A, Leonard T, Power M, Studd JW (1990) A report on 100 cycles of oocyte donation; factors affecting the outcome. *Human Reproduction*. 5(8); 1018-1022

Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA, Studd JW (1993) Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Human Reproduction*. 8(9); 1512-1517

Acosta TJ (2007) Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 53; 39-44

Adashi EY (1994) Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*. 9(2); 36-51

Albright CD, Tsai AY, Friedrich CB, Mar MH, Zeisel SH (1999) Choline availability alters embryonic development of the hippocampus and septum in the rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*. 113(1-2); 13-20

Alikani M, Sadowy S, Cohen J (2002) Human embryo morphology and developmental capacity, pp. 1-31. Van Soom A, Boerjan M Eds. *Assessment of Mammalian Embryo Quality, Invasive and Non-invasive techniques*. Kluwer Academic Publishers

Andersen MM, Kroll J, Byskov AG, Faber M (1976) Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48; 109-118

Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C (2006) Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1764; 1775-1785

Arya BK, Haq UA, Chaudhury K (2012) Oocyte quality reflected by follicular fluid analysis in polycystic ovary syndrome (PCOS): A hypothesis based on intermediates of energy metabolism *Medical Hypotheses*. 78(4); 475-478

Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser BC (2007) Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*. 22; 980-988

Baerwald AR, Walker RA, Pierson RA (2009) Growth rates of ovarian follicles during natural menstrual cycles, oral contraception cycles, and ovarian stimulation cycles. *Fertility and Sterility*. 91(2); 440-449

Bajo-Arenas JM, Coroleu-Lleget B (2009) Esterilidad: Definiciones, Epidemiología y Etiología, pp. 41-47. *Fundamentos de la Reproducción*. Ed. Médica Panamericana.

Balaban B, Urman B (2006) Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive Biomedicine Online*. 12(5); 608-615

Balasz J, Miró F, Burzaco I, Casamitjana R, Civico S, Balleasca JL, Puerto B, Vanrell JA (1995) The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: evidence from in vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*. 10(7); 1678-1683

- Baltsen M, Byskov AG (1999) Quantitation of meiosis activating sterols in human FF using HPLC and photodiode array detection. *Biomedical Chromatography*. 13(6); 382-388
- Barba I, Fernandez-Montesinos R, Garcia-Dorado D, Pozo D (2008) Alzheimer's disease beyond the genomic era: nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy-based metabolomics. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 12(5A); 1477-1485
- Baron JA, La Vecchia C, Levi F (1990) The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 162(2); 502-514
- Bartmann AK, Romao GS, Ramos Eda S, Ferriani RA (2004) Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 21; 79-83
- Bassil S, Godin PA, Donnez J (1999) Outcome of in-vitro fertilization through natural cycles in poor responders. *Human Reproduction*. 14(5); 1262-1265
- Bax A, Davis DG (1985) Homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence for mixing using two power levels for excitation and spinlock phase sensitive using States-TPPI method. *Journal of Magnetic Resonance*. 65; 355-360
- Bayer SR, Armant DR, Dlugi AM, Seibel MM (1988) Spectrophotometric absorbance of follicular fluid: A predictor of oocyte fertilizing capability. *Fertility and Sterility*. 49; 442-446
- Bayer SR, Ransil BJ, Shelton S, Armant DR (1990) Spectrophotometric analysis of follicular fluid related to oocyte fertilization, embryo cleavage and follicular fluid protein and hormone concentrations. *Fertility and Sterility*. 54(4); 606-611
- Beecher CWW. (2003) The human metabolome, pp. 311-319. Harrigan GG and Goodacre R. *Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*. Kluwer Academic Publishers
- Bell JD, Brown JCC and Sadler PJ (1989) NMR studies of body fluids. *NMR in Biomedicine*. 2(5-6); 246-256
- Bender K, Walsh S, Evans AC, Feria de T, L Brennan (2010) Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction*. 139(6); 1047-1055
- Berisha B, Schams D (2005) Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*. 29; 305-317
- Berkowitz GS, Skovron ML, Lapinski RH, Berkowitz RL (1990) Delayed childbearing and the outcome of pregnancy. *The New England Journal of Medicine*. 322(10); 659-664
- Berridge MJ (1987) Inositol lipids and cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta- Reviews on Cancer*. 907; 33-45
- Bianco A, Stone J, Lynch L, Lapinski R, Berkowitz G, Berkowitz RL (1996) Pregnancy outcome at age 40 and older. *Obstetrics and Gynecology*. 87(6); 917-922
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP (1967) The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 58(2); 560-567

Billari FC, Liefbroer AC, Philipov D (2006) The postponement of childbearing in Europe: driving forces and implications. *Vienna Yearbook of Population Research*. 1-17

Bloch F, Hanson WW, Packard M (1946) Nuclear Induction. *Physical Review*. 69; 127

Bloch K (1965) The biological synthesis of cholesterol. *Science*. 150(3692); 19-28

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*. 22(6); 1506-1512

Bonilla-Musoles, Dolz, Moreno, Raga (2010) Inseminación Artificial, pp. 297-304. *Reproducción asistida: Abordaje en la práctica clínica*. Ed. Médica Panamericana

Brinton LA, Moghissi KS, Scoccia B, Westhoff CL, Lamb EJ (2005) Ovulation induction and cancer risk. *Fertility and Sterility*. 83; 261-274

Bristow RE, Karlan BY (1996) Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertility and Sterility*. 66; 499-507

Brook JD, Gosden RG, Chandley AC (1984) Maternal aging and aneuploid embryos; evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. *Human Genetics*. 66(1); 41-45

Cano F, Simon C, Remohi J, Pellicer A (1995) Effect of aging on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertility and Sterility*. 64(3); 584-589

Casanova B, Martinez-Bisbal MC, Valero C, Celda B, Martí-BonMatí L, Pascual A, Landete L, Coret F (2003) Evidence of Wallerian degeneration in normal appearing white matter in the early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis: a HRMS study. *Journal of Neurology*. 250(1); 22-28

Cavender JL, Murdoch WJ (1988) Morphological studies of the microcirculatory system of periovarian ovine follicles. *Biology of Reproduction*. 39; 989-997

Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M (2003) Involvement of enzymes of amino acids metabolism and Tricarboxilic acid in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*. 126; 753-763

Chang SCS, Jones JD, Ellefson RD and Ryan RJ (1976) The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biology of Reproduction*. 15(3); 321-328

Chang G, McNamara TK, Haimovici F, Hornstein MD (2006) Problem Drinking in Women Evaluated for Infertility. *American Journal on Addictions*. 15(2); 174-179

Chapin RE, Robbins WA, Schieve LA, Sweeney AM, Tabacova SA, Tomashek KM (2004) Off to a good start: the influence of pre- and periconceptional exposures, parental fertility, and nutrition on children's health. *Environmental Health Perspectives*. 112(1); 69-78

Chaudhuri JD (2000) An analysis of the teratogenic effects that could possibly be due to alcohol consumption by pregnant mothers. *Indian Journal of Medical Sciences*. 54(10); 425-431.

