



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado 3102 en Biomedicina y Biotecnología. Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Valencia.

**“Análisis molecular de la valoración del  
intervalo de tiempo óptimo entre la  
administración de acetato de triptorelina y la  
punción folicular en los tratamientos de FIV”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

D. <sup>a</sup> Ana García Belda

Dirigida por:

Dr. D. César Díaz García

Dra. D. <sup>a</sup> Sonia Herraiz Raya

Valencia, agosto de 2022





Dr. D. César Díaz García, Doctor en Medicina, *Honorary Associate Professor at  
Institute for Woman's Health, University College London.*

CERTIFICO

Que D. <sup>a</sup> Ana García Belda ha realizado bajo mi dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "Análisis molecular de la valoración del intervalo de tiempo óptimo entre la administración de acetato de triptorelina y la punción folicular en los tratamientos de FIV"

Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 15 de agosto de 2022.

Firmado: Dr. D. César Díaz García





Dra. D. <sup>a</sup> Sonia Herraiz Raya, Doctora en Biología, Investigadora principal del área de Rejuvenecimiento ovárico y Preservación de la fertilidad en Fundación IVI y miembro del grupo de Investigación en Medicina Reproductiva del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

#### CERTIFICO

Que D. <sup>a</sup> Ana García Belda ha realizado bajo mi dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada "Análisis molecular de la valoración del intervalo de tiempo óptimo entre la administración de acetato de triptorelina y la punción folicular en los tratamientos de FIV"

Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 15 de agosto de 2022.

Fdo. Dra. D. <sup>a</sup> Sonia Herraiz Raya





Yo, D. <sup>a</sup> Ana García Belda, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación realizado bajo la dirección del Dr. D. César Díaz García, Doctor en Medicina y *Honorary Associate Professor Institute for Woman's Health, UCL*; y la Dra. D. <sup>a</sup> Sonia Herraiz Raya, Doctora en Biología, Investigadora principal del área de Rejuvenecimiento ovárico y Preservación de la fertilidad en Fundación IVI y miembro del grupo de Investigación en Medicina Reproductiva del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia a 15 de agosto de 2022,

Firmado: D. <sup>a</sup> Ana García Belda





## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría pensar que soy alguien agradecida y que todas las personas que citaré a continuación ya saben que son importantes en mi vida personal y/o profesional. No pienso, estoy segura, que soy muy afortunada por haberos encontrado o tenido a mi lado a todos en este largo viaje.

A mis chicas IVI, porque fue muy bonito conocer a otras personas que no sabían muy bien donde se metían, pero no querían hacer otra cosa en la vida que ser embriólogas. A Ali, por estar siempre en la salud y en la enfermedad, en la riqueza y la pobreza, hasta que la muerte nos separe.

A Irene y Carli por estar conmigo en cada pasito y dejarme volar, pero no soltarme nunca de la mano. A Juanma por ser el más brillante compañero y mejor amigo. A todos en la Unidad de Reproducción del Hospital General de Valencia por hacerme sentir como en casa y por enseñarme que ciencia y diversión siempre van de la mano.

A Alicia por permitirme ser coinvestigadora del estudio que ha dado lugar a esta tesis doctoral. A César por creer en mí, entender mis cataclismos y enseñarme que hay que trabajar sin descanso para conseguir las cosas salgan. A Sonia, por toda la ciencia que me has enseñado y todas las sonrisas y buenos momentos que me has regalado dentro y fuera del laboratorio. A Anna por enseñarme con tanto cariño y paciencia y a Mariajo por contestar todos mis e-mails absurdos (y no bloquearme), sin vosotros no habría tesis. A todo el personal de la URHA del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia por su apoyo con "las del Timing". A todas las pacientes del estudio por compartir todos sus desconsuelos, pero también sus alegrías para que pudiera ver que todo lo sufrido al final valía la pena.

A mis embriolocos por ser cada uno único y dejarme formar parte de ese gran cerebro comunitario dentro de una gran "cabeza". A Onica por aparecer en los peores momentos y ser capaz de transmitirme su paz. A todos los de reproducción del Hospital Universitario La Paz de Madrid por hacer que adore ir a trabajar cada día.

A mi madre y mis hermanas porque me conocen como nadie y me dejan navegar en mis propias aguas, pero siempre que las necesito aparecen y me salvan de todos mis naufragios. A mi padre, mente inquieta que tal y como reflexionó Mahatma Gandhi en su frase "Vive como si fueras a morir mañana; aprende como si el mundo fuera a durar para siempre"; me transmitió las ganas de atreverme con nuevos retos y disfrutar aprendiendo al máximo de ellos.

A Alber por darme cada año los mejores otoños, por estar siempre dispuesto a vivir todas las aventuras conmigo y por ser un padre maravilloso. A mi pequeño Teo por ser único y darle sentido a todo.

A todos vosotros, gracias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	I
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	III
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
ABREVIATURAS .....	IX
RESUMEN .....	XIII
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Inducción de la ovulación y fármacos inductores.....	4
1.2. Inducción de la Ovulación con GnRHa .....	6
1.2.1 Dosis y tipo de GnRHa para inducir la ovulación .....	8
1.3. Características de la Inducción de la ovulación con GnRHa vs hCG .....	10
1.3.1. Perfiles endocrinológicos.....	10
1.4 Resultados clínicos en los protocolos de estimulación ovárica con GnRHa .	12
1.5. Efecto del intervalo de tiempo entre la inducción de la ovulación y la recuperación ovocitaria .....	15
1.6. Cascada de mediadores de la ovulación.....	16
1.7. Genes y líquidos foliculares como marcadores predictivos de competencia ovocitaria en RHA.....	25
1.7.1 Células de la granulosa.....	25
1.7.2. Líquido folicular.....	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
2.1. Hipótesis .....	31
2.2. Objetivos.....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	35

3.1	Diseño del estudio.....	35
3.1.1.	Tipo/diseño del ensayo.....	35
3.1.2.	Variables de respuesta.....	36
3.2.	Selección de sujetos.....	37
3.2.2.	Criterios de inclusión.....	37
3.2.3.	Criterios de exclusión.....	38
3.2.4.	Criterios de retirada de sujetos.....	38
3.3.	Tratamiento del paciente.....	39
3.4.	Procedimientos del estudio.....	40
3.4.1.	Selección de pacientes.....	41
3.4.2.	Asignación de las pacientes a los grupos de estudio.....	41
3.4.3.	Periodo del estudio.....	41
3.5.	Recuperación del líquido folicular y células de la granulosa.....	45
3.6.	Selección de los genes a analizar en las células de la granulosa.....	48
3.7.	PCR cuantitativa a tiempo real.....	48
3.7.1.	Extracción y purificación del mRNA de las CG.....	49
3.7.2.	Síntesis del ADNc.....	50
3.7.3.	Preparación de las muestras: elaboración de los grupos de análisis...	51
3.7.4.	RT-qPCR.....	53
3.7.5.	Expresión génica diferencial.....	54
3.8.	ELISA en LF.....	55
3.9.	Análisis estadístico.....	57
4.	RESULTADOS.....	61
4.1	Características de las pacientes.....	61
4.2.	Niveles hormonales séricos.....	64
4.3.	Tratamientos de FIV.....	67
4.4.	Análisis de las células de la granulosa.....	69

4.4.1. Número de muestras .....	69
4.4.2. Análisis de la expresión génica .....	70
4.5. Análisis del líquido folicular.....	72
5. DISCUSIÓN .....	77
6. CONCLUSIONES .....	93
7. APÉNDICE DOCUMENTAL.....	97
7.1 Dictamen del CEIC .....	97
8. BIBLIOGRAFÍA.....	103









## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Lugar de acción de los diferentes inductores de la maduración ovocitaria durante los tratamientos de FIV .....	5
Ilustración 2 Concentraciones plasmáticas de inductores de la ovulación .....	7
Ilustración 3. Concentraciones séricas hormonales durante la ovulación .....	11
Ilustración 4. Desarrollo del folículo y detalle de los diferentes componentes de un folículo maduro o terciario. ....	17
Ilustración 5. Cascada de mediadores en la fase folicular y la ovulación .....	24
Ilustración 6. Diagrama del diseño del ensayo clínico .....	36
Ilustración 7. Procesamiento y almacenamiento del LF y CG .....	47
Ilustración 8. Esquema de RT-qPCR cuantitativa a tiempo real.....	48
Ilustración 9. Flujo de trabajo del ensayo clínico.....	62
Ilustración 10. Concentraciones plasmáticas medias $\pm$ DS de LH.....	66
Ilustración 11. Concentraciones plasmáticas medias $\pm$ DS de P <sub>4</sub> .. ....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción para RT-PCR.....	50
Tabla 2. Leyenda de códigos de las agrupaciones de muestras.....	52
Tabla 3. Referencias de las sondas utilizadas en la RT-qPCR.....	53
Tabla 4. Referencias de los kits empleados y las diluciones realizadas para el ensayo... 56	
Tabla 5. LOD y variaciones intra e interensayo de cada uno de los ensayos de ELISA realizados. ....	57
Tabla 6. Características de las pacientes.....	64
Tabla 7. Concentraciones plasmáticas de E <sub>2</sub> , LH y P <sub>4</sub> para cada intervalo ensayado monitorizadas a diferentes tiempos durante el periodo de estudio. ....	65
Tabla 8. Resultados reproductivos tras los tratamientos de FIV.....	68
Tabla 9. Relación entre tamaño folicular y calidad embrionaria. ....	69
Tabla 10. Número final de muestras por cada subgrupo de análisis. ....	70
Tabla 11. Resultados de fc corregido de los genes incluidos en el estudio para las agrupaciones de muestras en las que se hallaron ovocitos inmaduros.....	71
Tabla 12. Resultados de fc corregido de los genes incluidos en el estudio para cada una de las agrupaciones de muestras en las que se hallaron ovocitos maduros.....	71
Tabla 13. Niveles medios $\pm$ DS de los distintos factores solubles analizados en el LF....	73

## ABREVIATURAS

**ADAMTS** del inglés *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif*, proteína ADAM con motivos de trombospondina tipo 1

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**ADNc** ADN complementario

**AME** administración de la medicación en estudio

**AMH** del inglés anti-Müllerian hormone, hormona antimülleriana

**AMPc** adenosinmonofosfato cíclico

**AREG** ampiregulina

**ARN** ácido ribonucleico

**ARNm** ARN mensajero

**ARNt** ARN total

**BTC** betacelulina

**CC** células del cúmulo

**CEIC** comité ético de investigación clínica

**CG** células de la granulosa

**CM** células murales

**COC** del inglés *cumulus oocyte complex*, complejos cúmulo-ovocitarios

**CP** corpúsculo polar

**CREB** del inglés *cAMP response element-binding*, proteína de unión a AMPc

**Ct** del inglés *cycle treshold*, umbral de ciclo

**CV** coeficiente de variación

<sup>1</sup>**CYP19A1** gen que codifica la enzima citocromo P450 familia 19 subfamilia A miembro 1, aromatasa

**D** día

---

<sup>1</sup> La nomenclatura de los genes en este manuscrito ha sido asignada de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Genes de HUGO (*HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute. 2022*) y las directrices de MGI para la nomenclatura de genes, marcadores genéticos, alelos y mutaciones en ratón y rata (Benavides & Guénet, 2014). Por ejemplo, *CYP19A1* y *Cyp19a1* son los genes ortólogos humano y murino respectivamente. El producto proteico de ambos se designa como CYP19A1.

**DS** desviación estándar

**E<sub>2</sub>** estradiol

**EFNB2** gen que codifica la proteína efrina-B2

**EGF** del inglés *epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidérmico

**EGF-R** receptor de EGF

**ELISA** acrónimo del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*, enzimoimmunoanálisis de adsorción

**EOC** estimulación ovárica controlada

**Eph-R** del inglés *erythropoietin-producing human hepatocellular receptors*, receptores hepatocelulares humanos productores de eritropoyetina

**EREG** epiregulina

**ERK** del inglés *extracellular signal-regulated kinases*, quinasas reguladas por señal extracelular

**ESHRE** por sus siglas en inglés, European Society of Human Reproduction and Embryology, Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología

**F** folículos

**fc** del inglés *fold change*, valor de cambio.

**FIV** fecundación *in vitro*

**FL** fase lútea

**FSH** hormona foliculoestimulante

**FSH-R** receptor de FSH

**g** fuerza centrífuga relativa

**GDP** guanosín difosfato

**GMPC** guanosín monofosfato cíclico

**GnRH<sub>a</sub>** agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina

**GnRH<sub>ant</sub>** antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina

**GPCR** del inglés *G-protein coupled receptors*, receptores acoplados a proteínas G

**GTP** guanosín trifosfato

**h** horas

**HA** ácido hialurónico

**hCG** del inglés *human chorionic gonadotropin*, hormona gonadotropina coriónica humana

**IC** intervalo confianza

**ICSI** del inglés *intracytoplasmic sperm injection*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides

**IMC** índice de masa corporal

**IQR** del inglés *interquartile range*, rango intercuartílico

**KO** del inglés *knock-out*, modelo modificado genéticamente para presentar un bloqueo en uno o más de sus genes.

**L** litro

**LF** líquido folicular

**LH** del inglés *luteinizing hormone*, hormona luteinizante

**LH-R** receptor para LH y hCG

**LOD** del inglés *limit of detection*, límite de detección

**mg** miligramos

**MI** metafase I

**MII** metafase II

**mL** mililitro

**mm** milímetro

**MPF** del inglés *maturarion promoting factor*, factor promotor de maduración

**µg** microgramo

**NPPC** del inglés *natriuretic peptide precursor C*, precursor de péptido natriurético tipo C

**NPR2** receptor de NPPC

**Nrg** neuregulina

**OD** F >16 mm procedentes del ovario derecho

**Od** F <16 mm procedentes del ovario derecho

**OI** F >16 mm procedentes del ovario izquierdo

**Oi** F <16 mm procedentes del ovario izquierdo

**OPU** del inglés *ovum pick-up*, aspiración folicular

**OR** del inglés *odds ratio*, razón de oportunidades

**OOR** del inglés *oocyte recovery rate*, tasa de recuperación ovocitaria.

**p** p-valor

**p38 MAPK** de las siglas en inglés *mitogen-activated protein kinases*, proteínas quinasas activadas por mitógenos

**P<sub>4</sub>** progesterona

**PDE** fosfodiesterasa

**pg** picogramos

**PGE2** prostaglandina E2

**PHLDA1** del inglés *pleckstrin homology-like domain, family A, member 1*; dominio con homología a la Pleckstrina, familia A miembro 1

**PI** profase I

**PI3K/AKT** fosfatidilinositol 3 quinasa

**PKA** proteína quinasa A

**PKB** proteína quinasa B

**PKC** proteína quinasa C

**PN** pronúcleo

**PR** receptor de progesterona

**PTGS2** prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, COX-2

**REM** recuento de espermatozoides móviles

**RFA** recuento de folículos antrales

**RGS2** del inglés *regulator of G protein signaling 2*, regulador de señalización de la proteína G 2

**RHA** reproducción humana asistida

**RNasas** ribonucleasas

**RNV** recién nacido vivo

**RT-qPCR** del inglés *quantitative real-time polymerase chain reaction*, determinación cuantitativa mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**s.c.** subcutáneo

**SHEO** síndrome de hiperestimulación ovárica

**SOP** síndrome de ovario poliquístico

**T** testosterona

**TA** temperatura ambiente

**TE** transferencia embrionaria

**TRA** técnicas de reproducción asistida

**UDP** uridina difosfato

**UGP-2** UDP-glucosa pirofosforilasa 2

**UI** Unidad Internacional

**URA** unidad de reproducción asistida

**vs** del latín *versus*, frente a

## RESUMEN

Los fármacos análogos de la GnRH y la hCG han demostrado ser igualmente eficaces en la activación de la cascada de intermediarios de la maduración final ovocitaria que ocurre tras el estímulo ovulatorio. Sin embargo, su mecanismo de acción y por tanto los perfiles hormonales hallados tras el estímulo de los dos fármacos son muy diferentes. El tiempo más adecuado para programar la recolección ovocitaria tras la administración de acetato de triptorelina podría no ser 36 horas como ampliamente se ha pautado en los tratamientos de FIV con hCG.

Este intervalo de tiempo es sumamente importante para obtener la mayor proporción posible de ovocitos MII porque procesos como el inicio de la luteinización del folículo, la expansión del cúmulo y el reinicio de la segunda división meiótica deben haberse establecido antes de realizar la aspiración folicular. A su vez, hay que tener en cuenta el tiempo máximo del que se dispone antes de que pueda producirse un efecto negativo en los folículos o una ovulación espontánea con la consecuente liberación y pérdida ovocitaria antes de su aspiración.

Se administró la medicación en intervalos de 30 y 40 horas comparando los resultados obtenidos con el tiempo habitual en la práctica clínica, es decir, las 36 horas. Paralelamente, se realizaron extracciones sanguíneas para monitorizar el cambio en los niveles plasmáticos hormonales de las pacientes y finalmente estudiamos marcadores moleculares no invasivos de madurez ovocitaria mediante RT-qPCR y ELISA.

El acortamiento del intervalo de tiempo entre la administración de acetato de triptorelina y la recuperación ovocitaria provoca una disminución en el número de ovocitos maduros respecto a las 36 horas. Por el contrario, el alargamiento del intervalo de tiempo hasta las 40 horas no supuso una mejora en la recuperación de ovocitos maduros frente a las 36 horas.

La expresión de los genes relacionados con la maduración ovocitaria es mayor en las células de la granulosa que fueron recogidas de folículos puncionados a las 40h tras la administración del acetato de triptorelina.

En la optimización de los resultados clínicos con diferentes protocolos farmacológicos de estimulación ovárica, los resultados sugieren que la utilización de marcadores somáticos no invasivos podrían ser un complemento en la valoración morfológica de madurez ovocitaria.



# Introducción



## 1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) son cada vez más empleadas en el tratamiento de la infertilidad, especialmente la fecundación *in vitro* (FIV). La realización de esta implica la estimulación farmacológica del ovario de forma suprafisiológica con gonadotrofinas para la inducción de desarrollo multifolicular. Una vez estos folículos (F) han alcanzado el tamaño adecuado, se desencadena la maduración última de los ovocitos que contienen los F mediante aspiración por punción ovárica. Todo el proceso ocurre bajo un estricto protocolo de supresión hipofisaria cuya finalidad es evitar una indeseable ovulación espontánea (Oberyé et al., 1999).

Durante décadas se ha empleado la gonadotrofina coriónica humana (hCG) en reproducción humana asistida (RHA) como sustitutivo del pico endógeno de la hormona luteinizante (LH) para lograr la inducción de la maduración ovocitaria en los ciclos de FIV. Debido a la similitud estructural y biológica entre la hCG (del inglés *human chorionic gonadotropin*, hormona gonadotrofina coriónica humana) y la LH, ambas se unen y activan el mismo receptor (LH-R) e inician la cascada molecular que desencadena la maduración del ovocito y su ovulación. Sin embargo, existe una importante diferencia entre ambas hormonas, puesto que la vida media de la LH es de 60 minutos mientras que la hCG tiene actividad biológica luteotrópica más prolongada, que se mantiene durante 24 horas. Esta diferencia conduce a perfiles farmacodinámicos y endocrinológicos diferentes, que generan alteraciones del patrón habitual durante la fase lútea (FL) como son su desarrollo inadecuado o la posible aparición del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO).

El SHEO se conoce desde 1943, cuando empezaron a realizarse las primeras inducciones de la ovulación. Hoy en día, es un trastorno iatrogénico que ocurre en pacientes sometidas a TRA y sobre todo en pacientes en las que se ha utilizado hCG para provocar la maduración final de los ovocitos. Puede tener una morbilidad variable en función de la severidad e incluso llegar a provocar la muerte (Delvigne & Rozenberg, 2003).

Con la aparición en los años 80 de la supresión hipofisaria mediante protocolos con antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHant) se abrió la posibilidad de emplear un agonista de la GnRH (GnRHa), como inductor de la maduración ovocitaria y de la ovulación alternativo a la hCG. Con ello podemos evitar los efectos negativos derivados del empleo de la hCG, especialmente el SHEO.

### **1.1 Inducción de la ovulación y fármacos inductores**

El momento de inducir la ovulación durante las TRA viene indicado por el número y tamaño de los folículos, controlados mediante ecografía transvaginal. Por consenso se indica la administración de los desencadenantes de la ovulación cuando se alcanza un diámetro medio folicular de 17-20 mm, en un número suficiente de folículos, según la TRA indicada. Unos niveles séricos de estradiol (E<sub>2</sub>) entre 150-200 pg/mL por cada folículo maduro apoyan la decisión.

Existen diferentes fármacos inductores de la maduración final del ovocito y desencadenantes de la ovulación (Ilustración 1):

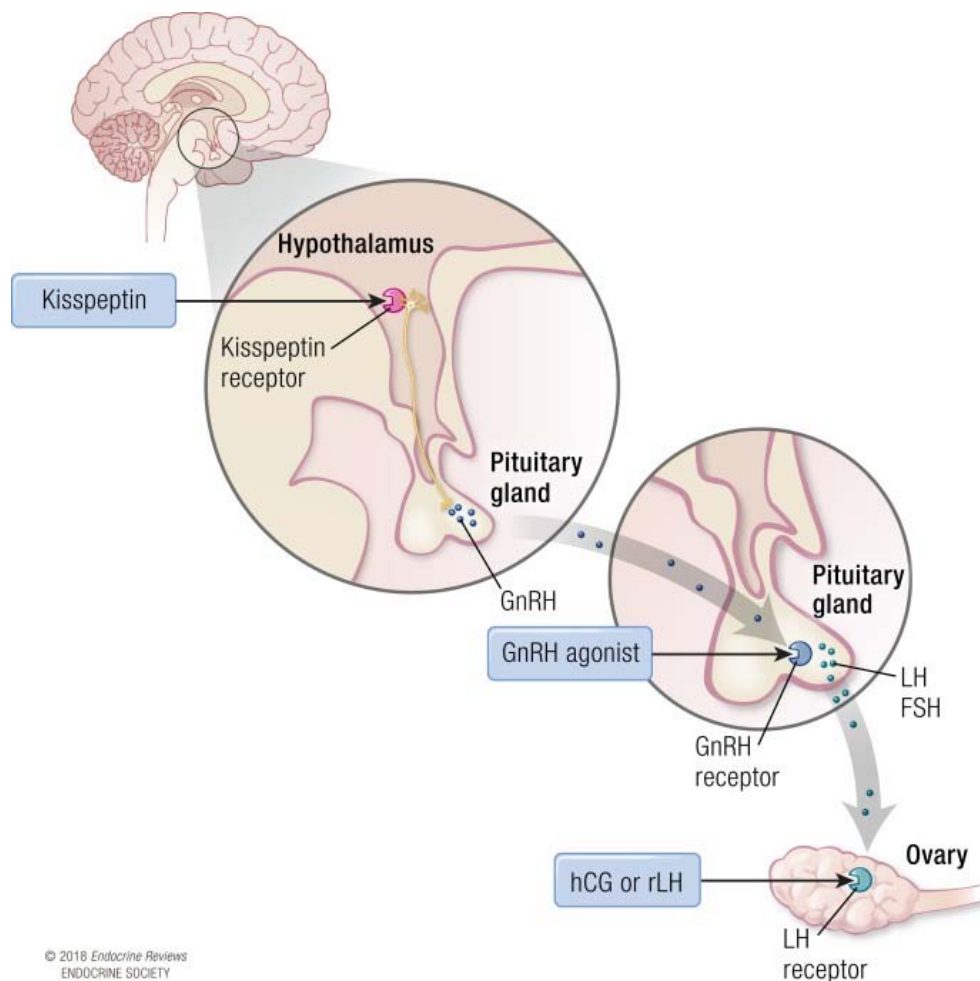
- Gonadotropinas coriónicas urinarias: Hormona del embarazo obtenida de la orina de gestantes, con posterior purificación. Activa el receptor de la LH e inician la cascada molecular que desencadena la maduración del ovocito.

- Gonadotropina coriónica humana recombinante: Péptido sintético modificado que se une y activa el receptor de la LH.

- Agonistas de la GnRH: Son péptidos sintéticos análogos de la GnRH en los que se ha modificado la estructura proteica para alterar su afinidad por el receptor de la GnRH y retrasar su aclaramiento metabólico, aumentando así su vida media y su potencia. La modificación de los aminoácidos en posición 6 y 10 causa una disminución de la degradación por parte de las peptidasas hipofisarias. Por tanto, el mecanismo de actuación de los GnRHa es una unión al

receptor, con mayor afinidad que la GnRH, produciendo una activación inicial del mismo y generando con ello una liberación masiva de LH y hormona foliculoestimulante (FSH) parecida a la que se produce en los ciclos naturales (Nakano et al., 1973). Este mecanismo por el que los GnRHa logran la inducción de la ovulación es conocido como efecto llamarada (del inglés *Flare-Up*).

- Kisspeptina: Las kisspeptinas son péptidos hipotalámicos que junto con otros neuropéptidos se encargan de regular la reproducción liberando GnRH. La inyección periférica de kisspeptina provoca la secreción de gonadotrofinas y la maduración ovocitaria en mujeres sometidas a tratamientos de FIV (Jayasena et al., 2014) y es por lo que actualmente es un fármaco inductor en estudio (Kasum et al., 2017).



*Ilustración 1. Lugar de acción de los diferentes inductores de la maduración ovocitaria durante los tratamientos de FIV. (Abbara et al., 2018).*

## **1.2. Inducción de la Ovulación con GnRHa**

El uso de los GnRHa para inducir la ovulación fue inicialmente estudiado a finales de los años 80. Como ya se ha explicado, la administración de estos fármacos es capaz de inducir la liberación de LH por parte de la hipófisis, provocando un ascenso hormonal similar al pico espontáneo de LH y por lo tanto es una alternativa al tratamiento con hCG en las técnicas reproducción asistida (Gonen et al., 1990). Sin embargo, esta opción no es aplicable cuando el régimen de tratamiento emplea los propios agonistas como mecanismo de desensibilización de la hipófisis para supresión de la ovulación espontánea durante la estimulación ovárica con gonadotrofinas. Es por ello, que con la aparición de los nuevos protocolos de tratamiento con GnRHant como supresores hipofisarios, ha resurgido el interés clínico por el empleo de los GnRHa como alternativa a la hCG.

Este tipo de protocolos se basan en la unión reversible y competitiva que se produce entre el receptor de la GnRH y el antagonista. Puesto que la afinidad que muestra el GnRHa por dicho receptor es superior a la del antagonista, la administración del agonista hace que la unión con el antagonista se revierta. Es decir, el GnRHa es capaz de desplazar al GnRHant del receptor y producir el efecto *Flare-Up*, que genera una activación inicial de receptores y provoca la liberación de FSH y LH (Nakano et al., 1973).

Son muchos los estudios dedicados a comprender mejor la curva plasmática de LH, tanto en ciclos naturales como estimulados (Ilustración 2). Hoff y col. estudiaron en 1983 la dinámica hormonal periovulatoria en ciclos naturales para determinar de manera precisa el tiempo de ovulación tras el ascenso de LH. Para ello, determinaron valores hormonales en sangre cada 2 h durante 5 días (D) y encontraron que el pico de la LH consta de 3 fases: un primer ascenso rápido (14 horas), una meseta de 14 horas y descenso progresivo final en 20 h (Hoff et al., 1983). Determinaron de esta forma que la duración global comprende una media de 48 horas.

Tras estudiar la liberación de la LH producida por los GnRHa en pacientes normo-respondedoras que padecían únicamente factor de esterilidad tubárico, Itskovitz et al. observaron que ésta se divide exclusivamente en dos fases: fase de ascenso rápido y corto (en 4 horas) y lento descenso de 32 horas (Itskovitz et al., 1991). Como era de esperar, existen diferencias entre el pico de LH producido por los GnRHa y el que se produciría en un ciclo natural. Este fenómeno parece ser debido a la inmediata desensibilización e internalización de receptores que se produce justo tras el efecto *flare-up*. Cabe destacar que, aunque ambos picos son similares en magnitud, la duración total del pico de LH producido por los GnRHa en 36 h es mucho menor que la de un ciclo natural. A pesar de su menor duración, el pico de LH tras la administración de GnRHa logró de manera igualmente eficaz la maduración y liberación de los ovocitos en los folículos con tamaño adecuado.