Chen L, Liu Q (2009) Natural cycle versus ovulation induction cycle in intrauterine insemination. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 15(12); 1112-1115

- Chiu TTY, Rogers MS, Law ELK, Briton-Jones CM, Cheung LP, Haines CJ (2002) Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. *Human Reproduction*. 17(6); 1591-1596
- Chong AP, Taymor ML, Lechene CP (1977) Electron probe microanalysis of the chemical elemental content of human follicular fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 128; 209-211
- Clark LJ, Irving-Rodgers HF, Dharmarajan AM, Rodgers RJ (2004) Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biology of Reproduction*. 71; 1071-1078
- Clarke HG, Hope SA, Byers S, Rodgers RJ (2006) Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction*. 132; 119-131
- Cnattingius S, Forman MR, Berendes HW, Isotalo L (1992) Delayed childbearing and risk of adverse perinatal outcome. A population based study. *Journal of the American Medical Association*. 268(7); 886-890
- Cnattingius S, Berendes HW, Forman MR (1993) Do delayed childbearers face increased risks of adverse pregnancy outcomes after the first birth? *Obstetrics and Gynecology*. 81(4); 512-516
- Coleman D (2007) The road to low fertility. *Ageing Horizons*. 7; 7-15
- Collier AC, Tingle MD, Paxton JW, Mitchell MD, Keelan JA (2002) Metabolizing enzyme localization and activities in the first trimester human placenta: the effect of maternal and gestational age, smoking and alcohol consumption. *Human Reproduction*. 17; 2564-2572
- Commission of the European Communities (2006) Commission communication. The demographic future of Europe—from challenge to opportunity
- Commission of the European Communities (2007) Commission staff working document. Europe's demographic future: facts and figures
- Conley A, Hinshelwood M (2001) Mammalian aromatases. *Reproduction*. 121(5); 685-695
- Cousineau TM, Domar AD (2007) Psychological impact of infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 21(2); 293-308
- Craciunescu CN, Albright CD, Mar MH, Song J, Zeisel SH (2003) Choline Availability During Embryonic Development Alters Progenitor Cell Mitosis in Developing Mouse Hippocampus. *Journal of Nutrition*. 133(11); 3614-3618
- Curtis KM, Savitz DA, Arbuckle TE (1997) Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *American Journal of Epidemiology*. 146; 32-41
- D'Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, Capiello F, Topo E, D'Aniello E, Ronsini S (2007) Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Human Reproduction*. 22; 3178-3183
- Day NL, Jasperse D, Richardson G, Robles N, Sambamoorthi U, Taylor P, Scher M, Stoffer D, Cornelius M (1989) Prenatal exposure to alcohol: effect on infant growth and morphologic characteristics. *Pediatrics*. 84; 536-541

De Almeida Ferreira Braga DP, de Cássia Savio Figueira R, Queiroz P, Madaschi C, Iaconelli A Jr, Borges E Jr (2010) Zona pellucida birefringence in in vivo and in vitro matured oocytes. *Fertility and Sterility*. 94(6); 2050-2053

De La Rochebrochard E, Thonneau P (2002) Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Human Reproduction*. 17(6); 1649-1656

De los Santos MJ, Cobo A, Ruiz A, Romero JL, Galán A, Pellicer A, Remohí J (2002) El nuevo laboratorio de fecundación in Vitro, una "cleanroom". *Reproducción Humana 2ª Edición*. Ed. Mc Graw Hill

Derome A, Williamson M (1990) 2D homonuclear shift correlation with double quantum filter phase sensitive using States-TPPI method water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients allowing for presaturation during relaxation delay in cases of radiation damping phasecycle. *Journal of Magnetic Resonance*. 88; 177-185

Devlin TM (2006) *Biochemistry:Textbook With Clinical Correlations*. Wiley-Liss: Hoboken, NJ

Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A (2007) Reproductive ageing in women. *The Journal of Pathology*. 211; 219-231

Downes CP (1989) The cellular function of myo-inositol. *Biochemical Society Transaction*. 17; 391-395

Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, Stamler J, Elliott P, Chan Q, Holmes E (2006) Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Analytical Chemistry*. 78; 2199-2208

Dunn WB, Baley NJC y Johnson HE (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*. 130(5); 606-625

Dunson DB, Baird DD, Colombo B (2004) Increased infertility with age in men and women. *The Obstetrics & Gynecology*. 103(1); 51-56

Edwards RG (1974) Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. 37(1); 189-219

Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R (2004) Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*. 8; 45-58

Endresen MJ, Haug E, Abyholm T, Henriken T (1990) The source of cholesterol for progesterone synthesis in cultured preovulatory human granulosa cells. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*. 123(3); 359-364

Erickson GF, Shimasaki S (2001) The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility*. 76(5); 943-949

Espey LL, Lipner H (1963) Measurements of intrafollicular pressures in the rabbit ovary. *American Journal of Physiology*. 205; 1067-1072

Espey LL (1980) Ovulation as an inflammatory reaction: a hypothesis. *Biology of Reproduction*. 22; 73-106

Esteve V, Celda B (2008) ABioS. A compact program for the analysis of NMR spectra in metabonomics. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 21; 484-484

Evers JLH (2002) Female subfertility. *Lancet*. 360(9327); 151-159

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF (1992) Accelerated disappearance of ovarian follicles in midlife: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*. 7(10); 1342-1346

Fall CH, Yajnik CS, Rao S, Davies AA, Brown N, Farrant HJ (2003) Micronutrients and fetal growth. *Journal of Nutrition*. 133(5 Suppl 2); 1747S-1756S

Fan WMT (1996) Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 28; 161-219

FASTER Consortium: Cleary-Goldman J, Malone FD, Vidaver J, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Saade GR, Eddleman KA, Klugman S, Dugoff L, Timor-Tritsch IE, Craigo SD, Carr SR, Wolfe HM, Bianchi DW, D'Alton M (2005) Impact of maternal age on obstetric outcome. *Obstetrics and Gynecology*. 105; 983-990

Fauser BC, Devroey P (2005) Why is the clinical acceptance of gonadotropin-releasing hormone antagonist cotreatment during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization so slow? *Fertility and Sterility*. 83(6); 1607-1611.