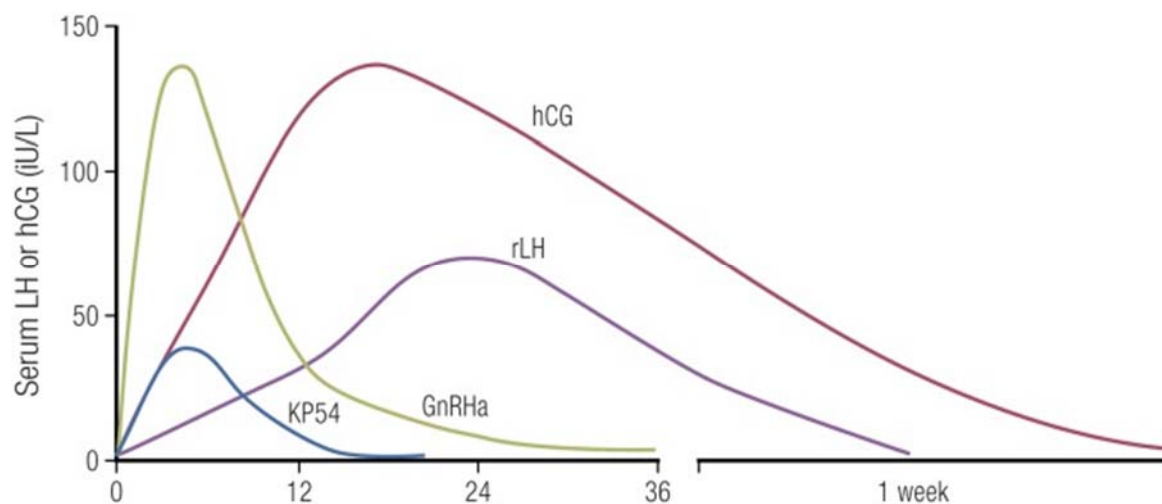


Ilustración 2 Concentraciones plasmáticas de inductores de la ovulación (Abbara et al., 2018).

Otro de los estudios que lo comprobaron fue el publicado por Segal y Casper en 1992, comparando el desencadenamiento de la ovulación con GnRHa y hCG en cuanto a tasas de gestación (Segal & Casper, 1992). Determinaron que las bajas concentraciones de E<sub>2</sub> en la FL podrían ser potencialmente beneficiosas para mejorar la implantación a la vez que evitarían el SHEO. Cuando estaban realizando este estudio, comenzaron a observar que las pacientes pertenecientes al grupo GnRHa menstruaban incluso antes de

pasados 10 días tras la aspiración folicular, y decidieron monitorizar también niveles sanguíneos de  $E_2$  y progesterona ( $P_4$ ). Fueron los primeros en reportar bajas concentraciones sanguíneas de  $P_4$  en la FL a pesar de la administración vaginal, planteando la necesidad de encontrar otro tipo de soporte lúteo adecuado en ciclos con GnRHa.

Finalmente, tras la aparición de protocolos de supresión hipofisaria con GnRHant en los protocolos de hiperestimulación ovárica, numerosos estudios han demostrado que los GnRHa inducen un pico de LH suficiente para madurar el ovocito. Fauser et al., utilizando el antagonista ganirelix para prevenir el aumento de LH durante la estimulación ovárica y desencadenando la ovulación con hCG o dos GnRHa diferentes, estudió los diferentes perfiles endocrinos generados (Fauser et al., 2002). Ambos GnRHa aumentaron los niveles de LH rápidamente en 4 horas, coincidiendo con los resultados de los estudios liderados por Itskovitz y Gonen, y regresaron a su estado basal pasadas 24 h, siendo más corto que en ciclos naturales donde suele durar entre 36 h y 48 h. Así mismo los niveles plasmáticos de esteroides y gonadotrofinas circulantes estuvieron cerca del rango fisiológico. En cuanto a los niveles plasmáticos en el grupo hCG, fueron máximos a las 24h y fueron aclarándose gradualmente hasta una semana tras la TE (transferencia embrionaria) lo que provocó niveles de  $E_2$  y  $P_4$  más altos en la FL.

Basándose en la teoría de que niveles hormonales próximos a los fisiológicos podrían mejorar las tasas de implantación, Beckers y sus colaboradores estudiaron ciclos de FIV sin suplementación en FL administrando hCG, LH o GnRHa para desencadenar la ovulación. A pesar de observar una correcta maduración ovocitaria en todos los grupos el estudio fue cancelado tras reclutar 40 pacientes por sangrado prematuro y muy baja tasa de embarazo (Beckers et al., 2003).

### **1.2.1 Dosis y tipo de GnRHa para inducir la ovulación**

Con respecto a la dosis y el tipo de agonista empleado para desencadenar la maduración del ovocito son muy escasos los estudios realizados. Lo cierto es que por el



momento no existe ningún estudio de dosis-respuesta adecuadamente diseñado en pacientes de FIV que nos permita conocer qué dosis es la más eficaz.

Buckett y colaboradores determinaron la dosis mínima eficaz de buserelina necesaria para inducir el aumento endógeno de gonadotrofinas. Las dosis administradas fueron desde 25 a 100 µg. A pesar de reclutar un número muy bajo de pacientes en cada grupo, según sus resultados 50µg sería la dosis mínimamente efectiva de buserelina (Buckett et al., 1998).

Parneix et al. evaluaron 162 ciclos con 5 diferentes tipos de regímenes de GnRHa (0.1 mg de triptorelina, 0.5 mg de buserelina en una o dos dosis, 1 mg de leuprolide o dos dosis de 200 µg de nafarelina) tomando como control hCG (Parneix et al., 2001). Ninguno de los regímenes fue superior con respecto a los otros o respecto al grupo control en cuanto a tasa de gestación. Sin embargo, no se especifica el tipo de estimulación ovárica realizada por lo que la publicación no aporta datos concretos que nos permitan extraer conclusiones. Los autores resolvieron en vista de semejantes resultados, que la triptorelina 0.1 mg es la mejor elección por razones prácticas y económicas.

Años más tarde, el mismo grupo realizó un nuevo estudio en pacientes que no habían conseguido gestar tras un primer ciclo de FIV y en las que se había observado fases lúteas inadecuadas administrado 0.1 mg de triptorelina (Empeaire et al., 2004). El objetivo de este segundo ciclo fue determinar si un cambio en la estrategia terapéutica podía provocar la ovulación o un diferente soporte de la FL podía mejorar el resultado de dichas pacientes. Los grupos fueron triptorelina 0.1 mg, triptorelina 0.5 mg, 3 dosis de 0.1 mg de triptorelina, 0.1 mg triptorelina con suplemento de P<sub>4</sub> y 0.1 mg triptorelina con apoyo de 1500 UI de hCG pasadas 12 h. Los resultados del estudio prospectivo revelaron que la solución para aquellos ciclos con FL inadecuada no era aumentar ni repetir la dosis de agonista y que posiblemente este efecto se debía a diferencias personales de algunos pacientes a los GnRHa o diferente farmacodinamia a nivel de la glándula pituitaria o el

ovario. Concluyeron que una posible solución a las deficiencias en la fase progestativa sería la suplementación con una dosis baja de hCG siempre teniendo en consideración el riesgo de SHEO.

La mayoría de los estudios actuales emplean monodosis bien de 0.2 mg de Triptorelina, 0.5 mg de Buserelina o de 1 mg de Leuprolide y en ellos se logra ovulación y maduración con resultados presumibles en base a número de ovocitos (Humaidan et al., 2011).

Un estudio simple ciego, randomizado, controlado y prospectivo para determinar la dosis óptima de triptorelina se llevó a cabo por Vuong y col. en 2016 con 165 donantes de ovocitos (Vuong et al., 2016). Las donantes recibieron 0.2 mg, 0.3 mg o 0.4 mg de triptorelina. Los resultados no mostraron diferencias en cuanto a número de ovocitos metafase II (MII), preembriones de buena calidad. Tampoco hallaron diferencias en concentraciones séricas de LH, FSH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> durante las fases folicular y lútea temprana.

Es por todos estos estudios que desde hace aproximadamente 20 años la dosis de 0.2 mg de acetato de triptorelina es práctica clínica en la mayoría de URA. Ahora bien, es obvio que sería recomendable más y mayores estudios sobre los diferentes tipos y dosificaciones para determinar la dosis mínima eficaz en pacientes de FIV.

### **1.3. Características de la Inducción de la ovulación con GnRHa vs hCG**

Los conocimientos acerca de la inducción de la ovulación con hCG son extensos. Durante casi 4 décadas se ha empleado la hCG en las TRA, para lograr la ovulación en el momento deseado y programar la punción folicular.

#### **1.3.1. Perfiles endocrinológicos**

Como ya se ha comentado, los perfiles endocrinológicos que desencadenan la hCG y los GnRHa son muy diferentes. Fauser y col. observaron que en las pacientes en las que

se empleó triptorelina o leuprolide se producía un rápido ascenso de la LH, que alcanzaba su pico máximo a las 4 h de la administración, volviendo a su estado basal en el día de la aspiración folicular (Fauser et al., 2002). La principal diferencia es, por lo tanto, la larga semivida que presenta la hCG, que se aleja del pico ovulatorio fisiológico de LH y que provoca áreas bajo la curva de niveles plasmáticos de  $E_2$  y, sobre todo  $P_4$  mayor que en el grupo del agonista (Ilustración 3).

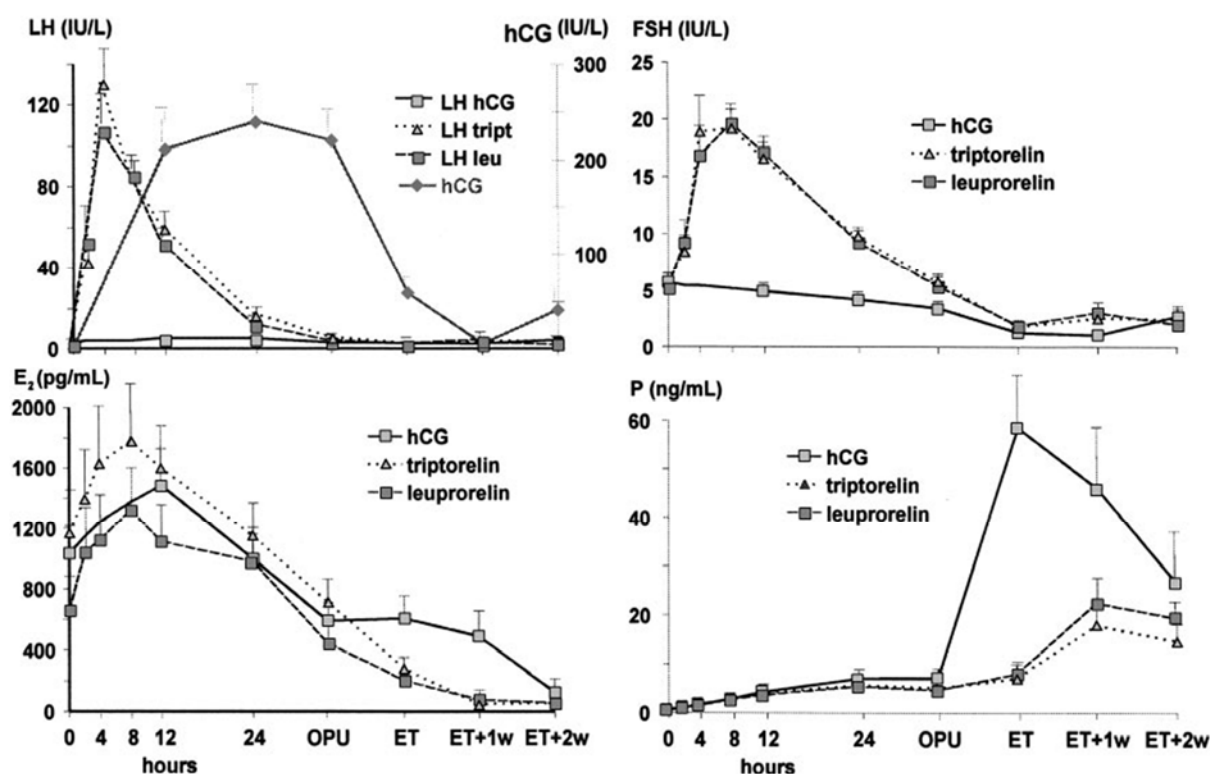


Ilustración 3. Concentraciones séricas hormonales durante la ovulación. Concentraciones séricas de LH, hCG, FSH,  $E_2$  y  $P_4$  durante la inducción de la ovulación en las etapas finales de la maduración ovocitaria (a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas) con dos GnRH $\alpha$  (triptorelina y leuprorelina) o hCG tras hiperestimulación ovárica para FIV y durante la subsecuente FL. Aspiración folicular: OPU, del inglés ovum pick-up; transferencia embrionaria: ET, del inglés embryo transfer; semanas 1 y 2 tras la ET: ET+1w, ET+2w. Imagen extraída de (Fauser et al., 2002).

En otro estudio publicado en 2012, se evaluaron los niveles de LH, FSH y  $P_4$  que se alcanzaban tras 12 horas de inducción de la ovulación con GnRH $\alpha$ . Determinaron que aquellas pacientes en las que el pico de LH no había alcanzado concentraciones superiores a las 15 UI/L tenían una reducción significativa en el número de ovocitos recuperados por

lo que repercutía en las tasas de maduración, pero sin afectar a las tasas de gestación (Chen, S. et al., 2012).

Otra importante diferencia es que con la administración de los GnRHa se produce liberación hipofisaria tanto de LH como de FSH, al igual que sucede en los ciclos naturales (Fauser et al., 2002). La liberación conjunta de ambas hormonas es uno de los argumentos de los autores que respaldan el mayor empleo de los GnRHa. El papel de la FSH en la ovulación, antes desconocido, está tomando protagonismo en la actualidad. La competencia ovocitaria requiere de una comunicación entre las células de la granulosa (CG), el cúmulo y el ovocito al carecer este último de receptores de gonadotrofinas. Se ha demostrado que la FSH aumenta los LH-R en las células de granulosa mejorando con ello la formación del cuerpo lúteo (Humaidan et al., 2013) e intensifica la traducción de ARNm maternos en el ovocito (Franciosi et al., 2016). Además, la activación de FSH-R promueve directamente la maduración nuclear del ovocito en ausencia de LH, favoreciendo la reactivación de la meiosis y la expansión del cuerpo lúteo (Andersen et al., 2001); (Zelinski-Wooten et al., 1995).

### **1.4 Resultados clínicos en los protocolos de estimulación ovárica con GnRHa**

Gracias a la aparición de la supresión hipofisaria con GnRHant en la estimulación ovárica controlada (EOC), en los últimos años ha habido un creciente aumento en el interés por los protocolos con inducción de la ovulación mediante GnRHa, de manera que se han realizado un número notable de publicaciones analizando los resultados. Sin embargo, la evidencia científica respecto al número de ensayos clínicos adecuadamente diseñados (prospectivos, con grandes cohortes o metaanálisis) es todavía reducida y la viabilidad de la utilización de GnRHa para desencadenar la ovulación en pacientes de buen pronóstico está todavía sometida a debate en la actualidad. De hecho, según la última guía clínica de la ESHRE (por sus siglas en inglés, European Society of Human Reproduction and Embryology, Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología) sobre la estimulación ovárica en ciclos FIV, el uso de GnRHa para la maduración final ovocitaria

con soporte lúteo convencional y TE en fresco no está recomendado para la población en general (The ESHRE guideline: Ovarian stimulation for IVF/ICSI, 2020).

En 2006, Griesinger et al. realizaron un metaanálisis en el que solamente pudieron ser incluidos 3 ensayos clínicos de los 23 estudios publicados hasta ese momento. Realizando una adecuada comparación de los datos obtenidos, se reunieron finalmente un total de 275 pacientes randomizadas en estudios controlados. El análisis combinado de los datos demostró que no existían diferencias en el número y la calidad de los ovocitos, las tasas de fecundación o el desarrollo embrionario entre los grupos de pacientes que recibieron hCG o GnRHa (Griesinger et al., 2006).

Recientemente, se ha publicado un estudio sobre la estrategia llamada en inglés “*freeze-all*”, que como su traducción indica, consiste en la congelación sistemática de todos los preembriones generados en un ciclo de FIV para luego realizar la TE en diferido. El grupo de pacientes que iban a recibir TE en fresco recibieron hCG para promover la ovulación frente a pacientes a las que se les iba a congelar todos sus preembriones, a las que se les administró GnRHa. El número de ovocitos recuperados y fecundados fue comparable, así como el número de preembriones de buena calidad obtenidos (Stormlund et al., 2020). Estos datos, también se ven apoyados por los buenos resultados que se obtienen en los ciclos con transferencia de preembriones criopreservados tras inducción con GnRHa (Eldar-Geva et al., 2007) viendo de nuevo que las diferencias en cuando a tasas de embarazo en fresco no se deben a factores oocito-embrionarios.

La administración de la hCG tras el desarrollo multifolicular conduce a la formación de múltiples cuerpos lúteos que son mantenidos con el paso de los días por el efecto suprafisiológico de la hCG. Sabemos que el efecto LH de hCG se mantiene constante durante más de una semana, sin embargo, con el empleo de GnRHa la supresión hipofisaria que se desencadena tras el efecto *Flare-up* produce una caída de los niveles circulatorios de LH de manera que se produce una función anormal de los cuerpos lúteos

existentes. Se ha descrito una producción de  $P_4$  y de estrógenos significativamente menor en los ciclos con GnRHa vs los ciclos con hCG (Itskovitz et al., 1991). En resumen, la corta duración del pico de LH, asociado con la inhibición hipofisaria y los menores niveles de esteroides conducen a una luteolisis precoz. Humaidan y col. compararon pacientes que habían recibido GnRHa o hCG en la maduración final ovocitaria y hallaron que las tasas de embarazo clínico eran significativamente menores en el grupo con análogos de la GnRH. El soporte de FL convencional con progesterona es insuficiente en este tipo de protocolos (Humaidan et al., 2005).

Probablemente el avance más importante de la inducción con GnRHa en los ciclos de FIV con estimulación ovárica es la eliminación del riesgo de SHEO. Humaidan y col. demostraron en su estudio prospectivo y randomizado que administrar GnRHa y un rescate de FL en forma de bolo de 1500 UI hCG el día de la punción folicular, es seguro en pacientes con riesgo de desarrollar SHEO. En este estudio, la suplementación de FL fue individualizada según la respuesta ovárica, clasificando a las pacientes de riesgo aquellas con más de 14 folículos  $\geq 11$ mm de diámetro. Ninguna paciente desarrolló SHEO, pero la incidencia en pacientes del grupo control, que recibieron hCG, fue del 3.4% (Humaidan et al., 2013). En un metaanálisis de ciclos con GnRHant, Youssef et. al evaluaron la eficacia y seguridad de la maduración ovocitaria con GnRHa y hCG. De las 101 publicaciones hasta el momento, 15 estudios fueron seleccionados por ser comparativos, controlados y randomizados. A pesar de los diferentes soportes de FL administrados a pacientes en los estudios incluidos, el grupo GnRHa se asoció con un riesgo menor de padecer SHEO que el grupo hCG (Youssef et al., 2015).

Se ha especulado que otra de las posibles ventajas del uso del desencadenamiento de la ovulación dual o doble frente hCG en solitario en ciclos controlados con GnRHant podría estar relacionada con los receptores de los análogos de la GnRH hallados en endometrio humano (Popovici et al., 2000). Durante la estimulación ovárica, los GnRHant podrían unirse a los receptores y bloquearlos frenando el desarrollo endometrial y es por

ello por lo que el uso de GnRHa, con una mayor afinidad por el receptor, desplazaría el antagonista y eliminaría este posible efecto negativo (Kim et al., 2014).

### **1.5. Efecto del intervalo de tiempo entre la inducción de la ovulación y la recuperación ovocitaria**

El intervalo de tiempo entre el estímulo ovulatorio y la propia ovulación es sumamente importante para obtener la mayor proporción posible de ovocitos MII porque procesos como el inicio de la luteinización del folículo, la expansión del cumulus y el reinicio de la segunda división meiótica deben haberse establecido antes de realizar la aspiración folicular. De igual manera, hay que tener en cuenta el tiempo máximo del que se dispone antes de que pueda producirse una ovulación espontánea con la consecuente liberación y pérdida ovocitaria antes de su aspiración.

Desde la introducción del empleo de la hCG en los años 70, se han realizado múltiples estudios para determinar el intervalo de tiempo óptimo necesario para la punción folicular (Mansour et al., 1994); (Nargund et al., 2001); (Bjercke et al., 2000); (Raziel et al., 2006). Apoyándose en estos estudios, en la práctica clínica habitual se realiza la punción folicular a nivel mundial, entre las 36 y las 38 horas tras la administración de la hCG. A pesar de ello, la realidad es que la gran mayoría de los estudios que hay al respecto tienen pequeños tamaños muestrales, muchos son retrospectivos y se han recogido resultados dispares (Wang, W. et al., 2011). De hecho, se han retomado ensayos clínicos al respecto y se están introduciendo nuevos conceptos como la determinación de la expresión génica y sustancias angiogénicas que puedan tener un impacto en la competencia ovocitaria (Bokal et al., 2005).

Con la aplicación de los protocolos de inducción de la ovulación con GnRHa se ha supuesto que el intervalo óptimo es el mismo que el calculado para los tratamientos con hCG (Humaidan et al., 2011). Sin embargo, lo cierto es que, a pesar de lo importante que es conocer el intervalo más adecuado para la OPU, no tenemos constancia de la existencia

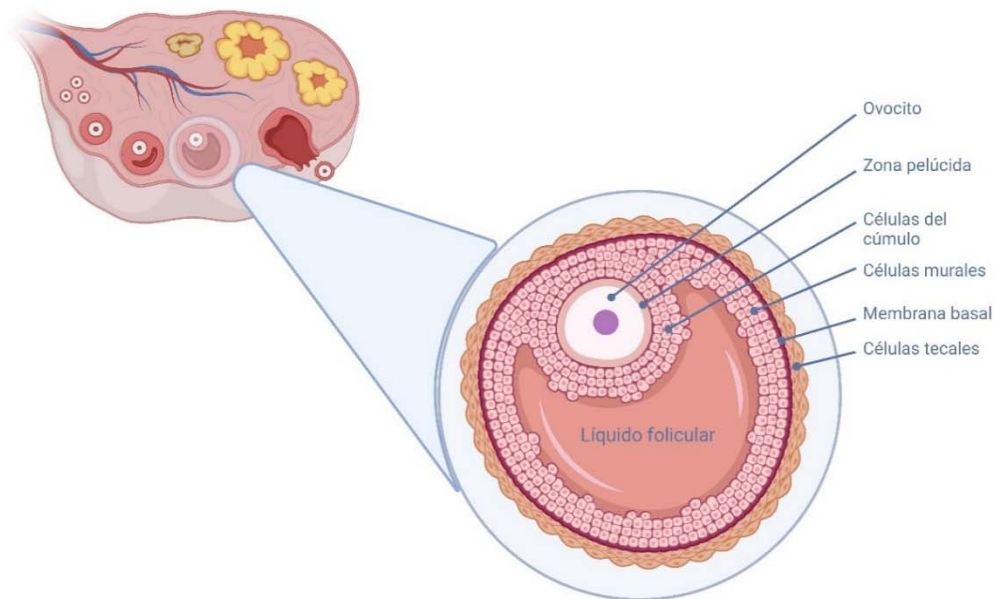
de estudios prospectivos que lo hayan evaluado específicamente en protocolos de EOC con GnRHant y la aplicación de los GnRHα.

### **1.6. Cascada de mediadores de la ovulación**

Existe una comunicación bidireccional entre el ovocito y su entorno somático. Este diálogo va a determinar el momento en el que ovocito empezará a crecer y adquirir la competencia necesaria antes de su maduración y liberación desde el ovario para finalmente ser fecundado.

Los ovocitos inician la meiosis durante el desarrollo fetal y se detienen en diploteno de la profase I (PI) durante meses o años. En la corteza ovárica, estos folículos primordiales permanecerán en reposo hasta la llegada de la pubertad, cuando el folículo reanuda la maduración en respuesta al estímulo de las hormonas gonadotrofinas (Ilustración 4). En fase de crecimiento folicular el ovocito aumenta de tamaño, las células que lo rodean cambian de forma a cuboidal y proliferan llegando a formar varias capas en lo que se denomina el folículo primario, posteriormente el secundario y terciario o folículo antral (Zuccotti et al., 2011). El antro del folículo es una cavidad rellena de LF, compuesto por la filtración del plasma a través de los capilares en la teca pero que ha sido modificado por la secreción y metabolismo de las células que forman el folículo (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010)





*Ilustración 4. Desarrollo del folículo y detalle de los diferentes componentes de un folículo maduro o terciario (Creado en Biorender. 2022).*

En el momento de la formación del antro folicular, las células que rodean al ovocito, las CG, se diferencian en células murales (CM), secretoras de esteroides que delimitan el folículo; y células del cúmulo (CC), estrechamente relacionadas con el ovocito. En este punto, los folículos empiezan a ser receptivos a las gonadotropinas. Los receptores de FSH (FSH-R) se expresan únicamente en CM y su expresión disminuye a medida que el folículo crece, por lo que la FSH conduce a la maduración de CG desde su fase preantral hasta la preovulatoria (Whitelaw et al., 1992). Al activarse FSH-R, se produce una activación AMPc (adenosinmonofosfato cíclico) dependiente de la proteína quinasa A (PKA), la ruta de MAP quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2 (ERK1/2, del inglés *extracellular signal-regulated kinases*, anteriormente llamadas MAPK3/1), la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (p38 MAPK, de las siglas en inglés *mitogen-activated protein kinases*) y la proteína quinasa B (PKB). Estas rutas regulan la traducción y transcripción de numerosos genes implicados en la proliferación, supervivencia, diferenciación celular, la esteroidogénesis y la expresión de receptores de LH y hCG (LH-R) en las CG (Gonzalez-Robayna et al., 2000) Entre los diferentes genes cabe destacar el *CYP11A1* y el *CYP19A1*

que codifica la aromatasas, enzima encargada de la síntesis de estrógenos y localizada únicamente en las CG (Wayne et al., 2007).

Como sabemos, la LH es uno de los desencadenantes principales de la maduración ovocitaria. Sin embargo, la maduración *in vivo* necesita toda una compleja red de factores endocrinos, autocrinos y paracrinos (Ilustración 5). También están involucrados factores de transcripción que regulan la expresión génica por la que el folículo dominante adquirirá finalmente la competencia ovocitaria para poder desarrollarse como preembrión.

LH-R empieza a expresarse en CM desde que el folículo tiene un diámetro de aproximadamente 5-6 mm hasta la ovulación (Jeppesen et al., 2012). Sin embargo, las CC expresan bajos niveles de LH-R (Maman et al., 2012); (Yung et al., 2014) por lo que existe una comunicación intercelular, a través de proyecciones tipo GAP desde las CM hasta el ooplasma, que atraviesan la zona pelúcida (Anderson & Albertini, 1976). El pico de LH induce la maduración ovocitaria, expansión del cúmulo ovocitario y la luteinización de las CG activando múltiples cascadas de señalización en el folículo.

El arresto meiótico por el que los ovocitos permanecen en estado quiescente desde el nacimiento de la mujer y durante años está relacionado con el precursor de péptido natriurético tipo C (NPPC, también llamado CNP); sintetizado en las capas externas de las CM y que es agonista extracelular del receptor de NPPC (también llamado NPR2 o guanilato ciclasa B) expresado en las CG. Concretamente, NPPC aumenta la síntesis de guanósín monofosfato cíclico (GMPc) en las CG, que es transportado al ovocito a través de uniones tipo gap inhibiendo la reanudación de la meiosis. El E<sub>2</sub> mantiene la expresión de NPPC en las CG, por lo que, de forma indirecta, podríamos decir que la FSH participa en el mantenimiento del arresto meiótico. De hecho, conforme el folículo crece, la concentración de NPPC aumenta para prevenir una progresión en la meiosis antes de tiempo (Robinson et al., 2012). Esta inhibición se logra gracias a que altos niveles de GMPc inhiben la acción de fosfodiesterasas (PDE) previniendo la hidrólisis de AMPc (Zhang, M. et al., 2011)

En respuesta a la hormona LH, se produce una desfosforilación e inactivación de NPR2, con el descenso de la actividad guanilato ciclasa, y por tanto un descenso en GMPc primero en las CG y finalmente en el ovocito (Robinson et al., 2012); (Egbert et al., 2014). Gracias a un estudio de imágenes con tecnología time-lapse en ovocitos de ratón se comprobó que en presencia de LH, descienden los niveles de GMPc. Inicialmente, los niveles de GMPc disminuyen por la acción de fosfodiesterasas en las regiones donde se encuentran los receptores de LH, en la periferia de las CG. Más tarde el descenso ocurre también en las CC y finalmente en el ovocito (Shuhaibar et al., 2015). Los bajos niveles de GMPc en el ovocito aumentan la hidrólisis de AMPc por la fosfodiesterasa 3A (PDE3A). El descenso de AMPc desactiva la PKA encargada de suprimir el factor promotor de maduración (MPF, del inglés *maturation promoting factor*), por lo que el ovocito reanuda la meiosis (Downs et al., 1988); (Gilchrist et al., 2016).

El LH-R es un receptor transmembrana acoplado a proteínas G (GPCR, del inglés "*G protein-coupled receptors*") (Segaloff & Ascoli, 1993) formado una subunidad  $G\alpha$  y un heterodímero  $G\beta\gamma$ . La unión del ligando al receptor activa la subunidad  $G\alpha$ , que intercambia GDP (guanósín difosfato) por GTP (guanósín trifosfato).  $G\alpha$ -GTP disociado de  $G\beta\gamma$  podrá entonces interactuar con diferentes enzimas efectoras y moléculas señalizadoras que harán posible el efecto fisiológico (Wess, 1997). La señal termina cuando la subunidad  $G\alpha$  cataliza la hidrólisis de GTP rearmando el heterodímero de la proteína G (Heximer et al., 1999)

Dada la importancia de la sincronización entre la maduración ovocitaria y la luteinización temprana del folículo, que podría tener un efecto negativo en la adquisición de la competencia ovocitaria; podemos encontrar varios reguladores a lo largo de la cascada de ovulación, tanto potenciadores como supresores de las rutas implicadas. Uno de los primeros controles sería el regulador de señalización de la proteína G 2 (RGS2, del inglés *regulator of G protein signaling 2*) (Doupnik et al., 1997); (Hepler et al., 1997).

Tras la unión de LH a su receptor GPCR, activa la PKA y la ruta p38 MAPK. Al fosforilar la proteína CRE (CREB, del inglés "*cAMP response element-binding*"), se une a ciertas secuencias del ADN (ácido desoxirribonucleico) actuando como factor de transcripción de determinados genes, en nuestro caso, relacionados con la ovulación (Conti, 2002); (Maizels et al., 2001).

Un tipo de proteínas cuya expresión se ve aumentada tras el estímulo de LH-R son las proteínas del tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF, de sus siglas en inglés *epidermal growth factor*), y la consecuente activación de su receptor (EGF-R) (Hsieh et al., 2007). Freimann y col. corroboraron estos hallazgos al observar que el tratamiento con Forskolina (sustancia activadora del adenilato ciclasa), mimetiza los efectos de la LH en las CG) demostrando que los péptidos del tipo EGF son parte de la cascada de transducción de LH-R (Freimann et al., 2004) principalmente ampiregulina (AREG), epiregulina (EREG) y betacelulina (BTC) (Park et al., 2004); (Inoue et al., 2009). Los ligandos de EGF-R se encuentran anclados a la membrana plasmática de las células en forma de precursores inactivos a la espera de una liberación proteolítica para ejercer su acción (Prenzel et al., 1999); (Yamashita & Shimada, 2012).

Otra cascada de señalización intracelular activada por la acción de LH relacionada con EGF-R, es la proteína quinasa C (PKC). Según en estudios realizados en animales, PKC actúa como mediador en la síntesis de  $P_4$  (Woods & Johnson, 2007) y regulador en la señalización ErbB/Erk en función de la diferenciación celular del folículo, ralentizando la progresión del ovocito hacia el estadio MII para que madure en el momento adecuado. En esta sincronización participa una de las proteínas del tipo EGF, la neuregulina (Nrg). Utilizando ratones *gcNrg1 KO*, Kawashima y col. observaron una fecundación anómala. La subfertilidad se relaciona con una activación de la PKC y fosforilación de la conexina 43 de forma temprana y anómala, cerrándose las conexiones de tipo GAP entre las CC y el ovocito que, como ya se ha explicado anteriormente, provoca un descenso en GMPc y la

reanudación de la meiosis. La Nrg, activada por LH y actuando en EFG-R disminuye la actividad de PKC hacia niveles fisiológicos (Kawashima et al., 2014)

Existe una regulación paracrina y autocrina de factores del tipo EGF en las células del cúmulo mediado por prostaglandinas y  $P_4$ . Inicialmente, los niveles de AMPc se elevan gracias a la activación del LH-R, pero se ha demostrado que la prostaglandina E2 (PGE2) ayuda a mantener esos niveles de AMPc y, por tanto, estimula la cascada de señalización que termina con la expresión de *AREG* o *EREG* en las CG (Ben-Ami et al., 2006)(Choi et al., 2017). La señalización de EGF estimula la prostaglandina-endoperoxidasa 2 (PTGS2, también conocida como ciclooxigenasa-2 o COX-2) en las CG. El aumento de PGE2 y la unión a su receptor PTGER2 activa la ruta p38 MAPK en las CC y ayuda a mantener la transcripción de ligandos del tipo EGF. La expresión de ARNm de *Areg* y *Ereg* en CG decae drásticamente en ratones KO (del inglés *knock out*, modificados genéticamente para presentar un bloqueo en uno o más de sus genes) con un bloqueo del gen *Ptgs2* (Shimada et al., 2006)

El aumento de  $P_4$ , aparte de ser esencial para la formación del cuerpo lúteo también está implicado en la regulación de la expresión de proteínas tipo EGF. En las CG tras el estímulo del LH-R, se activa la cascada de señalización ERK1/2 mediante factores del tipo EGF, que reprograma las células para que detengan la proliferación y diferenciación típicas de la fase folicular y se produzca un viraje hacia procesos relacionados con la ovulación como la maduración final ovocitaria, la expansión del cúmulo o la luteinización del folículo. Entre los genes que se ven afectados por una regulación a la baja encontramos LH-R. Por el contrario, el receptor de  $P_4$  (PR) se expresa tras la activación de LH-R, sobre todo en aquellas CG que rodean ovocitos destinados a ovular y es un importante regulador de la transcripción de otros genes que serán necesarios para la eclosión folicular (Robker et al., 2009)

Se ha observado que folículos que han dado lugar a ovocitos competentes podrían mostrar una sobreexpresión de genes relacionados con la luteinización (Hamel, Mélanie, Dufort, Robert, Léveillé, Leader, & Sirard, 2010b). El complejo cúmulo ovocitario se mantiene unido gracias al ácido hialurónico, un glucosaminoglicano cuya síntesis aumenta notablemente por las CG in vitro tras la subida de LH en respuesta a factores ovocitarios y que es incorporado a la matriz del complejo a medida que éste se expande (Salustri et al., 1992). La expansión del cúmulo es necesaria para permitir la liberación del ovocito desde el folículo periovulatorio. Entre las enzimas involucradas en esta ruta de síntesis encontramos la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa 2 (UGP 2) cuyo producto, la uridina difosfato (UDP) glucosa, se usa en la síntesis de diferentes glucosaminoglicanos, entre ellos hialuronato (O'Regan et al., 1994) (Magee et al., 2001).

Los proteoglicanos están involucrados en la composición y formación de la matriz extracelular, así como la regulación, organización y migración durante la proliferación celular. Versican se localiza en el folículo y LF durante su crecimiento (Russell et al., 2003). Éste interacciona con el hialuronato y otras proteínas estructurales para soportar la rápida expansión del folículo en crecimiento y sin embargo la estructura formada debe desintegrarse para permitir liberación de los COC en el momento oportuno. Los miembros de la familia ADAMTS (del inglés ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, proteína ADAM con motivos de trombospondina tipo 1) son enzimas proteolíticas capaces de degradar proteoglicanos y por tanto influir en la dinámica celular alterando la estructura de los tejidos. *Adamts9* se expresa considerablemente a lo largo del desarrollo embrionario murino (Jungers et al., 2005) y *ADAMTS9* ha sido también caracterizado en el ovario humano (Somerville et al., 2003).

Otras proteínas posiblemente relacionadas con la luteinización son las efrinas del tipo B (en inglés *Eph family receptor interacting proteins* o *ephrins*), proteínas integrales de membrana codificadas por el gen *EFNB*. Éstas son ligandos de los receptores tirosina

quinasa o receptores Eph (Eph-R, del inglés “*erythropoietin-producing hepatocellular receptors*”) que participan en la señalización celular mediante el contacto célula-célula activando procesos según el repertorio de receptores expresados, del tipo de efrina y el contexto celular. Pueden controlar respuestas celulares muy diversas como neovascularización, adhesión y repulsión, migración, proliferación y apoptosis celular. Es un sistema muy versátil ya que receptores y ligandos pueden intercambiar sus papeles dependiendo de las necesidades celulares (Kania & Klein, 2016).

El papel de *PHLDA1* (del inglés *pleckstrin homology-like domain, family A, member 1*; dominio con homología a la Pleckstrina, familia A miembro 1) ha sido ampliamente estudiado en oncología como supresor de tumores. Su expresión se ve disminuida en cánceres mamario y ovárico de mal pronóstico. Como consecuencia de una mayor activación de ERK y de la transformación mediada por esta ruta en células cancerígenas mamarias, se observa una sobreexpresión de *PHLDA1* y su producto TDAG51, oponiéndose a la proliferación celular (Oberst et al., 2008). Su modo de acción se basa en la unión a fosfatidilinositoles compitiendo en su unión a la PKB (también llamada Akt) y reprimiendo así la activación inducida por EGF.

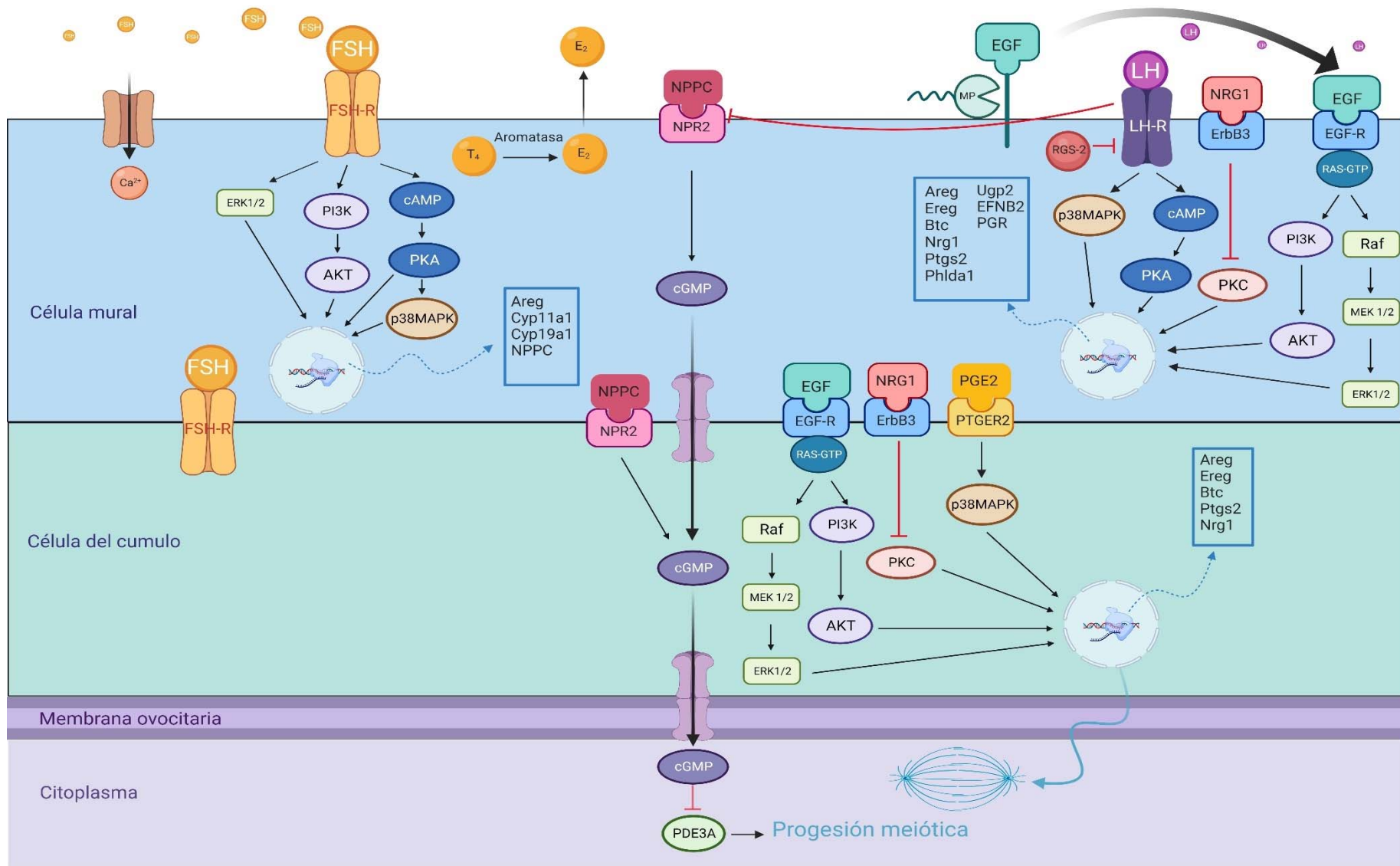


Ilustración 5. Cascada de mediadores en la fase folicular y la ovulación. Resumen del estado actual del conocimiento basado en la literatura revisada durante la elaboración de este manuscrito. (Creado en Biorender. 2022).



## **1.7. Genes y líquidos foliculares como marcadores predictivos de competencia ovocitaria en RHA**

### **1.7.1 Células de la granulosa**

Feuerstein y colaboradores evaluaron los transcritos de varios genes elegidos que se debían encontrar sobreexpresados tras el pico de LH, entre ellos AREG, para relacionarlos con su competencia meiótica o su capacidad de desarrollo. 149 cúmulos fueron analizados individualmente de forma cuantitativa mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR, del inglés *quantitative real-time polymerase chain reaction*). La expresión de los diferentes genes variaba en los estadios madurativos PI, MI (metafase I) o MII encontrándose disparidad de resultados. Se postuló que cada gen debía expresarse, según el mecanismo con el que estuvieran relacionados, en un momento adecuado a lo largo del proceso de maduración ovocitaria. En el caso de AREG, había una expresión mayor cuando los ovocitos presentaban madurez nuclear. En cuanto a la expresión de genes en células obtenidas de ovocitos que habían desarrollado hasta estadio de blastocisto, observaron que éstos estaban presentes en menor medida por lo que esos ARNm (ARN mensajero) podrían haberse consumido durante la maduración o tal vez una expresión tardía de los genes estaría relacionada con un efecto negativo en la competencia ovocitaria (Feuerstein, P. et al., 2007). Huang et al. también relacionaron la expresión génica de AREG de CG de ovocitos maduros con el resultado de las TRA. En este caso, por contra, hallaron que la expresión de AREG era mucho más elevada en aquellas CG correspondientes a ovocitos con los que habían logrado gestación y además positivamente correlacionado con la tasa de fecundación y la calidad embrionaria (Huang, Y. et al., 2015)

El grupo liderado por Hamel realizó tres estudios con la intención de predecir la competencia ovocitaria y el embarazo analizando células foliculares de ovocitos que habían dado o no lugar a embarazo, mediante microchips de ADNc (ADN complementario). En su primer estudio *FDX1*, *CYP19A1*, *cdc42*, *SERPINE2* y *3BHSD1* fueron seleccionados como

marcadores asociados con embarazo (Hamel, Melanie et al., 2008) Gracias a los resultados de este primer estudio, la transcriptómica reveló nuevos marcadores de embarazo relacionados con el proceso de luteinización: *PGK1* y *RGS2* (Hamel, Mélanie, Dufort, Robert, Léveillé, Leader, & Sirard, 2010aa) Finalmente estudiaron preembriones que tenían buena calidad morfológica pero esta vez con el objetivo de determinar qué genes se expresaban diferencialmente en aquellos que lograban o no generar un embarazo. Los resultados de este último estudio identificaron los genes *UGP2* y *PHLDA1* como marcadores de competencia embrionaria y embarazo (Hamel et al., 2010b) poniendo de manifiesto que el entorno folicular no sólo afecta a la maduración ovocitaria, sino que también podría llegar a condicionar el desarrollo embrionario. De nuevo, el grupo de Feuerstein et al. en 2012 estudiaron la expresión génica de CC. Esta vez mediante microchips de ADN para obtener una relación de genes que pudieran estar relacionados con la madurez ovocitaria. Tras validar los resultados de los hallazgos con RT-qPCR, *RGS2* fue el único gen cuya expresión se correlacionó con un valor predictivo de competencia ovocitaria y el embarazo clínico coincidiendo con el estudio de Hamel et al. (Feuerstein, Prisca et al., 2012)

Wathlet et al. trataron de relacionar la expresión de CC junto a la clasificación morfológica de los preembriones, como el grado de fragmentación en día 3 (D+3) de cultivo o la llegada a estadio de blastocisto en D+5 de desarrollo. Partiendo de genes diferencialmente expresados tras un análisis con microchips de ADN, los genes candidatos para seleccionar los preembriones capaces de conseguir un embarazo fueron *CAMK1D*, *EFNB2* y *STC1*. Observaron que aquellos genes diferencialmente expresados en preembriones de buena calidad morfológica no coincidían con los citados anteriormente, confirmando una vez más que los parámetros morfológicos actuales no son predictivos de embarazo (Wathlet et al., 2012). En 2013 realizaron otro estudio para validar los genes anteriormente hallados en ovocitos de la misma cohorte. Compararon CC de TE que no habían generado embarazo con las consecutivas transferencias de preembriones descongelados que habían resultado exitosas. De nuevo *EFNB2* y junto a PR esta vez, mostraron una capacidad predictiva para el embarazo (Wathlet et al., 2013).

### **1.7.2. Líquido folicular**

Tradicionalmente se ha empleado la valoración morfológica del ovocito para evaluar su estadio madurativo. El problema es que en muchos casos la presencia del CP (ovocito MII) no refleja necesariamente la capacidad fecundante, el potencial desarrollo de ese ovocito ni su futura calidad embrionaria.

El entorno folicular se encarga de proporcionar al ovocito todo lo que necesita para adquirir su competencia ovocitaria. Sin embargo, esta comunicación es bidireccional ya que el ovocito secreta numerosos factores que harán que las CG también se desarrollen con él a medida que el folículo crece (Revisado por (Conti & Franciosi, 2018)). La estrecha interacción entre el gameto y las células que lo rodean va a determinar la adquisición de la competencia ovocitaria; tanto nuclear como citoplasmática, y por tanto el desarrollo embrionario posterior (Zhang, A. et al., 2012)

A pesar de que la valoración morfológica del ovocito es rápida y directa, la expresión génica de las células somáticas y factores secretados al LF han sido estudiados en humanos durante los últimos años como marcadores complementarios y no invasivos de madurez ovocitaria, competencia embrionaria, tasa de embarazo o recién nacido vivo Revisado por (Uyar et al., 2013).



# Hipótesis y objetivos



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

La expresión génica en las CG y la presencia de factores solubles en LF podría ser un marcador no invasivo de competencia ovocitaria y, por tanto, del intervalo de tiempo favorable para realizar la OPU tras estimulación ovárica y desencadenamiento de la ovulación con 0.2 mg de acetato de triptorelina.

⊘

### 2.2. Objetivos

- Analizar genes relacionados con rutas activadas tras el estímulo ovulatorio (Ilustración 5) en células foliculares aspiradas: *RGS2*, *AREG*, *EREG*, *BTC*, *CYP19A1*, *UGP2*, *EFNB2* y *PHLDA1*.
- Comparar los niveles de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, T y otros factores solubles como AREG, EREG, BTC presentes en líquidos foliculares de aquellos que contienen ovocitos maduros e inmaduros.
- Investigar la relación entre los niveles en suero de LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> alcanzados tras la administración de acetato de triptorelina y la TRO MII obtenidos en la OPU.
- Determinar el lapso óptimo entre la administración de acetato de triptorelina y la OPU desde el punto de vista de maduración ovocitaria.





# Materiales y métodos



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Diseño del estudio**

##### **3.1.1. Tipo/diseño del ensayo**

Subestudio del ensayo clínico prospectivo, unicéntrico, aleatorizado, controlado y simple ciego para determinar el intervalo de tiempo que obtuvo mayor número de ovocitos MII tras la administración de 0.2 mg de acetato de triptorelina en pacientes normo-respondedoras dentro de los tratamientos de FIV. El Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital La Fe evaluó este estudio y emitió un informe favorable para su puesta en marcha el 29 de enero de 2013 (anexo 1). El ensayo se registró en ClinicalTrials.gov con identificador NTC02244151 y su número EudraCT es 2012-005571-14. Es un ensayo simple ciego porque en el momento de la punción folicular y en el momento de la TE; el intervalo de inducción de la ovulación fue enmascarado para los colaboradores del ensayo, es decir, desconocían el momento en el que se realizó la administración de acetato de triptorelina en las pacientes.

Este subestudio consta de una única fase controlada en la que se evaluaron 3 diferentes intervalos de tiempo tras la administración del fármaco inductor de la ovulación. Los 2 intervalos de tiempo en investigación, 30 y 40 h; se compararon con el grupo considerado control en el que se programó la aspiración folicular a las 36 h (Ilustración 6).

De esta manera, se incluyeron pacientes con respuesta normal de EOC durante su tratamiento, acorde a los protocolos vigentes de la Unidad de RHA del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. El día de cumplimiento de los criterios de inducción de ovulación las pacientes fueron aleatorizadas en uno de los siguientes grupos:

- Grupo 1: OPU a las 30 h de la administración de acetato de triptorelina.
- Grupo 2: OPU a las 40 h de la administración de acetato de triptorelina.
- Grupo 3: Control. OPU a las 36 h de la administración de acetato de triptorelina.

La asignación de grupo se realizó mediante apertura de sobre cerrado por parte del investigador participante que evaluó a la paciente en el momento de la indicación de inducción de ovulación. El proceso de aleatorización del tratamiento en ensayo se realizó mediante un generador informático de números aleatorios (Random Number Generator Pro, Segobit Software). El mantenimiento del ciego se llevó a cabo por parte del Investigador Principal del estudio.

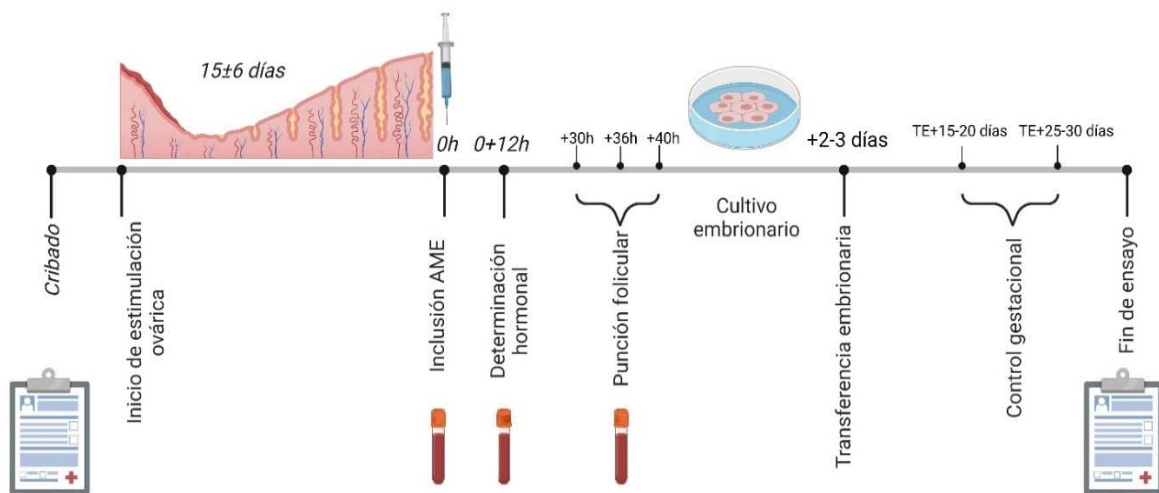


Ilustración 6. Diagrama del diseño del ensayo clínico. AME: Administración de la medicación en estudio; TE: Transferencia embrionaria. (Creado en Biorender. 2022)

### 3.1.2. Variables de respuesta

- Determinación cuantitativa de la expresión de *RGS2*, *AREG*, *EREG*, *BTC*, *CYP19A1*, *UGP2*, *EFNB2* y *PHLDA1* en CG aisladas del líquido aspirado durante la OPU.
- Número de folículos totales y mayores de 16 mm en el día de la inducción de la ovulación.
- Niveles séricos de LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en el momento de indicación de la inducción de la ovulación (aleatorización o momento 0h), a las 12 h de la administración del acetato de triptorelina (0+12h) y en el momento de la OPU.
- Número total de ovocitos obtenidos en el día de la OPU.

- Tasa de recuperación de ovocitos MII por folículos mayores de 16 mm y por el total de ovocitos recuperados.
- Tasa de fecundación: número de cigotos fecundados por ICSI (del inglés *intracytoplasmic sperm injection*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides) en el día posterior a la OPU.
- Número de preembriones transferidos y/o vitrificados.
- Valoración de AREG, EREG, BTC, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> y T en LF aspirado de folículos mayores y menores de 16 mm.

### 3.2. Selección de sujetos

En el estudio se incluyeron pacientes normo-respondedoras afectas de infertilidad primaria subsidiarias de tratamiento mediante FIV que acudieron al servicio de RHA del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y en base a los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

#### 3.2.2. Criterios de inclusión

Criterios de inclusión en el estudio (la paciente debía cumplir todos los criterios):

- Consentimiento informado firmado previamente a la realización de cualquier procedimiento relacionado con el ensayo clínico.
- Mujer entre 18 y 37 años en el momento de la aleatorización (ambas edades incluidas).
- Concentración sanguínea de FSH basal <10 UI/L en día 3 de ciclo menstrual.
- Concentración sérica de hormona antimülleriana (AMH, del inglés anti-Müllerian hormone) entre 5 y 45 pmol/L.
- Recuento de folículos antrales (RFA) entre 6 y 24, teniendo en cuenta ambos ovarios.
- Ecografía vaginal que documente visualización correcta de ambos ovarios y ausencia de patología ovárica significativa en el momento de inicio de la EOC.

- Protocolo de EOC corto con antagonista de la GnRH para frenado hipofisario y estimulación realizada con entre 225 y 300 unidades de FSH diarias.
- El número de folículos mayores o iguales a 16 mm tenía que ser igual o superior a 5 el día de inducción de la ovulación.

### **3.2.3. Criterios de exclusión**

Criterios de exclusión (la presencia de al menos uno de ellos excluyó la participación del estudio):

- Diagnóstico de endometriosis severa (Grado III-IV).
- Ausencia de un ovario debido a cirugía previa.
- Presencia de patología uterina definida como miomas submucosos o pólipo endometrial, documentados por ecografía y no corregidos en el momento de la valoración.
- Diagnóstico de Síndrome de ovarios poliquísticos definido acorde a los Criterios de Rotterdam (2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS 2004)
- Historia de baja respuesta en ciclos previos de EOC definido como obtención de menos de 3 ovocitos MII en ciclo previo o ciclo cancelado por falta de respuesta.
- Parejas con factor masculino severo definido como recuento de espermatozoides móviles (REM) menor a 1 millón de espermatozoides u obtención de semen mediante biopsia testicular.
- Haber participado en un ensayo clínico con medicamentos en un periodo inferior a un año en el momento de la visita de cribado de pacientes.

### **3.2.4. Criterios de retirada de sujetos**

Los sujetos pudieron retirar su consentimiento para su participación en cualquier momento sin perjuicio. Por otro lado, un investigador podía retirar a un sujeto si, según la opinión clínica del investigador, estaba en el mejor interés del sujeto, si el sujeto no podía cumplir o no accedía a cumplir con los requisitos del protocolo.