Fenichel P, Grimaldi M, Olivero JF, Donzeau M, Gillet JY, Harter M (1989) Predictive value of hormonal profiles before stimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 51(5); 845-849

Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L on behalf of the ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition (2011) ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction*. 26(7); 1616-1624

Fiehn O (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48; 155-171

Fisch B, Goldberg I, Ovadia J, Tadir Y (1990) Physicochemical properties of follicular fluid and their relation to in vitro fertilization outcome. *Journal on in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 7(2); 67-73

Fisch B, Harel L, Amit S, Kaplan-Kraicer R, Mor N, Tadir Y, Ovadia J, Merlob P (1996) Viscosity and refractive index of follicular fluid in relation to in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 13(6); 468-471

Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW (2001) Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neuroulating mouse embryos. *Teratology*. 64(2); 114-122

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY (2004) Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*. 82-83; 109-126

Gadea M, Martinez-Bisbal MC, Martí-BonMatí L, Espert R, Casanova B, Coret F, Celda B (2004) Spectroscopic axonal damage of the right locus coeruleus relates to selective attention impairment in early stage relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain*. 127; 89-98

- Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J (1996) Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility*. 65; 349-353.
- Gaulden ME (1992) Maternal age effect: the enigma of Down's syndrome and other trisomic conditions. *Mutation Research*. 296(1-2); 69-88
- Gérard N, Loiseau S, Duchamp G and Seguin F (2002) Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR). *Reproduction*. 124(2); 241-248
- Ghiafeh Davoodi F, Salsabili N, Sadeghipour Roodsari HR, Sattarian M (2005) Effects of Human follicular fluid and synthetic serum substitute of human embryonic development and cell cleavage. *Acta Medica Iranica*. 43(1); 1-6
- Gilbert WM, Nesbitt TS, Danielsen B (1999) Childbearing beyond age 40: pregnancy outcome in 24 032 cases. *Obstetrics and Gynecology*. 93(1); 9-14
- Givens CR, Markun LC, Ryan IP, Chenette PE, Herbert CM, Schriock ED (2009) Outcomes of natural cycles versus programmed cycles for 1677 frozen-thawed embryo transfers. *Reproductive Biomedicine Online*. 19(3); 380-384
- Goddard TD, Kneller DG. SPARKY 3. University of California, San Francisco
- Gomez E (1997) Acetoacetate and b-D-hydroxybutyrate as energy substrates during early bovine embryo development in vitro. *Theriogenology*. 48; 63-74
- Gonzales-Figueroa H, Gonzales-Molfino HM (2005) Maturation of pig oocytes in vitro in a medium with pyruvate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38(6); 869-872
- Gonzalez-Merlo J, Gonzalez Bosquet J, Gonzalez Bosquet E (2003) Esterilidad e Infertilidad, pp. 168-187. *Ginecología*. Ed. Masson
- Gosden RG, Telfer E (1987) Scaling of follicular size in mammalian ovaries. *Journal of Zoology (London)*. 211; 157-168
- Gosden RG, Hunter RH, Telfer E, Torrance C, Brown N (1988) Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. 82; 813-825
- Gosden RG, Sadler IH, Reed D and Hunter RH (1990) Characterization of ovarian follicular fluids of sheep, pigs and cows using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Experientia*. 46(10); 1012-1015
- Gougeon A. (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reproduction*. 1(2); 81-87
- Greenhall E, Vessey M (1990) The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertility and Sterility*. 54(6); 978-983.
- Grinsted J, Blendstrup K, Andreassen MP, Byskov AG (1980) Temperature measurements of rabbit antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60; 149-155

Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW (1994) Infertility in women and moderate alcohol use. *American Journal of Public Health*. 84(9); 1429-1432

Grupo Especializado de Resonancia Magnética Nuclear-Real Sociedad Española de Química (2006) Curso avanzado de Resonancia Magnética Nuclear

Gull I, Geva E, Lerner-Geva L, Lessing JB, Wolman I, Amit A (1999) Anaerobic glycolysis. The metabolism of the preovulatory human oocyte. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 85; 225-228

Gunter C, Frank M, Tian Y, Gopal Murti KG, Rehg JE, Jackowski S (2007) Probuco therapy overcomes the reproductive defect in CTP: phosphocholine cytidyltransferase $\beta 2$ knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1771; 845-852

Guyer B, Hoyert DL, Martin JA, Ventura SJ, MacDorman MF, Strobino DM (1999) Annual summary of vital statistics-1998. *Pediatrics*. 104; 1229-1246

Guyton AC, Hall JE (2011) Fisiología antes del embarazo y hormonas femeninas, pp. 1011-1025. *Tratado de fisiología médica* 12^{ed}. Elsevier

Guzmán López S, Guzmán López A (2003) Anatomía del aparato genital femenino, pp. 24-31. Cabero Roura L, Cabrillo Rodríguez E, Cabrillo Rodríguez EF, Abad L. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la reproducción*, tomo I. Editorial Médica Panamericana

Hakim RB, Gray RH, Zacur H (1998) Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility. *Fertility and Sterility*. 70(4); 632-637

Ham AW, Cormack DH (1985) Aparato reproductor femenino, pp. 942-957. *Tratado de histología*. Ed Interamericana

Hammadeh ME, Munz W, Meisinger M, Herrmann W, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W (2004) Effects of ovarian stimulation on serum concentrations of lipids and ketone bodies in patients undergoing IVF/ICSI treatment. *Zentralblatt für Gynäkologie*. 126(2); 67-72

Hansen JP (1986) Older maternal age and pregnancy outcome: a review of the literature. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 41(11); 726-742

Haslam DW, James WP (2005) Obesity. *Lancet*. 366(9492); 1197-1209

Hassold TJ, Jacobs PA (1984) Trisomy in man. *Annual Review of Genetics*. 18; 69-97.