Los datos identificativos de los pacientes retirados se mantuvieron registrados en el listado de pacientes incluidos en el ensayo, por parte de los investigadores. Las variables ya determinadas y recogidas permanecieron en el cuaderno de registro de datos (CRD), pero a partir de la retirada del ensayo sólo se registraron las posibles reacciones adversas, durante un periodo de seguimiento igual al de las pacientes que continuaban en el ensayo, es decir, durante 12 semanas.

Adicionalmente el promotor podía interrumpir el protocolo en cualquier momento. Los motivos para detener el estudio podían incluir, pero no se limitaban a, los siguientes:

- Incidencia inaceptable de acontecimientos adversos
- Inclusión inadecuada de sujetos
- Recogida de datos inadecuada o imprecisa.

### **3.3. Tratamiento del paciente**

Previamente a la inclusión en el ensayo, las pacientes se sometieron a un proceso de EOC siguiendo la práctica clínica habitual de las pacientes normo-respondedoras en las TRA. Las pacientes fueron estimuladas con dosis de 100 o 150 µg de coriofolitropina  $\alpha$  en función del peso. A partir del séptimo día de estimulación ovárica se añadió FSH recombinante a dosis variables en función del criterio del médico responsable. Una vez incluidas en el ensayo la medicación que recibieron fue:

- Fármaco experimental: acetato de triptorelina diario 0,1 mg polvo y disolvente para solución inyectable (Decapeptyl©, Ipsen Pharma-Biotech, Signes, Francia). La paciente recibió 2 viales, es decir, 0,2 mg de acetato de triptorelina vía subcutánea (s.c.). Como ya se ha comentado, los periodos desde la administración de la medicación hasta la OPU fueron diferentes según el grupo en que fue incluida la paciente:
  - Grupo 1: OPU a las 30 h de la administración de acetato de triptorelina.
  - Grupo 2: OPU a las 40 de la administración de acetato de triptorelina.

- Grupo 3: Control. OPU a las 36 h de la administración de acetato de triptorelina.

El periodo hasta la TE y la duración del seguimiento fue igual para todos los grupos.

- Fármacos administrados para el apoyo de la FL:
  - Ovitrelle® 250 microgramos solución inyectable en pluma precargada (Merck Europe B.V., Amsterdam, Países Bajos). La paciente se administró una monodosis de 1500 UI de coriogonadotrofina alfa vía s.c tras la OPU.
  - Progeffik® 200 mg cápsulas blandas (Laboratoire Effik, Meudon La Forêt, Francia). 400 mg de progesterona micronizada natural administrada vía vaginal fue pautaada a la paciente cada día durante la FL hasta la prueba de embarazo.

Además, se permitieron todos aquellos medicamentos no contraindicados durante la gestación y que la paciente precisara, desde el momento de la inclusión y hasta el final del ensayo.

A su vez, la monitorización del cumplimiento de la aplicación de los fármacos del estudio fue realizada por el personal del estudio que comprobó directamente su correcta administración. El grado de cumplimiento del tratamiento fue evaluado en todo momento en los pacientes.

### **3.4. Procedimientos del estudio**

El procedimiento del ensayo clínico ha quedado resumido previamente en la Ilustración 6. Diagrama del diseño del ensayo clínico. AME: Administración de la medicación en estudio; TE: Transferencia embrionaria.



### **3.4.1. Selección de pacientes**

En la fase de preselección, se revisó la lista de espera para FIV/ICSI en la Unidad de Reproducción Asistida (URA) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, cribando aquellas pacientes candidatas a participantes en el estudio.

A continuación, en la visita de selección se valoró si las candidatas para el estudio cumplían criterios de inclusión y exclusión previos a EOC. En esta primera visita en fase folicular, se actualizaron los datos de recuento folicular mediante ecografía y se practicó una extracción sanguínea para el análisis hormonal basal (FSH, LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>). Tras proporcionar información detallada del estudio a la paciente, se le propuso la participación en el mismo. En caso de aceptación, la paciente firmó el consentimiento informado y se le dio una copia de la hoja de información al paciente.

Una vez la paciente finalizó su proceso de EOC y tras evaluar definitivamente los criterios de inclusión y exclusión del ensayo, se informó a la paciente de su inclusión o no inclusión en el ensayo. Si la paciente no cumplía criterios se continuaba la inducción de la ovulación con medicación y tiempos de la práctica clínica habitual en el departamento.

### **3.4.2. Asignación de las pacientes a los grupos de estudio**

Se realizó mediante un generador de números aleatorios ([www.random.org](http://www.random.org)). Los números generados se encontraban guardados en un archivo digital al que solo tenía acceso la investigadora principal del estudio, la cual informaba al investigador vía telefónica cuando éste solicitaba aleatorizar a una paciente, para así garantizar el ocultamiento de la asignación.

### **3.4.3. Periodo del estudio**

El periodo de estudio se inició el día en el que las pacientes cumplían criterios para la inducción de ovulación según los criterios de la URHA, momento en el que fueron

aleatorizadas en uno de los 3 grupos de estudio. Los criterios de inducción fueron los siguientes:

- Desarrollo folicular adecuado (3 o más folículos  $\geq 18$  mm)
- E<sub>2</sub> sérico > 500 pg/ml.

Con el objetivo de obtener una curva del aumento de niveles plasmáticos hormonales antes de la recuperación de los ovocitos, se realizaron 3 extracciones sanguíneas a las participantes del estudio. La primera de ellas fue en la visita de inducción de la ovulación, la segunda a las 12 $\pm$ 1 hora de la inducción de la ovulación y finalmente cuando la paciente ingresó para la OPU. La LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> se cuantificaron en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe mediante el sistema de quimioluminiscencia Architect® de Abbott Diagnostics (*Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, Estados Unidos). El coeficiente de variación (CV) intra e interensayo es del 3% y 4% para la FSH, 4.6% y 5% para el E<sub>2</sub>, respectivamente. El CV total del ensayo de P<sub>4</sub> es  $\leq 10\%$  para concentraciones bajas y  $\leq 7\%$  para concentraciones medias y altas. En el caso de la LH, la precisión del ensayo fue diseñada para tener un CV total  $\leq 10\%$ .

La OPU se llevó a cabo vía transvaginal, ecoguiada, bajo sedación, y en el quirófano de FIV de la URA La Fe en el intervalo de tiempo asignado a cada grupo de investigación  $\pm 1$  hora de margen. Ésta se realizó aspirando de manera separada los folículos mayores de 16 mm y los menores de este tamaño. La duración aproximada del proceso de punción fue de 30 minutos.

Una vez en el laboratorio de embriología, en campana de flujo laminar con superficie calefactada bajo estereomicroscopio binocular, los LF fueron examinados y los complejos cúmulo-ovocitarios (COC, del inglés *cumulus-oocyte complex*) recuperados. Salvo que se especifique lo contrario, los medios de cultivo utilizados fueron los de la línea elaborada para FIV por la casa comercial MediCult® (Jyllinge, Dinamarca). Después de

lavarlos con *Flushing Medium*®, los COC se reservaron en la correspondiente placa de equilibrado, concretamente en macrogotas de *Universal IVF Medium*® bajo aceite mineral *Ovoil*® (Vitrolife, Gotemburgo, Suecia). Cada gota de cultivo en la que ovocitos o preembriones procedentes de participantes en este estudio fueron depositados, fue rotulada convenientemente para mantener su trazabilidad desde el inicio hasta la finalización del cultivo embrionario. Los líquidos foliculares se alicuotaron para su procesamiento según se describe con más detalle en el siguiente apartado "Recuperación del líquido folicular y CG".

Aproximadamente 2 h tras la OPU se procedió a la evaluación del estadio de maduración ovocitaria (MII, MI o PI). Para ello se realizó la decumulación ovocitaria, que es un proceso en dos pasos: uno enzimático y otro mecánico. Inicialmente y con la ayuda de la enzima hialuronidasa SynVitro Hydase®, se rompen los enlaces entre las CG para separarlas mecánicamente del ovocito haciéndolos pasar gradualmente por pipetas de calibre decreciente en un medio tamponado, *Flushing Medium*®. Una vez clasificados en cuanto a su estadio meiótico, los ovocitos se volvieron a colocar en *Universal IVF Medium*® y se reservaron hasta la ICSI.

La ICSI se realizó en una placa de Petri elaborada para la técnica de reproducción asistida. En ella, los ovocitos fueron colocados en gotas de *Flushing Medium*® y los espermatozoides fueron seleccionados e inmovilizados en gotas de PVP®. Una vez microinyectados, los ovocitos fueron cultivados a 37°C en una atmósfera con 6% de CO<sub>2</sub> y 85% humedad en medio de cultivo ISM1® bajo aceite mineral *Ovoil*® (Vitrolife, Gotemburgo, Suecia). La correcta fecundación fue evidenciada en D+1 por la presencia de 2 pronúcleos (2PN) y dos corpúsculos polares (2CP) entre las 16 y 18 h siguientes a la microinyección del espermatozoide (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011)

La valoración embrionaria en D+2 y D+3 de cultivo se realizó de acuerdo con la propuesta por Lucinda Veeck (Veeck, 1999) donde los preembriones son clasificados en grados del 1 al 5 en función del tamaño y simetría de las células blastómeras que los componen, y el porcentaje de fragmentación intercelular:

- Grado 1: Blastómeras de igual tamaño, ausencia de fragmentación citoplasmática.
- Grado 2: Preembrión cuyas blastómeras tienen un tamaño similar y la fragmentación corresponde a menos de un 10% del volumen embrionario.
- Grado 3: Preembrión que presenta blastómeras de diferente tamaño y fragmentación variable.
- Grado 4: Blastómeras del mismo o diferente tamaño, pero en este caso la fragmentación supone más del 10% del volumen total del preembrión.
- Grado 5: Pocas blastómeras de cualquier tamaño y fragmentación severa que ocupa más del 50% del volumen celular.

Con el fin de simplificar los datos obtenidos se suplantó cada una de las categorías descritas en cada clasificación por una letra (A, B, C o D), de forma que los preembriones de buena calidad (4cg1 o 4cg2) obtienen la máxima puntuación (A) y así sucesivamente. Los preembriones fueron clasificados en estadio de blastocisto (categorías A-D) según los criterios ASEBIR de valoración morfológica de preembriones (Grupo de Interés de Embriología, ASEBIR, 2015)

La transferencia de preembriones de buena calidad se realizó en D+2 o D+3 de desarrollo embrionario. Según los criterios clínicos de la Unidad de Reproducción, la TE se realizó siempre en ciclo fresco salvo contraindicación médica (niveles de  $P_4 > 2$  ng/mL o aspecto ecográfico del endometrio sugestivo de patrón no receptivo), en cuyo caso fueron congelados y transferidos en un ciclo diferido.

El soporte de FL se realizó mediante inyección de 1500 UI de hCG s.c. (equivalente a 60 microgramos de polvo para solución inyectable) el día de la OPU y se continuó con la administración diaria de 400 mg de progesterona micronizada vía vaginal, desde el día de la punción y hasta la realización de la prueba de embarazo. En el caso de confirmar la gestación, su administración se prolongó hasta la semana 12.

El diagnóstico de gestación se realizó mediante determinación de  $\beta$ -hCG sérica 15-20 días después de la TE y demostración de presencia de saco gestacional intrauterino con latido cardíaco por ecografía transvaginal a los 25-30 días de esta. La hormona se cuantificó en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe mediante el sistema de quimioluminiscencia Architect® de *Abbott Diagnostics (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos)* con un CV total <10%. El último control se realizó en la semana 12 de gestación, mediante llamada telefónica para comprobar la normal evolución de la gestación.

### **3.5. Recuperación del líquido folicular y células de la granulosa**

Durante la OPU, los líquidos foliculares fueron recolectados por aspiración en tubos Falcon® estériles de 14 ml (Corning, Nueva York, Estados Unidos) rotulados de acorde a los 4 grupos establecidos de folículos mayores o menores de 16 mm  $\emptyset$  de cada ovario. En campana de flujo laminar con superficie calefactada y bajo el estereomicroscopio binocular, se visualizaron por separado los líquidos foliculares correspondientes a todos los COC puncionados. En la tapa de cada placa de Petri Nunc® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) donde se había vertido el LF, se anotó el número de COC observados y su procedencia. De esta forma, se aseguró que los LF y los ovocitos que contenían pudieran ser identificados correctamente y, más tarde, a lo largo del cultivo embrionario. Si en alguna combinación de LF de folículos >16 mm procedente del ovario derecho (OD), F<16 mm del ovario derecho (Od), F>16 mm del ovario izquierdo (OI) o F<16 mm del ovario izquierdo (Oi) no se obtuvo ningún COC, no se procesó el correspondiente aspirado; sólo aquellos líquidos en los que sí hubo al menos un COC.

Para su procesamiento en columnas de gradiente de densidad, se repartió el LF recuperado en tubos *Falcon*® estériles de base cónica para centrífuga (Corning, Nueva York, Estados Unidos) adicionando el mismo volumen de muestra por cada volumen de *Hystopaque-1077*® (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) previamente atemperado. Tras el centrifugado a 500g durante 30 minutos, se obtuvieron 3 fases diferenciadas: una primera fase de color amarillento, correspondiente al LF filtrado; una fase intermedia blanquecina en la que se visualizaba un halo celular donde se encontraban las CG; y una tercera fase correspondiente al tapón hemático (Ilustración 7).

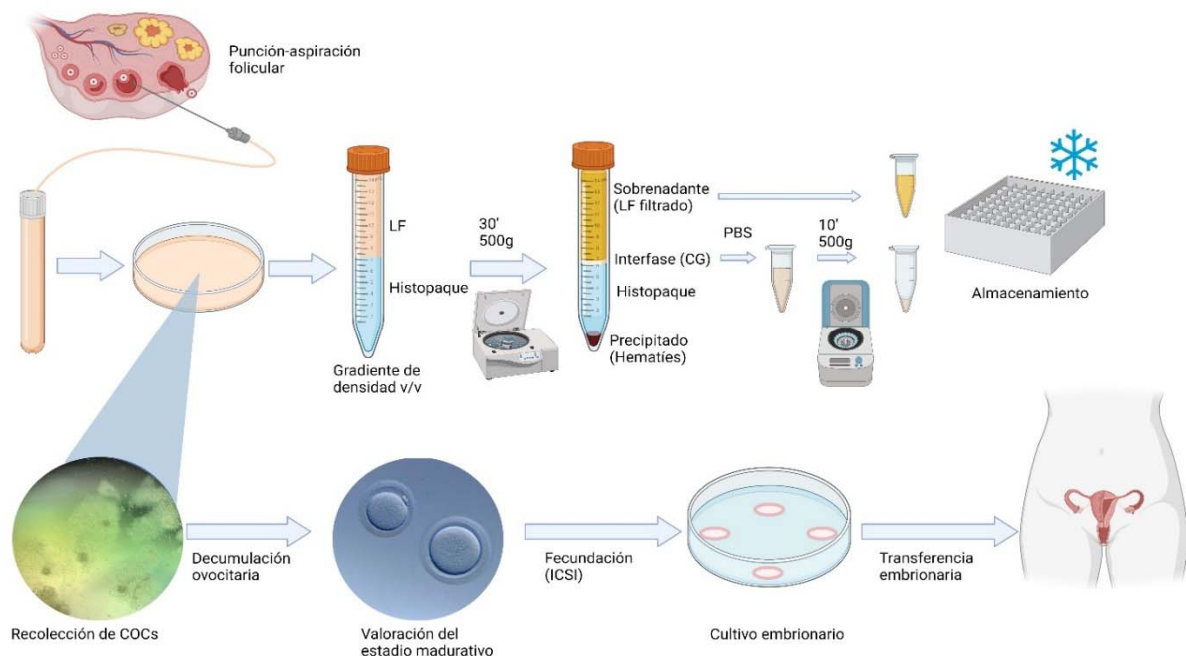
Se rotularon convenientemente 16 tubos estériles de microcentrífuga de 1,5 mL para almacenar las diferentes fases. TXXX corresponde al número asignado a la paciente:

- 3 tubos: TXXX + fecha + ODLF
- 3 tubos: TXXX + fecha + OdLF
- 3 tubos: TXXX + fecha + OILF
- 3 tubos: TXXX + fecha + OiLF
- 1 tubo: TXXX + fecha + ODCG
- 1 tubo: TXXX + fecha + OdCG
- 1 tubo: TXXX + fecha + OICG
- 1 tubo: TXXX + fecha + OiCG

A continuación, 1,5 mL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación (fase amarillenta) se transfirió a cada uno de los 3 tubos de microcentrífuga LF de cada una de las cuatro combinaciones para su almacenamiento a -20°C hasta el momento del enzimoanálisis de adsorción (ELISA, acrónimo del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Posteriormente se recuperaron las células de la interfase (el halo blanquecino) obtenidas tras la centrifugación, en cada tubo de centrífuga (CG) de cada una de las cuatro combinaciones. Se añadió a la suspensión celular tampón fosfato salino (PBS) estéril con

1% de albúmina de suero bovino (VWR International Eurolab, Barcelona, España) hasta un volumen final de 1,5 mL. Tras centrifugar los tubos de centrífuga (CG) a 500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular obtenido en el mínimo volumen posible. Este paso se realizó tantas veces como fue necesario hasta observar el medio limpio. Finalmente, se resuspendieron los agregados de forma mecánica con la ayuda de una pipeta Pasteur en PBS y las alícuotas de CG se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción y cuantificación del ARN (ácido ribonucleico).



*Ilustración 7. Procesamiento y almacenamiento del LF y CG. (Creado en Biorender. 2022)*

Tras la decumulación ovocitaria en el laboratorio de embriología, se recogió la información del estado madurativo de los COC recuperados de cada una de las 4 combinaciones. Se mantuvo en todo momento la trazabilidad de los MII de las 4 combinaciones para seguirlos a lo largo del desarrollo embrionario y destino de los preembriones (su transferencia, congelación o desecho sin ninguna utilización).

### 3.6. Selección de los genes a analizar en las células de la granulosa

Las CG son habitualmente descartadas junto con el LF tras recuperar los COC en la aspiración folicular rutinaria. Como ya se ha comentado, estas células están en estrecho contacto con el ovocito en el folículo por lo que se aislaron para identificar posibles marcadores de madurez ovocitaria complementarios a la valoración morfológica que puedan ayudar a ajustar los protocolos de EOC.

Uno de los objetivos del estudio fue determinar el tiempo necesario para lograr la maduración del ovocito tras la administración del acetato de triptorelina. Basándonos en una revisión del estado actual del conocimiento sobre genes relacionados con rutas periovulatorias activadas tras el estímulo de LH, se seleccionaron los siguientes genes: *RGS2*, *AREG*, *EREG*, *BTC*, *CYP19A1*, *UGP2*, *EFNB2* y *PHLDA1*.

### 3.7. PCR cuantitativa a tiempo real

Tras la revisión bibliográfica realizada, se puede observar que determinados genes expresados en las CG que rodean a los ovocitos parecen estar relacionados con la competencia ovocitaria y embrionaria. Es evidente suponer por ello que el perfil de expresión génica debería variar en función del estadio ovocitario, siendo diferente en ovocitos maduros o inmaduros.

Se realizó el análisis de la expresión génica por RT-qPCR (Ilustración 8) para los genes *RGS2*, *AREG*, *EREG*, *BTC*, *CYP19A1*, *UGP2*, *EFNB2*, *PHLDA1* y el gen constitutivo *18S*.

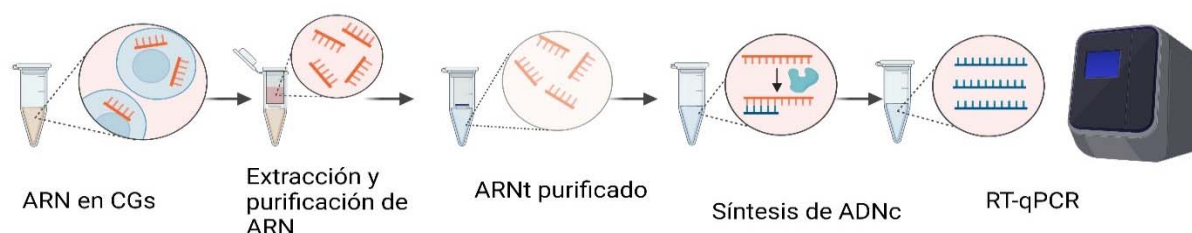


Ilustración 8. Esquema de RT-qPCR cuantitativa a tiempo real. (Creado en Biorender. 2022)



### 3.7.1. Extracción y purificación del mRNA de las CG

Para la extracción del ARN de las CG almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se empleó el kit *RNeasy® Mini* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante para células. Tras descongelar las muestras a temperatura ambiente, se realizó un lavado con PBS y se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 350  $\mu\text{l}$  de tampón RLT (tampón de lisis para lisar células y tejidos antes del aislamiento del ARN). Ayudándonos de una jeringuilla de 1 ml con aguja de 25G se facilitó la ruptura y homogeneización de las células. Para ello, se aspiró y soltó ininterrumpidamente el contenido del tubo Eppendorf® para microcentrífuga (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos).

A continuación, se añadió etanol 70% a partes iguales (1:1) al lisado celular y los 700  $\mu\text{l}$  resultantes se transfirieron a la columna *RNeasy Mini spin* incluida en el kit, que posee en su interior una membrana de sílice a la que el ARN total se une selectivamente y los componentes celulares se descartan pasando a través de ella. Encajada en un tubo de recogida de 2 ml, se centrifugó la columna a 10.000 g durante 30 segundos. En este paso, el ARN se une a la membrana y los contaminantes pasan a través de ella lavándolos de la muestra en los siguientes pasos. Tras descartar el solvente, se añadieron 700  $\mu\text{l}$  del tampón RW1 cuya función es lavar la membrana centrifugando a 10.000 g durante 30 segundos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de tampón RPE (tampón de lisis para lisar células y tejidos antes del aislamiento del ARN). Tras descartar el sobrenadante, se añadió nuevamente 500  $\mu\text{l}$  del mismo tampón y se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos para asegurar que la columna quedara seca y libre de etanol ya que éste podría interferir en futuras reacciones.

Finalmente, las columnas se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se añadió agua libre de ribonucleasas (RNasas). Las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 1 minuto para eluir el ARN.

Los tubos se mantuvieron en hielo hasta el momento de medir la concentración y pureza del ARN extraído empleando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260). La calidad del ARN extraído se determinó en base a la ratio A260/A280, considerándose valores comprendidos entre 1.7 y 2.2 como indicativos de una pureza apropiada. Una vez completado el análisis se almacenaron las muestras correctamente identificadas en condiciones de -80°C.

### 3.7.2. Síntesis del ADNc

La transcripción inversa de la PCR (RT-PCR) es una técnica variante de la PCR que permite sintetizar ADNc a partir de moléculas de ARN, usando para ello la enzima transcriptasa inversa. El ADNc obtenido es una cadena complementaria de la cadena molde de ARN.

Para este fin, se utilizó el protocolo *Prime Script® RT reagent Kit* (Takara Bio Inc., Kusatsu, Prefectura de Shiga, Japón). Tras realizar los cálculos oportunos, se añadió en tubos eppendorf de 200µl el volumen de ARN correspondiente para tener una cantidad final de 500 ng. El máximo volumen de ARN permitido por el protocolo es de 7 µl así que en aquellas muestras cuyo volumen total de ARN no se alcanzaba, se completó con agua libre de RNasas (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se añadieron 3 µl de *master mix* a cada uno de los tubos, para lograr un volumen final de 10 µl. La *master mix* es una solución concentrada con todos los componentes necesarios para la RT-PCR. Está compuesta por:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<i>5X PrimeScript Buffer</i>	2 µl
<i>PrimeScript RT Enzyme Mix</i>	0.5 µl
<i>Oligo dT Primer</i>	0.5 µl
<b>Total</b>	<b>3 µl</b>

Tabla 1. Mezcla de reacción para RT-PCR (*master mix*).

Los tubos con la mezcla de la reacción se incubaron en el termociclador siguiendo las siguientes condiciones:

- 37°C durante 15 minutos para permitir la transcripción inversa.
- 85°C durante 5 segundos para provocar la inactivación de la transcripción inversa.
- 4°C para el mantenimiento de las muestras.

Una vez finalizado el programa de la RT, se midió la concentración de ADNc en el espectrofotómetro y se realizaron los cálculos necesarios para alcanzar una concentración final de 100 ng/ $\mu$ L de ADNc, concentración ideal para realizar la PCR cuantitativa. Para ello, se diluyeron las muestras con el correspondiente volumen de agua libre de RNasas (Qiagen, Hilden, Alemania). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C.

### **3.7.3. Preparación de las muestras: elaboración de los grupos de análisis**

Ya que la finalidad del estudio fue caracterizar de forma diferencial ovocitos maduros de los inmaduros, únicamente se seleccionaron muestras en las que todos ovocitos procedentes de los folículos aspirados hubieron o no alcanzado la madurez citoplasmática. Al mismo tiempo, dado que las pacientes incluidas en el estudio se consideraban normorrespondedoras y se sometieron a una EOC exitosa, fue complicado encontrar aspirados de COC que contenían únicamente ovocitos PI y MI. Además, la cantidad de ARNm que se logra extraer habitualmente de las escasas CG encontradas en suspensión en el LF aspirado puede llegar a ser un factor limitante para su análisis. Por ello, con el objetivo de facilitar el desarrollo experimental, se decidió realizar agrupaciones de muestras de CG. El uso del *pooling* (del inglés, *pool testing*) se refiere a la mezcla (*pool*) de muestras para detección de ARN mediante RT-qPCR.

De este modo, se pusieron en común aquellas muestras de cada grupo de estudio experimental (30 y 40 h) en las que únicamente se habían encontrado ovocitos maduros (MII) o inmaduros (MI y PI), de folículos mayores o menores de 16 mm. En el grupo control (36 h) se analizaron de forma conjunta aquellas muestras en las que exclusivamente habían concurrido ovocitos MII procedentes de folículos mayores de 16 mm. Aquellos LF en los que, tras la decumulación ovocitaria, se había hallado una combinación de ovocitos maduros e inmaduros fueron excluidos del análisis.

*En resumen, se realizó un pooling de muestras en 9 subgrupos (*

Tabla 2) de las cuales se realizaron 3 réplicas analíticas para cada uno de los 10 genes estudiados en el ensayo clínico.

<b>Subgrupo</b>	<b>Código Muestra</b>
Grupo 36 h, F>16 mm, ovocitos maduros	36hF>16M
Grupo 30 h, F<16 mm, ovocitos inmaduros	30hF<16i
Grupo 30 h, F<16 mm, ovocitos maduros	30hF<16M
Grupo 30 h, F>16 mm, ovocitos inmaduros	30hF>16i
Grupo 30 h, F>16 mm, ovocitos maduros	30hF>16M
Grupo 40 h, F<16 mm, ovocitos inmaduros	40hF<16i
Grupo 40 h, F<16 mm, ovocitos maduros	40hF<16M
Grupo 40 h, F>16 mm, ovocitos inmaduros	40hF>16i
Grupo 40 h, F>16 mm, ovocitos maduros	40hF>16M
Grupo 40 h, F>16 mm, ovocitos maduros	40hF>16M

*Tabla 2. Leyenda de códigos de las agrupaciones de muestras.*

Para la obtención de los subgrupos de análisis, se realizaron los cálculos correspondientes, añadiendo la misma cantidad de muestra por cada paciente, que fue de 100 ng/μl ADNc, hasta completar un volumen total de 120 μl por *pool*.

### 3.7.4. RT-qPCR

El análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real es una variante de la PCR donde se amplifica y cuantifica de forma simultánea el ADN, o en nuestro caso, ADNc. Se utilizó el Taqman Gene Expression Master Mix® (Referencia 4369514; Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y sondas Taqman® (Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos) para los genes detallados en la Tabla 3.

<b>Gen</b>	<b>Referencia</b>
<i>AREG</i>	Hs00950669_m1
<i>EREG</i>	Hs00914313_m1
<i>BTC</i>	Hs01101201_m1
<i>ADAMTS9</i>	Hs00172025_m1
<i>EFNB2</i>	Hs00187950_m1
<i>CYP19A1</i>	Hs00903411_m1
<i>UGP2</i>	Hs00198879_m1
<i>RGS2</i>	Hs00180054_m1
<i>PHLDA1</i>	Hs00378285_g1
<i>18S</i>	Hs99999901_s1

Tabla 3. Referencias de las sondas utilizadas en la RT-qPCR.