Herrmann G, Spanel-Borowski K (1998) A sparsely vascularised zone in the cortex of the bovine ovary. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 27; 143-146

Homan GF, Davies M, Norman R (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Human Reproduction Update*. 13(3); 209-223

Hong JY, Yong HY, Lee BC, Hwang WS, Lim JM, Lee ES (2004) Effects of amino acids on maturation, fertilization and embryo development of pig follicular oocytes in two IVM media. *Theriogenology*. 62(8); 1473-82

Hoult DI (1976) Solvent peak saturation with single phase and quadrature Fourier transformation. *Journal of Magnetic Resonance* 21(2); 337

Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*. 15(6); 707-724

Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, Oehninger S (1999) Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 72; 707-712

Hunter AG, Moor RM (1987) Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *Journal of Dairy Science*. 70(8); 1646-1651

Hunter MG (2000) Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5(2); 122-130.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T (1986) Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 78(2); 615-625

Ibeh IN, Uraih N, Ogonar JI (1994) Dietary exposure to aflatoxin in human male infertility in Benin City, Nigeria. *International Journal of Fertility and Menopausal Studies*. 39; 208-214

Issaq HJ, Van Qn, Waybright Tj, Muschik GM, Veenstra TD (2009) Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *Journal of Separation Science*. 32; 2183-2199

Iyengar MR, Iyengar CW, Chen HY, Brinster RL, Bornslaeger E, Schultz RM (1983) Expression of creatine kinase isoenzyme during oogenesis and embryogenesis in the mouse. *Developmental Biology*. 96(1); 263-268

Jacobsson B, Ladfors L, Milsom I (2004) Advanced maternal age and adverse perinatal outcome. *Obstetrics and Gynecology*. 104(4); 727-733

Jenkins JM, Davies DW, Devonport H, Anthony FW, Gadd SC, Watson RH, Masson GM (1991) Comparison of poor responders with good responders using a standard buselerin/human menopausal gonadotrophins regime for in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. 6(7); 918-921

Jenkins J, Daya S, Kremer J, Balasch J, Barratt C, Cooke I, Lawford-Davies J, De Sutter P, Suikari AM, Neulen J, Nygren K (2004) European Classification of Infertility Taskforce (ECIT) response to Habbema et al., 'Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal'. *Human Reproduction*. 19; 1497-1501.

Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, Sato E (2002) Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell and Tissue Research*. 310; 93-101

Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E (2003) Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction*. 125; 211-223

Jin X, Xiao LJ, Zhang XS, Liu YX (2011) Apoptosis in ovary. *Frant Biosci (Schol Ed)*. 3; 680-697

Jordan KW, Cheng LL (2007) NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer. *Expert Review of Proteomics*. 4; 389-400

Johnson MT, Freeman EA, Gardner DK, Hunt PA (2007) Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. *Biology of Reproduction*. 77(1); 2-8

- Joseph KS, Allen AC, Dodds L, Turner LA, Scott H, Liston R (2005) The perinatal effects of delayed childbearing. *Obstetrics and Gynecology*. 105(6); 1410-1418
- Józwik M, Józwik M, Teng C, Battaglia FC (2006) Amino acid, ammonia and urea concentrations in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. *Human Reproduction*. 21(11); 2776-2782
- Kastrop PM, Bevers MM, Destrée OH, Kruij TA (1991) Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Molecular Reproduction and Development*. 29(3); 271-275
- Kalu E, Thum MY, Abdalla H (2007) Intrauterine insemination in natural cycle may give better results in older women. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 24(2-3); 83-86
- Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM (1997) Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulating. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 104(5); 521-527
- Keen CL, Clegg MS, Hanna LA, Lanoue L, Rogers JM, Daston GP, Oteiza P, Uriu-Adams JY (2003) The plausibility of micronutrient deficiencies being a significant contributing factor to the occurrence of pregnancy complications. *Journal of Nutrition*. 133(5 Suppl 2); 1597S-1605S
- Keun HC, Ebbels TM, Antti H, Bollard ME, Beckonert O, Schlotterbeck G, Senn H, Niederhauser U, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2002a) Analytical reproducibility in (1)H NMR-based metabolomic urinalysis. *Chemical Research in Toxicology*. 15; 1380-1386
- Keun HC, Beckonert O, Griffin JL, Richter C, Moskau D, Lindon JC, Nicholson JK (2002b) Cryogenic probe 13C NMR spectroscopy of urine for metabolomic studies. *Analytical Chemistry*. 74(17); 4588-4593
- Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss ML, Levin B (2007) Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Human Reproduction*; 22(4); 1175-1185
- Klonoff-Cohen H, Bleha J, Lam-Kruglick P (2002) A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Human Reproduction*. 17(7); 1746-1754
- Krisner RL (2004) The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*. 82 E-Suppl; E14-23
- Kruij TAM, Cran DG, van Beneden TH, Dieleman SJ (1983) Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research*; 8(1); 29-47
- Larsen U (2005) Research on infertility: which definition should we use? *Fertility and Sterility*. 83(4); 846-852
- Lasiene K, Aleksandras V, Angelija V, Lasys V (2009) Morphological criteria of oocyte quality. *Medocona (Kaunas)*. 45(7); 509-515
- Lee MS, Liu CH, Lee TH, Wu HM, Huang CC, Huang LS, Chen CM, Cheng EH (2010) Association of creatin kinase B and peroxiredoxin 2 expression with age and embryo quality in cumulus cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 27(11); 629-639
- Leese HJ, Hooper MA, Edwards RG, Ashwood-Smith MJ (1986) Uptake of pyruvate by early human embryos determined by a non-invasive technique. *Human Reproduction*. 1(3); 181-182

Leese HJ, Lenton EA (1990) Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Human Reproduction*. 5; 915-919

Leridon H (2004) Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Human Reproduction*. 19(7); 1548-1553

Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ and de Kruif A (2004a) Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 80(3-4); 201-211.

Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A (2004b) Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*. 62(6); 1131-1143

Lévesque JT, Sirard MA (1995) Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 42(1); 114-121

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, Capítulo II, artículo 5

Li J, Xu Y, Zhou G, Guo J, Xin N (2011) Natural cycle IVF/IVM may be more desirable for poor responder patients after failure of stimulated cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 28(9); 791-795

Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK (2004a) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers*. 9(1); 1-31

Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2004b) Toxicological applications of magnetic resonance. *Progress In Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 45(1-2); 109-143

Liu M, Mao X, He C, Huang H, Nicholson JK, Lindon JC (1998) 1D sequence water suppression using watergate W5 pulse sequence with gradients using double echo. *Journal of Magnetic Resonance*. 132; 125-129

Liu N, Wu YG, Lan GC, Sui HS, Ge L, Wang JZ, Liu Y, Qiao TW, Tan JH (2009) Pyruvate prevents aging of mouse oocytes. *Reproduction*. 138(2); 223-234

Longombe AO, Geelhoed GW (2000) Iodine deficiency disorders and infertility in northeast Zaire. *Nutrition*. 13; 342

Loy R, Heyer D, Williams CL, Meck WH (1991) Choline-induced spatial memory facilitation correlates with altered distribution and morphology of septal neurons. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 295; 373-382

Lucero J, Harlow BL, Barbieri RL, Sluss P, Cramer DW (2001) Early follicular phase hormone levels in relation to patterns of alcohol, tobacco, and coffee use. *Fertility and Sterility*. 76(4); 723-729

Lukassen HG, Kremer JA, Lindeman EJ, Braat DD and Wetzels AM (2003) A pilot study of the efficacy of intracytoplasmic sperm injection in a natural cycle. *Fertility and Sterility*. 79; 231-232

Lunenfeld B, Van Steirteghem A (2004) Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Human Reproduction Update*. 10(4); 317-326

- Lutjen P, Trouson A, Leeton J, Findlay J Wood C, Renous P (1984) The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature*. 307; 104-5
- Martinez-Bisbal MC, Celda B, Martí-BonMatí L, Ferrer P, Revert AJ, Piquer J, Mollá E, Arana E, Dosdá R (2002a) Contribution of magnetic resonance spectroscopy to the classification of high grade gliomas. The predictive value of macromolecules. *Revista de Neurología*. 34(4); 309-313
- Martinez-Bisbal MC, Celda B, Martí-BonMatí L, Casanova B, Coret F (2002b) Differences in the spectroscopy of the remitting relapsing form of multiple sclerosis shown by magnetic resonance. *Revista de Neurología*. 34(9); 807-812
- Martinez-Bisbal MC, Arana E, Martí-BonMatí L, Mollá E, Celda B (2004a) Cognitive impairment: classification by 1H magnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Neurology*. 11(3); 187-193
- Martinez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, Revert A, Ferrer P, Llacer JL, Piotto M, Assemat O, Celda B (2004b) 1H and 13C HR-MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo 1H MRS study of human high grade gliomas. *NMR in Biomedicine*. 17; 191-205
- Mattison DR, Plowchalk DR, Meadows MJ, Al-Juburi AZ, Gandy J, Malek A (1991) Reproductive toxicity: male and female Reproductive systems as targets for chemical injury. *Medical Clinics North America*. 74; 391-411
- MacDonald RC, MacDonald RI (1988) Membrane surface pressure can account for differential activities of membrane penetrating molecules. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(21); 10052-10055
- McDonald P. (2007) Low fertility and policy. *Ageing Horizons*. 7; 22-27
- Meck WH, Williams CL (2003) Metabolic imprinting of choline by its availability during gestation: implications for memory and attentional processing across the lifespan. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 27(4); 385-399
- Mellott TJ, Williams CL, Meck WH, Blusztajn JK (2004) Prenatal choline supplementation advances hippocampal development and enhances MAPK and CREB activation *The FASEB Journal*. 18(3); 545-547
- Menken J, Trusell J, Larsen U (1986) Age and Infertility. *Science*. 233(4771); 1389-1394
- Merton S (2002) Morphological evaluation of embryos in domestic species. pp. 33–55. Van Soom A, M Boerjan M (Eds.), *Assessment of Mammalian Embryo Quality, Invasive and Non-invasive Techniques*. Kluwer academic Publishers.
- Morán C, Hernández E, Ruíz JE, Fonseca ME, Bermúdez JA, Zárate A (1999) Upper body obesity and hyperinsulinemia are associated with anovulation. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 47(1); 1-5
- Morgan SP, Taylor MG (2006) Low Fertility at the turn of the Twenty-First Century. *Annual Review of Sociology*. 32; 375-399
- Mountford CE, Doran S, Lean CL, Russell P (2004) Proton MRS can determine the pathology of human cancers with a high level of accuracy. *Chemical Reviews*. 104; 3677-3704

- Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Tanaka A, Saito M, Jin CH, Musaka C, Okabe T, Nomura M, Goto K, Nawata H (2001) Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology*. 142(8); 3590-3597
- Mustafa NR, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R (2009) Metabolic changes of salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolomics. *Biotechnology Letters*. 31(12); 1967-1974
- Nachtigall RD (2006) International disparities in acces to infertility services. *Fertility and Sterility*. 85(4); 871-875
- Nagy ZP, Jones-Colon S, Roos P, Botros L, Greco E, Dasig J, Behr B (2009) Metabolomic assessment of oocyte viability. *Reproductive Biomedicine Online*. 18(2); 219-225
- Nandi S, Girish Kumar V, Manjunatha BM, Gupta (2007) Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicular size. *Development, Growth and Differentiation*. 49; 61-66
- Nargund G, Waterstone J, Bland J, Philips Z, Parsons J, Campbell S (2001) Cumulative conception and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles. *Human Reproduction*. 16; 259-262
- Naumoff PA, Stevenson PM (1985) Creatine kinase, steroidogenesis and the developing ovarian follicle. *International Journal of Biochemistry*. 17(12); 1363-1367
- Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*. 337(8754); 1375-1377
- Nehlig A (2004) Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70(3); 265-275
- Nelson SM, Fleming RF (2007) The preconceptional contraception paradigm: obesity and infertility. *Human Reproduction*. 22(4); 912-915
- Newcomb WW, Rodriguez M, Johnson JW (1991) Reproduction in the older gravida. A literature review. *Journal of Reproductive Medicine*. 36; 839-845
- Nicholson JK, Foxall PJD, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC (1995) 750 Mhz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood-plasma. *Analytical Chemistry*. 67; 793-811.
- Norman RJ, Clark AM (1998) Obesity and reproductive disorders: a review. *Reproduction, Fertility and Development*. 10(1); 55-63
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M (2000) Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *British Medical Journal*. 320; 1708-1712
- Nybo Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG (2004) Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 19(3); 490-503
- Nygren KG, Nyboe Andersen A (2001a) Assisted reproductive technology in Europe, 1997. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 16(2); 384-391
- Nygren KG, Nyboe Andersen A (2001b) Assisted reproductive technology in Europe, 1998. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 16(11); 2459-2471