Las mezclas de *master mix* para PCR de cada gen se prepararon con la sonda Taqman® correspondiente al 20X. Las muestras se amplificaron empleando el *Applied*

*Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System*® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) añadiendo 9  $\mu$ L de *master mix* y 1 $\mu$ L de muestra por triplicado. Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de precalentamiento a 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 min para la activación de la enzima polimerasa. A continuación, se realizaron 45 ciclos consistentes en una separación de ácidos nucleicos de doble cadena durante 15 segundos a 95°C y una extensión de 1 min a 60°C.

Los controles negativos fueron aquellos formados por el mastermix (los cebadores de cada gen) y H<sub>2</sub>O.

### **3.7.5. Expresión génica diferencial**

La expresión diferencial de los genes se calculó mediante el método valor de cambio (*fc*, del inglés *fold-change*) normalizando los resultados con respecto al gen constitutivo 18S con el objetivo de determinar cambios en la expresión de los genes diana y si estaban up o downregulados en los distintos grupos de ovulación.

Puesto que se partió de agrupaciones de muestras para realizar la RT-qPCR, resultó imposible aplicar análisis estadísticos de gran complejidad. Por ello, se empleó el análisis descriptivo para determinar, junto con el *fc*, qué genes mostraban una expresión diferencial. Con el fin de determinar el correcto funcionamiento de la qPCR y analizar la posible variabilidad en el procedimiento de carga de las placas, se calculó el CV. Este cálculo se llevó a cabo ya que en ambas placas se utilizó el gen 18S como gen *housekeeping*. Por este motivo se realizó un cómputo de CV de los datos que se obtuvieron de la PCR sobre el umbral de ciclo *Ct*, (del inglés "*cycle threshold*"). El *Ct*, es el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo y hace referencia al número de ciclos en un ensayo de RT-PCR necesario para amplificar el ARN. El CV ha sido calculado como el cociente entre la desviación estándar/media del *Ct* para cada una de las muestras.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Mean}_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct \text{ Mean}_{\text{muestra control} \oplus} \text{ del mismo gen}$$

$$fc = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$fc \text{ corregido} = -1/fc$$

La muestra de referencia es el control  $\oplus$ , que corresponde al grupo cuya OPU se realizó a las 36 h de la administración de acetato de triptorelina. Frente al resultado de este grupo de análisis, es decir, el grupo 36 h en el que se aspiraron folículos mayores de 16 mm y que fueron maduros tras la decumulación ovocitaria; se normalizó y comparó la expresión de los genes del resto de grupos analizados.

Se consideró que un gen presentaba una variación significativa cuando el valor de  $fc$  era  $\geq 2$  genes significativamente sobreexpresados o  $fc \leq -2$  (genes downregulados), aunque también se tuvieron en cuenta aquellos resultados que, sin ser estadísticamente significativos, muestran una tendencia al alza o baja siendo su  $fc \geq 1.5$  o  $\leq -1.5$  (McCarthy & Smyth, 2009); (Livak & Schmittgen, 2001); (Dalman et al., 2012).

### 3.8. ELISA en LF

Para determinar la relación entre distintos factores solubles, el grado de madurez ovocitaria y su competencia reproductiva; se analizó mediante ELISA la concentración de AREG, EREG, BTC, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y testosterona (T). La técnica ELISA es un método de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado en un pocillo se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, en nuestro caso un cambio de color. De igual manera que se realizó al analizar las muestras para la RT-qPCR, en las 9 agrupaciones de muestras se realizaron 2 réplicas analíticas para cada uno de los 7 factores analizados por ELISA.

Inicialmente se testaron kits de las diferentes casas comerciales para determinar la dilución a aplicar. Para ello se realizaron diluciones: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 y 1:10000.

Una vez conocida la dilución a aplicar en cada factor, se siguió el protocolo del fabricante (Tabla 4). Se añadieron 100 µL de cada estándar y las muestras de LF a una microplaca de 96 pocillos recubiertos con los antígenos a analizar. Tras incubar la placa a temperatura ambiente (TA) durante 2 h, se realizaron tres lavados y se añadió un anticuerpo secundario policlonal específico para el factor soluble de interés conjugado con peroxidasa, realizando una incubación a TA durante 2 h. A continuación, se lavaron los pocillos y se añadió una solución sustrato con peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina, incubando la placa durante 30 min en ausencia de luz. La reacción colorimétrica se detuvo con una solución de ácido sulfúrico 2N.

<b>Ensayo</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
E <sub>2</sub>	Abnova, Taipéi, Taiwán	KA2535	1:1000
P <sub>4</sub>	Abnova, Taipéi, Taiwán	KA0299	1:30000
T	Cusabio, Houston, TX, Estados Unidos	CSB-E05096h	Sin diluir
AREG	Cloud-Clone Corp., Houston, TX, Estados Unidos	SEA006Hu	1:10
EREG	Abbexa, Cambridge, Reino Unido	Abx574701	1:10
BTC	Fine Test, Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, China	EH0044	1:2

*Tabla 4. Referencias de los kits empleados y las diluciones realizadas para el ensayo*

Finalmente, se midió la absorbancia de los pocillos a 450 nm mediante el espectrofotómetro *SPECTRAMax PLUS 384* (Molecular Devices, San José, CA, USA). La concentración de cada muestra se calculó extrapolando el valor de absorbancia obtenido en la curva patrón. Cada muestra de LF, así como cada estándar, se ensayó por duplicado, calculándose posteriormente la media de los duplicados y expresándose los resultados en



pg/mL. En la Tabla 5 se indica el límite de detección (LOD, del inglés Limit of detection) y las variaciones intra e interensayo de cada uno de los kits.

<b>Factor soluble</b>	<b>LOD</b>	<b>Variación intraensayo</b>	<b>Variación interensayo</b>
E <sub>2</sub>	15.6 pg/mL	5%	10.6%
P <sub>4</sub>	15.62 pg/mL	6%	6%
T	7.5 pg/mL	<15%	<15%
EREG	15.62 pg/mL	≤ 6.0%	≤ 10.5%
AREG	15.62 pg/mL	<10%	<12%
BTC	15.62 pg/mL	<8%	<10%

*Tabla 5. LOD y variaciones intra e interensayo de cada uno de los ensayos de ELISA realizados.*

### **3.9. Análisis estadístico**

El tamaño muestral fue inicialmente calculado mediante el paquete estadístico R versión 2.15.2. Deseando un poder estadístico del 80%, un nivel de confianza del 95% y basándonos en la bibliografía existente respecto a la variabilidad y cantidad en el número de ovocitos maduros, el tamaño muestral necesario para demostrar un aumento de al menos 3 ovocitos MII entre los 3 grupos sería de 40 por grupo de tratamiento (120 en total). En el caso de tener que asumir un 10% de pérdidas sería de 44 por grupo (132 en total).

La información de las variables del estudio se recogió en el CRD diseñado específicamente para este estudio. Una vez finalizado el periodo de investigación, se llevó a cabo la digitalización de datos para el posterior análisis de estos.

El analista de datos es ciego respecto a la intervención asignada a cada brazo. El análisis estadístico se ha realizado con el software estadístico R v4.0.3. Las variables cuantitativas que siguen una distribución normal se expresan como media y desviación

estándar y las variables no normales como mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se expresan en valores absolutos, porcentajes y sus IC95%. Las diferencias observadas se consideran estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ . La comparación entre grupos de variables cuantitativas se realiza mediante la prueba de t-Student o U-Mann según proceda. La comparación de las variables categóricas, mediante la prueba de Chi-cuadrado o Fisher según proceda. Además, se plantearán modelos ANOVA para el comparativo de variables continuas entre variables categóricas de 3 o más categorías. Se plantearán modelos de regresión logística binaria o modelos de regresión lineal dependiendo del tipo de variable que sea la variable dependiente. Se valorarán siempre las condiciones de aplicabilidad de los modelos.

# Resultados



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características de las pacientes

Se revisaron las historias clínicas de aquellas pacientes incluidas en la lista de espera para FIV/ICSI en la Unidad de Reproducción Asistida (URA) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Tras valorar los criterios de inclusión y exclusión en una primera visita presencial, 147 pacientes aceptaron participar en el estudio. Las razones por las que 21 pacientes no fueron finalmente aleatorizadas para participar en el ensayo clínico se detallan en la Ilustración 9. Estas pacientes continuaron la inducción de la ovulación con medicación y tiempos de la práctica clínica habitual en el departamento y quedaron registradas en el listado de candidatas, pero no fueron incluidas en la base de datos del estudio.

Las 126 pacientes que terminaron la EOC fueron aleatorizadas en los 3 bloques de investigación: 30 h (n=42), 36 h (n= 43) y 40 h (n=41). Por las razones explicadas en el flujo de trabajo del estudio, 3 pacientes fueron excluidas tras ser aleatorizadas y no completaron el estudio. Un total de 123 pacientes fueron incluidas en el estudio completo.

De las pacientes incluidas en el estudio, para los cálculos estadísticos de este manuscrito, se tuvieron en cuenta únicamente los valores basales como resultados de tratamientos de FIV procedentes aquellas participantes en las que se pudo completar el análisis molecular de los fluidos recolectados en la OPU. Fueron excluidas de este subestudio aquellas pacientes en las que:

- No se aspiraron durante la punción los folículos mayores y menores de 16 mm de forma separada como dicta el protocolo del estudio.
- Las muestras no cumplieron los criterios de selección (véase el apartado 3.7.3. Preparación de las muestras: elaboración de los grupos de análisis) por lo que se excluyó a la paciente del subestudio.
- Las muestras no cumplieron la pureza aceptable para el análisis de RT-qPCR

De este modo, el número final de participantes en este subestudio fue 66, repartidas en los grupos 30 h (n=20; 30.3%), 36 h (n= 25; 37.88%) y 40 h (n=21; 31.82%).

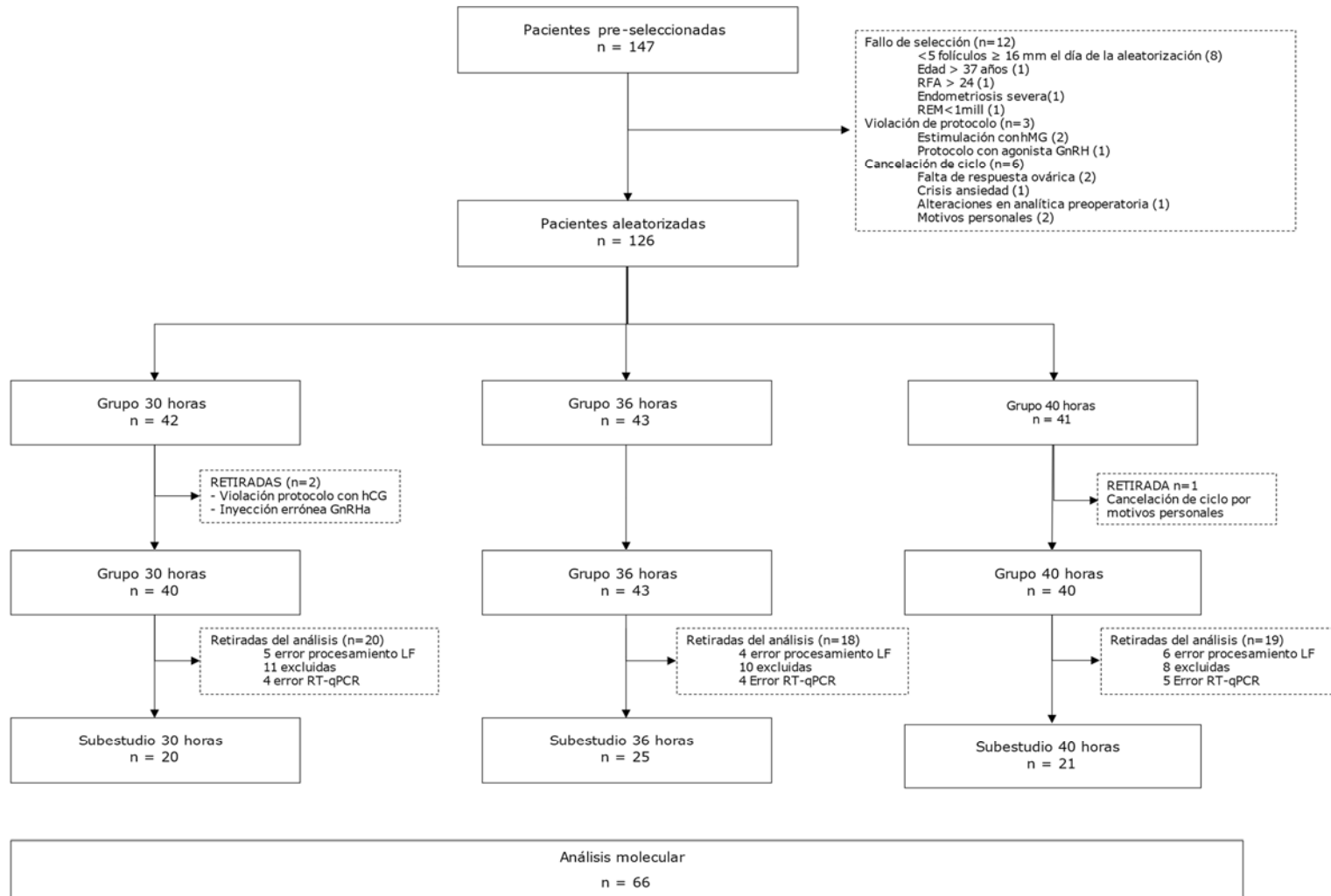


Ilustración 9. Flujo de trabajo del ensayo clínico. Paso de las pacientes a través de las diferentes fases del estudio hasta alcanzar el total de 66 pacientes que completaron el análisis molecular en los diferentes grupos de estudio.

La media de edad de las pacientes fue de  $32.89 \pm 2.84$  años, y su IMC  $22.91 \pm 2.74$  Kg/m<sup>2</sup> (

Tabla 6). Las parejas aportaban un seminograma previo con un diagnóstico de ausencia de factor masculino severo, imprescindible para poder ser reclutadas en el estudio. En el reclutamiento, las parejas presentaban una media de 3 años de infertilidad y no habían realizado ciclos de FIV con anterioridad. En la primera visita de control, previo al inicio del estudio, las pacientes presentaban en la ecografía basal para el RFA de  $14.94 \pm 3.75$  folículos, un valor sérico de AMH de  $18.8 \pm 1.6$  pM y FSH pituitaria  $6.4 \pm 1.37$  IU/L.

La EOC tuvo una duración media de  $10.9 \pm 1.6$  días y la dosis inicial de coriolfolitropina  $\alpha$  y la dosis adicional de gonadotrofinas administrada a las pacientes fue  $135.61 \pm 22.81$   $\mu$ g y  $939.6 \pm 508.6$  UI respectivamente, similar en todos los grupos. En el momento de la inducción de la ovulación, la extracción sanguínea practicada a las pacientes evidenció unos valores hormonales de  $2004.3 \pm 873.1$  pg/mL de E2,  $1.2 \pm 0.9$  ng/mL de P4 y  $0.5 \pm 0.9$  UI/L de LH sin evidenciarse diferencias estadísticas entre los grupos. En proporción al RFA, hubo un porcentaje medio de folículos mayores de 16 mm tras la EOC del 70%.

	Grupo 30 h (n=20)	Grupo control 36 h (n=25)	Grupo 40 h (n=21)	p-valor
<b>Edad de la paciente (años)</b>	33.50 (32.75-35.00)	32.00 (30.00-34.00)	33.00 (31.00-35.00)	0.114
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	22.44 (20.45-23.75)	23.34 (21.34-23.74)	23.18 (20.83-25.78)	0.567
<b>Etiología de la esterilidad</b>				
<i>Idiopática</i>	15 (75%)	17 (68%)	17 (81%)	0.103
<i>Factor tubárico</i>	2 (10%)	8 (32%)	2 (10%)	0.3
<i>Anovulación</i>	2 (10%)	0 (0%)	1 (5%)	0.286
<i>Factor masculino</i>	1 (5%)	0 (0%)	1 (5%)	0.515
<b>Tiempo de esterilidad (años)</b>	3.00 (2.00-4.00)	3.00 (2.00-4.00)	3.00 (2.00-4.00)	0.792

<b>REM (millones de espermatozoides)</b>	29.75 (13.35-63.38)	13.20 (8.00-34.00)	25.20 (11.25-49.50)	0.258
<b>RFA inicial total</b>	15.00 (12.00-16.00)	14.00 (11.00-15.00)	17.00 (13.50-19.00)	0.063
<b>FSH basal (UI/L)</b>	6.40 (5.40-7.00)	6.40 (5.80-8.00)	6.40 (5.10-7.10)	0.770
<b>Dosis inicial de coriofolitropina <math>\alpha</math> (<math>\mu</math>g)</b>	150.00 (100.00-150.00)	150.00 (150.00-150.00)	150.00 (100.00-150.00)	0.105
<b>Dosis adicional de gonadotropinas (UI)</b>	812.50 (587.50-956.25)	825.00 (450.00-1500.00)	825.00 (450.00-1350.00)	0.663
<b>Grosor endometrial (mm)</b>	10.50 (9.75-11.00)	10.00 (8.00-11.00)	10.00 (9.00-11.50)	0.767
<b>Duración de la estimulación (días)</b>	11.00 (10.00-12.00)	11.00 (10.00-12.00)	11.00 (9.00-13.00)	0.948
<b>Foliculometría el día de aleatorización</b>				
<b>F&lt;10 mm</b>	0(0-4.2)	0(0-1)	1(0-2)	0.144
<b>F 10-13mm</b>	4(2-5.2)	4(2-5)	3(2-6)	0.965
<b>F 14-15mm</b>	4(2-6)	4(3-5)	5(3-7)	0.607
<b>F&gt;16 mm</b>	9.5(7-13)	10(8-12)	10(7-13)	0.944
<b>Total</b>	20(13.7-27.2)	19(15-24)	20[16-24]	0.714
<b>Ratio F&gt;16 mm/RFA (%)</b>	66.73 (49.17-81.39)	73.33 (52.17-88.24)	60.00 (53.26-79.64)	0.402

Tabla 6. Características de las pacientes. Los datos se expresan como mediana y entre paréntesis IQR. IMC: Índice de masa corporal; REM: Recuento de espermatozoides móviles; RFA: Recuento de folículos antrales; F: Folículos.

#### 4.2. Niveles hormonales séricos

Las concentraciones medias séricas de E2, LH y P4 antes y después del desencadenamiento de la ovulación (en el momento de la aleatorización, 12h; y 30 h, 36 h o 40 h según el intervalo asignado para la OPU) se encuentran recogidas en la

Tabla 7.

	Grupo 30 h (n=20)	Grupo 36 h control (n=25)	Grupo 40 h (n=21)	p-valor
<b>E<sub>2</sub> aleatorización (pg/mL)</b>	1525.00 (1102.50-2584.50)	1756.00 (1406.00-2533.00)	1957.00 (1608.00-2946.00)	0.382
<b>P<sub>4</sub> aleatorización (ng/mL)</b>	1.05 (0.70-1.69)	0.84 (0.56-1.20)	1.00 (0.77-1.78)	0.235



<b>LH aleatorización (UI/L)</b>	0.10 (0.08-0.65)	0.20 (0.05-0.55)	0.15 (0.10-0.30)	0.243
<b>E<sub>2</sub> 12 h (pg/mL)</b>	1627.50 (1174.25-2406.00)	2108.50 (1618.75-2497.75)	2223.00 (1848.00-3570.00)	0.155
<b>P<sub>4</sub> 12 h (ng/mL)</b>	9.49 (6.57-13.93)	9.34 (6.84-12.07)	10.91 (7.28-14.27)	0.771
<b>LH 12 h (UI/L)</b>	38.60 (32.70-43.85)	34.60 (25.50-42.70)	34.80 (22.20-41.97)	0.376
<b>E<sub>2</sub> OPU (pg/mL)</b>	825.00 (606.00-1324.00)	771.00 (650.25-884.00)	872.00 (731.50-1000.00)	0.390
<b>P<sub>4</sub> OPU (ng/mL)</b>	11.68 (7.16-15.32)	8.39 a (6.60-10.79)	12.57 a (10.80-17.34)	0.038
<b>LH OPU (UI/L)</b>	4.80 (3.00-5.60)	2.55 b (2.08-3.62)	1.70 b (1.30-3.00)	0.005

*Tabla 7. Concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub>, LH y P<sub>4</sub> para cada intervalo ensayado monitorizadas a diferentes tiempos durante el periodo de estudio. Los datos se expresan como mediana y entre paréntesis IQR. (a) p=0.012; (b) p=0.05.*

La media de los valores plasmáticos de E<sub>2</sub> es similar en los 3 grupos: las curvas experimentaron inicialmente un ligero ascenso para, tras el estímulo ovulatorio de LH, terminar descendiendo hasta la OPU donde los valores fueron mínimos.

Se observó un aumento endógeno de LH en todos los grupos pasadas 12 h tras la administración de acetato de triptorelina (Ilustración 10). Los valores medios de todas las pacientes ascendieron para volver a los valores basales el día de la OPU.

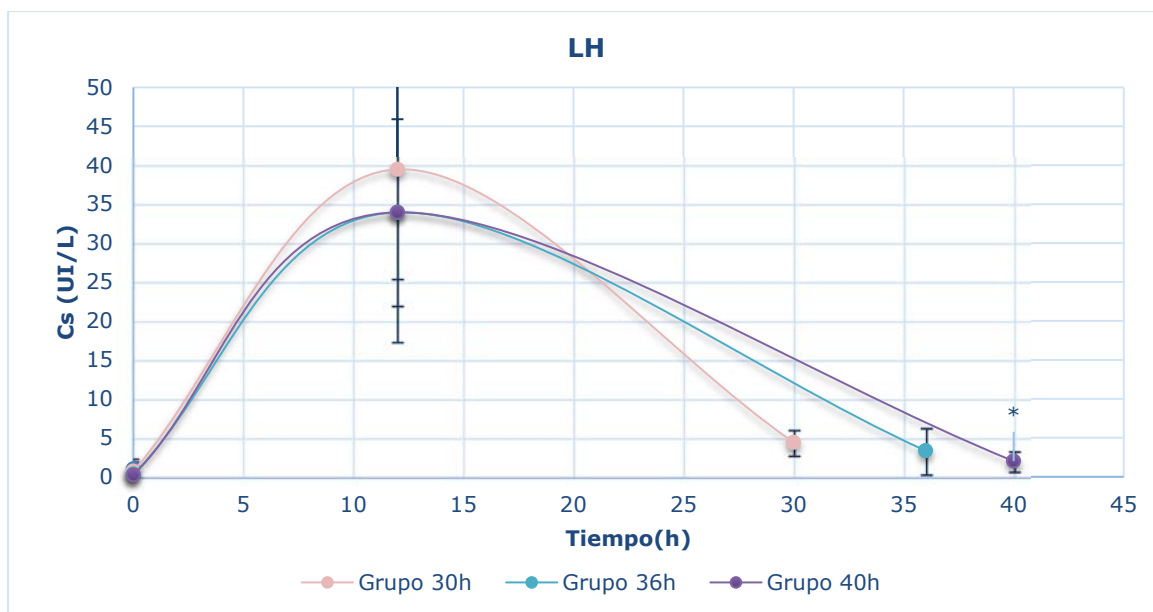


Ilustración 10. Concentraciones plasmáticas medias  $\pm$ DS de LH. (\*)  $p=0.05$

Los niveles hormonales circulantes de P<sub>4</sub> incrementaron rápidamente tras la administración de la medicación en estudio y finalmente alcanzaron niveles con tendencia estacionaria entre las 12 h y la OPU (Ilustración 11).

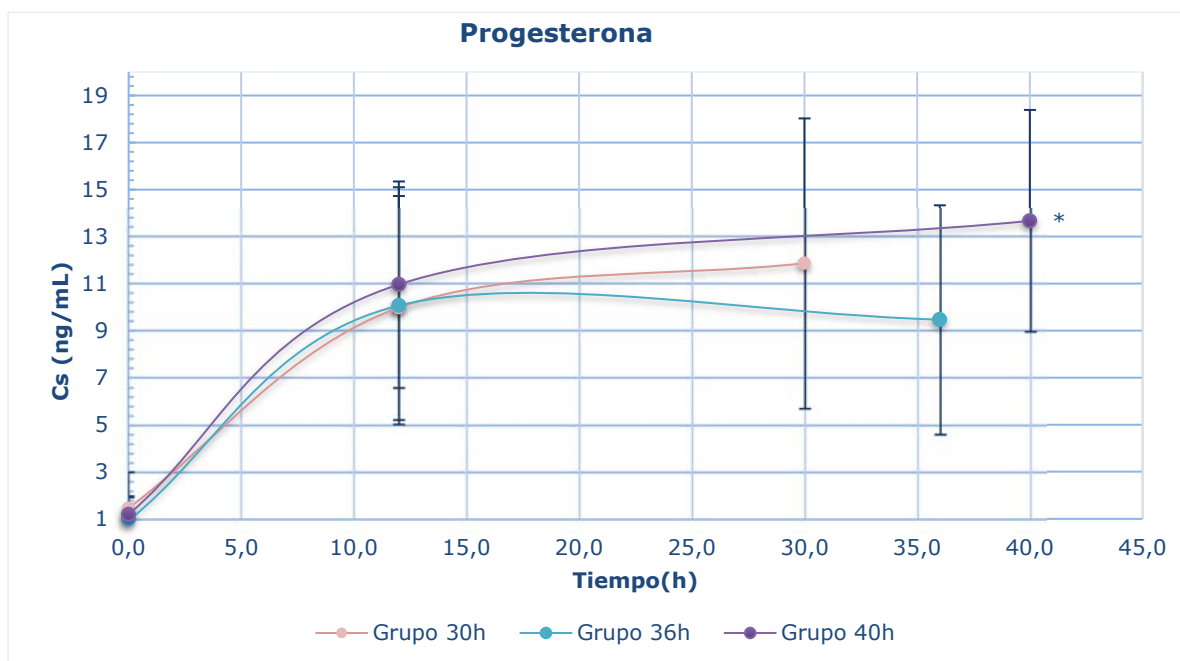


Ilustración 11. Concentraciones plasmáticas medias  $\pm$ DS de P<sub>4</sub>. (\*)  $p=0.012$ .

Se plantearon modelos lineales para ver si había relación entre los valores basales hormonales antes de la GnRH y 12h post. Se usaron como variables dependientes LH y P4 a las 12 h y como variables independientes el valor de LH y P4 en el momento de la aleatorización. También se plantearon modelos lineales para ver si había relación entre los valores hormonales obtenidos para los diferentes grupos y el número de ovocitos maduros o inmaduros recuperados en los tratamientos de FIV. Como variables dependientes se establecieron el nº de MII, MI y PI. Como variables independientes se tomaron los resultados de las diferentes concentraciones plasmáticas de LH y P4 tomadas en el momento de la aleatorización, 12 h y en la OPU. No se encontró ninguna una relación predictiva para los parámetros analizados.

### 4.3. Tratamientos de FIV

Los resultados reproductivos en los diferentes grupos de pacientes de detallan en la Tabla 8. En la punción folicular de las participantes del estudio, se aspiró una media de  $15.53 \pm 5.76$  folículos siendo  $10.24 \pm 4.13$  folículos mayores de 16 mm.