- Nygren KG, Nyboe Andersen A (2002) Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. 17(12); 3260-3274
- O'Herlihy C, Crespigny LC, Lopata A, Johnston I, Houtt I, Robinson H (1980) Preovulatory follicular size: A comparison of ultrasound and laparoscopic measurements. *Fertility and Sterility*. 34; 24-26
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB and Baganz F (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*. 16(9); 373-378
- Orsi NM, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM, Harris SE (2005) Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction*. 129(2); 219-228
- Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, Lane M (2012) Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertility and Sterility*. 98(4); 986-994
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 340(8810); 17-18
- Pelinc MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ (2002) Efficacy of natural cycle IVF: a review of the literature. *Human Reproduction Update*. 8(2); 129-139
- Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohi J, Simon C (1996) Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertility and Sterility*. 65(6); 1190-1195
- Piñero-Sagredo E, Nunes S, de los Santos MJ, Celda B, Esteve V (2010) NMR metabolic profile of human follicular fluid. *NMR in Biomedicine*. 23; 485-495
- Piotto M, Saudek V, Sklenár V (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR*. 2(6); 661-665
- Preis KA, Seidel G Jr, Gardner DK (2005) Metabolic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes. *Reproduction*. 130(4); 475-483
- Pritchard JA, MacDonald PC, Gant NF (1987) Anatomía del aparato reproductor femenino, pp. 7-28. Cunningham FG. *Williams Obstetricia 3ª edición*. Salvat Editores S.A
- Proctor WG, Yu FC (1950) The dependence of nuclear magnetic resonance. frequency upon chemical shift. *Physical Review*. 70; 717
- Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B, Young N, Xia J, Knox C, Dong E, Huang P, Hollander Z, Pedersen TL, Smith SR, Bamforth F, Greiner R, McManus B, Newman JW, Goodfriend T, Wishart DS (2011) The Human Serum Metabolome. *PLoS ONE*. 6(2); e16957
- Purcell EM, Torrey HC, Pound RV (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical Review*. 69; 37-38
- Quigley MM, Wolf DP, Maklad NF, Dandekar PV, Sokoloski JE (1982) Follicular size and number in human in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 38; 678-681
- Rabiee AR, Lean JJ, Gooden JM, Miller BG (1997a) Short-term studies of ovarian metabolism in the ewe. *Animal Reproduction Science*. 47; 43-58

- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ (1997b) An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous differences methods in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*. 48; 9-25
- Randall CL (1987) Alcohol as a teratogen: a decade of research in review. *Alcohol and Alcoholism Supplement*. 1; 125-132
- Renaville B, Comin A, Fazzini U, Marchini E, Maiero S, Marchi V, Prandi A (2007) Estrogen to progesterone ratio affects hormonal and lipid follicular fluid profiles in dairy cows. *Reproductive Medicine and Biology*. 6; 45-51
- Renaville B, Bacciu N, Comin A, Motta M, Poli I, Vanini G, Prandi A (2010) Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(1); 118-121
- Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosch E, Pellicer A (2008) *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. Mgh Interamericana De España
- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and endocrinology*. 7(40); 1-13
- Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F (2011) Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literatura. *Human reproduction Update*. 17(1); 34-45
- Robker RL, Akism LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, Lane M, Norman RJ (2009) Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 94; 1533-1540
- Rondell P (1964) Follicular pressure and distensibility in ovulation. *Journal of Physiology*. 207; 590-594
- Roth LK, Taylor HS (2001) Risks of smoking to reproductive health: assessment of women's knowledge. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 184(5); 934-939.
- Sakkas D, Gardner DK (2005) Non-invasive methods to assess embryo quality. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 17; 283-288
- Salihu HM, Shumpert MN, Slay M, Kirby RS, Alexander GR (2003) Childbearing beyond maternal age 50 and fetal outcomes in the United States. *Obstetrics and Gynecology*. 102; 1006-1014
- Schwartz D, Mayaux MJ (1982) Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS. The New England Journal of Medicine*. 306; 404-406
- Sciarra J (1994) Sexually transmitted diseases: global importance. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 58; 107-109
- Scott RT, Hofmann GE, Muasher SJ, Acosta AA, Kreiner DK, Rosenwaks Zn (1989) Correlation of follicular diameter with oocyte recovery and maturity at the time of transvaginal follicular aspiration. *Journal on in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. 6; 73-75
- Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH (2007) Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with

reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 88(5); 1350-1357

Serafini P, Stone B, Kerin J, Batzofin J, Quinn P, Marrs RP (1988) An alternative approach to controlled ovarian hyperstimulating in poor responders: pretreatment with a donadotrophin-releasing hormone analog. *Fertility and Sterility*. 49(1); 90-95

Shahara F (1998) Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and Sterility*. 70(4); 613-622

Shalgi R, Kraicer PF, Soferman N (1972) Gases and electrolytes of human follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. 28; 335-340

Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Selvin S, Schaffer DM (2004) Periconceptional Dietary Intake of Choline and Betaine and Neural Tube Defect in offspring. *American Journal of Epidemiology*. 160(2); 102-109

Sherman SL, Freeman SB, Allen EG, Lamb NE (2005) Risk factors for non-disjunction of trisomy 21. *Cytogenetic and Genome Research*. 111(3-4); 273-280

Shiloh H, Lahav-Baratz S, Koifman M, Ishai D, Bidder D, Weiner-Meganzi Z, Dirnfeld M (2004) The impact of cigarette smoking on zona pellucid thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Human Reproduction*. 19(1); 157-159

Shufaro Y, Lebovich M, Aizenman E, Miller C, Simon A, Laufer N, Saada A (2012) Human granulosa luteal cell oxidative phosphorylation function is not affected by age or ovarian response. *Fertility and Sterility*. 98(1); 166-172.

Simon C, Cano F, Valbuena D, Remohi J, Pellicer A (1995) Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Human Reproduction*. 10(9); 2432-2437

Simonetti S, Veeck LL, Jones HW Jr (1985) Correlation of follicular fluid volume with oocyte morphology from follicles stimulated by human menopausal gonadotropin. *Fertility and Sterility*. 44; 177-180

Singh R, Sinclair KD (2007) Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology*. 68 (1);S56-62

Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL (1989) Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 40(6); 1257-1263

Sitter B, Sonnenwald U, Spraul M, Föjnsne HM, Gribbestad I (2002) High-resolution magic angle spinning MRS of breast cancer tissue. *NMR in Biomedicine*. 15; 327-337.

Soares SR, Rubio C, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A (2003) High frequency of chromosomal abnormalities in embryos obtained from oocyte donation cycles. *Fertility and Sterility*. 80; 656-657

Speroff L (1994) The effect of aging on fertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 6(2); 115-120

Spira A (1988) The decline of fecundity with age. *Maturitas*. Suppl 1; 15-22

Stephoe PC and Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 2(8085); 366

Stryer L (1995) *Biochemistry*, 4th edn. WH Freeman and Company

Sturmeijer R, Leese H (2003) Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction*. 126; 197-204

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG (2003) Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*. 9(1); 35-48

Te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BCJM (1998) Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145; 67-73

Testa MR (2007) Childbearing preferences and family issues in Europe: evidence from the Eurobarometer 2006 survey. *Vienna Yearbook of Population Research*. 357-379

The ESHRE Capri Workshop (1996) European Society for Human Reproduction and Embryology. Infertility revisited: The state of the art today and tomorrow. *Human Reproduction*. 11; 1779-1807

The ESHRE Capri Workshop Group: Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B (2005) Fertility and ageing. *Human Reproduction Update*. 11(3); 261-276

The ESHRE Capri Workshop Group: Aboulghar M, Baird DT, Collins J, Evers JL, Fauser BC, Lambalk CB, Somigliana E, Sunde A, Crosignani PG, Devroey P, Diczfalusy E, Diedrich K, Fraser L, Geraedts JP, Gianaroli L, Glasier A, Van Steirteghem A, Veiga A, Collins J, Crosignani PG (2009) Intrauterine insemination. *Human reproduction Update*. 15(3); 265-277

The ESHRE Capri Workshop Group: Collins J, Evers JL, Leridon H, Lutz W, te Velde E, Thevenon O, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Geraedts JP, Gianaroli L, Glasier A, Sunde A, Tarlatzis B, Van Steirteghem A, Veiga A, Collins J, Crosignani PG. (2010) Europe continent with the lowest fertility. *Human Reproduction Update*. 16(6); 590-602

Toner JP, Brzyski RG, Oehninger S, Veeck LL, Simonetti S, Muasher SJ (1990) Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on IVF outcome. *Human Reproduction*. 6(2); 284-289

Trokoudes KM, Minbattiwalla MB, Kalogirou L, Pantelides K, Mitsingas P, Sokratous A, Chrysanthou A, Fasouliotis SJ (2005) Controlled natural cycle IVF with antagonist use and blastocyst transfer. *Reproductive Biomedicine Online*. 11; 685-689

Trounson A, Leeton J, Besako M, Wood C, Conti M (1983) Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilized in vitro. *British Medical Journal*. 286; 835-8

Tsafirri A (1988) Local nonsteroidal regulators of ovarian function. *The Physiology of Reproduction*, pp. 527-565. Eds E Knobil and JD Neill

Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, Livny M, Mading S, Maziuk D, Miller Z, Nakatani E, Schulte CF, Tolmie DE, Wenger RK, Yao H, Markley JL. (2008) *Nucleic Acids Research* 36; D402-D408

Valckx SD, De Pauw I, De Neubourg D, Inion I, Berth M, Fransen E, Bols PE, Leroy JL (2012) BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Human Reproduction*. 27(12); 3531-3539

Van QN, Chmurny GN, Veenstra TD (2003) The depletion of protein signals in metabonomics analysis with the WET-CPMG pulse sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 301(4); 952-959

Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, Habbema JD, Hompes PG, Burggraaff JM, Oosterhuis GJ, Bossuyt PM, van der Veen F, Mol BW (2008) Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Human Reproduction*. 23(2); 324-328

Van Wezel IL, Rodgers RJ (1996) Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biology of Reproduction*. 55; 1003-1011

Van Winkle LJ, Mann DF, Wasserlauf HG, Patel M (1992) Mediated Na(+)- independent transport of glutamate and cystine in 1- and 2-cell mouse conceptuses. *Biochimica et Biophysica acta-Biomembranes*. 1107; 299-304

Vanholder T, Leroy JL, Van Soom AV, Opsomer G, Maes D, Coryn M, de Kruif A (2005) Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells steroidogenesis and proliferation in vitro. *Animal Reproduction Science*. 87(1-2); 33-44

Vanholder T, Leroy JL, Van Soom A, Coryn M, de Kruif A, Opsomer G (2006) Effects of beta-OH butyrate on bovine granulosa and theca cell function in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(1); 39-40

Veech RL (2004) The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 70(3); 309-319

Velazquez A, Reyes A, Chargoy J, Rosado A (1977) Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertility and Sterility*. 28; 96-100

Ventura SJ, Taffel SM, Mosher WD (1988) Estimates of pregnancies and pregnancy rates for the United States, 1976-85. *American Journal of Public Health*. 78; 506-511

Verberg MFG, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ, Fauser BCJM (2009) Mild ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update*. 15(1); 13-29

Vermesh M, KJletzy OA (1987) Longitudinal evaluation of the luteal phase and its transition into the follicular phase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 65(4); 653-658

Vion-Dury J, Nicoli F, Torri G, Torri J, Kriat M, Sciaky M, Davin A, Viout P, Confort-Goumy S and Cozzone PJ (1992) High resolution NMR spectroscopy of physiological fluids: from metabolism to physiology. *Biochimie*. 74(9-10); 801-80

Von Wald TV, Monisova Y, Hacker MR, Yoo SW, Penzias AS, Reindollar RR, Usheva A (2010) Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertility and Sterility*. 93; 2354-2361

Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, Brennan L (2012) An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertility and Sterility*. 97(5); 1078-1084

Wang Q, Sun QY (2007) Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development*. 19(1); 1-12.