	<b>Grupo 30 h</b> <b>n = 20</b>	<b>Grupo control 36</b> <b>h</b> <b>n = 25</b>	<b>Grupo 40 h</b> <b>n = 21</b>	<b>P-valor</b>
<b>Ovocitos totales</b>	8.50 a (6.75-10.25)	12.00 a (7.00-16.00)	10.00 (8.00-11.00)	0.082
<b>Ovocitos MII</b>	7.00 b (4.50-9.00)	10.00 b (6.00-14.00)	7.00 (3.00-9.00)	0.066
<b>Ovocitos MI</b>	0.00 (0.00-1.00)	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-2.00)	0.302
<b>Ovocitos PI</b>	0.00 (0.00-1.00)	1.00 (0.00-1.00)	1.00 (0.00-3.00)	0.228
<b>Ovocitos anómalos</b>	0.50 (0.00-1.00)	0.00 (0.00-2.00)	0.00 (0.00-1.00)	0.851
<b>Ovocitos MII/F&gt;16mm (%)</b>	57.27 (45.83-91.03)	100.00 (66.67-154.55)	70.00 (50.00-90.00)	0.292
<b>Ovocitos MII/ovocitos totales (%)</b>	80.00 (61.88-100.00)	85.71 c (78.26-90.91)	71.43 c (56.25-88.89)	0.114

## Resultados

<b>Fecundación normal (%)</b>	75.00 (66.67-88.19)	75.00 (50.00-80.00)	71.43 (57.14-90.00)	0.945
<b>Degeneración post ICSI (%)</b>	0.00 d (0.00-0.00)	9.09 d (0.00-16.67)	0.00 (0.00-20.00)	0.048
<b>Calidad embrionaria (n):</b>				
A	1.7 (1.2)	1.4 (2.0)	1.4 (1.7)	0.790
B	0.5 (0.7)	1.0 (0.9)	0.5 (0.8)	0.093
C	0.8 (1.0)	0.9 (0.9) e	0.3 (0.5) e	0.083
D	3.6 (1.6)	3.0 (2.7)	3.2 (3.5)	0.761
<b>Preembriones utilizados (%)</b>	45.00 (33.33-59.52)	50.00 (33.33-68.75)	50.00 (17.14-92.86)	0.529
<b>Preembriones criopreservados por ciclo (%)</b>	0.00 (0.00-22.62)	25.00 (0.00-33.33)	14.29 (0.00-53.57)	0.439

Tabla 8. Resultados reproductivos tras los tratamientos de FIV. Los datos se expresan como mediana y entre paréntesis IQR. Los datos de calidad embrionaria se expresan como media (DS). (a)  $p=0.027$ ; (b)  $p=0.032$ ; (c)  $p=0.042$ ; (d)  $p=0.018$ ; (e)  $p=0.032$ . F: folículos.

El número total de ovocitos recuperados fue significativamente menor en el grupo 30 h respecto al grupo control. También se obtuvo un menor número de ovocitos maduros en el grupo 30 h frente al grupo control, pero sin diferencias en el número de ovocitos inmaduros o anómalos procedentes de folículos que estuvieron expuestos el menor tiempo a la medicación.

La tasa de recuperación de MII respecto al total de ovocitos obtenidos (ovocitos MII/ovocitos totales), es el grupo 40h el que tuvo un porcentaje menor de gametos maduros.

El porcentaje de fecundación normal refleja la proporción de cigotos normales que pueden generarse a partir de todos los ovocitos maduros obtenidos. En los 3 grupos se generaron de forma similar cigotos normales a partir de los ovocitos maduros obtenidos. Sin embargo, el grupo 30h fue en el que más ovocitos se mantuvieron intactos después de haber sido microinyectados. La tasa de degeneración se calculó teniendo en cuenta el

número de ovocitos degenerados en D+1 / el número de ovocitos microinyectados en D+0 teniendo el grupo 30 h la menor tasa de degeneración post-ICSI.

Otra de las variables que afecta al resultado final de los ciclos de FIV es la proporción de preembriones evolutivos que por sus características han tenido la calidad suficiente para ser utilizados en fresco o criopreservados. A pesar de tener un número comparable de cigotos normales, el grupo control es aquel con el mayor porcentaje de preembriones transferidos y/o congelados y el grupo 30 h el de menor sin ser la diferencia estadísticamente significativa. A modo informativo, los 3 grupos presentaron una distribución parecida de preembriones en cuanto a su calidad embrionaria, únicamente el grupo 40h tuvo un número medio menor de preembriones tipo C que el grupo control.

Quisimos analizar si existía una relación entre el tamaño folicular (mayor o menor de 16 mm) y la calidad posterior de los preembriones destinados para la transferencia intrauterina. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 9).

	<b>Calidad A</b>	<b>Calidad B</b>	<b>Calidad C</b>	<b>P-valor</b>
<b>Folículos &gt; 16 mm</b>	18 (48.65%)	10 (27.03%)	9 (24.32%)	0.951
<b>Folículos &lt; 16 mm</b>	10 (52.63%)	5 (26.32%)	4 (21.05%)	

*Tabla 9. Relación entre tamaño folicular y calidad embrionaria.*

#### **4.4. Análisis de las células de la granulosa**

##### **4.4.1. Número de muestras**

Durante el periodo de estudio se congelaron 344 muestras pertenecientes a 79 pacientes. Una vez terminados los tratamientos de FIV y establecida la presencia de ovocitos maduros e inmaduros en las diferentes alícuotas de CG criopreservadas, 173 muestras que cumplían los criterios fueron seleccionadas inicialmente para el análisis. De ellas, 51 fueron excluidas por baja concentración de ARNm (cociente A260/A280 > 5). La mínima concentración hallada en una de las muestras fue 2,6 ng/μl.

Una vez realizada la RT, se eliminaron del estudio 6 muestras por sospecha de contaminación al tener un cociente A260/A280 <1.7. También se excluyó del procedimiento de RT-qPCR 1 alícuota al presentar una baja concentración de ADNc y otra por presentar un cociente >2.2. Un total de 114 muestras relativas a 66 pacientes fueron incluidas finalmente en el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR (Tabla 10).

Subgrupo	n muestras
30hF<16i	4
30hF<16M	14
30hF>16i	3
30hF>16M	27
36hF>16M	28
40hF<16i	6
40hF<16M	12
40hF>16i	1
40hF>16M	19

Tabla 10. Número final de muestras por cada subgrupo de análisis.

#### 4.4.2. Análisis de la expresión génica

Los resultados obtenidos en la RT-qPCR se expresaron en función las horas transcurridas desde el desencadenamiento de la ovulación hasta la OPU, el estadio de madurez ovocitaria (reinicio de la segunda meiosis) y la expansión del *cumulus oophorus* (tamaño folicular mayor o menor de 16 mm).

El grupo de 30 h muestra una menor expresión de los genes relacionados con las funciones biológicas implicadas en la ovulación respecto a la referencia. En contraposición, la mayoría de estos genes se encuentran sobreexpresados en el grupo 40 h. Además, aquellos grupos cuyos ovocitos fueron inmaduros muestran una downregulación de los genes, especialmente significativa en los de 30 h (30F<16i y 30hF<16M).

	30hF<16i	30hF>16i	36hF>16M	40hF<16i	40hF>16i
<i>ADAMTS9</i>	-5.15	-3.37	1.00	-1.37	1.27
<i>AREG</i>	-8.59	-2.44	1.00	-1.37	2.56
<i>BTC</i>	-4.42	-4.55	1.00	-1.13	1.07
<i>CYP19A1</i>	-3.33	-2.78	1.00	2.01	-3.75
<i>EFNB2</i>	-1.06	-1.07	1.00	1.14	1.63
<i>EREG</i>	-13.41	-6.35	1.00	-3.10	2.50
<i>PHLDA1</i>	-4.34	-4.05	1.00	-1.05	1.88
<i>RGS2</i>	-1.44	-1.24	1.00	-1.18	2.69
<i>UGP2</i>	-5.13	-6.81	1.00	1.79	1.84

Tabla 11. Resultados de *fc* corregido de los genes incluidos en el estudio para las agrupaciones de muestras en las que se hallaron ovocitos inmaduros. En verde  $fc \geq 2$ , en rojo  $fc \leq -2$  y en amarillo  $fc \geq 1.5$  o  $\leq -1.5$ . F: Folículos; i: ovocitos inmaduros.

	30hF<16M	30hF>16M	36hF>16M	40hF<16M	40hF>16M
<i>ADAMTS9</i>	-4.53	-1.79	1.00	-1.81	1.17
<i>AREG</i>	-8.31	-3.32	1.00	1.31	1.05
<i>BTC</i>	-3.68	-1.93	1.00	1.04	1.02
<i>CYP19A1</i>	-2.48	-1.09	1.00	1.84	1.92
<i>EFNB2</i>	-1.87	2.45	1.00	-1.26	-1.41
<i>EREG</i>	-8.63	-4.80	1.00	1.21	-1.32
<i>PHLDA1</i>	-4.72	-1.91	1.00	-1.12	-1.33
<i>RGS2</i>	-2.01	1.15	1.00	1.22	-1.20
<i>UGP2</i>	-5.26	-2.03	1.00	-1.09	-1.09

Tabla 12. Resultados de *fc* corregido de los genes incluidos en el estudio para cada una de las agrupaciones de muestras en las que se hallaron ovocitos maduros. En verde  $fc \geq 2$ , en rojo  $fc \leq -2$  y en amarillo  $fc \geq 1.5$  o  $\leq -1.5$ . F: Folículos; M: ovocitos maduros

Si analizamos los resultados en función del estadio madurativo de los ovocitos en el grupo 30 h vemos una tendencia a la sobreexpresión de los ovocitos maduros en los genes *ADAMTS9*, *BTC*, *PHLDA1* y una variación significativa del gen *EFNB2* ( $fc=2.45$ ). En el grupo 40 h, vemos una expresión diferencial esta vez en los ovocitos inmaduros. En aquellos que proceden de folículos pequeños se observa una sobreexpresión de *CYP19A1* ( $fc=2.01$ ) y una tendencia al alza de *UGP2* ( $fc=1.79$ ) mientras que *EREG* se expresa en menor medida ( $fc=-3.10$ ). En los ovocitos inmaduros que fueron aspirados de folículos mayores de 16 mm encontramos una sobreexpresión de *AREG* ( $fc=2.56$ ), *EREG* ( $fc=2,50$ )

y *RGS2* (fc=2.69); aunque también cierta tendencia sin estar significativamente sobreexpresados los genes *EFNB2*, *PHLDA1* y *UGP2*. A la inversa de lo observado en folículos pequeños, en este grupo se observó una menor expresión del gen *CYP19A1* (fc=3.75).

#### **4.5. Análisis del líquido folicular**

Quisimos estudiar la importancia de los mecanismos autocrinos y paracrinos de determinados factores solubles secretados fluido que rodea al ovocito durante los tratamientos de FIV. Según la hora de la OPU, 344 muestras fueron seleccionadas y agrupadas según la hora de OPU para el análisis mediante ELISA. La media de los valores obtenidos  $\pm$  DS se muestran en la Tabla 13 y se resumen a continuación:

- Se halló el nivel de E2 significativamente más bajo en 36h que en 40 h
- Los valores de P4 significativamente reducidos en 36 h que en 30 y 40, y así como en 40 h respecto al grupo 30 h.
- La T más alta en el grupo de 30h que en los grupos 36 h y 40 h.
- AREG se encontró disminuida en el grupo 30 h cuando se compara con el grupo 40h.
- El nivel de BTC en el grupo 36 h se encuentra más baja que en 30 h y 40 h.



<b>Grupo</b>	<b>30h (n=29)</b>	<b>36 h (n=30)</b>	<b>40h (n=20)</b>	<b>p-valor</b>
<b>E<sub>2</sub> (pg/mL)</b>	248078.25 ± 85996.48	214451.00 ± 87096.44a	297156.75 ± 118965.68a	0.0145
<b>P<sub>4</sub> (pg/mL)</b>	6977850.00 ± 519226.17 b, c	3165442.50 ± 2384653.16 b, d	4569660.00 ± 2316881.95 c, d	0.0000
<b>T (pg/mL)</b>	841.68 ± 106.41 e, f	660.01 ± 108.02 e	615.32 ± 258.02 f	0.0000
<b>AREG (pg/mL)</b>	18.14 ± 3.68 g	35.65 ± 39.31	44.47 ± 28.39 g	0.0050
<b>EREG (pg/mL)</b>	957.05 ± 137.81	1100.54 ± 354.14	925.68 ± 237.48	N.S.; 0.0385
<b>BTC (pg/mL)</b>	1248.74 ± 1367.22 h	92.57 ± 22.18h i	805.22 ± 1180.07 i	0.0002

Tabla 13. Niveles medios ± DS de los distintos factores solubles analizados en el LF. (a)  $p=0.0103$ ; (b)  $p=0.0000$ ; (c)  $p=0.0001$ ; (d)  $p=0.0330$ ; (e)  $p=0.0001$ ; (f)  $p=0.0000$ ; (g)  $p=0.0055$ ; (h)  $p=0.0001$ ; (i)  $p=0.0462$ .



# Discusión



## 5. DISCUSIÓN

Los GnRHa y la hCG han demostrado ser igualmente eficaces en la activación de la cascada de intermediarios de la maduración final ovocitaria que ocurre tras el estímulo ovulatorio. No obstante, su mecanismo de acción y por tanto los perfiles hormonales hallados tras el estímulo de los dos fármacos son muy diferentes por lo que inicialmente se postuló que el tiempo más adecuado para programar la OPU podría no ser 36 h como ampliamente se ha pautado en los tratamientos de FIV.

El presente trabajo se ha centrado en el ensayo de diferentes tiempos entre la inyección de acetato de triptorelina y la OPU con la finalidad de aumentar la recuperación de ovocitos MII en los tratamientos de FIV. Para ello, se administró la medicación en intervalos de 30 y 40 horas comparando los resultados obtenidos con el tiempo habitual de administración de hCG en la práctica clínica, es decir, las 36 h. Paralelamente, se realizaron extracciones sanguíneas para monitorizar el cambio en los niveles plasmáticos hormonales de las pacientes y finalmente estudiamos marcadores moleculares no invasivos de madurez ovocitaria mediante PCR y ELISA.

En nuestro estudio se obtuvieron menos ovocitos y en concreto, un número menor de ovocitos maduros en el grupo de 30h respecto al de 36 h. En un estudio publicado en 2001, 533 pacientes fueron aleatorizadas en grupos con intervalos diferentes de tiempo entre 33-35 horas, 36-37 horas y 38-41 horas desde la administración de la hCG y hasta la punción folicular para investigar si los diferentes tiempos podían tener efectos sobre los ovocitos, la fecundación o los resultados de los ciclos de FIV. No se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos en cuanto al número de ovocitos, sin embargo, existió una tendencia al alza en cuanto a madurez ovocitaria y tasa de embarazo clínico cuando se superaban las 38 horas y no se registraron ovulaciones espontáneas hasta las 41 horas analizadas (Nargund et al., 2001). Raziel et al., en un estudio randomizado, prolongaron el tiempo entre la administración de hCG y la aspiración folicular en segundos ciclos de pacientes en las que previamente se había obtenido un número más bajo de MII al

esperado. Alargando ese tiempo de 38,5 a 40 horas frente a las habituales 34,5 a 36 horas, lograron obtener un mayor porcentaje de ovocitos maduros, mejores tasas de implantación y embarazo (Raziel et al., 2006). Mansour et al. aleatorizaron a 90 pacientes en 3 grupos (punción a las 35, 36 y 37 horas de la administración de la hCG). En este estudio, al igual que hallamos en el nuestro, sí que se demostraron diferencias significativas y aquellas pacientes en las que se realizó la punción antes de las 36 horas tuvieron un número inferior de ovocitos maduros (Mansour et al., 1994).

En nuestro estudio, el grupo 36 h parece presentar una tendencia a las mejores tasas de recuperación ovocitaria que los otros grupos de estudio. Últimamente y aunque de manera retrospectiva, ha sido estudiado el intervalo de la inducción de la ovulación en diferentes protocolos de estimulación ovárica. Shen y colaboradores han observado que la proporción de ovocitos MII está influenciada en los diferentes protocolos por el intervalo de tiempo hasta la aspiración folicular, teniendo cada uno de ellos un intervalo óptimo en el que se logra obtener más de un 80% de ovocitos en estadio MII pero en el caso del ciclo con antagonistas, el intervalo óptimo se encontró entre 34.5 - 36.3 h, sin diferencias en los tres métodos empleados para provocar la ovulación (GnRH $\alpha$ , hCG o doble trigger con GnRH $\alpha$  y hCG) (Shen et al., 2020). Weiss y col. tampoco encontraron una asociación significativa entre el protocolo de estimulación ovárica (largo, corto, estimulación suave o GnRHant) ni el inductor de la ovulación (hCG o GnRH $\alpha$ ) y la proporción de ovocitos MII obtenidos (Weiss et al., 2014). En aquellas pacientes en las que la ovulación se desencadenó con GnRH $\alpha$ , la proporción de ovocitos MII fue aumentando hasta las 35 horas y se estabilizó al llegar al intervalo de las 38 horas. En vista a estas observaciones, recientemente, el mismo grupo de investigadores ha publicado un nuevo artículo en el que, aunque de nuevo de forma retrospectiva, se analizaron con más detalle aquellos resultados procedentes de las mujeres sometidas a tratamiento con un protocolo de GnRHant y GnRH $\alpha$  para inducir la ovulación. Las 220 pacientes incluidas en este nuevo estudio se dividieron en 4 grupos: 34, 35, 36 y  $\geq$  37 horas desde la administración del agonista. Existe la misma proporción de ovocitos MII en todos los grupos por lo que

aparentemente, el retraso en la aspiración folicular no ofrecería ninguna ventaja. Sin embargo, sí se observaron diferencias sobre la tasa de recién nacido vivo (RNV) por preembrión transferido concluyendo los autores que sería necesario realizar un estudio prospectivo y con un mayor número de participantes (Herskop et al., 2021). En vista a estos resultados, hay un intervalo de tiempo óptimo que afecta a la madurez citoplasmática y nuclear de los ovocitos aspirados, pero no se han observado grandes diferencias en cuanto a los resultados obstétricos por lo que otros factores están influenciando el desarrollo y la implantación embrionaria. Todos estos resultados apoyan los hallados en nuestro estudio ya que alargar el intervalo de acetato de triptorelina no ha supuesto una mejora significativa en cuanto al número de ovocitos maduros pero el acortamiento de este intervalo sí ha desfavorecido a las pacientes en cuanto al número de ovocitos MII cuando se compara con el grupo 36 h.

La recuperación de ovocitos maduros es esencial para el buen resultado de las TRA. Se considera que 6 ovocitos MII es un número mínimo aceptable y que la probabilidad de conseguir embarazo no varía con el número de ovocitos recuperados siempre y cuando la paciente pueda llegar a someterse a una transferencia embrionaria (McAvey et al., 2011); (Yoldemir & Fraser, 2010). Un punto a favor de nuestro estudio en comparación con otros es que el método de fecundación elegido para todos los ovocitos recuperados fue la ICSI. Esto permitió establecer con exactitud el estadio de maduración ovocitaria de todos los COC hallados tras la decumulación ovocitaria para el cálculo de las tasas de recuperación ovocitaria. Las tasas de recuperación de ovocitos maduros son indicadores de monitorización de la inducción de la ovulación y la OPU. Se ha reportado que alrededor de 85% de los ovocitos recuperados en el laboratorio de embriología son maduros y, por tanto, pueden utilizarse en las TRA (Cha & Chian, 1998). El grupo 40 h obtuvo una menor proporción de MII seleccionados para ICSI frente al total de ovocitos recuperados que el grupo 36 h. Hay un único estudio del intervalo de tiempo en el que también se usó un protocolo de EOC con antagonistas y administrando GnRHa para provocar la ovulación. En este análisis retrospectivo estos autores observaron que el grupo 36 h tuvo un número

mayor de ovocitos MII que el grupo 35 h pero que alargar la exposición al fármaco no incrementó la tasa de madurez (Hershkop et al., 2021). La posible explicación de nuestra menor proporción de ovocitos MII aptos para ICSI en el grupo en el que se prolongó la exposición a desencadenantes de la ovulación podría explicarse en un contexto parecido al de la hipótesis formulada por Dozortsev y Diamond sobre los folículos desvanecientes y los ovocitos post-maduros. En el artículo explican el fenómeno de luteinización espontánea (Dozortsev & Diamond, 2020). En esta anomalía, las células de la granulosa luteinizadas pierden su integridad estructural con lo que puede llegar a producirse la rotura folicular, observándose a su vez un aumento precoz de los valores plasmáticos de progesterona. En aquellos casos en los que el folículo no llega a romperse y liberar su contenido, es común recuperar en la OPU ovocitos post-maduros con un aspecto degenerado caracterizado por un espacio perivitelino aumentado y granuloso, CP fragmentado, inclusiones citoplasmáticas, etc. (Veeck, 1999). En el grupo de pacientes de las 40 h se observó un aumento de P4 sérica post-ovulatoria mayor que en los otros grupos en el momento de la OPU por lo que este microambiente podría haber afectado negativamente a la integridad estructural de los folículos. También se recuperó un número menor de ovocitos MII respecto a los folículos mayores de 16 mm medidos el día de la inducción de la ovulación que el resto de los grupos, lo que indica que los folículos de mayor tamaño podrían haber eclosionado en el ovario antes de la OPU. Podríamos suponer que, alargando el tiempo de estímulo de la LH en los folículos, todos ellos tendrían tiempo para completar la meiosis I y progresar en la meiosis II obteniendo un mayor porcentaje de ovocitos MII. En otros estudios del intervalo ovulatorio con hCG se estableció un límite seguro máximo de 39 horas para mejorar la madurez in vivo de los ovocitos sin producirse ovulaciones espontáneas y observaron el primer colapso de un folículo las 39 h y 30 min (Gudmundsson et al., 1990), pero se ha llegado a extender el intervalo hasta las 41 h tras la administración de hCG (Nargund et al., 2001).

Las hormonas se filtran desde el plasma sanguíneo a través de los capilares de la teca ejerciendo su acción sobre el folículo. Con el propósito de establecer un marcador



bioquímico predictivo de madurez ovocitaria antes de la OPU, en nuestro estudio quisimos analizar la relación entre los valores plasmáticos hormonales tomados en diferentes momentos de LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> y el número de ovocitos maduros.

La administración de la hCG tras el desarrollo multifolicular conduce a la formación de múltiples cuerpos lúteos que son mantenidos con el paso de los días por el efecto suprafisiológico de la hCG. Sabemos que el efecto LH de hCG se mantiene constante durante más de una semana, sin embargo, con el empleo de GnRHa la supresión hipofisaria que se desencadena tras el efecto Flare-up produce una caída de los niveles circulatorios de LH de manera que se produce una función anormal de los cuerpos lúteos existentes. Se ha descrito una producción de P<sub>4</sub> y de estrógenos significativamente menor en los ciclos con GnRHa vs los ciclos con hCG (Itskovitz et al., 1991). En resumen, la corta duración del pico de LH, asociado con la inhibición hipofisaria y los menores niveles de esteroides conducen a un insuficiente soporte de LH que finaliza en una luteolisis precoz.

La LH es uno de los principales estímulos ovulatorios por lo que es indispensable que esta se una a su receptor situado en las CG que rodean al ovocito. En un ovario sometido a una EOC, los folículos en crecimiento se encuentran en diferentes estadios de maduración y es por ello por lo que la proporción de ovocitos MII recuperados no siempre es la esperada. En esta asincronía folicular, aquellos en una fase de crecimiento menos avanzado podrían necesitar un estímulo más prolongado de LH para poder avanzar en la meiosis desde el estadio de MI hasta MII. Fauser y col. observaron que en las pacientes en las que se empleó triptorelina o leuprolide se producía un rápido ascenso de la LH, que alcanzaba su pico máximo a las 4 h de la administración, volviendo a su estado basal en el día de la aspiración folicular (Fauser et al., 2002). A pesar de que los niveles máximos de LH se alcanzan 4 h tras la administración del análogo, un intervalo de tiempo más corto entre la administración del GnRHa y la aspiración folicular podría ser insuficiente para optimizar la maduración folicular. En nuestro estudio, el grupo de pacientes 30h, la curva

todavía se encontraba en un momento menos avanzado de la fase de descenso en el momento de la OPU, mientras que las pacientes del grupo 36 h y 40 h ya estaban en una etapa más cercana al estado basal. Esto unido a un número significativamente menor de ovocitos en general y también en el caso de la cohorte de MII en el grupo 30h, apunta que algunos de los folículos podrían haberse beneficiado de una exposición más prolongada a la LH. Este hallazgo confirma que, a pesar de haberse encontrado ovocitos maduros en todos los grupos, el tiempo necesario para que se produzca la maduración final de los ovocitos se encuentra perfectamente sincronizado.

Chen y colaboradores evaluaron los niveles de LH, FSH y P4 que se alcanzaban tras 12 horas de inducción de la ovulación con GnRHa. Subdividieron las pacientes en grupos según los niveles de LH alcanzados 12 h tras la administración del GnRHa triptorelina. Determinaron que aquellas pacientes en las que el pico de LH no había alcanzado concentraciones superiores a las 15 UI/L tenían una reducción significativa en el número de ovocitos recuperados. Sin embargo, estas diferencias no se reflejaron en el número de ovocitos maduros, tasa de fecundación, calidad embrionaria, en tasa de implantación ni gestación. Por lo ello, los autores postularon que niveles inferiores a 15 UI/L de LH podrían condicionar menores tasas de maduración, pero los niveles de LH no parecen afectar al posterior desarrollo de la gestación. Hay que tener en cuenta que las 91 pacientes incluidas en el estudio fueron pacientes con alto riesgo de sufrir SHO: pacientes con SOP o aquellas que habían tenido una hiper-respuesta a gonadotrofinas anteriormente; por lo que los resultados podrían no ser extrapolables al resto de pacientes que se someten a TRA (Chen et al., 2012). Otros autores no observaron esta relación (Abbara et al., 2020); (Dunne et al., 2018). Nosotros no observamos esta asociación ya que, en nuestro estudio, valores séricos de LH antes o después de la administración de acetato de triptorelina no fueron predictivos del estadio de maduración ovocitaria.

El grupo 30 h tuvo un menor porcentaje de ovocitos maduros recuperados, pero estos degeneraron en menor proporción tras la ICSI. La degeneración post-ICSI es un indicador de calidad del laboratorio de embriología. ASEBIR considera un porcentaje aceptable de degeneración ovocitaria por debajo de 9% (Iglesias Nuñez et al., 2021) pudiendo variar del 5 al 19% (Ebner et al., 2001). La micromanipulación de ovocitos conlleva un largo aprendizaje y años de experiencia para su perfeccionamiento, pero, pasado este periodo de entrenamiento y al ser una técnica claramente invasiva, la calidad ovocitaria va a condicionar el éxito de la TRA (Dumoulin et al., 2001). No hubo diferencias significativas entre la calidad de los preembriones obtenidos en los diferentes grupos a excepción de una disminución significativa de embriones de calidad C en el grupo 40 h. La valoración morfológica embrionaria es subjetiva por lo es común que diferentes observadores asignen calificaciones no concordantes, sobre todo en la zona intermedia de calidad como los embriones tipo B y C (Bruna Catalán et al., 2005).

En cuanto al LF de las pacientes sometidas a FIV, Inoue et al. encontraron que la concentración de AREG era significativamente menor en ovocitos con tasas más altas de fecundación (Inoue et al., 2009). Por el contrario, Zamah y colaboradores observaron un aumento de AREG en el LF de ovocitos maduros y, además; los niveles más bajos de AREG fueron detectados en aquellos folículos en los que se encontraron ovocitos en estadio de PI u ovocitos que dieron lugar a una fecundación anómala (Zamah et al., 2010). Al realizar agrupaciones de muestras en nuestro estudio no ha sido posible determinar los valores de AREG en los cigotos anómalos pero los resultados sí coinciden con una menor concentración en el grupo 30 h, en el que se observa una tendencia a la obtención de un mayor número de ovocitos inmaduros. Además, en este mismo estudio el LF de 5 pacientes también fue extraído antes de desencadenar la ovulación y los niveles de AREG fueron indetectables, demostrando que la síntesis ocurre tras el estímulo ovulatorio.

Las concentraciones hormonales en LF varían durante el desarrollo folicular por lo que no se ha establecido un consenso en cuanto a niveles de referencia, de hecho, los

resultados entre los diferentes estudios son a menudo contradictorios. Los niveles de E<sub>2</sub> fueron significativamente más bajos en el grupo 36 h que en el grupo 40 h, donde se observó una tendencia a una menor recuperación de ovocitos. Esta tendencia se ha observado anteriormente, ya que mayores concentraciones de E<sub>2</sub> se han relacionado negativamente con la recuperación ovocitaria (Rosen et al., 2009). Al contrario de lo que ocurre con el E<sub>2</sub>, altas concentraciones de andrógenos sí están asociadas con una mala calidad ovocitaria y atresia (Hillier & Tetsuka, 1997); (Liu, T. et al., 2015) pero no lo hemos podido relacionar con nuestro estudio, ya que el grupo 30 h, el que mostró una menor tasa de degeneración post-ICSI tuvo un valor de T más alta que los otros grupos. También hay una concentración de P<sub>4</sub> por la que los ovocitos se ven beneficiados en su desarrollo y calidad, aunque se han relacionado altas concentraciones de P<sub>4</sub> asociadas a ovocitos postmaduros que tras fecundación dieron lugar a preembriones multipronucleares (Revelli et al., 2009).

La posible explicación de los resultados conflictivos presentados por diferentes autores podrían ser los distintos protocolos de estimulación ovárica o de inducción de la ovulación empleados en cada estudio, así como la elaboración de pools como ocurre en nuestro caso. Liu y colaboradores hallaron diferencias significativas entre las concentraciones de AREG en LF de varios protocolos de estimulación ovárica relacionándolas con el número de ovocitos recuperados, preembriones generados y traduciéndose en última instancia con la tasa de gestación acumulada (Liu, N. et al., 2012). Se ha visto también que la composición hormonal del LF varía si se utiliza hCG o GnRHa para desencadenar la ovulación. En concreto, la concentración de P<sub>4</sub> es mucho mayor en pacientes a las que se les administra hCG, pero las concentraciones de andrógenos y estrógenos se mantienen constantes (Andersen et al., 2006).

En conclusión, hay un rango hormonal intrafolicular óptimo que va a permitir una correcta regulación de la madurez ovocitaria y su capacidad de desarrollo posterior. Fuera de esas concentraciones deseadas, un desequilibrio endocrino tiene un efecto patogénico

en la función ovárica como se ha podido evidenciar en pacientes infértiles que padecen síndrome de ovario poliquístico o endometriosis (Teissier et al., 2000); (Wang, J. et al., 2012).

Una limitación de este estudio es que, debido al proceso de selección de muestras para su análisis, el número final de las mismas se redujo significativamente y hubo que realizar un *pooling* para los grupos de estudio. Inicialmente, por la necesidad de seleccionar solamente aquellos líquidos foliculares en los que se habían recolectado únicamente ovocitos maduros o inmaduros. Pero, por otro lado, en el proceso de aislamiento de las CG, el factor limitante es la cantidad inicial de material biológico (Ferrero et al., 2012). Una alta tasa de apoptosis en CG se ha relacionado con una mayor proporción de folículos vacíos, una baja tasa de recuperación y mala calidad ovocitarias (Fan, Y. et al., 2019)(Fan et al., 2019). Durante el procesamiento de las células en nuestro estudio muchas veces se evidenció una fina o ausente interfase celular, sobre todo en aquellas alícuotas de LF que contenían ovocitos inmaduros. Muchas muestras resultaron en una extracción y purificación incorrecta de ARN o finalmente fueron eliminadas del estudio al presentar una baja concentración de ADNc antes de la RT-qPCR. Este es el caso de los grupos de folículos inmaduros del intervalo 30h. Como ya se ha postulado, estos ovocitos y sus células debían estar firmemente arraigados en el ovario así que en aquellos casos en los que se recuperaron gametos por aspiración, se hallaron pocas CG en suspensión o no se logró extraer de ellas una cantidad suficiente de ARN. Por el contrario, en el grupo 40h fue complicado hallar ovocitos inmaduros, sobre todo en los folículos de mayor diámetro por lo que el subgrupo 40 h F>16 mm estuvo compuesto únicamente por una muestra, así que los resultados obtenidos no deben ser considerados de gran representatividad biológica.

En la maduración final ovocitaria ocurren transformaciones tanto a nivel nuclear como citoplasmático, por lo que la continuación de la meiosis en los ovocitos PI con la extrusión del primer corpúsculo polar no es el único determinante de su capacidad para

ser fecundado. Una correcta sincronía entre la madurez nuclear y citoplasmática permitirá que, tras la entrada del espermatozoide, el ovocito MII sea capaz de completar la segunda división meiótica. Durante años, se ha intentado valorar y predecir la competencia ovocitaria del ovocito MII por su morfología con resultados heterogéneos. Diversos parámetros como la vacuolización, el espacio perivitelino aumentado o la granulosidad central han sido estudiados, pero ninguno de ellos establece una relación directa con su aptitud reproductiva. Únicamente cuando estos presentan alteraciones aberrantes deberían considerarse variaciones no fenotípicas de la normalidad (Grupo de Interés de Embriología, ASEBIR, 2015). Debido a su escaso valor predictivo, ha habido una creciente búsqueda de otras herramientas que puedan complementar la valoración morfológica ovocitaria como la metabolómica, el consumo de oxígeno o la expresión génica de CG (Rienzi et al., 2012). En la práctica clínica, cualquier método diagnóstico o de selección debe ser idealmente no invasivo; máxime cuando se trata de una célula tan valiosa como es un ovocito. En consecuencia, otro de nuestros objetivos fue identificar marcadores de competencia ovocitaria analizando su entorno somático. Numerosos autores han demostrado que, debido a la estrecha relación que se produce entre la célula sexual y el ambiente que lo rodea, este es reflejo de su capacidad reproductiva. El análisis del ambiente ovocitario permitirá conocer mejor la fisiología de los cambios necesarios para que un ovocito sea competente a escala reproductiva, es decir, que sea capaz de madurar, fecundar y desarrollarse hasta conseguir un recién nacido vivo sano (Li et al., 2008). Una vez establecida la normalidad, podríamos ser capaces de detectar anomalías genéticas de una forma no invasiva.

Los ovocitos inmaduros se encuentran firmemente anclados a la pared del folículo en desarrollo en estrecho contacto con su entorno somático para establecer una buena comunicación bidireccional. Gracias al colágeno y los proteoglicanos, a medida que el ovocito madura, el folículo altera su configuración estructural para permitir la liberación de este al oviducto. En aquellos folículos que no han completado su maduración los ovocitos deberían encontrarse fuertemente anclados a la pared folicular, protegidos por

las células foliculares. *ADAMTS9*, gen que codifica una proteasa que interviene en el crecimiento y eclosión del folículo y anteriormente relacionada con un correcto desenlace ovulatorio (Huang, X. et al., 2013); (Wissing et al., 2014); se encontró downregulado en todos los subgrupos 30h, coincidiendo con una menor recuperación de ovocitos en este grupo. *UGP2* es otro gen relacionado con la arquitectura del folículo que se encontró menos expresado en el grupo 30h. La *UGP2* es una enzima involucrada en la síntesis de HA y a través de sus receptores CD44 inhibe la apoptosis en las CG. Este efecto es todavía mayor en las CC ya que éstas tienen una mayor densidad de receptores para el HA, incluso la presencia de CD44 en LF se ha relacionado con una mejor calidad embrionaria (Kaneko et al., 2000) (Ohta et al., 2001). *PHDLA1* actúa reprimiendo la PKB, afectando a la supervivencia celular y la proliferación de tumores. Su presencia en CG inducida por el estímulo ovulatorio podría estar relacionada con la regulación estrecha de la apoptosis al tener la capacidad de inhibir el crecimiento y/o inducir la muerte celular (Chen, Y. et al., 2018). Hamel y sus colaboradores identificaron los genes *PHLDA1* y *UGP2* como marcadores de buen pronóstico en el desarrollo embrionario y su competencia. Tras comprobar que la expresión diferencial de estos genes estaba relacionada con la probabilidad de conseguir un embarazo, propusieron utilizarlos como un método complementario a la selección morfológica de preembriones (Hamel et al., 2010).

El gen *EFNB2* es el único que se encontró regulado al alza en los folículos de mayor tamaño que dieron lugar a ovocitos maduros del grupo 30h. *EFNB2* también ha sido detectado durante la formación del cuerpo lúteo en folículos humanos preovulatorios, en CG de pacientes sometidas a TRA. En otros estudios la expresión de este gen se detectó rápidamente tras la subida de LH dando lugar a la hipótesis de que las CG podrían comunicarse con las células vasculares endoteliales mediante el sistema efrinaB-Eph-R para inducir angiogénesis (Egawa et al., 2003); (Xu et al., 2006). De hecho, se ha demostrado que bloqueando *EFNB2* se logra inhibir la organización vascular y la migración celular, estudiando los anticuerpos anti-*EFNB2* como agente antiangiogénico en terapia contra el cáncer (Abéngozar et al., 2012). Wathlet y colaboradores identificaron al gen

*EFNB2* como un marcador común en preembriones con altas probabilidades de implantar especulando que un aumento en la vascularización celular podría mejorar los resultados reproductivos (Wathlet et al., 2012).

RGS2 se encarga de modular la respuesta celular al estímulo de LH-R pudiendo desactivarla si fuera necesario sincronizar la maduración ovocitaria con la luteinización temprana del folículo, que podría sabotear la adquisición de la competencia ovocitaria. Las RGS son capaces de regular la señal de las proteínas G y, por tanto, al estímulo de LH-R por medio de dos mecanismos. En primer lugar, las RGS estimulan la actividad GTPasa de la subunidad activa  $G\alpha$ -GTP reduciendo su vida útil y por tanto finalizando la señalización antes de tiempo. Por otra parte, también pueden unirse a la subunidad  $G\alpha$  y antagonizar la activación, evitando que se produzca la señal (Doupnik et al., 1997); (Hepler et al., 1997). En nuestro estudio, la expresión de *RGS2* se ha visto disminuida en folículos de menor tamaño a las 30h tras la inducción de la ovulación en las CG tras el estímulo de LH en línea con estudios de otros autores realizados en ratas (Ujioka et al., 2000), ratones y humanos (Wu et al., 2008).

El LH-R está relacionado con la activación de la cascada de señalización de EGF de dos maneras diferentes. Por una parte, con un mecanismo todavía desconocido, la unión del ligando al GPCR resulta en una señal intracelular que activa la acción de metaloproteasas transmembrana, liberando al espacio extracelular la forma biodisponible de ligandos de tipo EGF (Prenzel et al., 1999). El GPCR también es capaz de activar de forma indirecta a los EGF-R (también llamados ErbB o HER) promoviendo la fosforilación del dominio intracelular del receptor, activándolo sin tan siquiera necesitar la unión del agonista (Yarden & Sliwkowski, 2001). ErbB es un receptor de la superficie celular con actividad tirosina quinasa ampliamente estudiado en la cascada de señalización de la maduración final del ovocito. ErbB1, es uno de los cuatro tipos junto a ErbB2, ErbB3 y ErbB4. Todos ellos han sido detectados en el ovario tras la estimulación con hCG. AREG se une de forma específica a ErbB1 mientras que EREG y BTC son también capaces de



unirse a ErbB4 (Citri & Yarden, 2006). El hecho de que varios ligandos puedan unirse a al receptor proporciona redundancia y por tanto robustez a la cascada de señalización, asegurando la transducción. En el ovario EGF-R activa varias rutas de señalización, entre ellas Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 (Holbro & Hynes, 2004); (Panigone et al., 2008) también llamada MAPK3/1, que son capaces de translocarse al núcleo de la célula para modular la transcripción de genes) y fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/AKT) (Chen, J. et al., 2013) cuya función es amplificar la señal, aumentando la síntesis de más ligandos tipo EGF en las CM y CC. En un principio, la activación de la cascada de la ovulación se produce de manera suave, por lo que se hipotetiza que podría haber un reservorio de ligandos del tipo EGF que no dependería de la síntesis de novo y a medida que se sintetizan nuevos ligandos en las células somáticas la señal se intensifica (Panigone et al., 2008). AREG, EREG y BTC; genes ampliamente estudiados y caracterizados en la cascada de señalización celular de la ovulación tras el estímulo ovulatorio (Zamah et al., 2010); (Wissing et al., 2014), se encontraron igualmente downregulados en las CG de los folículos en el grupo 30h y con una tendencia a la sobreexpresión en el grupo 40h. La excepción en el subgrupo 40h son los folículos pequeños de los cuales se obtuvieron ovocitos inmaduros, donde el gen EREG presentó de forma significativa una menor expresión. Una disminución de la expresión de EREG también se ha encontrado en pacientes con hiper-respuesta a la medicación a las que también se les administró GnRHa (Fuchs Weizman et al., 2019).

*CYP19A1*, el gen que codifica la aromatasa es uno de los genes cuya expresión se ha encontrado disminuida tras el estímulo ovulatorio de hCG provocando un cambio desde el ambiente estrogénico al progestagénico (Andric & Ascoli, 2006). Este efecto fue también demostrado por Fan y colaboradores en CG de ratones KO *Erk1<sup>-/-</sup>* y *Erk2<sup>gc<sup>-/-</sup></sup>* en los que al haber una afectación en la ruta de señalización celular ERK1/2, los folículos preovulatorios presentaban ausencia de CL y la expresión de *CYP19A1* era más elevada que en ratones no modificados genéticamente (Fan, H. et al., 2009). En la misma trayectoria que el resto de los genes analizados, la expresión génica de *CYP19A1* se encontró down-regulada en las células foliculares del grupo 30h y con una predisposición o significativamente

sobreexpresados en el grupo 40 h. Estos resultados son contrarios de lo que podría esperarse en vista a los resultados de otros estudios, donde los GnRHa suelen resultar en una luteolisis temprana por lo que *CYP19A1* se encuentra downregulado (Wissing et al., 2014). Este efecto podría explicarse porque diferentes estimulaciones ováricas son capaces de provocar un cambio en la expresión génica de CG según el tipo de paciente (con baja respuesta ovárica, normo-respondedoras o con alta respuesta a la medicación), afectando a la competencia ovocitaria y la funcionalidad del cuerpo lúteo (Grøndahl et al., 2009). Además, cada fármaco inductor de ovulación altera la transcriptómica de las CG de forma heterogénea (Fuchs Weizman et al., 2019) por lo que los resultados obtenidos en este estudio sólo podrían ser trasladados a pacientes normo-respondedoras, y un mismo protocolo de EOC y de inducción de la ovulación.

Debido a las limitaciones observadas, habría sido más adecuado realizar este subestudio de análisis molecular con un mayor número de participantes, en las que se analizaran cada uno de sus ovocitos por separado para poder tener una información más precisa acerca de los marcadores no invasivos de competencia ovocitaria y del posterior desarrollo embrionario. Considerando el alto coste económico y social que los TRA suponen para las parejas con esterilidad como para el sistema sanitario, la utilización de estos marcadores para el estudio de la expresión génica y factores secretados podría ayudar a optimizar los resultados clínicos con diferentes protocolos farmacológicos de estimulación ovárica. En este caso, en los que se induce la maduración ovocitaria con acetato de triptorelina, con el objetivo final de reducir el número de preembriones transferidos a las pacientes sin alterar las tasas de gestación.

# Conclusiones



## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son:

1. El acortamiento del intervalo de tiempo entre la administración de acetato de triptorelina y la recuperación ovocitaria provoca una disminución en el número de ovocitos maduros respecto a las 36 horas.
2. El alargamiento del intervalo de tiempo hasta las 40 horas no supuso una mejora en la recuperación de ovocitos maduros frente a las 36 horas.
3. El menor intervalo tras la administración de acetato de triptorelina mostró una menor expresión de los genes relacionados con las funciones biológicas implicadas en la ovulación respecto a la referencia.
4. La expresión de los genes relacionados con la maduración ovocitaria es mayor en las células de la granulosa que fueron recogidas de folículos puncionados a las 40h tras la administración del acetato de triptorelina.
5. Existe una necesidad de un análisis molecular con un mayor número de muestras e individualizado en cada ovocito para poder relacionar los posibles marcadores de maduración ovocitaria y los habitualmente empleados en los tratamientos de FIV.
6. La utilización de marcadores no invasivos de madurez ovocitaria podrían ser una herramienta complementaria a la valoración morfológica ovocitaria en la optimización los resultados clínicos con diferentes protocolos farmacológicos de estimulación ovárica.



# Apéndice documental





## 7. APÉNDICE DOCUMENTAL

### 7.1 Dictamen del CEIC



#### DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

#### CERTIFICA

Que este Comité, ha evaluado en su sesión de fecha 29 de Enero de 2013, la propuesta del promotor para que se realice el estudio:

Nº EUDRACT: **2012-005571-14**

Código de protocolo del promotor: **TIMING**

Versión/fecha del protocolo: **1/ 04 de diciembre de 2012**

Versión/fecha de la Hoja de Información y consentimiento informado para el paciente: **1/ 12 de diciembre de 2012**

Título: **"ENSAYO CLÍNICO, SIMPLE CIEGO, ALEATORIZADO, CONTROLADO Y PROSPECTIVO PARA LA VALORACIÓN DEL INTERVALO DE TIEMPO ÓPTIMO ENTRE LA ADMINISTRACIÓN DEL ACETATO DE TRIPTORELINA Y LA PUNCIÓN FOLICULAR EN LOS TRATAMIENTOS DE FIV."**

Promotor: **INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE**

Y que tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- El seguro o la garantía financiera previstos.
- El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos, el plan de reclutamiento de sujetos y las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho ensayo en este centro, en el servicio de **REPRODUCCIÓN**, por el/la **Dr./Dra. ALICIA MARZAL ESCRIVÁ** como investigador principal.

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente (Real Decreto 223/2004) para que la decisión del citado CEIC sea válida.

Que el CEIC, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y que su composición actual es la siguiente:



**Presidente:**

Dr. Joaquín Montalar Salcedo. (Jefe de Servicio-Oncología Médica)

**Vicepresidente - Farmacólogo Clínico:**

Dr. Salvador Aliño Pellicer. (Catedrático Farmacólogo Clínico)

**Secretario- Licenciado en Derecho:**

D. Serafín Rodríguez Capellán. (Asesor jurídico)

**Miembros:**

Dr. Melchor Hoyos García. (Gerente del Departamento de salud nº 7-La Fe)  
Dr. José Vicente Castell Ripoll. (Director de Investigación)  
Dra. Adela Cañete Nieto. (Oncología Pediátrica)  
Dr. Marino Blanes Juliá. (Unidad de Enfermedades Infecciosas)  
Dr. Jorge Pallarés Delgado de Molina. (Jefe de Sección-Anestesia y Reanimación)  
Dr. Antonio Salvador Sanz. (Jefe de Servicio-Cardiología)  
Dra. Sara Brugger Frigols. (Radiodiagnóstico)  
Dr. José Francisco Ibor Pica. (Médico de Atención Primaria)  
Dr. José Andrés Román Iborra. (Jefe de Servicio-Reumatología)  
Dr. Bonaventura Casanova Estruch. (Neurología)  
Dr. Eduardo García-Granero Ximénez. (Jefe de Sección-Cirugía General y Aparato Digestivo)  
Dr. Felipe Querol Fuentes. (Rehabilitación)  
Dr. Santiago Domingo del Pozo. (Jefe Clínico-Oncología Ginecológica)  
Dra. Remedios Clemente García. (Medicina Intensiva)  
Dr. Ramiro Jover Atienza. (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)  
Dra. M<sup>a</sup> Luisa Martínez Triguero. (Análisis Clínicos)  
Dr. Juan B. Salom Sanvalero. (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)  
Dr. José Vicente Cervera Zamora. (Hematología)  
Dr. José Luis Vicente Sánchez. (Jefe de sección-Unidad de Reanimación)  
Dr. Isidro Vitoria Mifana. (Pediatria)  
Dra. Belén Beltrán Niclós. (Medicina Digestiva)  
Dra. Inmaculada Calvo Penadés. (Reumatología Pediátrica)  
Dra. María Tordera Baviera. (Farmacéutica del Hospital)  
D<sup>o</sup>. José M<sup>a</sup> Canelles Gamir. (Farmacéutico de Atención Primaria)  
D. Jesús Delgado Ochando. (Diplomado en Enfermería)  
Dña. Ana María Vivas Broseta.  
D. Amparo Fuertes Vidal. (Subdirectora Económica)  
D. Carlos Tonda Cucarella. (Unión de Consumidores de la Comunidad Valenciana)

Lo que firmo en Valencia, a 29 de Enero de 2013



Fdo.: Serafín Rodríguez Capellán  
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica



**\*OBSERVACIONES ADICIONALES AL DICTAMEN:**

Se emite DICTAMEN FAVORABLE, pero el promotor debe resolver las siguientes cuestiones:

- En el protocolo indica que serán 160 pacientes (40 por grupo) y en la HIP indica que son 15. Suponemos que es un error en la HIP que debe corregirse.
- En la página 28 del protocolo se indica que: "El periodo de estudio se iniciará el día en el que la paciente cumpla criterios de inducción de ovulación. Estos son los siguientes: Desarrollo folicular adecuado (3 o más folículos, 18 mm)". En el resto del documento y en la HIP, al hablar del tamaño de los folículos se indica mayor o igual que 16 mm por lo que suponemos que debe ser un error a corregir. En caso contrario, debería aclararse.
- Deben presentar del CRF y la hoja de recogida de acontecimientos adversos.
- ¿Se aporta medicación del estudio? En el protocolo indica que es medicación comercial, en la memoria económica, se dice que sí se aporta.
- En el compromiso de los colaboradores falta la firma de un colaborador.
- En la aceptación del servicio de Lab.FIV, falta la firma del jefe de servicio y del investigador principal.
- Deben presentar la aceptación de colaboración del servicio de farmacia.



# Bibliografía



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abbara, A., Clarke, S. A., & Dhillon, W. S. (2018). Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment. *Endocrine Reviews*, 39(5), 593-628. 10.1210/er.2017-00236

Abbara, A., Hunjan, T., Ho, V. N. A., Clarke, S. A., Comninou, A. N., Izzi-Engbeaya, C., Ho, T. M., Trew, G. H., Hramyka, A., Kelsey, T., Salim, R., Humaidan, P., Vuong, L. N., & Dhillon, W. S. (2020). Endocrine Requirements for Oocyte Maturation Following hCG, GnRH Agonist, and Kisspeptin During IVF Treatment. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 537205. 10.3389/fendo.2020.537205

Abéngozar, M. A., de Frutos, S., Ferreira, S., Soriano, J., Perez-Martinez, M., Olmeda, D., Marenchino, M., Cañamero, M., Ortega, S., Megias, D., Rodriguez, A., & Martínez-Torrecuadrada, J. L. (2012). Blocking ephrinB2 with highly specific antibodies inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor growth. *Blood*, 119(19), 4565-4576. 10.1182/blood-2011-09-380006

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(6), 1270-1283. 10.1093/humrep/der037 [doi]

Andersen, C. Y., Humaidan, P., Ejdrup, H. B., Bungum, L., Grøndahl, M. L., & Westergaard, L. G. (2006). Hormonal characteristics of follicular fluid from women receiving either GnRH agonist or hCG for ovulation induction. *Human Reproduction*, 21(8), 2126-2130. 10.1093/humrep/del119

Andersen, C. Y., Leonardsen, L., Ulloa-Aguirre, A., Barrios-De-Tomasi, J., Kristensen, K. S., & Byskov, A. G. (2001). Effect of different FSH isoforms on cyclic-AMP production by mouse cumulus-oocyte-complexes: a time course study. *Molecular Human Reproduction*, 7(2), 129-135. 10.1093/molehr/7.2.129

Anderson, E., & Albertini, D. F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of Cell Biology*, 71(2), 680-686. 10.1083/jcb.71.2.680

Andric, N., & Ascoli, M. (2006). A delayed gonadotropin-dependent and growth factor-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade negatively regulates aromatase expression in granulosa cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(12), 3308-3320. 10.1210/me.2006-0241

Beckers, N. G. M., Macklon, N. S., Eijkemans, M. J., Ludwig, M., Felberbaum, R. E., Diedrich, K., Bustin, S., Loumaye, E., & Fauser, Bart C. J. M. (2003). Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *88*(9), 4186-4192. 10.1210/jc.2002-021953

Ben-Ami, I., Freimann, S., Armon, L., Dantes, A., Strassburger, D., Friedler, S., Raziell, A., Seger, R., Ron-El, R., & Amsterdam, A. (2006). PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Molecular Human Reproduction*, *12*(10), 593-599. 10.1093/molehr/gal068

Benavides, F. J., & Guénet, J. (2014). *Manual de genética de roedores de laboratorio*. [https://secal.es/publicaciones/libros-de-experimentacion-animal/#elementor-toc\\_heading-anchor-1](https://secal.es/publicaciones/libros-de-experimentacion-animal/#elementor-toc_heading-anchor-1). <https://secal.es/publicaciones/libros-de-experimentacion-animal/>

Bjercke, S., Tanbo, T., Dale, P. O., & Abyholm, T. (2000). Comparison between two hCG-to-oocyte aspiration intervals on the outcome of in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *17*(6), 319-322. 10.1023/a:1009401027251

Bokal, E. V., Vrtovec, H. M., Virant Klun, I., & Verdenik, I. (2005). Prolonged HCG action affects angiogenic substances and improves follicular maturation, oocyte quality and fertilization competence in patients with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *20*(6), 1562-1568. 10.1093/humrep/deh789



Bruna Catalán, I., Pérez Milán, F., Tur Padró, R., Ricciarelli, E., De la Fuente Hernández, A., Monzó Miralles, A., & Martínez-Salazar, J. (2005). Multiple pregnancies after IVF-ICSI in Spain: incidence and criteria for embryo transfer. *Revista Iberoamericana De Fertilidad*, 22(2), 99-110.

<http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert-Marz-Abr05-Trabajo2.pdf>

Bucket, W. M., Bentick, B., & Shaw, R. W. (1998). Induction of the endogenous gonadotrophin surge for oocyte maturation with intra-nasal gonadotrophin-releasing hormone analogue (buserelin): effective minimal dose. *Human Reproduction*, 13(4), 811-814. 10.1093/humrep/13.4.811

Cha, K. Y., & Chian, R. C. (1998). Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update*, 4(2), 103-120. 10.1093/humupd/4.2.103

Chen, J., Torcia, S., Xie, F., Lin, C., Cakmak, H., Franciosi, F., Horner, K., Onodera, C., Song, J. S., Cedars, M. I., Ramalho-Santos, M., & Conti, M. (2013). Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1415-1423. 10.1038/ncb2873

Chen, S., Ye, D., Chen, X., Yang, X., Zheng, H., Tang, Y., He, Y., & Guo, W. (2012). Circulating luteinizing hormone level after triggering oocyte maturation with GnRH agonist may predict oocyte yield in flexible GnRH antagonist protocol. *Human Reproduction*, 27(5), 1351-1356. 10.1093/humrep/des049

Chen, Y., Takikawa, M., Tsutsumi, S., Yamaguchi, Y., Okabe, A., Shimada, M., Kawase, T., Sada, A., Ezawa, I., Takano, Y., Nagata, K., Suzuki, Y., Semba, K., Aburatani, H., & Ohki, R. (2018). PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt. *Cancer Science*, 109(11), 3532-3542. 10.1111/cas.13796

Choi, Y., Wilson, K., Hannon, P. R., Rosewell, K. L., Brännström, M., Akin, J. W., Curry, T. E., & Jo, M. (2017). Coordinated Regulation Among Progesterone, Prostaglandins, and EGF-Like Factors in Human Ovulatory Follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(6), 1971-1982. 10.1210/jc.2016-3153

Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(7), 505-516. 10.1038/nrm1962

Conti, M. (2002). Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1653-1661.

10.1095/biolreprod.102.004952

Conti, M., & Franciosi, F. (2018). Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human Reproduction Update*, 24(3), 245-266. 10.1093/humupd/dmx040

*Creado en Biorender.* (2022). [www.biorender.com](http://www.biorender.com). [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

Dalman, M. R., Deeter, A., Nimishakavi, G., & Duan, Z. (2012). Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC Bioinformatics*, 13 Suppl 2, S11. 10.1186/1471-2105-13-S2-S11

Delvigne, A., & Rozenberg, S. (2003). Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Human Reproduction Update*, 9(1), 77-96. 10.1093/humupd/dmg005

Douppnik, C. A., Davidson, N., Lester, H. A., & Kofuji, P. (1997). RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of gbetagamma-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10461-10466. 10.1073/pnas.94.19.10461

Downs, S. M., Daniel, S. A., & Eppig, J. J. (1988). Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *The Journal of Experimental Zoology*, 245(1), 86-96. 10.1002/jez.1402450113

Dozortsev, D. I., & Diamond, M. P. (2020). Luteinizing hormone-independent rise of progesterone as the physiological trigger of the ovulatory gonadotropins surge in the human. *Fertility and Sterility*, 114(2), 191-199. 10.1016/j.fertnstert.2020.06.016

Dumoulin, J. M., Coonen, E., Bras, M., Bergers-Janssen, J. M., Ignoul-Vanvuchelen, R. C., van Wissen, L. C., Geraedts, J. P., & Evers, J. L. (2001). Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(2), 306-312. 10.1093/humrep/16.2.306

Dunne, C., Shan, A., & Nakhuda, G. (2018). Measurement of Luteinizing Hormone Level After Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Trigger Is Not Useful for Predicting Oocyte Maturity. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal D'Obstetrique Et Gynecologie Du Canada: JOGC*, 40(12), 1618-1622.

10.1016/j.jogc.2018.01.032

Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Jesacher, K., & Tews, G. (2001). A Prospective Study on Oocyte Survival Rate After ICSI: Influence of Injection Technique and Morphological Features. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(12), 623-628. 10.1023/A:1013171505702

Egawa, M., Yoshioka, S., Higuchi, T., Sato, Y., Tatsumi, K., Fujiwara, H., & Fujii, S. (2003). Ephrin B1 is expressed on human luteinizing granulosa cells in corpora lutea of the early luteal phase: the possible involvement of the B class Eph-ephrin system during corpus luteum formation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(9), 4384-4392. 10.1210/jc.2002-021910

Egbert, J. R., Shuhaibar, L. C., Edmund, A. B., Van Helden, D. A., Robinson, J. W., Uliasz, T. F., Baena, V., Geerts, A., Wunder, F., Potter, L. R., & Jaffe, L. A. (2014). Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development (Cambridge, England)*, 141(18), 3594-3604. 10.1242/dev.112219

Eldar-Geva, T., Zylber-Haran, E., Babayof, R., Halevy-Shalem, T., Ben-Chetrit, A., Tsafrir, A., Varshaver, I., Brooks, B., & Margalioth, E. J. (2007). Similar outcome for cryopreserved embryo transfer following GnRH-antagonist/GnRH-agonist, GnRH-antagonist/HCG or long protocol ovarian stimulation. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(2), 148-154. 10.1016/s1472-6483(10)60781-x

Emperaire, J. C., Parneix, I., & Ruffie, A. (2004). Luteal phase defects following agonist-triggered ovulation: a patient-dependent response. *Reproductive Biomedicine Online*, 9(1), 22-27. 10.1016/s1472-6483(10)62105-0

Fan, H., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P. F., Hedrick, S. M., & Richards, J. S. (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for

female fertility. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 938-941.

10.1126/science.1171396

Fan, Y., Chang, Y., Wei, L., Chen, J., Li, J., Goldsmith, S., Silber, S., & Liang, X. (2019). Apoptosis of mural granulosa cells is increased in women with diminished ovarian reserve. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(6), 1225-1235.

10.1007/s10815-019-01446-5

Fausser, B. C., de Jong, D., Olivennes, F., Wramsby, H., Tay, C., Itskovitz-Eldor, J., & van Hooren, H. G. (2002). Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(2), 709-715. 10.1210/jcem.87.2.8197

Ferrero, H., Delgado-Rosas, F., Garcia-Pascual, C. M., Monterde, M., Zimmermann, R. C., Simón, C., Pellicer, A., & Gómez, R. (2012). Efficiency and purity provided by the existing methods for the isolation of luteinized granulosa cells: a comparative study. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(6), 1781-1789.

10.1093/humrep/des096

Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., & Royere, D. (2007). Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(12), 3069-3077. 10.1093/humrep/dem336

Feuerstein, P., Puard, V., Chevalier, C., Teusan, R., Cadoret, V., Guerif, F., Houlgatte, R., & Royere, D. (2012). Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors. *PloS One*, 7(7), e40449. 10.1371/journal.pone.0040449

Franciosi, F., Manandhar, S., & Conti, M. (2016). FSH Regulates mRNA Translation in Mouse Oocytes and Promotes Developmental Competence. *Endocrinology*, 157(2), 872-882. 10.1210/en.2015-1727

Freimann, S., Ben-Ami, I., Dantes, A., Ron-El, R., & Amsterdam, A. (2004). EGF-like factor epiregulin and amphiregulin expression is regulated by gonadotropins/cAMP in

human ovarian follicular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(2), 829-834. 10.1016/j.bbrc.2004.09.129

Fuchs Weizman, N., Wyse, B. A., Gat, I., Balakier, H., Sangaralingam, M., Caballero, J., Kenigsberg, S., & Librach, C. L. (2019). Triggering method in assisted reproduction alters the cumulus cell transcriptome. *Reproductive Biomedicine Online*, 39(2), 211-224. 10.1016/j.rbmo.2019.03.213

Gilchrist, R. B., Luciano, A. M., Richani, D., Zeng, H. T., Wang, X., Vos, M. D., Sugimura, S., Smitz, J., Richard, F. J., & Thompson, J. G. (2016). Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(5), 143. 10.1530/REP-15-0606

Gonen, Y., Balakier, H., Powell, W., & Casper, R. F. (1990). Use of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist to Trigger Follicular Maturation for in Vitro Fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 71(4), 918-922. 10.1210/jcem-71-4-918

Gonzalez-Robayna, I. J., Falender, A. E., Ochsner, S., Firestone, G. L., & Richards, J. S. (2000). Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(8), 1283-1300. 10.1210/mend.14.8.0500

Griesinger, G., Diedrich, K., Devroey, P., & Kolibianakis, E. M. (2006). GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 12(2), 159-168. 10.1093/humupd/dmi045

Grøndahl, M. L., Borup, R., Lee, Y. B., Myrhøj, V., Meinertz, H., & Sørensen, S. (2009). Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertility and Sterility*, 91(5), 1820-1830. 10.1016/j.fertnstert.2008.02.137

Grupo de Interés de Embriología, ASEBIR. (2015). *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos* (3rd ed.)

Gudmundsson, J., Fleming, R., Jamieson, M. E., McQueen, D., & Coutts, J. R. (1990). Luteinization to oocyte retrieval delay in women in whom multiple follicular growth was induced as part of an in vitro fertilization/gamete intrafallopian transfer program. *Fertility and Sterility*, *53*(4), 735-737. 10.1016/s0015-0282(16)53474-8

Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M., Leader, A., & Sirard, M. (2008). Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *23*(5), 1118-1127. 10.1093/humrep/den048

Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Léveillé, M., Leader, A., & Sirard, M. (2010a). Genomic assessment of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF. *Molecular Human Reproduction*, *16*(2), 87-96. 10.1093/molehr/gap079

Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Léveillé, M., Leader, A., & Sirard, M. (2010b). Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. *Molecular Human Reproduction*, *16*(8), 548-556. 10.1093/molehr/gaq051

Hepler, J. R., Berman, D. M., Gilman, A. G., & Kozasa, T. (1997). RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(2), 428-432. 10.1073/pnas.94.2.428

Hershkop, E., Khakshooy, A., Simons, J., Weiss, A., Geslevich, J., Goldman, S., Baram, S., Nothman, S., & Beck-Fruchter, R. (2021). Ideal lag time from ovulation to oocyte aspiration using a GnRH agonist trigger. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, *50*(7), 102055. 10.1016/j.jogoh.2020.102055

Heximer, S. P., Srinivasa, S. P., Bernstein, L. S., Bernard, J. L., Linder, M. E., Hepler, J. R., & Blumer, K. J. (1999). G protein selectivity is a determinant of RGS2 function. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(48), 34253-34259. 10.1074/jbc.274.48.34253

Hillier, S. G., & Tetsuka, M. (1997). Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, *11*(2), 249-260. 10.1016/s0950-3552(97)80036-3

Hoff, J. D., Quigley, M. E., & Yen, S. S. C. (1983). Hormonal Dynamics at Midcycle: A Reevaluation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *57*(4), 792-796. 10.1210/jcem-57-4-792

Holbro, T., & Hynes, N. E. (2004). ErbB Receptors: Directing Key Signaling Networks Throughout Life. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*(1), 195-217. 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D. C., Threadgill, D. W., & Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(5), 1914-1924. 10.1128/MCB.01919-06

Huang, X., Hao, C., Shen, X., Liu, X., Shan, Y., Zhang, Y., & Chen, L. (2013). Differences in the transcriptional profiles of human cumulus cells isolated from MI and MII oocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Reproduction (Cambridge, England)*, *145*(6), 597-608. 10.1530/REP-13-0005

Huang, Y., Zhao, Y., Yu, Y., Li, R., Lin, S., Zhang, C., Liu, P., & Qiao, J. (2015). Altered amphiregulin expression induced by diverse luteinizing hormone receptor reactivity in granulosa cells affects IVF outcomes. *Reproductive Biomedicine Online*, *30*(6), 593-601. 10.1016/j.rbmo.2015.03.001

HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute. (2022). <https://www.genenames.org/>. <https://www.genenames.org/>

Humaidan, P., Ejdrup Bredkjær, H., Bungum, L., Bungum, M., Grøndahl, M. L., Westergaard, L., & Yding Andersen, C. (2005). GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Human Reproduction*, *20*(5), 1213-1220. 10.1093/humrep/deh765

Humaidan, P., Kol, S., & Papanikolaou, E. G. (2011). GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice? *Human Reproduction Update*, 17(4), 510-524. 10.1093/humupd/dmr008

Humaidan, P., Polyzos, N. P., Alsbjerg, B., Erb, K., Mikkelsen, A. L., Elbaek, H. O., Papanikolaou, E. G., & Andersen, C. Y. (2013). GnRHa trigger and individualized luteal phase hCG support according to ovarian response to stimulation: two prospective randomized controlled multi-centre studies in IVF patients. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(9), 2511-2521. 10.1093/humrep/det249

Iglesias Nuñez, M., FERRER I ROBLES, E., MAURI LÓPEZ, A., MARTINEZ GRANADOS, L., SERRANO MOLINA, M., & CASTILLA ALCALÁ, J. A. (2021). *Actualización de ESPECIFICACIONES DE CALIDAD DE INDICADORES DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA (OCTUBRE 2021)* (12th ed.)

Inoue, Y., Miyamoto, S., Fukami, T., Shirota, K., Yotsumoto, F., & Kawarabayashi, T. (2009). Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 91(4), 1035-1041. 10.1016/j.fertnstert.2008.01.014

Itskovitz, J., Boldes, R., Levron, J., Erlik, Y., Kahana, L., & Brandes, J. M. (1991). Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist\*\*Presented in part at the International Symposium on GnRH Analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva, Switzerland, February 18 to 21, 1988, and at the 6th World Congress of In Vitro Fertilization and Alternative Assisted Reproduction, Jerusalem, Israel, April 2 to 7, 1989. *Fertility and Sterility*, 56(2), 213-220. 10.1016/S0015-0282(16)54474-4

Jayasena, C. N., Abbara, A., Comninos, A. N., Nijher, G. M. K., Christopoulos, G., Narayanaswamy, S., Izzi-Engbeaya, C., Sridharan, M., Mason, A. J., Warwick, J., Ashby, D., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Carby, A., Trew, G. H., & Dhillon, W. S. (2014).



Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3667-3677. 10.1172/JCI75730

Jeppesen, J. V., Kristensen, S. G., Nielsen, M. E., Humaidan, P., Dal Canto, M., Fadini, R., Schmidt, K. T., Ernst, E., & Yding Andersen, C. (2012). LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(8), 1524. 10.1210/jc.2012-1427

Jungers, K. A., Le Goff, C., Somerville, R. P. T., & Apte, S. S. (2005). Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene Expression Patterns: GEP*, 5(5), 609-617. 10.1016/j.modgep.2005.03.004

Kaneko, T., Saito, H., Toya, M., Satio, T., Nakahara, K., & Hiroi, M. (2000). Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(3), 162-167. 10.1023/a:1009470206468

Kania, A., & Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(4), 240-256. 10.1038/nrm.2015.16

Kasum, M., Franulić, D., Čehić, E., Orešković, S., Lila, A., & Ejubović, E. (2017). Kisspeptin as a promising oocyte maturation trigger for in vitro fertilisation in humans. *Gynecological Endocrinology*, 33(8), 583-587. 10.1080/09513590.2017.1309019

Kawashima, I., Umehara, T., Noma, N., Kawai, T., Shitanaka, M., Richards, J., & Shimada, M. (2014). Targeted Disruption of Nrg1 in Granulosa Cells Alters the Temporal Progression of Oocyte Maturation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28, me20131316. 10.1210/me.2013-1316

Kim, C., Ahn, J., You, R., Kim, S., Chae, H., & Kang, B. (2014). Combined administration of gonadotropin-releasing hormone agonist with human chorionic gonadotropin for final oocyte maturation in GnRH antagonist cycles for in vitro fertilization. *The Journal of Reproductive Medicine*, 59(1-2), 63-68.

Li, Q., McKenzie, L. J., & Matzuk, M. M. (2008). Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte

developmental competence. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 673-678.

10.1093/molehr/gan064

Liu, N., Ma, Y., Li, R., Jin, H., Li, M., Huang, X., Feng, H. L., & Qiao, J. (2012). Comparison of follicular fluid amphiregulin and EGF concentrations in patients undergoing IVF with different stimulation protocols. *Endocrine*, 42(3), 708-716.

10.1007/s12020-012-9706-z

Liu, T., Cui, Y., Zhao, H., Liu, H., Zhao, S., Gao, Y., Mu, X., Gao, F., & Chen, Z. (2015). High levels of testosterone inhibit ovarian follicle development by repressing the FSH signaling pathway. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban =*

*Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, 35(5), 723-729. 10.1007/s11596-015-1497-z

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. 10.1006/meth.2001.1262

Magee, C., Nurminskaya, M., & Linsenmayer, T. F. (2001). UDP-glucose pyrophosphorylase: up-regulation in hypertrophic cartilage and role in hyaluronan synthesis. *The Biochemical Journal*, 360(Pt 3), 667-674. 10.1042/0264-6021:3600667

Maizels, E. T., Mukherjee, A., Sithanandam, G., Peters, C. A., Cottom, J., Mayo, K. E., & Hunzicker-Dunn, M. (2001). Developmental Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in Vivo during Corpus Luteum Formation in the Rat. *Molecular Endocrinology*, 15(5), 716-733.

10.1210/mend.15.5.0634

Maman, E., M.D, Yung, Y., Ph.D, Kedem, A., M.D, Yerushalmi, Gil M., M.D., Ph.D, Konopnicki, S., B.Sc, Cohen, B., B.Sc, Dor, J., M.D, & Hourvitz, A., M.D. (2012). High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertility and Sterility*, 97(3), 592-598. 10.1016/j.fertnstert.2011.12.027

Mansour, R. T., Aboulghar, M. A., & Serour, G. I. (1994). Study of the optimum time for human chorionic gonadotropin-ovum pickup interval in in vitro fertilization.

*Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 11(9), 478-481. 10.1007/BF02215712

McAvey, B., Zapantis, A., Jindal, S. K., Lieman, H. J., & Polotsky, A. J. (2011). How many eggs are needed to produce an assisted reproductive technology baby: is more always better? *Fertility and Sterility*, 96(2), 332-335.

10.1016/j.fertnstert.2011.05.099

McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(6), 765-771.

10.1093/bioinformatics/btp053

Nakano, R., Mizuno, T., Kotsuji, F., Katayama, K., Wshio, M., & Tojo, S. (1973). "Triggering" of ovulation after infusion of synthetic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 52(3), 269-272.

10.3109/00016347309158325

Nargund, G., Reid, F., & Parsons, J. (2001). Human chorionic gonadotropin-to-oocyte collection interval in a superovulation IVF program. A prospective study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(2), 87-90. 10.1023/a:1026530624575

Oberst, M. D., Beberman, S. J., Zhao, L., Yin, J. J., Ward, Y., & Kelly, K. (2008). TDAG51 is an ERK signaling target that opposes ERK-mediated HME16C mammary epithelial cell transformation. *BMC Cancer*, 8, 189. 10.1186/1471-2407-8-189

Oberyé, J. J., Mannaerts, B. M., Huisman, J. A., & Timmer, C. J. (1999). Pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of ganirelix (Antagon/Orgalutran). Part II. Dose-proportionality and gonadotropin suppression after multiple doses of ganirelix in healthy female volunteers. *Fertility and Sterility*, 72(6), 1006-1012. 10.1016/s0015-0282(99)00414-8

Ohta, N., Saito, H., Kaneko, T., Yoshida, M., Takahashi, T., Saito, T., Nakahara, K., & Hiroi, M. (2001). Soluble CD44 in human ovarian follicular fluid. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(1), 21-25. 10.1023/a:1026494528415

O'Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., De Luca, C., & Lansing, M. (1994). Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(6), 283-286. 10.1016/0141-8130(94)90056-6

Ovarian Stimulation, The Eshre Guideline Group On, Bosch, E., Broer, S., Griesinger, G., Grynberg, M., Humaidan, P., Kolibianakis, E., Kunicki, M., La Marca, A., Lainas, G., Le Clef, N., Massin, N., Mastenbroek, S., Polyzos, N., Sunkara, S. K., Timeva, T., Töyli, M., Urbancsek, J., Vermeulen, N., & Broekmans, F. (2020). ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI†. *Human Reproduction Open*, 2020(2), hoaa009. 10.1093/hropen/hoaa009

Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., & Conti, M. (2008). Luteinizing Hormone Signaling in Preovulatory Follicles Involves Early Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway. *Molecular Endocrinology*, 22(4), 924-936. 10.1210/me.2007-0246

Park, J., Su, Y., Ariga, M., Law, E., Jin, S. -. C., & Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5658), 682-684. 10.1126/science.1092463

Parneix, I., Empeiraire, J. C., Ruffie, A., & Parneix, P. (2001). Comparaison de différents protocoles de déclenchement de l'ovulation, par agonistes du GnRH et gonadotrophine chorionique\*\*\*Présenté en partie au quatrième International symposium on GnRH analogues in cancer and human reproduction, Genève, Suisse, 8-11 février 1996. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 29(2), 100-105. 10.1016/S1297-9589(00)00064-3

Popovici, R. M., Kao, L. C., & Giudice, L. C. (2000). Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*, 141(9), 3510-3513. 10.1210/endo.141.9.7789

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402(6764), 884-888. 10.1038/47260

Raziel, A., Schachter, M., Strassburger, D., Kasterstein, E., Ron-El, R., & Friedler, S. (2006). In vivo maturation of oocytes by extending the interval between human chorionic gonadotropin administration and oocyte retrieval. *Fertility and Sterility*, 86(3), 583-587. 10.1016/j.fertnstert.2006.02.091

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(1), 40. 10.1186/1477-7827-7-40

Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). (2004). *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(1), 41-47. 10.1093/humrep/deh098

Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27 Suppl 1, 2. 10.1093/humrep/des200

Robinson, J. W., Zhang, M., Shuhaibar, L. C., Norris, R. P., Geerts, A., Wunder, F., Eppig, J. J., Potter, L. R., & Jaffe, L. A. (2012). Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Developmental Biology*, 366(2), 308-316. 10.1016/j.ydbio.2012.04.019

Robker, R. L., Akison, L. K., & Russell, D. L. (2009). Control of oocyte release by progesterone receptor-regulated gene expression. *Nuclear Receptor Signaling*, 710.1621/nrs.07012

Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1021-1029. 10.1095/biolreprod.109.082941

Rosen, M. P., Zamah, A. M., Shen, S., Dobson, A. T., McCulloch, C. E., Rinaudo, P. F., Lamb, J. D., & Cedars, M. I. (2009). The effect of follicular fluid hormones on oocyte recovery after ovarian stimulation: FSH level predicts oocyte recovery. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 7, 35. 10.1186/1477-7827-7-35

Russell, D. L., Ochsner, S. A., Hsieh, M., Mulders, S., & Richards, J. S. (2003). Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology*, *144*(3), 1020-1031. 10.1210/en.2002-220434

Salustri, A., Yanagishita, M., Underhill, C. B., Laurent, T. C., & Hascall, V. C. (1992). Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Developmental Biology*, *151*(2), 541-551. 10.1016/0012-1606(92)90192-j

Segal, S., & Casper, R. F. (1992). Gonadotropin-releasing hormone agonist versus human chorionic gonadotropin for triggering follicular maturation in in vitro fertilization\*\*Supported by a grant from Abbott Pharmaceutical Company, Montreal, Quebec, Canada.††Presented in part at the 34th Annual Meeting of The American Fertility Society, Orlando, Florida, October 23 to 26, 1991. *Fertility and Sterility*, *57*(6), 1254-1258. 10.1016/S0015-0282(16)55083-3

Segaloff, D. L., & Ascoli, M. (1993). The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor... 4 Years Later. *Endocrine Reviews*, *14*(3), 324-347. 10.1210/edrv-14-3-324

Shen, X., Long, H., Guo, W., Xie, Y., Gao, H., Zhang, J., Wang, Y., Lyu, Q., Kuang, Y., & Wang, L. (2020). The ovulation trigger-OPU time interval of different ovarian protocols in ART: a retrospective study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *302*(2), 519-527. 10.1007/s00404-020-05568-5

Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., & Richards, J. S. (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(6), 1352-1365. 10.1210/me.2005-0504

Shuhaibar, L. C., Egbert, J. R., Norris, R. P., Lampe, P. D., Nikolaev, V. O., Thunemann, M., Wen, L., Feil, R., & Jaffe, L. A. (2015). Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(17), 5527-5532.

Somerville, R. P. T., Longpre, J., Jungers, K. A., Engle, J. M., Ross, M., Evanko, S., Wight, T. N., Leduc, R., & Apte, S. S. (2003). Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9503-9513. 10.1074/jbc.M211009200

Stormlund, S., Sopa, N., Zedeler, A., Bogstad, J., Prætorius, L., Nielsen, H. S., Kitlinski, M. L., Skouby, S. O., Mikkelsen, A. L., Spangmose, A. L., Jeppesen, J. V., Khatibi, A., la Cour Freiesleben, N., Ziebe, S., Polyzos, N. P., Bergh, C., Humaidan, P., Andersen, A. N., Løssl, K., & Pinborg, A. (2020). Freeze-all versus fresh blastocyst transfer strategy during in vitro fertilisation in women with regular menstrual cycles: multicentre randomised controlled trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 370, m2519. 10.1136/bmj.m2519

Teissier, M. P., Chable, H., Paulhac, S., & Aubard, Y. (2000). Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15(12), 2471-2477. 10.1093/humrep/15.12.2471

Ujioka, T., Russell, D. L., Okamura, H., Richards, J. S., & Espey, L. L. (2000). Expression of regulator of G-protein signaling protein-2 gene in the rat ovary at the time of ovulation. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1513-1517. 10.1095/biolreprod63.5.1513

Uyar, A., Torrealday, S., & Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 99(4), 979-997. 10.1016/j.fertnstert.2013.01.129

Veeck, L. (1999). *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses : An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology* 10.1201/B14639

Vuong, T. N. L., Ho, M. T., Ha, T. D., Phung, H. T., Huynh, G. B., & Humaidan, P. (2016). Gonadotropin-releasing hormone agonist trigger in oocyte donors co-treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist: a dose-finding study. *Fertility and Sterility*, 105(2), 356-363. 10.1016/j.fertnstert.2015.10.014

Wang, J., Shen, X., Huang, X., & Zhao, Z. (2012). Follicular fluid levels of prostaglandin E2 and the effect of prostaglandin E2 on steroidogenesis in granulosa-lutein cells in women with moderate and severe endometriosis undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Chinese Medical Journal*, 125(22), 3985-3990.

Wang, W., Zhang, X., Wang, W., Liu, Y., Zhao, L., Xue, S., & Yang, K. (2011). The time interval between hCG priming and oocyte retrieval in ART program: a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(10), 901-910.

10.1007/s10815-011-9613-x

Wathlet, S., Adriaenssens, T., Segers, I., Verheyen, G., Janssens, R., Coucke, W., Devroey, P., & Smits, J. (2012). New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression. *Fertility and Sterility*, 98(2), 432-4. 10.1016/j.fertnstert.2012.05.007

Wathlet, S., Adriaenssens, T., Segers, I., Verheyen, G., Van Landuyt, L., Coucke, W., Devroey, P., & Smits, J. (2013). Pregnancy prediction in single embryo transfer cycles after ICSI using QPCR: validation in oocytes from the same cohort. *PloS One*, 8(4), e54226. 10.1371/journal.pone.0054226

Wayne, C. M., Fan, H., Cheng, X., & Richards, J. S. (2007). Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(8), 1940-1957.

10.1210/me.2007-0020

Weiss, A., Neril, R., Geslevich, J., Lavee, M., Beck-Fruchter, R., Golan, J., & Shalev, E. (2014). Lag time from ovulation trigger to oocyte aspiration and oocyte maturity in assisted reproductive technology cycles: a retrospective study. *Fertility and Sterility*, 102(2), 419-423. 10.1016/j.fertnstert.2014.04.041

Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(5), 346-354.



Whitelaw, P. F., Smyth, C. D., Howles, C. M., & Hillier, S. G. (1992). Cell-specific expression of aromatase and LH receptor mRNAs in rat ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*, 9(3), 309-312. 10.1677/jme.0.0090309

Wissing, M. L., Kristensen, S. G., Andersen, C. Y., Mikkelsen, A. L., Høst, T., Borup, R., & Grøndahl, M. L. (2014). Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(5), 997-1010. 10.1093/humrep/deu008

Woods, D., & Johnson, A. (2007). Protein kinase C activity mediates LH-induced ErbB/Erk signaling in differentiated hen granulosa cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133, 733-41. 10.1530/REP-06-0261

Wu, Y., Chuang, H., Kou, Y. R., Lee, T., Lu, S., Huang, Y., Nishi, Y., & Yanase, T. (2008). Regulation of LH receptor and PGF2alpha receptor signaling by the regulator of G protein signaling 2 (RGS2) in human and mouse granulosa cells. *The Chinese Journal of Physiology*, 51(5), 282-291.

Xu, Y., Zagoura, D., Keck, C., & Pietrowski, D. (2006). Expression of Eph receptor tyrosine kinases and their ligands in human Granulosa lutein cells and human umbilical vein endothelial cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 114(10), 590-595. 10.1055/s-2006-950499

Yamashita, Y., & Shimada, M. (2012). The release of EGF domain from EGF-like factors by a specific cleavage enzyme activates the EGFR-MAPK3/1 pathway in both granulosa cells and cumulus cells during the ovulation process. *The Journal of Reproduction and Development*, 58(5), 510-514. 10.1262/jrd.2012-056

Yarden, Y., & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(2), 127-137. 10.1038/35052073

Yoldemir, T., & Fraser, I. S. (2010). The effect of retrieved oocyte count on pregnancy outcomes in an assisted reproduction program. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 281(3), 551-556. 10.1007/s00404-009-1221-y

Youssef, M. a. F., Abdelmoty, H. I., Ahmed, M. A. S., & Elmohamady, M. (2015). GnRH agonist for final oocyte maturation in GnRH antagonist co-treated IVF/ICSI treatment cycles: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Advanced Research*, 6(3), 341-349. 10.1016/j.jare.2015.01.005

Yung, Y., Aviel-Ronen, S., Maman, E., Rubinstein, N., Avivi, C., Orvieto, R., & Hourvitz, A. (2014). Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 20(9), 844-849. 10.1093/molehr/gau041

Zamah, A. M., Hsieh, M., Chen, J., Vigne, J. L., Rosen, M. P., Cedars, M. I., & Conti, M. (2010). Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(10), 2569-2578. 10.1093/humrep/deq212

Zelinski-Wooten, M. B., Hutchison, J. S., Hess, D. L., Wolf, D. P., & Stouffer, R. L. (1995). Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(7), 1658-1666. p10.1093/oxfordjournals.humrep.a136151

Zhang, A., Xu, B., Sun, Y., Lu, X., Niu, Z., Chen, Q., Feng, Y., & Xu, C. (2012). The effect of human cumulus cells on the maturation and developmental potential of immature oocytes in ICSI cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(4), 313-319. 10.1007/s10815-012-9712-3

Zhang, M., Su, Y., Sugiura, K., Wigglesworth, K., Xia, G., & Eppig, J. J. (2011). Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*, 152(11), 4377-4385. 10.1210/en.2011-1118

Zuccotti, M., Merico, V., Cecconi, S., Redi, C. A., & Garagna, S. (2011). What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Human Reproduction Update*, 17(4), 525-540. 10.1093/humupd/dmr009