Wevers R, Engelke U, Heerschap A (1994) High-resolution ¹H NMR spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. *Clinical Chemistry*. 40(7); 1245–1250

Wilcox A, Weinberg C, Baird D (1988) Caffeinated beverages and decreased fertility. *Lancet*. 2(8626-8627); 1453-1456

Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*. 35(Database issue); D521-526

Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, Hau DD, Psychogios N, Dong E, Bouatra S, Mandal R, Sinelnikov I, Xia J, Jia L, Cruz JA, Lim E, Sobsey CA, Shrivastava S, Huang P, Liu P, Fang L, Peng J, Fradette R, Cheng D, Tzur D, Clements M, Lewis A, De Souza A, Zuniga A, Dawe M, Xiong Y, Clive D, Greiner R, Nazyrova A, Shaykhtudinov R, Li L, Vogel HJ, Forsythe I (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*. 37(Database issue); D603-610

Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Mandal R, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorn Dahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A (2013) HMDB 3.0: the Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*. 41(D1); D801-807

World Health Organization (1991) Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Geneva Programme on maternal and child health and family planning. Division of family health. Geneva: World Health Organization

World Health Organization (1993) Guidelines for gamete donation. *Fertility and Sterility*. 59; 5s-9s

World Health Organization (2001) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. Geneva:WHO

Younglai EV, Holloway AC, Foster WG (2005) Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Human Reproduction Update*. 11(1); 43-57

Zachariae F (1958a) Studies on the mechanism of ovulation: Permeability of the blood-liquor barrier. *Acta Endocrinologica*. 27; 339-342

Zachariae F, Jensen CE (1958b) Studies on the mechanism of ovulation: Histochemical and physico-chemical investigations on genuine follicular fluid. *Acta Endocrinologica*. 27; 343-355

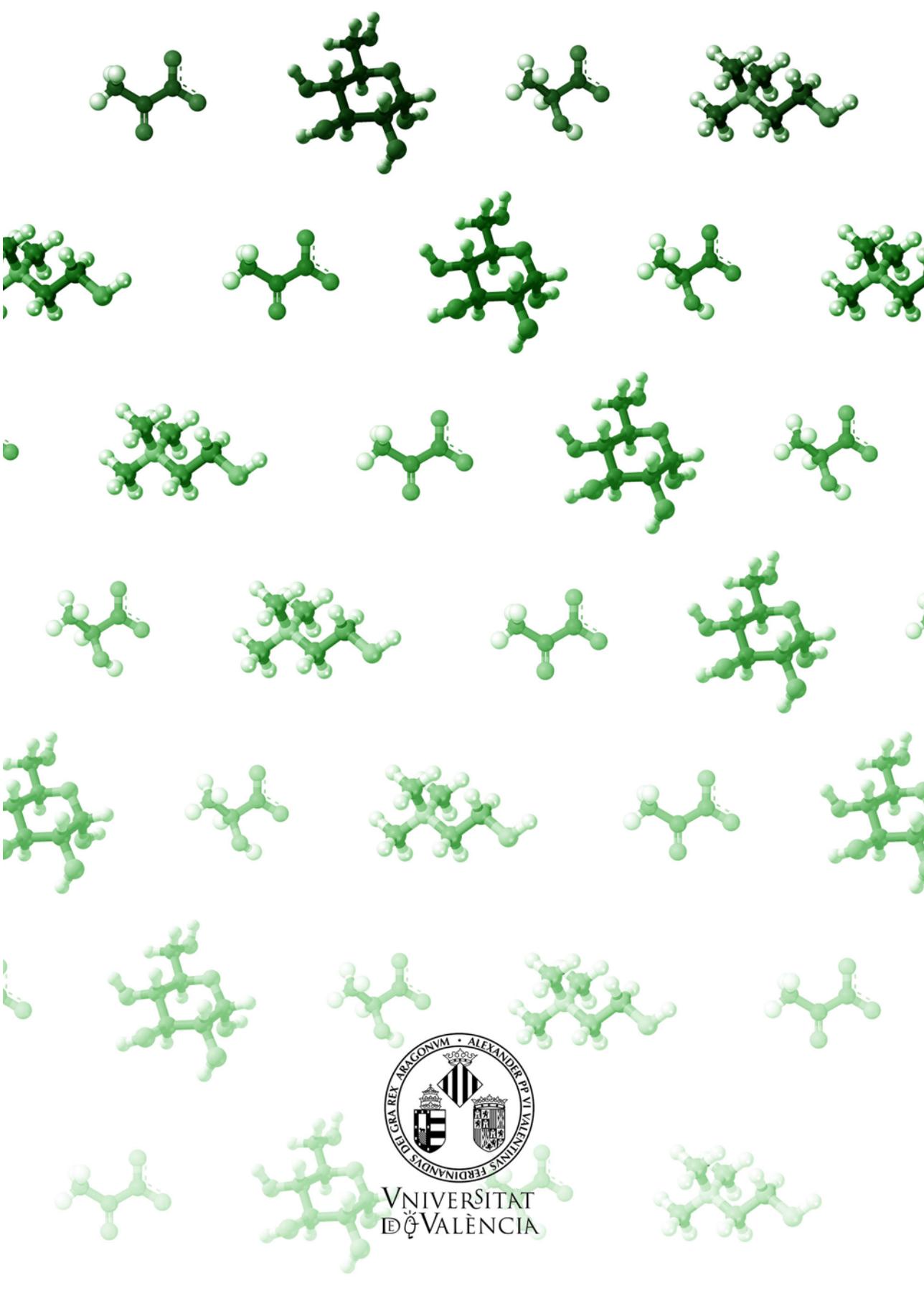
Zeisel SH, Blusztajn JK (1994) Choline and human Nutrition. *Annual Review of Nutrition*. 14; 269-296

Zenzes MT, Reed TE, Wang P, Klein J (1996) Cotinine, a major metabolite of nicotine, is detectable in follicular fluid of passive smokers in in vitro fertilization therapy. *Fertility and Sterility*. 66(4); 614-619

Zheng P (2007) Effects of in vitro maturation of monkey oocytes on their developmental capacity. *Animal Reproduction Science*. 98; 56-71

Zhou H, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Fujii Y, Ohno S (2007) Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood follicle barrier formation of mice revealed by 'in vivo cryotechnique'. *Reproduction*. 134; 307–317

Ziebe S, Devroey P on behalf of the State of the ART 2007 Workshop Group (2008) Assisted reproductive technologies are an integrated part of national strategies addressing demographic and reproductive challenges. *Human Reproduction Update*. 14(6); 583-59



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA