

# Universidad Rey Juan Carlos

Facultad de Ciencias de la Salud  
Departamento de Medicina y Cirugía



## Tesis Doctoral

**Influencia del tipo de gonadotropina sobre la calidad ovocitaria: perfil hormonal, secreción de factores ovocitarios y actividad apoptótica.**  
**Análisis de las diferencias en los patrones de expresión génica en células del cúmulo.**

Antonio Requena Miranda  
Licenciado en Medicina y Cirugía

*Directores de Tesis:*

Juan Antonio García-Velasco  
Doctor en Medicina y Cirugía

David Agudo Garcillán  
Doctor en Ciencias de la Salud

Madrid 2013

**Dr. Juan Antonio García- Velasco**, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular de la Universidad Rey Juan Carlos, con NIE 01823265D,

**CERTIFICA:** Que D. Antonio Requena Miranda, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado en el Dpto. de Medicina y Cirugía, bajo su dirección, el trabajo correspondiente a la tesis doctoral titulada:

**Influencia del tipo de gonadotropina sobre la calidad ovocitaria: perfil hormonal, secreción de factores ovocitarios y actividad apoptótica.**  
**Análisis de las diferencias en los patrones de expresión génica en células del cúmulo.**

Revisado el presente trabajo, estima que puede ser presentado al tribunal que ha de juzgarlo. Y para que conste a efecto de lo establecido en la normativa reguladora del tercer ciclo de la Universidad Rey Juan Carlos, autoriza su presentación.

Madrid, 18-Noviembre 2013

Fdo. Dr. Juan A. García-Velasco

**Dr. David Agudo Garcillán**, Doctor en Ciencias de la Salud, con NIE 50201446J

**CERTIFICA:** Que D. Antonio Requena Miranda, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado en el Dpto. de Medicina y Cirugía, bajo su dirección, el trabajo correspondiente a la tesis doctoral titulada:

**Influencia del tipo de gonadotropina sobre la calidad ovocitaria: perfil hormonal, secreción de factores ovocitarios y actividad apoptótica.**  
**Análisis de las diferencias en los patrones de expresión génica en células del cúmulo.**

Revisado el presente trabajo, estima que puede ser presentado al tribunal que ha de juzgarlo. Y para que conste a efecto de lo establecido en la normativa reguladora del tercer ciclo de la Universidad Rey Juan Carlos, autoriza su presentación.

Madrid, 18-Noviembre 2013

Fdo. Dr. David Agudo Garcillán



<b>INTRODUCCION</b> .....	15
1. Situación actual. ....	16
2. El folículo ovárico .....	17
2.1.-Foliculogénesis. ....	17
2.2.-Procesos celulares y moleculares relacionados con el crecimiento y maduración ovocitaria. ....	19
2.3.- Complejo cúmulo-ovocito. ....	21
2.3.1.- <i>Diferenciación células de la granulosa.</i> .....	21
2.3.2.- <i>Componentes de la matriz del cúmulo.</i> .....	23
2.3.3- <i>Comunicación cúmulo-ovocito.</i> .....	24
2.4.-Función del folículo ovárico.....	25
2.4.1.- <i>Esteroidogénesis.</i> .....	26
2.4.2.- <i>Función reproductiva.</i> .....	27
2.5.- Competencia ovocitaria. ....	28
2.5.1.- <i>Adquisición de la competencia ovocitaria.</i> .....	28
2.5.2.- <i>Marcadores de competencia ovocitaria.</i> .....	28
3. Protocolos de estimulación.....	29
3.1. Tipos de gonadotropinas.....	30
3.1.1. <i>Mecanismos de obtención.</i> .....	30
3.1.2. <i>Mecanismos de acción. Efectos sobre la foliculogénesis.</i> .....	32
4.- Tecnología de los microarrays. ....	34
4.1. Análisis transcriptómico de las células del cúmulo y de la granulosa.....	35
5.- Citometría de flujo. ....	37
5.1. Aplicaciones al estudio de células de la granulosa. ....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	40

<b>MATERIAL Y METODO</b> .....	42
1.- Donación de ovocitos .....	43
1.1.- Selección de las donantes .....	43
1.2. Consentimiento informado.....	44
2.- Protocolo de estimulación.....	44
3.- Punción ovárica y recuperación de ovocitos .....	45
4.- Aislamiento y obtención de las células del cúmulo/granulosa.....	46
5.- Cuantificación de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular.....	46
5.1.- Determinación de GDF-9. ....	47
5.2.- Determinación de BMP-15.....	48
6.- Determinaciones hormonales en líquido folicular .....	50
7.- Citometría de flujo .....	50
7.1.- Anexina V/yoduro de propidio (PI).....	51
7.2. Fragmentación DNA (TUNEL). ....	52
8.- Análisis de microarrays.....	52
8.1. Extracción del RNA.....	52
8.2.- Procesamiento de los arrays. ....	53
8.3.- Análisis de los datos derivados de las plataformas de microarrays.....	54
8.4.- Análisis de “clustering” .....	56
8.5.-Análisis de enriquecimiento funcional. ....	57
9.- Análisis estadístico.....	58
 <b>RESULTADOS</b> .....	 59
1.- Características de las donantes. Resultados clínicos.....	60
2.- Determinación de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular dependiendo del tipo de gonadotropina.....	61
2.1. Determinación de GDF-9.....	61

2.2. Determinación de BMP-15. ....	62
3. Niveles hormonales en líquido folicular en función del tipo de gonadotropina.....	64
3.1 FSH. ....	64
3.2. Estradiol. ....	64
3.3. Testosterona. ....	65
3.4. Progesterona.....	66
4.- Determinación del porcentaje de apoptosis en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina. ....	66
4.1. Apoptosis precoz.....	66
4.2. Apoptosis tardía. ....	67
4.3.- Necrosis. ....	68
5.- Análisis de las diferencias en los patrones de expresión génica en células del cúmulo en función del tipo de gonadotropina ....	69
5.1.- FSH urinaria vs hMG (hMG como control). ....	69
5.2.- FSH urinaria vs FSH recombinante (FSH recombinante como control).....	78
5.3.- FSH recombinante vs hMG (hMG como control).....	82
<b>DISCUSION</b> .....	90
Análisis del perfil hormonal y de los factores de secreción ovocitaria en función del tipo de gonadotropina. ....	93
Análisis de la tasa de apoptosis en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina. ....	98
Análisis de los patrones de expresión génica en células del cúmulo en función del tipo de gonadotropina. ....	102
FSHu vs hMG .....	104
FSHu vs FSHr .....	105
FSHr vs hMG .....	106
Patrones de expresión de genes implicados en procesos apoptóticos. ....	106

<b>CONCLUSIONES</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	112

**Lista de Figuras.**

<b>Figura 1.</b> Progresión de la foliculogénesis y la ovogénesis.....	20
<b>Figura 2.</b> Gradiente morfogénico establecido por los OSFs en el COC.....	23
<b>Figura 3.</b> Papel de la CCs como reguladores potenciales de la ovogénesis .....	25
<b>Figura 4.</b> Esteroidogénesis durante un ciclo natural.....	27
<b>Figura 5.</b> Tecnología de microarrays.....	35
<b>Figura 6.</b> Protocolo de estimulación.....	45
<b>Figura 7.</b> Esquema de un procedimiento de ELISA para la detección de GDF-9.....	48
<b>Figura 8.</b> Técnica de "western blotting" para la detección y cuantificación de BMP-15. ....	49
<b>Figura 9.</b> Representación gráfica de una citometría de flujo.....	51
<b>Figura 10.</b> Esquema de un experimento con microarrays .....	54
<b>Figura 11.</b> Concentraciones de GDF-9 en función del tipo de gonadotropina.....	61
<b>Figura 12.</b> Concentración total de proteína en función del tipo de gonadotropina. ....	62
<b>Figura 13.</b> Western-blot para la identificación de BMP-15 .....	63
<b>Figura 14.</b> Concentración de FSH en función del tipo de gonadotropina .....	64
<b>Figura 15.</b> Concentración de estradiol en función del tipo de gonadotropina.....	65
<b>Figura 16.</b> Niveles de testosterona en función del tipo de gonadotropina .....	65
<b>Figura 17.</b> Niveles de progesterona en función del tipo de gonadotropina .....	66
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de actividad apoptótica precoz en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina .....	67
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de actividad apoptótica tardía en células de la granulosa .....	67
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de necrosis en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina.....	68
<b>Figura 21.</b> Expresión global y de genes DE entre FSH urinaria y hMG .....	69
<b>Figura 22.</b> Análisis de enriquecimiento de genes DE en células del cúmulo (FSH urinaria vs hMG) .....	77
<b>Figura 23.</b> Expresión global y de genes DE entre FSH recombinante y FSH urinaria .	78

<b>Figura 24.</b> Análisis de enriquecimiento de genes DE en células del cúmulo (FSH recombinante vs FSH urinaria).....	81
<b>Figura 25.</b> Expresión global y de genes DE entre FSH recombinante y hMG.....	82
<b>Figura 26.</b> Análisis de enriquecimiento de genes DE en células del cúmulo (FSH recombinante vs hMG).....	87
<b>Figura 27.</b> "Cluster" jerárquico de los genes DE en los tres tratamientos de estudio ...	88
<b>Figura 28.</b> Análisis de PCA para la determinación de las diferencias en los patrones de expresión génica.....	89

### **Lista de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Características demográficas y clínicas .....	60
<b>Tabla 2.</b> Diagrama de flujo de donantes .....	61
<b>Tabla 3.</b> Genes DE entre ciclos estimulados con hMG y FSH urinaria.....	70
<b>Tabla 4.</b> Genes DE entre ciclos estimulados con FSH recombinante y FSH urinaria ...	79
<b>Tabla 5.</b> Genes DE entre ciclos estimulados con FSH recombinante y hMG.....	83

**Lista de abreviaturas**

- ADAMTS4**- metaloproteínasa con trombospondina, motivo 4
- AMPc**- adenosín monofosfato cíclico
- ANOVA**- análisis de varianza
- AREG**- anfiregulina
- BSA**- albúmina sérica bovina
- Bcl-2**- linfoma2 de células B
- BMP-15**- proteína ósea mofogenética-15.
- BP**- procesos biológicos
- BTC**- betacelulina
- CC**- componentes celulares
- CCND2**- ciclina D2 específica de G1/S.
- CCs**- células del cúmulo
- CDC-42**- proteína-42 homóloga de control de ciclo celular
- CGs**- células de la granulosa
- COC**- complejo cúmulo-ovocito
- COX2**- citocromo c oxidasa, subunidad II
- CTNDD1**- catenina delta-1
- Cx43**- conexina- 43
- CXCR-4**- receptor tipo 4 de quimiocinas con motivo C-X-C
- CYP11A1**- citocromo P450, familia 11, subfamilia A, polipéptido 1 (P450<sub>scc</sub>)
- CYP17A1**- citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1 (17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa).
- CYP19A1**- citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1 (aromatasa).
- DEPC**- dietilpirocarbonato
- DHCR7**- dehidrocolesterol reductasa-7
- DHEA**- dehidroepiandrosterona
- DNA**- ácido dexosirribonucleico
- dUTPs**- desoxiuridina-5'-trifosfato
- DVL3**- proteína homóloga de polaridad segmentaria DVL-3
- E2**- estradiol
- EGF**- factor de crecimiento epidérmico
- ELISA**- inmunoensayo de unión enzimática

**EREG**- epiregulina  
**FC**- nivel de cambio  
**FDR**- tasa de falsos positivos  
**FDX-1**- ferredoxina adrenal-1  
**FIV**- fecundación *in vitro*  
**FSH**- hormona folículo-estimulante  
**FSHr**- FSH recombinante  
**FSHu**- FSH urinaria  
**GAL**- galanina  
**GDE**- genes diferencialmente expresados  
**GDF-9**- factor de diferenciación del crecimiento  
**GnRH**- hormona liberadora de gonadotropinas  
**GO**- término ontológico  
**GPX-3**- glutatión peroxidasa- 3  
**GREM1**- gremlina- 1  
**HA**- ácido hialurónico  
**HAS2**- hialurónico sintasa-2  
**hCG**- gonadotropina coriónica humana  
**hMG**- gonadotropina menopáusica humana  
**HMGR**- 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa  
**HP-FSHu**- FSH urinaria altamente purificada  
**HSD3B1**- 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ5-4-isomerasa  
**HSPB1**- proteína de choque térmico beta-1  
**ICSI**- inyección intracitoplasmática de espermatozoides  
**IGFBP-5**- proteína 5 de unión a factor de crecimiento insulínico  
**IGFBP-7**- proteína 7 de unión a factor de crecimiento insulínico  
**IMC**- índice de masa corporal  
**IP3**- inositol trifosfato  
**KEGG**- rutas metabólicas  
**KL**- ligando de Kit  
**LH**- hormona luteinizante  
**LHr**- LH recombinante  
**LTB**- linfotóxina beta  
**mCGs**- células murales de la granulosa

**MF-** funciones moleculares  
**MI-** metafase I  
**MII-** metafase II  
**MVD-** pirofosfomevalonato decarboxilasa  
**NFIB-** factor nuclear 1, tipo B  
**NR4A3-** receptor huérfano neuronal tipo 1  
**NTS-** neurotensina  
**OSBPL6-** proteína unión a oxisterol, tipo 6  
**OSFs-** factores secretados por el ovocito  
**P4-** progesterona  
**PCA-** análisis de componentes principales  
**PCK1-** fosfoenolpiruvato carboxikinasa- 1  
**PCR-** reacción en cadena de la polimerasa  
**PCR-RT-** reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real  
**PI-** yoduro de propidio  
**PI3K/Akt-** fosfoinosítido 3-kinasa/proteín-kinasa B  
**PKA-** proteín-kinasa A  
**PS-** fosfatidilserina  
**RNA-** ácido ribonucleico  
**S100-A8-** proteína S100-A8  
**SCD1-** estearil-CoA desaturasa- 1  
**SCD5-** estearil-CoA desaturasa-5  
**SDC2-** sindecan-2  
**SERPINE-2-** nexina derivada de glía  
**StAR-** proteína reguladora esteroideogénica aguda  
**T-** testosterona  
**TGF-β-** factor beta transformador del crecimiento  
**TNFSF11-** ligando del factor de necrosis tumoral, miembro 11  
**TNFSF4-** ligando del factor de necrosis tumoral, miembro 4  
**TRIM-28-** motivo tripartito 28  
**TUNEL-** marcaje del nucleótido terminal por la dioxinucleotidil-transferasa  
**UI-** unidades internacionales  
**VG-** vesícula germinal  
**VIH-** virus de la inmunodeficiencia humana.

## Resumen

Los tratamientos actuales frente a la infertilidad se caracterizan por las dificultades en la identificación del ovocito con mayor potencial de desarrollo, lo que reduce la eficacia de los tratamientos aplicados, obteniéndose resultados en tasa de gestación por debajo de lo esperado. El potencial de desarrollo ovocitario está estrechamente relacionado con las características nucleares y del citoplasma, de modo que un mejor conocimiento de estas estructuras podría mejorar las tasas de éxito de un tratamiento de reproducción asistida al optimizar los procedimientos de selección ovocitaria y embrionaria. La comunicación entre el ovocito y las células foliculares circundantes es esencial para el crecimiento, maduración y actividad metabólica del ovocito, hecho que potencia las razones para utilizar a las células del cúmulo en la valoración de la calidad ovocitaria. La calidad de los ovocitos obtenidos después de un protocolo de estimulación ovárica controlada varía considerablemente. Los patrones de expresión génica de las células foliculares que rodean al ovocito pueden actuar como marcadores, que una vez validados podrían representar una herramienta valiosa en la práctica clínica, no sólo en la selección de los ovocitos de mejor calidad sino también en la optimización de los protocolos de estimulación.

Ante estas perspectivas, el objetivo de nuestro trabajo se centró en determinar la posible influencia del tipo de gonadotropina empleado en un protocolo de estimulación ovárica sobre diversos parámetros relacionados con la adquisición de la competencia ovocitaria como son las concentraciones de los diferentes factores de secreción ovocitaria, perfil endocrino, tasa de actividad apoptótica y patrones de expresión génica.

Se realizó un estudio prospectivo y aleatorio en el que participaron 90 mujeres incluidas en nuestro programa de donación de ovocitos a las que se administró un protocolo corto con antagonistas en dosis múltiple y con pauta fija de inicio de la administración. Se realizaron mediciones de GDF-9 y BMP-15 a través de técnicas de ELISA y “Western Blot” respectivamente; por otra parte, se realizaron determinaciones hormonales en líquido folicular correspondientes a hormona folículo estimulante (FSH), estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (T). Los datos correspondientes al porcentaje de apoptosis en células de la granulosa se obtuvieron mediante un análisis de citometría de flujo; finalmente, se realizó un análisis transcriptómico de las células del cúmulo con el propósito de establecer correlaciones entre los patrones de expresión génica y el grado de madurez ovocitaria.

Nuestros resultados muestran que el tipo de de gonadotropina empleado en un protocolo de estimulación ovárica influye de forma significativa sobre el perfil endocrino, particularmente sobre las concentraciones de andrógenos y estrógenos, sobre el porcentaje de apoptosis precoz y tardía y sobre los patrones de expresión génica de las células del cúmulo. En cuanto a los factores de secreción ovocitaria, no se registraron diferencias estadísticamente relevantes, aunque sí se observó una asociación positiva entre las concentraciones de GDF-9 y las concentraciones de FSH en líquido folicular. En conjunto, no se pudo establecer ninguna correlación entre los parámetros evaluados y los criterios de madurez ovocitario basados en la proporción de ovocitos maduros metafase II, por lo que resulta evidente la necesidad de buscar nuevos parámetros no-invasivos de la calidad ovocitaria. Un conocimiento más profundo de estas herramientas de análisis será útil a la hora de definir parámetros cuantitativos y objetivos, capaces de establecer una valoración cuantitativa del gameto femenino más fiable y precisa.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. Situación actual.**

La esterilidad es un problema que afecta actualmente al 15-20% de parejas en edad reproductiva (McDonald 2004), y que se define como la incapacidad de conseguir una gestación después de un tiempo razonable (un año) de mantener relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas. En los países en vías de desarrollo, las tasas de esterilidad son relativamente bajas en comparación con los países desarrollados debido fundamentalmente a la búsqueda de la maternidad a edades muy tempranas; este escenario cambia radicalmente en el caso de la esterilidad secundaria, en la que las enfermedades de transmisión sexual y las dificultades para acceder a un servicio sanitario adecuado actúan como causas responsables de los índices de esterilidad en los países subdesarrollados (Lunenfeld et al. 2004).

El siglo XX se ha caracterizado por un creciente control de la fecundidad, es decir, son los individuos los que deciden o no tener hijos. El desarrollo de los métodos anticonceptivos permite prorrogar las gestaciones hasta el momento en el que se desee; al mismo tiempo, el aplazamiento de la maternidad deriva en una tendencia creciente de mujeres o parejas con dificultades para concebir o para llevar un embarazo a término (Schultz, 2007).

La esterilidad está considerada como un problema de carácter público que repercute sobre los servicios sociales y sanitarios del país. La gestión de la esterilidad supone para la medicina una labor considerable por las dificultades que entraña su diagnóstico y el tratamiento de los desórdenes reproductivos de cada miembro de la pareja; además, es importante que la pareja reciba información realista sobre las posibilidades que tienen de tener un hijo así como de los riesgos y de sus posibles alternativas (Kamel 2010).

Frente a la esterilidad, históricamente se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida, en función del motivo por el que una pareja no puede concebir. No obstante, es importante ampliar el conocimiento acerca de los factores que inician y promueven una gestación y cómo pueden ser implementados durante un tratamiento de esterilidad para lograr más recién nacidos vivos después de aplicar un procedimiento de reproducción asistida. En este contexto, quizás no se le ha dado al ovocito la importancia necesaria en relación a la obtención de una gestación viable. El crecimiento y maduración ovocitaria son procesos altamente regulados que dependen del soporte aportado por las células foliculares y de la presencia de rutas de señalización tanto

sistémicas como locales. En especies mono-ovulatorias como los humanos, el ovocito extruido representa al ovocito con mayor potencial de desarrollo (Krisher 2004); la alteración del proceso de maduración puede conducir a una regresión folicular y a la desaparición del folículo degenerado de la cohorte en crecimiento. El éxito del desarrollo embrionario está limitado por la calidad de los gametos, especialmente del ovocito. La capacidad de un embrión para producir una gestación refleja el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria previa a la fecundación; la comprensión de cómo adquiere el ovocito su potencial de desarrollo tendrá una repercusión importante en la práctica de la medicina reproductiva permitiendo incrementar las tasas de gestación.

El ovocito es un determinante clave de los resultados clínicos, aunque actualmente no es posible investigar marcadores específicos de calidad ovocitaria ya que la propia célula no puede ser alterada y manipulada. Teniendo en cuenta esta situación, el siguiente candidato a considerar podrían ser las células del cúmulo, que actúan como células de soporte y que mantienen una estrecha relación con el ovocito durante el proceso de maduración. El estudio de marcadores en las células del cúmulo aparece como un atractivo método no invasivo de evaluación del potencial de desarrollo ovocitario, que nos permitiría valorar la calidad ovocitaria y por tanto, la posibilidad de que el ovocito culmine en una gestación viable (Gebhardt 2010).

## **2. El folículo ovárico**

En la última década ha surgido una nueva perspectiva en relación al desarrollo del folículo ovárico. Tradicionalmente, el ovocito ha sido considerado como un receptor pasivo de las señales procedentes de las células de la granulosa, pero actualmente se sabe que la comunicación entre ambos tipos celulares es bidireccional ya que se ha descrito una compleja interacción entre diversos factores de regulación que gobiernan el desarrollo tanto del ovocito como de las células somáticas asociadas y que también resulta fundamental para el desarrollo folicular.

### **2.1.-Foliculogénesis.**

Poco después de que los ovocitos entren en un estadio prolongado de diplotene en la meiosis, los precursores de las células foliculares somáticas rodean al ovocito en una monocapa de células escamosas para formar el **folículo primordial**. La amplia

población de folículos primordiales que no crecen actúa como reserva hasta el final de la vida reproductiva de la mujer.

Los folículos primordiales permanecen en una fase silente hasta que son reclutados para los estadios primarios de crecimiento. Tradicionalmente, se ha descrito la presencia de una compleja comunicación multidireccional entre ovocitos y células somáticas que actúa de forma autocrina/paracrina y que desempeña funciones críticas en la transición y posterior crecimiento folicular (Eppig 2001, Skinner 2005). Estudios recientes en modelos animales modificados genéticamente plantean la presencia de señales inhibitoras que mantienen al folículo primordial en estado quiescente; la pérdida de función de cualquiera de estas moléculas inhibitoras conduce a una activación prematura de esta reserva de folículos primordiales, que en última instancia puede derivar en la aparición de patologías como el fallo ovárico prematuro (Adhikari et al. 2010, Reddy et al. 2008).

El reclutamiento inicial de los folículos primordiales para su transformación en **folículos primarios** depende de un conjunto de señales ováricas que promueven y coordinan esta transición. El ovocito de un folículo primario inicia su fase extensiva de crecimiento y las células foliculares circundantes -células de la granulosa-, se convierten en cuboidales y proliferativas; esta transición es independiente de gonadotropinas ya que los folículos primordiales carecen de receptores de FSH (Oktay et al. 1997). Cuando los ovocitos en crecimiento se rodean de más de una capa de células de la granulosa pasan a denominarse **folículos secundarios**; esta etapa se caracteriza por el aumento del diámetro ovocitario, la formación de una lámina basal, la aparición de la zona pelúcida y el desarrollo de una capa de células de la teca. Aunque esta transformación también parece ser independiente de gonadotropinas, este tipo de folículos sí es sensible a la acción gonadotrópica (Fortune and Eppig 1979).

Los folículos con un diámetro superior a las 200 micras evolucionan hacia el estadio **antral**; esta etapa se caracteriza por la formación de la cavidad antral, aumento de la vascularización de las células de la teca, crecimiento continuado de los ovocitos y proliferación de dos tipos de células foliculares somáticas. La formación de la cavidad antral separa dos poblaciones de células de la granulosa funcionalmente distintas: las células parietales de la granulosa (mCGs), importantes para la esteroidogénesis y la ovulación, y las células del cúmulo (CCs) que rodean al ovocito promoviendo el crecimiento y la competencia en el desarrollo.

La transición de folículo pre-antral a antral marca el paso de una regulación intraovárica a una regulación extraovárica de la foliculogénesis, marcada por el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario; aunque los folículos pre-antrales son capaces de responder a la FSH, ésta desempeña un papel clave durante la foliculogénesis antral (Kumar et al. 1997): previene la apoptosis en las células de la granulosa y la atresia folicular, y estimula la proliferación de estas células, la síntesis de estradiol y la expresión de receptores para la LH.

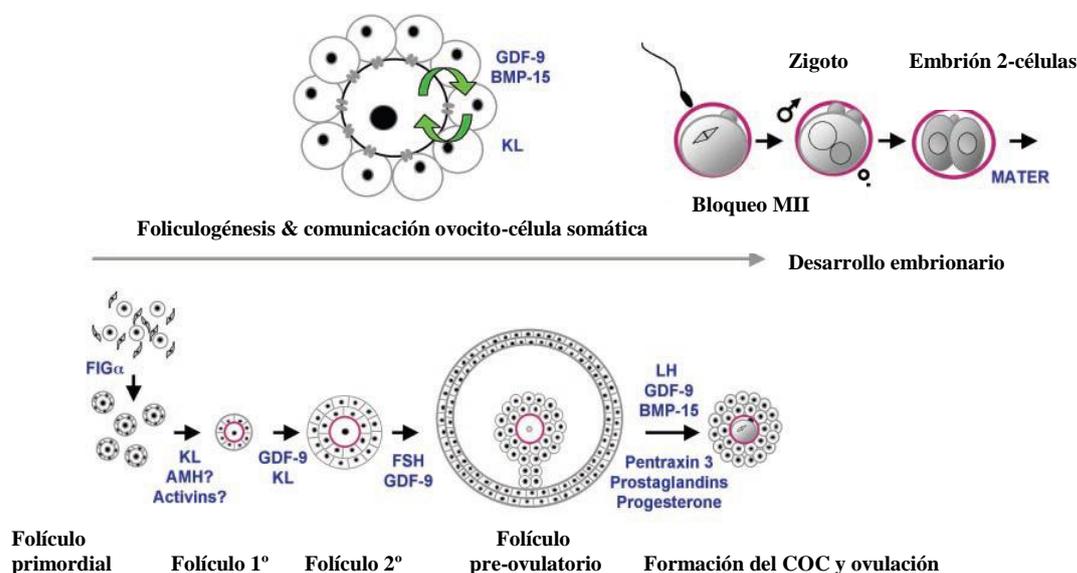
Los **folículos pre-ovulatorios** expresan grandes cantidades de receptores de LH en las células de la granulosa permitiendo que puedan responder al pico de mitad de ciclo, el cual inicia la cascada de sucesos que conducen a la reanudación de la meiosis ovocitaria, expansión del cúmulo, ruptura folicular y formación del cuerpo lúteo.

## **2.2.-Procesos celulares y moleculares relacionados con el crecimiento y maduración ovocitaria.**

En todas las especies de mamíferos, el desarrollo del folículo y del ovocito sigue una secuencia característica de acontecimientos que comienza con la formación del ovario durante la etapa de embriogénesis precoz y que terminan con la ovulación de un ovocito maduro y fértil. A lo largo de la prolongada etapa pre-antral, el desarrollo del ovocito transcurre paralelo al de las células foliculares de la granulosa (Diaz et al. 2006). La comunicación efectiva entre los distintos tipos de células foliculares se consigue vía uniones conocidas con el término anglosajón de “**gap junction**”; este diálogo entre las células de la granulosa y el ovocito es vital para mantener el crecimiento ovocitario ya que la fuente principal de nutrientes para el gameto lo constituye el compartimento somático (Harris SE & Picton HM 2007).

El ovocito secreta factores que regulan el inicio del crecimiento del folículo primordial y moderan las acciones tróficas de las gonadotropinas sobre el crecimiento de los folículos pre-antrales y antrales (Knight and Glister 2006). Se ha descrito una amplia variedad de reguladores de la foliculogénesis *in vivo*, algunos de los cuales se muestran en la Figura 1 (Matzuk et al. 2002). La señalización bi-direccional entre los ovocitos y las células somáticas circundantes es esencial para la progresión del desarrollo folicular. Los estudios con modelos animales han identificado proteínas específicas implicadas en este bucle de regulación ovocito-células de la granulosa que desempeñan funciones esenciales en el desarrollo folicular y ovocitario. Los ejemplos

incluyen a GDF-9, un factor de secreción ovocitario, al receptor de Kit expresado en la superficie del ovocito y al ligando de Kit (KL) derivado de las células de la granulosa.



**Figura 1. Progresión de la foliculogénesis y la ovogénesis (Matzuk, 2002)**

Los factores paracrinos derivados del ovocito son esenciales para una ovulación eficaz; por ejemplo, GDF-9 induce la síntesis de una serie de sustancias en las células de la granulosa que ayudan a la formación e integridad del complejo cúmulo-ovocito (Kumar et al. 1997), estimula la síntesis de prostaglandinas y de progesterona, activa determinadas rutas de señalización en células pre-ovulatorias del cúmulo e inhibe su luteinización al impedir la expresión de receptores de LH (Elvin et al. 2000). Por su parte BMP-15, otro factor de secreción ovocitaria, coopera con GDF-9 para mantener la integridad del complejo cúmulo-ovocito y optimiza la fertilidad femenina.

La competencia ovocitaria se adquiere progresivamente tras una serie coordinada de cambios estructurales y funcionales que afectan al gameto y a las células somáticas que lo rodean; sin embargo, no es hasta el final del desarrollo folicular cuando los ovocitos logran la capacidad de progresar hasta la metafase II. *In vivo*, el pico pre-ovulatorio de LH desencadena la maduración ovocitaria y dirige una cascada de eventos foliculares que desembocan en un cambio en la síntesis de esteroides en las células de la granulosa que pasan de producir estrógenos a sintetizar progesterona; disminuye la concentración de AMP cíclico (AMPC), debido a la pérdida de “gap

junctions” entre las células del cúmulo y el ovocito (Mehlmann 2005); y activa rutas moleculares que sintetizan ácido hialurónico (HA), responsable de la mucificación y expansión del cúmulo (Schoenfelder and Einspanier 2003). La pérdida de contacto entre el ovocito y las células somáticas permite la reanudación de la meiosis con el consiguiente descenso en las concentraciones de AMPc, en la actividad de la proteína-quinasa A (PKA) y de la señal inhibitoria que mantiene el bloqueo meiótico.

### **2.3.- Complejo cúmulo-ovocito.**

La mayor parte del crecimiento ovocitario transcurre en la etapa de folículo pre-antral, en la que el ovocito está estrechamente relacionado con células de la granulosa relativamente indiferenciadas. Con la formación del antro, las CGs se diferencian en dos poblaciones anatómica y funcionalmente distintas, células parietales de la granulosa y células del cúmulo; estas últimas se encuentran en íntimo contacto con el ovocito y cuentan con proyecciones citoplásmicas trans-zonales altamente especializadas que penetran la zona pelúcida para formar “gap junctions”, derivando en una estructura elaborada y compleja denominada **complejo cúmulo-ovocito** (COC) (Albertini et al. 2001). La estrecha relación e interacción con el ovocito convierte a las células del cúmulo en candidatas ideales para la evaluación del potencial del ovocito adjunto.

#### **2.3.1.-Diferenciación células de la granulosa.**

Un concepto atractivo e interesante es la capacidad del ovocito de secretar **OSFs** (*oocyte-secreted factors*) que regulan la diferenciación de las células del cúmulo con el propósito de ejercer un estricto control sobre su propio entorno. Las células del cúmulo y las células parietales de la granulosa se originan a partir de células progenitoras comunes, aunque en términos de expresión génica y función son muy diferentes. La heterogeneidad en la diferenciación de las células somáticas foliculares es un proceso cuidadosamente dirigido ya que ambos tipos celulares tienen distintas funciones: las **células del cúmulo (CC)** son responsables de un desarrollo adecuado del ovocito, facilitando la ovulación y posterior fecundación, mientras que las **células parietales de la granulosa (mCG)** están implicadas en la síntesis de esteroides y en la diferenciación hacia células lúteas (Gilchrist et al. 2008).

Bajo la influencia de la FSH, la vía por defecto de diferenciación de células de la granulosa es hacia el fenotipo más luteinizado de las mCGs. La eliminación de la

señalización ovocitaria paracrina hace que las CCs pierdan su fenotipo distintivo y comiencen a exhibir características más representativas de las mCGs, como por ejemplo, un bajo índice de proliferación, aumento en la expresión de receptores LH y capacidad esteroidogénica. Sin embargo, las CCs pueden recuperar sus rasgos distintivos si son tratadas con OSFs, demostrando que el ovocito anula activamente la diferenciación de las células de la granulosa hacia un fenotipo luteínico inducido por la FSH (Eppig et al. 1997). Estos estudios validan la observación original de que el ovocito previene la luteinización folicular (el-Fouly et al. 1970).

Puesto que la función primaria de los factores ovocitarios en los folículos terciarios es promover y mantener el fenotipo del complejo cúmulo-ovocito, no resulta sorprendente que adquieran su máxima actividad biológica durante la fase antral de la foliculogénesis. Conforme el folículo crece, las células de la granulosa contiguas a la pared folicular se diferencian en mCGs esteroidogénicas bajo influencia de la FSH, aunque estos efectos son contrarrestados por los factores ovocitarios únicamente en aquellas células estrechamente relacionadas con el ovocito (Diaz et al. 2007, Hussein et al. 2005). Se plantea que estos factores actúan de manera extremadamente localizada, estableciendo un gradiente morfogénico en el interior del complejo cúmulo-ovocito; la hipótesis se valida examinando el gradiente de actividad anti-apoptótica del ovocito a través de las capas del COC, donde se demuestra que la incidencia de apoptosis en las células del cúmulo es menor en las capas más internas y mayor en las capas más externas (Hussein et al. 2005). Estos resultados sugieren que las células del cúmulo son las receptoras primarias de la acción paracrina de estos factores ovocitarios y se concluye que una de sus principales funciones es dirigir la diferenciación de las células del cúmulo y mantener sus funciones características, regulando activamente la composición de un entorno altamente especializado que difiere del resto del folículo ovárico.

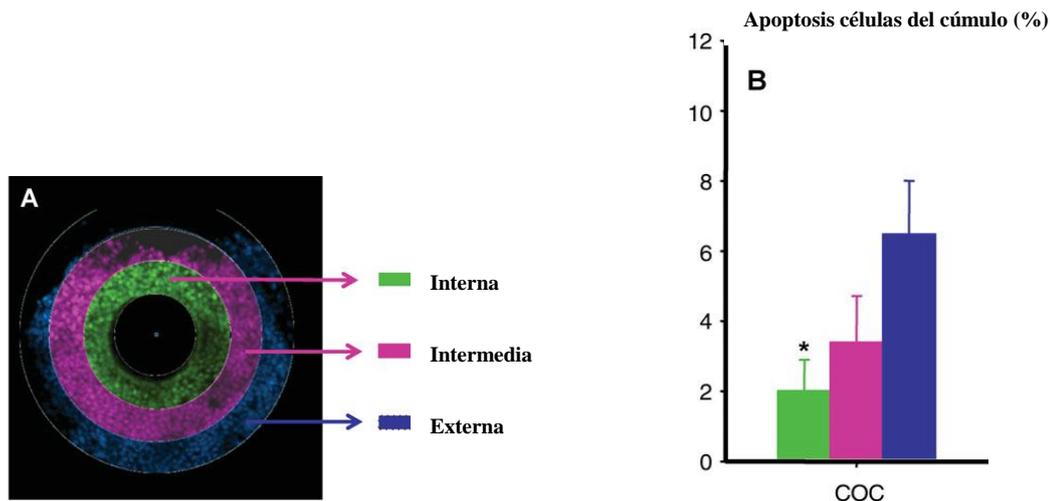


Figura 2. Gradiente morfogénico establecido por los OSFs en el COC (Hussein, 2005)

### 2.3.2.-Componentes de la matriz del cúmulo.

El pico pre-ovulatorio de gonadotropinas induce una secuencia de acontecimientos que culminan en la ovulación, siendo uno de los procesos más destacados la expansión del cúmulo o **mucificación**. Las gonadotropinas estimulan la síntesis de ácido hialurónico (HA) en las células del cúmulo, el cual se une a estas células y expande los espacios entre ellas, alojándolas en una matriz mucilaginosa. Este proceso es importante para la ovulación, ya que la inhibición de la síntesis de ácido hialurónico reduce notablemente la tasa de ovulación (Chen et al. 1993); de hecho, el éxito de la ruptura folicular y de la fecundación es enormemente sensible a las perturbaciones en la composición y en la capacidad funcional de la matriz del cúmulo.

La expresión génica asociada a la formación de la matriz del cúmulo está modulada por el ovocito a través de la secreción de factores como GDF-9 y BMP-15; una formación y expansión adecuada del cúmulo precisa de la síntesis de HA y de la incorporación de proteínas séricas y proteínas secretadas por las mCGs y CCs de folículos pre-ovulatorios. La composición y estabilidad de la matriz del cúmulo es fundamental para la ovulación y posterior proceso de fecundación ya que facilita la captura del complejo cúmulo-ovocito por la fimbria oviductal y media las interacciones ovocito-espermatozoide (Lam et al. 2000). La expansión del cúmulo también es importante en la maduración del citoplasma y en la protección del ovocito frente a agentes proteolíticos y mecánicos durante la extrusión desde el folículo.

### 2.3.3- Comunicación cúmulo-ovocito.

Un desafío clave al que se enfrentan los especialistas en medicina reproductiva es cómo integrar el conocimiento adquirido acerca de los factores secretados por el ovocito en mecanismos fisiológicos coherentes que expliquen cómo los ovocitos gobiernan la foliculogénesis, la función de las células del cúmulo, su propio desarrollo y su potencial de fertilidad. La comprensión de cómo actúan estos factores es sustancialmente complicada debido a las múltiples interacciones entre moléculas de señalización materna y del propio ovocito, y a los continuos cambios en las interacciones físicas entre el ovocito y las células somáticas adyacentes a lo largo de la foliculogénesis.

Las células del cúmulo están ancladas al ovocito y a otras moléculas a través de “gap junctions” que permiten la **comunicación célula-célula** y el intercambio de moléculas como iones, metabolitos y aminoácidos necesarios para el crecimiento ovocitario, así como de AMPc que controla la maduración nuclear del ovocito. La señalización vía uniones “gap junction” es un proceso esencial en la diseminación de señales endocrinas y locales procedentes del ovocito hacia las células del cúmulo.

En cuanto a los mecanismos moleculares que subyacen a esta comunicación paracrina, la atención se ha centrado en dos miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ : **GDF-9** y **BMP-15**, expresados por los ovocitos y que presentan una serie de rasgos que los hacen particularmente importantes en este tipo de interacciones:

- la expresión de GDF-9 y BMP-15 es necesaria para la fertilidad femenina ya que los portadores homocigotos de mutaciones en estos genes son estériles debido al bloqueo en el estadio primario de la foliculogénesis (Dong et al. 1996, Galloway et al. 2000).

- la expresión de GDF-9 y BMP-15 está restringida exclusivamente a los ovocitos (Juengel and McNatty 2005). La expresión no ovárica de estos factores varía entre especies y actualmente se desconoce si ejercen alguna función de carácter fisiológico.

- ambas proteínas forman un heterodímero. GDF-9 y BMP-15 se localizan juntas e incluso es probable que se secreten al mismo tiempo de modo que posiblemente actúen sinérgicamente a la hora de regular determinadas funciones de las células de la granulosa (McNatty et al. 2005a).

- desde una perspectiva ovárica local, GDF-9 y BMP-15 *in vitro* imitan todas las acciones ovocitarias relacionadas con el control de las funciones de las células

somáticas: regulan la expresión del ligando de Kit en células de la granulosa, estimulan la proliferación de células foliculares somáticas, previenen la apoptosis, inhiben la luteinización, regulan el metabolismo de las células del cúmulo y promueven la expansión y mucificación de la matriz del cúmulo (Gilchrist et al. 2008).

Los requerimientos energéticos del complejo cúmulo-ovocito son únicos, ya que tanto las células del cúmulo como los ovocitos presentan diferentes necesidades metabólicas (Eppig 2001). Los ovocitos son incapaces de incorporar L-alanina, no pueden sintetizar colesterol a partir de acetato y obtienen poco rendimiento energético del metabolismo de la glucosa; por su parte, las células del cúmulo metabolizan sustratos alternativos como aminoácidos, colesterol y glucosa, esenciales para el desarrollo y función ovocitaria. Los complejos cúmulo-ovocito participan en la comunicación bidireccional que demuestra la señalización conjunta entre el ovocito y las células del cúmulo circundantes; el registro de esta actividad en las células somáticas, específicamente en las células del cúmulo estrechamente relacionadas con el ovocito, puede ayudar a la descripción de marcadores potenciales de competencia ovocitaria.

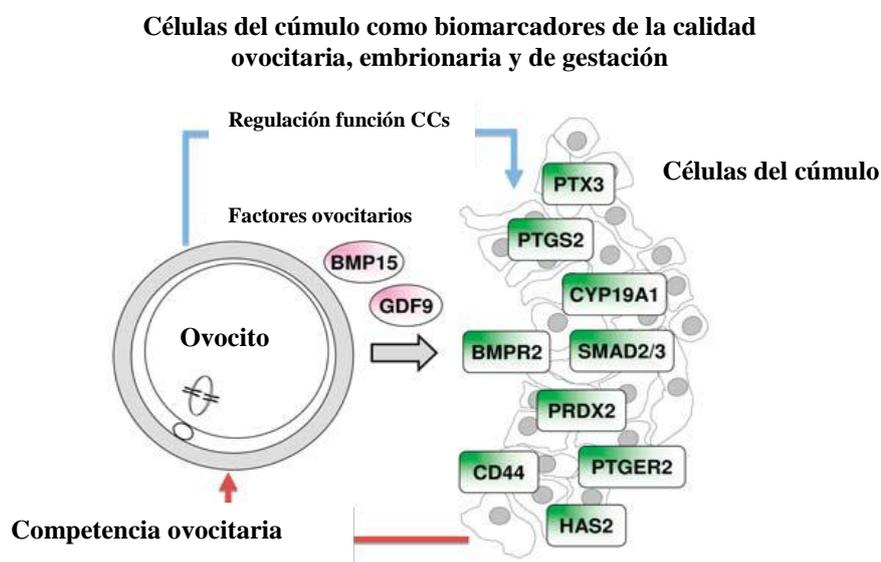


Figura 3. Papel de las CCs como reguladores potenciales de la competencia ovocitaria (Assou, 2010)

#### 2.4.-Función del folículo ovárico.

Las dos funciones principales del ovario son obtener ovocitos competentes y potencialmente fecundables y secretar las hormonas esteroideas necesarias que preparan

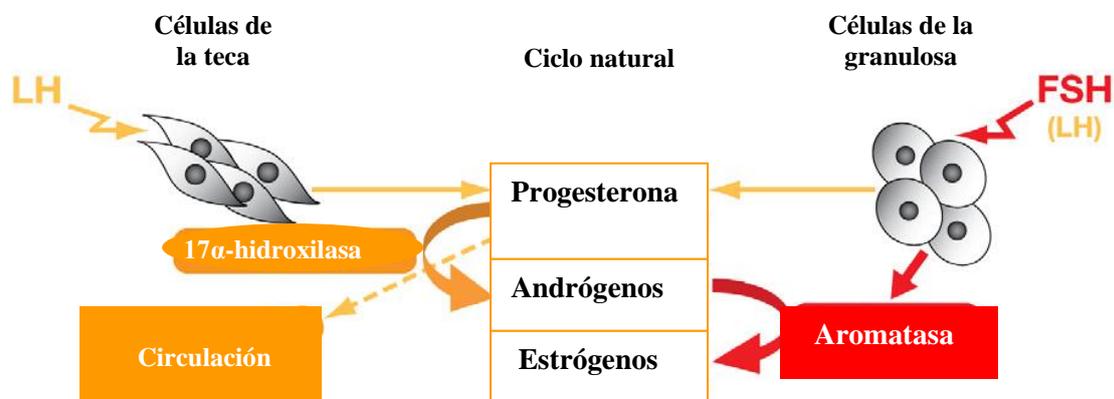
al tracto reproductivo para la fecundación y posterior gestación. Para ejercer su potencial esteroidogénico y ovulatorio, los folículos deben progresar por una serie de estadios del desarrollo altamente coordinados y regulados.

#### ***2.4.1.-Esteroidogénesis.***

La síntesis ovárica de esteroides y la señalización mediada por ellos son procesos críticos para el funcionamiento normal del ovario, incluyendo el crecimiento folicular, la maduración ovocitaria y la ovulación. La **esteroidogénesis** es vital para mantener el funcionamiento de las células de la granulosa ya que el estradiol y la progesterona son fundamentales para el desarrollo del complejo cúmulo-ovocito (Lucidi et al. 2003).

La FSH actúa sobre las células de la granulosa promoviendo la división celular y la síntesis de esteroides a partir del colesterol (Fleming 2008). El paso limitante en la síntesis intrafolicular de esteroides es la conversión del colesterol en pregnenolona y progesterona. De acuerdo al modelo de 2-células 2-gonadotropinas de la biosíntesis de estrógenos (Moor and Trounson 1977), la enzima CYP17A1 (17 $\alpha$ -hidroxilasa) metaboliza la progesterona a andrógenos en las células de la teca por influencia de la LH, y la aromataasa convierte a estos andrógenos en estrógenos en las células de la granulosa bajo el control de la FSH.

La progesterona producida en las células de la granulosa bajo la dirección de la FSH debe pasar a la región vascularizada de las células de la teca para ser catabolizada a andrógenos. Sin embargo, desde aquí, los esteroides pueden acceder a la circulación general o bien ser metabolizados en la cascada esteroidea normal. Es probable que conforme mayor sea la señal de LH sobre las células de la teca, mayor será la actividad catabólica que convierte a la progesterona en andrógenos, disminuyendo su presencia en la circulación general. Este proceso puede resumirse de la siguiente manera: hay dos fuentes de progesterona en el folículo, pero sólo un paso metabólico (catabolismo de progesterona a andrógenos), el cual está dirigido por la acción de la LH sobre las células de la teca (Fleming and Jenkins 2010).



**Figura 4. Esteroidogénesis durante un ciclo natural (Fleming, 2010)**

#### **2.4.2.-Función reproductiva.**

La ovulación es un proceso complejo a través del cual el folículo ovárico reactiva la meiosis ovocitaria, se crea un poro de ruptura en el extremo apical del folículo y se inicia la reestructuración y diferenciación del tejido inicial para la formación del cuerpo lúteo. Estos procesos son fundamentales para la implantación y el desarrollo embrionario.

La cronología de la **ovulación** se inicia con un folículo pre-ovulatorio sensible al pico de LH, que actúa sobre las células de la granulosa y de la teca estimulando la síntesis de AMPc y activando una cascada selectiva de señalización de la PKA (Richards 2001). Estas rutas de señalización inducen rápidamente la transcripción de genes específicos, los cuales se expresan transitoriamente antes de la ruptura folicular; estos productos génicos inician y/o alteran vías adicionales de señalización celular y promueven la remodelación folicular para la posterior formación del cuerpo lúteo.

La ovulación está dirigida por una secuencia de acontecimientos que se inician con la recepción por parte del folículo del pico de gonadotropinas, única señal que desencadena todo el proceso; en respuesta a este estímulo, se observan una serie de cambios en la expresión génica y en la estructura folicular que tienen consecuencias interdependientes para la teca, las células parietales de la granulosa, las células del cúmulo y los compartimentos ovocitarios del folículo ovárico. En resumen, la ovulación es un proceso controlado por numerosos factores que facilitan la sincronización de la

maduración ovocitaria con su liberación, al mismo tiempo que permite la selección de los ovocitos que han adquirido una competencia completa para el desarrollo.

### **2.5.- Competencia ovocitaria.**

El concepto de competencia ovocitaria hace referencia a la capacidad del ovocito para completar la maduración, ser fecundado y producir embriones de buena calidad capaces de generar una descendencia viable. Se han publicado numerosos estudios que documentan la importancia de la maduración como paso crucial en la adquisición de la **competencia ovocitaria** (Hyttel et al. 1986, Sirard et al. 2007) en los que se llega a la conclusión de que la maduración citoplásmica, nuclear y molecular del ovocito es determinante para el éxito global de la competencia ovocitaria teniendo en cuenta que estos procesos son coincidentes e interdependientes.

#### ***2.5.1.-Adquisición de la competencia ovocitaria.***

El principal acontecimiento de la **maduración nuclear** implica la progresión del núcleo desde el estadio de vesícula germinal hasta metafase II. La **maduración citoplásmica** incluye una serie de modificaciones ultraestructurales que afectan a la pre-maduración (pocos días antes del pico de LH) y maduración final del ovocito, y que permiten la fecundación, división y mantenimiento de las primeras etapas del desarrollo embrionario; desafortunadamente, no se pueden realizar registros directos de este proceso, de ahí que la maduración nuclear se use como referencia de la maduración citoplásmica del ovocito. Por último, la **maduración molecular** es necesaria para garantizar la maduración (Sirard et al. 2006), y su importancia aumenta cuando se adquiere conciencia de las limitaciones de los criterios morfológicos usados para identificar la competencia ovocitaria; gracias a sus reservas metabólicas, el ovocito maduro es potencialmente fecundable y capaz de sostener el desarrollo embrionario temprano.

#### ***2.5.2.-Marcadores de competencia ovocitaria.***

Los conocimientos actuales de los mecanismos que contribuyen a la adquisición de la competencia ovocitaria conducen al desarrollo de estudios de perfiles de expresión génica diseñados para encontrar marcadores de calidad ovocitaria. La identificación de

estos marcadores permitiría mejorar los resultados de un ciclo de reproducción asistida y ampliar el campo de conocimiento en relación a la maduración ovocitaria y a la importancia del entorno folicular (Gebhardt 2010).

Históricamente, las mejoras en las tasas de gestación *in vitro* se han conseguido a través de mejoras en las condiciones de cultivo y en los procedimientos del laboratorio; sin embargo, la posibilidad de identificar a los gametos y/o embriones más competentes se ha basado tradicionalmente en la evaluación morfológica durante el periodo de cultivo. La dificultad de seleccionar fiablemente al ovocito con mayor potencial de desarrollo se traduce en tasas de gestación relativamente bajas y en la transferencia de varios embriones con un aumento del porcentaje de gestaciones múltiples y las consiguientes complicaciones obstétricas y pediátricas.

Los **marcadores de calidad ovocitaria** susceptibles de ser aplicados a un procedimiento clínico deben ser no-invasivos, hecho que limita la valoración ovocitaria a inspecciones morfológicas. Sin embargo, las células de la granulosa y en particular las células del cúmulo se presentan como una opción alternativa, ya que se recuperan con facilidad durante el transcurso del tratamiento. El papel vital de estas células en el desarrollo del ovocito *in vivo* y en la maduración *in vitro* las ha convertido en el centro de atención de muchos investigadores con el propósito de obtener respuestas sobre cómo maduran y se desarrollan los ovocitos en su trayecto hacia la adquisición de funciones reproductivas.

### **3. Protocolos de estimulación.**

Los tratamientos farmacológicos que restauran o modifican desde un punto de vista terapéutico los procesos ovulatorios se han utilizado para tratar, en las últimas décadas, trastornos relacionados con desórdenes del ciclo menstrual y condiciones de infertilidad. El discurso teórico de estos tratamientos se basa en la capacidad de estos fármacos de superar e interrumpir los mecanismos de control hormonal de un ciclo natural para forzar al ovario a producir uno o más folículos y en consecuencia, más ovocitos competentes desde un punto de vista reproductivo.

### **3.1. Tipos de gonadotropinas.**

La investigación subyacente a la producción de las preparaciones gonadotrópicas más habituales engloba las últimas cinco décadas. La industria de las gonadotropinas ha evolucionado desde los extractos urinarios hasta la aplicación de técnicas recombinantes que revierten una amplia variedad de preparaciones de FSH para la estimulación ovárica y cuyo resultado es la ampliación de las opciones a la hora de elegir fármacos efectivos con similar eficacia clínica (Casper 2005).

#### **3.1.1. Mecanismos de obtención.**

En los 85 años transcurridos desde el descubrimiento de las gonadotropinas (Aschheim, S. & Zondek, B. 1927), la FSH se ha convertido en el fármaco principal en las terapias contemporáneas frente a la infertilidad. Sus aplicaciones clínicas incluyen el tratamiento de la infertilidad anovulatoria y la estimulación ovárica de mujeres sometidas a un tratamiento de reproducción asistida. Además, la FSH también puede emplearse en el tratamiento de la infertilidad masculina con origen en el hipogonadismo hipogonadotrópico.

- Extractos hipofisarios. Las gonadotropinas se introdujeron por primera vez en las terapias de inducción de la ovulación en 1958, cuando Gemzell logró el primer embarazo con gonadotropinas extraídas de glándula hipofisaria humana (Gemzell et al. 1958). El uso de estos extractos continuó durante tres décadas hasta que el riesgo de infección por priones eliminó este tratamiento del conjunto de protocolos terapéuticos.

#### -Extractos urinarios

-Gonadotropina menopáusica humana (hMG). Los ovarios menopáusicos se caracterizan por un marcado descenso en la síntesis de estrógenos; como resultado, aumenta la presencia sérica y la excreción urinaria de FSH y LH hipofisarias. Donini (Donini et al. 1964) describió un conjunto de técnicas para extraer estas hormonas a partir de la orina de mujeres menopáusicas para su posterior uso biológico en mujeres en edad reproductiva.

Las primeras gonadotropinas clínicamente disponibles contenían una mezcla de FSH y LH en proporción 1:1 y una gran cantidad de proteínas urinarias. Las mejoras en las técnicas de purificación condujeron a una estandarización de la actividad FSH y LH en 75 UI para cada tipo de gonadotropina, aunque actualmente todavía persisten

proteínas urinarias en las preparaciones de **hMG** disponibles comercialmente. La actividad LH en la hMG deriva originariamente del componente hCG, el cual se concentra durante el proceso de purificación y se añade para lograr el grado de actividad LH deseado (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama 2008).

-FSH urinaria. La eliminación de la LH mediante anticuerpos policlonales resultó en una preparación biológicamente pura de **FSH urinaria** (FSHu) que todavía contenía proteínas (Giudice et al. 1994). El uso de anticuerpos monoclonales específicos para la FSH supuso la introducción de cierto grado de refinamiento en los procesos de producción, lo que condujo a la síntesis de **FSH urinaria altamente purificada** (HP-FSHu) con menos de 0.1 UI de LH y del 5% de proteínas urinarias no identificadas. El mayor grado de pureza y el aumento en la actividad específica de la HP-FSHu permite la administración subcutánea en volúmenes muy pequeños, además de la eliminación virtual de la variación entre lotes.

-Extractos recombinantes. El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante abrió la puerta a la síntesis de preparaciones de **FSH recombinante** (FSHr); este hecho garantizó una disponibilidad ilimitada del producto y mejoró la consistencia entre lotes en comparación con las gonadotropinas urinarias. En general, la purificación de los preparados gonadotrópicos ha contribuido al diseño de protocolos de estimulación individualizados, ha facilitado el proceso de administración y ha permitido un tipo de administración subcutánea debido a la menor concentración proteica (Feinberg et al. 2005). Las dos preparaciones de FSH recombinante disponibles en el mercado son la folitropina  $\alpha$  y la folitropina  $\beta$ ; recientemente, se ha incorporado a este grupo de fármacos la corifolitropina alfa con un sistema de liberación retardado de FSH recombinante (Devroey et al. 2009).

La **gonadotropina coriónica humana** (hCG) se ha utilizado en los tratamientos de reproducción asistida para imitar el pico de LH endógeno, debido a las semejanzas estructurales entre la propia hCG y la LH y a que ambas hormonas estimulan el mismo receptor. Promueve los estadios finales de la maduración folicular y la progresión meiótica y puede derivar de la orina de mujeres gestantes (hCG) o bien producirse a nivel industrial como **hCG recombinante** (r-hCG), donde 250  $\mu$ g de hormona equivalen a 5000-6000 UI de hCG.

La **LH recombinante** (LHr) refuerza el desarrollo folicular en combinación con la FSH en pacientes que presentan hipogonadismo hipogonadotrópico y que tienen un profundo déficit de LH (Hreinsson et al. 2003)

### **3.1.2. Mecanismos de acción. Efectos sobre la foliculogénesis.**

Aunque se ha descrito la participación de numerosos factores en el desarrollo folicular, la FSH y la LH desempeñan un papel central en los complejos y delicados mecanismos endocrinos que regulan la biología del ovario. Comprender la estructura molecular de las gonadotropinas y de sus receptores así como los mecanismos que gobiernan su función se ha convertido en el objetivo fundamental de la industria farmacéutica con el propósito de implementar sus aplicaciones en los tratamientos de reproducción asistida.

- FSH y foliculogénesis. La FSH desempeña un papel obligatorio en el mecanismo de selección y desarrollo del folículo dominante, no habiendo ningún otro ligando que por sí mismo posea esta actividad reguladora. El control diferencial ejercido por la FSH a través de la ruta de señalización PKA/AMPC es el responsable del crecimiento del folículo dominante y del desarrollo durante el estadio pre-ovulatorio. El diálogo entre las rutas de señalización activadas por la FSH deriva en el fenotipo característico de las células parietales de la granulosa

Aunque todos los folículos tienen la capacidad potencial de madurar, sólo los folículos en estadios avanzados del desarrollo y más sensibles a la FSH ganan dependencia gonadotrópica, experimentando un reclutamiento secundario en oposición a la fase previa independiente de gonadotropinas. En la posterior transición lúteo-folicular, los folículos seleccionados comienzan a crecer a mayor velocidad bajo la influencia de la elevación selectiva inicial de la FSH más allá de una concentración umbral crítica (van Santbrink et al. 1995) capaz de abrir la denominada “**ventana de la FSH**” y que permite la entrada de los folículos antrales más sensibles a la acción de la hormona; cuando los niveles de FSH comienzan a disminuir todos los folículos, excepto aquéllos con mayor sensibilidad a la actividad FSH, entran en atresia (Macklon and Fauser 2001). Además, la FSH induce la síntesis de receptores de LH en las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios; la acción de la LH sobre sus receptores activa a la adenilato-ciclasa con la consiguiente síntesis de AMPC que representa una respuesta adicional a la FSH. El folículo que está madurando reduce su dependencia de

la FSH mediante la adquisición de receptores y de sensibilidad a la LH (Filicori et al. 2002b).

*-LH y foliculogénesis.* La LH ejerce un papel fundamental en la selección y dominancia monofolicular. Aunque las células de la granulosa de los folículos antrales tempranos sólo responden a la FSH, aquellos folículos maduros que expresan receptores para la LH también son capaces de responder a la hormona y son progresivamente menos dependientes del estímulo de la FSH. La LH se une a su receptor con un elevado grado de afinidad iniciando una serie de fenómenos que culminan con la activación de un conjunto de rutas de señalización (PKA/AMPC) que conducen eventualmente a la síntesis de andrógenos (androstenediona); sin embargo, si las concentraciones de LH superan un nivel máximo, el desarrollo de los folículos pre-ovulatorios se inhibe.

En el delicado contexto de interacción hormonal en la etapa dependiente de gonadotropinas de la fase folicular, la acción de la LH queda enmarcada en un intervalo de concentración delimitado por unos valores mínimos y máximos. Durante la segunda mitad de la fase folicular, cuando la FSH decae, la etapa dependiente de LH del desarrollo folicular pre-ovulatorio progresa normalmente si los niveles de LH se encuentran dentro de esos límites. Con estos argumentos, se plantea la posibilidad de que la actividad LH por sí sola es capaz de sostener la secreción folicular de estrógenos en ausencia de un estímulo de FSH. Sullivan (Sullivan et al. 1999) demostró que la interrupción en la administración de FSH al final de la etapa folicular supone un descenso tanto en las concentraciones de FSH como de estradiol; sin embargo, la sustitución de FSH recombinante por LH recombinante estimula la secreción folicular de estradiol hasta niveles comparables a los de tratamientos con una administración continuada de FSH recombinante. Aunque la duración de este estudio es demasiado corta para analizar en profundidad el efecto de este tipo de estimulación bifásica sobre el desarrollo folicular, se demostró por primera vez que la secreción ovárica de estrógenos puede mantenerse con una administración selectiva de LH.

Posteriormente Filicori (Filicori et al. 2002c) demostró que dosis bajas de hCG pueden estimular el crecimiento y maduración folicular en ausencia de FSH. Estos datos sugirieron que en las etapas finales de la inducción de la ovulación, la FSH puede ser reemplazada por dosis bajas de hCG/LH sin ningún efecto negativo sobre los resultados del tratamiento. En resumen, la información disponible actualmente sugiere que la actividad LH puede usarse para mejorar y optimizar los efectos de la FSH en los protocolos de estimulación ovárica.

#### 4.- Tecnología de los microarrays.

Un paso clave en los tratamientos de Reproducción Asistida es la evaluación de la calidad ovocitaria y embrionaria para determinar los embriones con más posibilidades de derivar en una gestación. Desafortunadamente, el conocimiento de los determinantes moleculares de la competencia embrionaria es limitado, por lo que las estrategias clínicas habituales se basan en el examen de la morfología y de la tasa de división embrionaria aunque su precisión está lejos de ser la ideal (Bromer and Seli 2008). El diseño de una prueba objetiva y segura que permita identificar al ovocito/embrión más competente y que por tanto conduzca a una mejora de las tasas de gestación al mismo tiempo que disminuye la tasa de gestaciones múltiples supone uno de los grandes desafíos de la medicina reproductiva. En los últimos tiempos, el desarrollo tecnológico ha permitido el acceso a la información contenida en el genoma, haciendo de la biología una ciencia única en el sentido de que los investigadores cuentan con un núcleo central de información accesible que actúa como punto de partida para la comprensión de los distintos procesos biológicos.

Tradicionalmente, el estudio de una determinada patología y/o de la eficacia de un procedimiento médico implicaba la descripción del fenotipo como principal fuente de información; aunque esta metodología sigue siendo útil, en los últimos tiempos han surgido nuevas herramientas que han permitido ampliar la descripción fenotípica y aplicar esta nueva información a un nuevo contexto de interacciones genotipo-fenotipo. La emergencia de las denominadas “**ómicas**” ha modificado gradualmente los métodos de aproximación al estudio de la fisiología en mamíferos, ya que son capaces de identificar y cuantificar todos los componentes de los sistemas celulares diseccionando las rutas de señalización intracelular, hecho que permite obtener una gran cantidad de información en un periodo corto de tiempo. La aplicación de estas técnicas a los tratamientos de Reproducción Asistida es un acontecimiento relativamente reciente; entre sus ventajas destacan la contribución al diseño de procedimientos no invasivos que faciliten la selección embrionaria en un programa de transferencia única, la evaluación del impacto de los protocolos de estimulación sobre la receptividad endometrial y la identificación de proteínas que predicen una evolución normal o degenerativa del embrión.

Cada célula combina la información aportada por el genoma y por el entorno para crear un fenotipo característico. La monitorización de los cambios en la transcripción génica permite la identificación de un conjunto de genes funcionalmente

relacionados con un fenotipo tisular o celular. Los **análisis transcriptómicos** se emplean para saber qué genes se han transcrito y en qué cantidad, por lo que en esencia los microarrays ofrecen la posibilidad de obtener información de multitud de genes simultáneamente a partir de una única muestra.

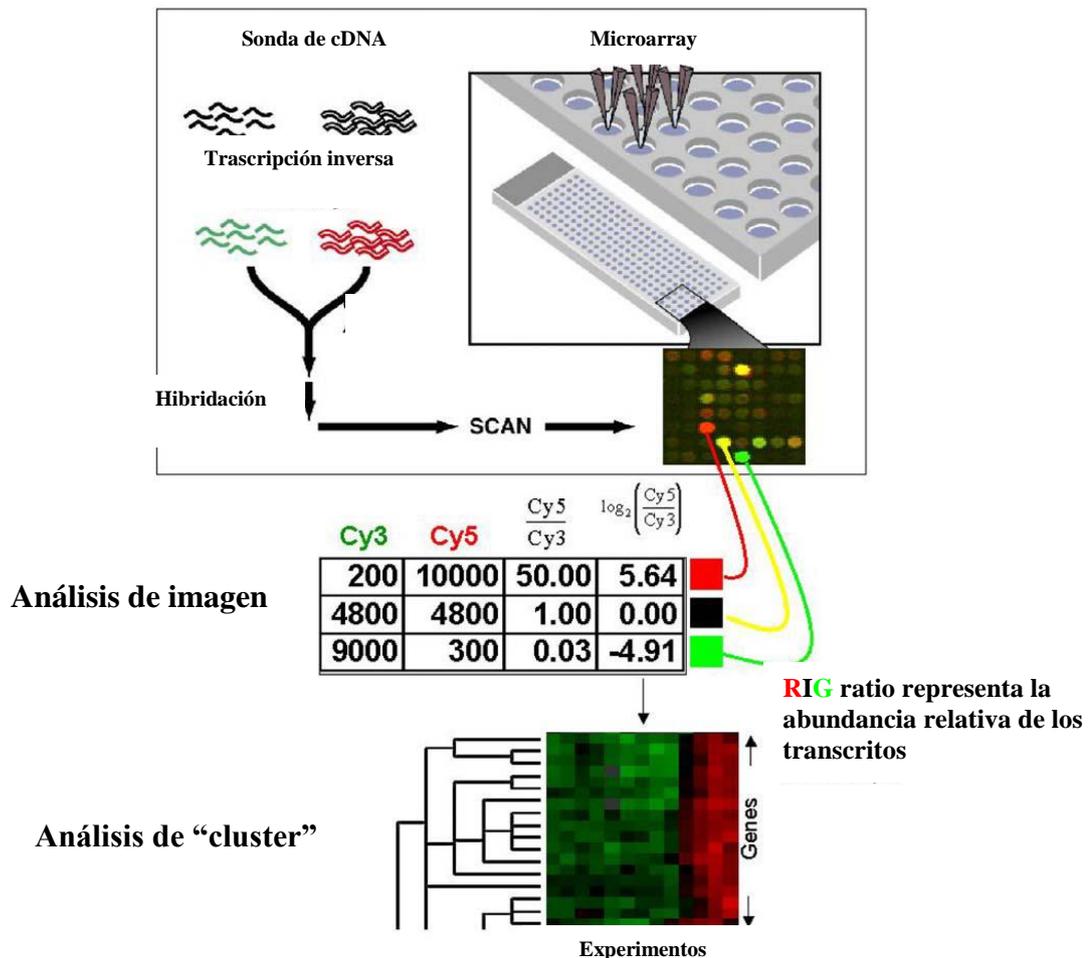


Figura 5. Tecnología de microarrays

#### 4.1. Análisis transcriptómico de las células del cúmulo y de la granulosa.

El análisis transcriptómico en el contexto de la medicina reproductiva puede servir para diferentes propósitos: identificación de un fenotipo celular para la comprensión de un fenómeno fisiológico, selección mejor ovocito/embrión o evaluación de la respuesta a un protocolo de estimulación hormonal (Hamel et al. 2008). Uno de los aspectos más atractivos de esta tecnología es el análisis de las células del cúmulo en la búsqueda de nuevos marcadores de calidad ovocitaria; estas células

comparten el mismo ambiente folicular que el ovocito asociado, además de que pueden manipularse y testarse sin riesgo a comprometer la viabilidad del mismo. Los datos acerca de la expresión de biomarcadores en estas células aportan información consistente y precisa sobre el micro-ambiente de maduración ovocitaria, aumentando la capacidad de los embriólogos para seleccionar a los embriones más competentes en el momento de la transferencia.

Tras los primeros trabajos centrados en la caracterización del transcriptoma de las células del cúmulo (Assou et al. 2006), el grupo de Hamamah trató de identificar reguladores potenciales y marcadores génicos implicados en la maduración ovocitaria (Gasca et al. 2007) y describieron genes involucrados en el ciclo celular y en la reparación del DNA cuya expresión tiene relevancia en la determinación de la calidad ovocitaria. En un estudio posterior, el mismo grupo demostró que los ovocitos morfológicamente normales de pacientes con fallos recurrentes de fecundación presentaban patrones de expresión génica alterados que afectaban principalmente a genes relacionados con la meiosis, el crecimiento celular y la apoptosis (Gasca et al. 2008).

En 2008, se publicó un trabajo que demostraba que los perfiles de expresión génica de las células del cúmulo estaban significativamente relacionados con la morfología embrionaria y los consiguientes resultados clínicos; se observó la sobreexpresión de Bcl-2 implicado en la apoptosis y de PCKI en la gluconeogénesis así como la disminución en los niveles del factor de transcripción NFIB (Assou et al. 2008).

Feuerstein (Feuerstein et al. 2007), examinó la expresión de 6 genes en células del cúmulo de folículos pre-ovulatorios mediante PCR. La selección de estos genes se basó en su inducción por el pico de LH (StAR, COX2 y AREG), su función en el metabolismo lipídico (SCD1 y SCD5) y/o en las “gap junction” (Cx43). Los niveles de expresión de todos los genes analizados, excepto de Cx43, aumentaron después de reiniciarse la meiosis. Se concluyó que la maduración nuclear de los ovocitos estaba asociada a un aumento de la expresión de StAR, COX-2, AREG, SCD1 y SCD5, al demostrarse la presencia de un fuerte vínculo entre los patrones de expresión génica y la capacidad de desarrollo.

Los trabajos con COX-2, HAS2 y GREM1 identificaron a estos genes como marcadores de competencia ovocitaria (McKenzie et al. 2004). Las células aisladas de ovocitos que se desarrollaron normalmente a embriones de día 3 presentaron mayor cantidad de estos transcritos que las células del cúmulo derivadas de ovocitos que

generaron embriones de mala calidad. Estudios posteriores (Cillo et al. 2007) confirmaron estos resultados y demostraron que el registro de los niveles de expresión de estos genes puede actuar como complemento a la valoración morfológica y actuar como una herramienta de selección adicional en los procesos de selección embrionaria.

Otros trabajos se han centrado en el estudio de los patrones de expresión génica entre embriones que presentan o no división temprana (van Montfoort et al. 2008). Se identificaron 8 genes con diferencias consistentes en su expresión y cuya función sugería su participación en el establecimiento de condiciones hipóxicas (CXCR-4, GPX-3, DVL3 y HSPB1) y/o de retraso en la maduración ovocitaria (CCND2, CTNDD1, DHCR7, y TRIM28) en embriones que no habían experimentado una división temprana. Por último, otra colección de marcadores de competencia folicular/ovocitaria procede de los estudios de Hamel (Hamel et al. 2008) quien describió una serie de genes específicos en células del cúmulo y de la granulosa pertenecientes a ovocitos que desembocan en una gestación (CDC42, SERPINE2, FDX1 y CYP19A1). Los genes con expresión diferencial entre ovocitos competentes y de peor pronóstico reproductivo estaban involucrados en distintas funciones ovocitarias.

Aunque la cantidad de información obtenida es extraordinaria, sólo estamos al principio de encajar las piezas que definen las complejas interacciones entre el ovocito y las células foliculares circundantes.

## **5.- Citometría de flujo.**

La citometría de flujo es una técnica ampliamente utilizada que aporta información relacionada con parámetros como el tamaño, granulosidad y contorno celular así como sobre diversas funciones biológicas relacionadas con la capacidad enzimática y la expresión de moléculas específicas en tipos celulares particulares. Se ha aplicado al estudio de numerosos fenómenos asociados a procesos reproductivos; esta técnica puede aplicarse al análisis de proteínas de membrana con el propósito de identificar tipos celulares específicos en el contexto de una muestra más heterogénea o puede utilizarse para la cuantificación de moléculas intracelulares en distintos tejidos reproductivos bajo unas condiciones concretas (Garrido et al. 2002).

### 5.1. Aplicaciones al estudio de células de la granulosa.

Aunque contamos con numerosos indicadores de los posibles resultados de un tratamiento de reproducción asistida, todavía hay numerosos aspectos relacionados con los mecanismos básicos de la fisiología ovárica que resultan desconocidos. Como se ha comentado anteriormente, las células de la granulosa operan como determinantes críticos del destino ovocitario y dado el papel central de la FSH en la regulación y selección del folículo dominante, cada vez está más claro que las interacciones entre el ovocito y las células de la granulosa son obligatorias en este proceso de selección; considerando la estrecha relación entre ambos tipos celulares, el estatus de las células de la granulosa funciona como imagen especular de la condición ovocitaria (Suh et al. 2002).

La **apoptosis** está relacionada con la atresia folicular en ciclos naturales y estimulados (Palumbo and Yeh 1994). En la fase temprana de la apoptosis se observa una alteración en la organización de los fosfolípidos en la membrana plasmática, lo que deriva en la exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana; este evento es importante ya que permite el reconocimiento de las células apoptóticas por los macrófagos. Por su parte, la apoptosis tardía supone la fragmentación del DNA en segmentos de bajo peso molecular como consecuencia de una permeabilización previa de las membranas.

La determinación del grado de apoptosis en las células de la granulosa puede ayudar a predecir el potencial de desarrollo ovocitario en un ciclo de fecundación *in vitro*. En mamíferos, la mayor parte de la atresia folicular se observa entre el final de la etapa pre-antral y el inicio de la fase antral, cuando el crecimiento folicular es dependiente de gonadotropinas. Los primeros signos de atresia apuntan hacia la degeneración de las células parietales de la granulosa, que pierden su actividad aromataza y sufren apoptosis; posteriormente, las células de la teca se hipertrofian y disminuyen su producción de androsterona, mientras que el ovocito y las células del cúmulo sólo se ven afectadas en los estadios más avanzados de la degeneración folicular.

El estudio de la tasa de apoptosis asociado a las células de la granulosa pretende identificar marcadores no morfológicos de calidad ovocitaria. La baja tasa apoptótica de las células del cúmulo es consecuencia de su estrecho contacto con el ovocito y de su exposición a factores secretados por el mismo (Hussein et al. 2005), cuya actividad se ve reforzada en presencia de la FSH. Mantener la función fisiológica de las células del

cúmulo durante más tiempo implica favorecer la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito hasta la ovulación, y recuperar gametos con mejores cualidades capaces de sostener la fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario. Un bajo índice apoptótico de las células del cúmulo es indicativo de una buena calidad ovocitaria (Bosco et al. 2005).

Teniendo en cuenta los diferentes efectos inductores (andrógenos, GnRH y análogos de la GnRH) e inhibidores (estradiol, FSH, LH y hCG) sobre la apoptosis, no es sorprendente pensar que los protocolos de estimulación puedan aumentar la tasa de apoptosis en células del cúmulo en comparación con los ciclos naturales (Kaneko et al. 2000). La valoración de la muerte celular en la granulosa revela que los mecanismos de inhibición hipofisaria desencadenados por los análogos de la GnRH no afectan a la supervivencia celular (Giampietro et al. 2006, Hassun Filho et al. 2008); sin embargo, cuando se examina la apoptosis en células parietales de la granulosa se observa que ésta es más común en tratamientos con agonistas de la GnRH en comparación con ciclos naturales o espontáneos (Thomas and Vanderhyden 2006) y que las células de la granulosa expuestas a agonistas de la GnRH son más susceptibles de sufrir apoptosis que las expuestas a antagonistas (Nakahara et al. 1997). Por último, se publican una serie de trabajos que ponen de relevancia el efecto protector tanto de la FSH (Hussein et al. 2005) como de la LH (Ruvolo et al. 2007) a la hora de preservar a las células del cúmulo de los fenómenos apoptóticos.

# **OBJETIVOS**

El micro-ambiente folicular es crítico para la maduración ovocitaria. En este contexto, destacan el propio líquido folicular y las células del cúmulo caracterizadas por mantener una estrecha relación funcional con el ovocito, ser esenciales para la maduración ovocitaria y responder directamente a las señales procedentes del mismo, por lo que podrían considerarse como células que reflejan la calidad del ovocito al que acompañan. El patrón de expresión génica de las células del cúmulo y las determinaciones hormonales y de factores ovocitarios en líquido folicular son indicativas de la calidad ovocitaria, por lo que su determinación puede contribuir de forma muy valiosa a la optimización de los protocolos de estimulación, y en consecuencia, a la mejora de los criterios de selección ovocitarios y embrionarios.

Con estas premisas, los objetivos del estudio son:

1.- cuantificar los niveles de expresión de las proteínas GDF-9 y BMP-15 en función del tipo de gonadotropina empleada (FSH recombinante, FSH urinaria o hMG) utilizando técnicas de inmunoensayo.

2.-cuantificar niveles hormonales (FSH, estradiol, testosterona y progesterona) en líquido folicular dependiendo del tipo de gonadotropina empleada (FSH recombinante, FSH urinaria o hMG).

3.- determinar el porcentaje de apoptosis y necrosis en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina utilizado en una estimulación ovárica (FSH recombinante, FSH urinaria o hMG) a partir de técnicas de citometría de flujo.

4.- establecer las diferencias en los patrones de expresión génica en células del cúmulo en función del tipo de gonadotropina empleado en un protocolo de estimulación ovárica (FSH recombinante, FSH urinaria o hMG) mediante tecnología de microarrays.

5.- a través de plataformas de microarrays, identificación de marcadores génicos expresados diferencialmente en células del cúmulo asociados a la calidad ovocitaria, dependiendo del tipo de gonadotropina aplicado en un protocolo de estimulación (FSH recombinante, FSH urinaria o hMG)

6.- ofrecer una nueva estrategia de trabajo cuantitativa y no invasiva que mejore los criterios de selección ovocitaria y embrionaria.

# **MATERIAL Y MÉTODO**

## 1.- Donación de ovocitos

### 1.1.- Selección de las donantes

Se realizó un estudio prospectivo y aleatorio en el que participaron 90 mujeres incluidas en nuestro programa de donación de ovocitos. Con respecto al propio proceso de donación, hay que tener en cuenta que según la legislación vigente en España (Ley 14/2006 de 26 Mayo):

- la donación debe ser anónima y no tener carácter lucrativo y/o comercial

- la edad de las donantes debe estar entre 18-35 años

- las donantes deben gozar de buen estado psicofísico y carecer de antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias (vasculopatías, ceguera, artritis grave, diabetes juvenil), esquizofrenia, depresión, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, alcoholismo, etc.

- las donantes deben presentar serologías negativas para sífilis, toxoplasma, rubéola, gonorrea, *Chlamydia*, hepatitis B, hepatitis C y VIH determinado previamente al inicio de la estimulación.

- además, el IVI ha introducido una serie de requisitos adicionales que incluyen la confirmación de un cariotipo normal (46, XX).

- asimismo, debe garantizarse en la medida de lo posible, la máxima similitud fenotípica e inmunológica (grupo sanguíneo y Rh) de la donante con la pareja receptora y su entorno familiar.

Todas las donantes mostraron ciclos menstruales de 27-28 días de duración, un índice de masa corporal (IMC) entre 18-28 Kg/m<sup>2</sup>, ausencia de tratamiento endocrino incluyendo la administración de gonadotropinas y/o algún tipo de anticonceptivo oral en los 3 meses previos al estudio, útero y ovarios ecográficamente normales y un recuento de folículos antrales igual o superior a 6 folículos por ovario en estado basal.

La asignación de pacientes a cada tratamiento de estudio se realizó en base a un diseño experimental que comprende un muestreo de oportunidad consecutiva; las donantes que visitaron el centro se incluyeron de forma consecutiva en cada uno de los protocolos de estudio hasta que se completó el número de pacientes asignados a cada uno de ellos. La distribución se realizó durante la visita de control que coincidía con el inicio de la regla, antes de comenzar la estimulación ovárica.

## **1.2. Consentimiento informado**

Las donantes de ovocitos firmaron un consentimiento informado que les fue entregado por el centro, y en el que figuraba una descripción del procedimiento al que se van a someter junto a los posibles efectos secundarios derivados del mismo.

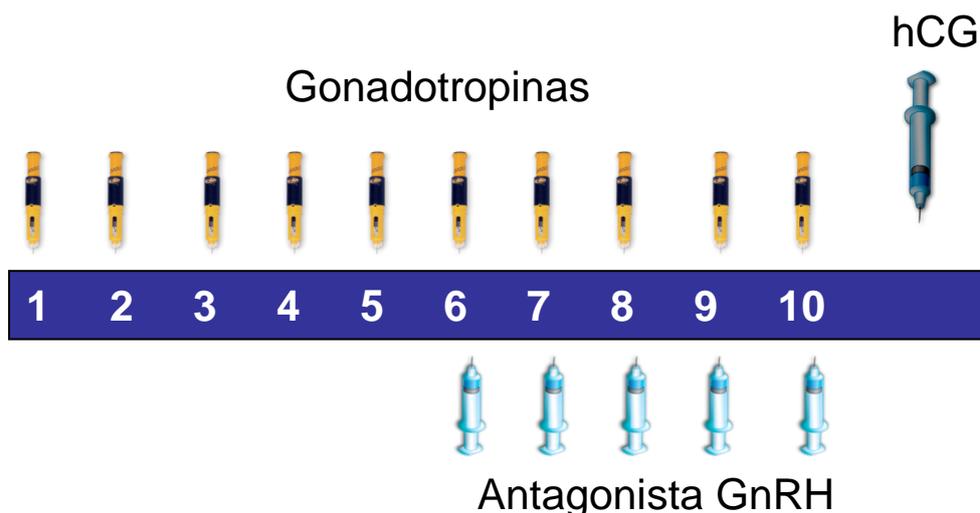
## **2.- Protocolo de estimulación.**

En este estudio se aplicó un protocolo corto con antagonistas en dosis múltiple y pauta fija de inicio de la administración; previamente, las donantes habían recibido un tratamiento con anticonceptivos (Microgynon30, Bayer Hispania, España) desde el día 1-2 de regla del ciclo anterior y durante 12-16 días, transcurriendo un periodo de 5 días desde el último día del tratamiento con anticonceptivo hasta el inicio del protocolo de estimulación.

En el día 5 post-píldora se inició la estimulación con gonadotropinas a una dosis inicial que varió entre 150-300 UI de FSH recombinante (Gonal-F®, Merck-Serono, España), FSH urinaria (Fostipur®, Angelini, España) o hMG (HMG-Lepori®, Angelini, España), dependiendo de la edad, el índice de masa corporal, la respuesta obtenida en ciclos previos y el número de folículos antrales; el antagonista se introdujo en día 6 de estimulación a dosis de 0.25 mg/día (Cetrotide®, Merck-Serono, España).

Cuando se observó una respuesta folicular adecuada (3 ó más folículos de 18 mm de diámetro medio) se desencadenó la ovulación con hCG (Ovitrelle®, 250 µg; Merck-Serono, España).

En cada protocolo de estimulación se incluyeron un total de 30 donantes.



**Figura 6. Protocolo de estimulación**

### **3.- Punción ovárica y recuperación de ovocitos**

Se realizó punción folicular guiada por ecografía vaginal entre 35-36 horas después de haber administrado el agente desencadenante de la ovulación, anticipándonos al proceso ovulatorio. Se empleó anestesia general, consistente en una sedación, para la que se usó:

- propofol (2-3 mg/kg), a una velocidad de 3-4 ml/minuto, repitiendo bolos de 20-50 mg dependiendo del tiempo de la punción.

- atropina 0,5 mg.

- fentanilo 0,75 mg como analgésico intravenoso.

- analgésicos por vía intravenosa una vez que se ha finalizado la punción.

Tras lavado vaginal con suero fisiológico y utilizando una aguja de punción ovárica de 18G (Kitazato Medical, Japón) se puncionaron uno a uno los folículos y se recogió el líquido folicular en tubos (Falcon 2057, Becton Dickinson, Reino Unido) con un sistema de vacío a 140 mm Hg.

El contenido del folículo aspirado se transportó rápidamente al laboratorio contiguo al quirófano para comprobar la presencia del complejo cúmulo-ovocito en el líquido recuperado. Los complejos recuperados se lavaron en Global for Fertilization (Global, Canadá) y se cultivaron individualmente en gotas de 70  $\mu$ l de Global for Fertilization (Global, Canadá) a 6,5% de CO<sub>2</sub> y 37,0 °C durante un mínimo de 3 horas.

#### **4.- Aislamiento y obtención de las células del cúmulo/granulosa.**

Durante la aspiración folicular, los complejos cúmulo-ovocito se separaron inmediatamente del líquido folicular, se lavaron en medio de cultivo Global for Fertilization (Global, Canadá) y se transfirieron a medio de maduración Global for Fertilization (Global, Canadá) donde permanecieron un mínimo de 3 horas hasta el momento de la fecundación. Transcurrido este tiempo, las células del cúmulo se separaron físicamente del ovocito mediante un proceso fundamentalmente mecánico, después de una breve exposición a una solución que contiene 0.2 mUI de hialuronidasa por mililitro de medio de cultivo.

Se recogieron muestras de las células del cúmulo de folículos derivados de cada uno de los tratamientos de estudio. Los concentrados celulares se resuspendieron en 2 ml de Global for Fertilization (Global, Canadá), se depositaron en gradientes de Percoll al 45% (Pharmacia, Reino Unido) y se centrifugaron durante 20 minutos a 4°C y a 400g para separar a las células del cúmulo/granulosa de los eritrocitos. Posteriormente, se recuperaron las células de interés de la interfase, se lavaron en Global for Fertilization (Global, Canadá) y se centrifugaron a 600g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y todas las muestras se almacenaron en un volumen mínimo de medio de cultivo Global for Fertilization (Global, Canadá) a -80°C hasta el momento del análisis.

Previamente al aislamiento de las células del cúmulo, los complejos cúmulo-ovocito se valoraron individualmente siguiendo el protocolo original propuesto por Veeck (Veeck 1988) donde las capas de células del cúmulo y de la corona se clasifican de acuerdo al grado de expansión y al espacio delimitado entre células individuales. En cuanto al grado de maduración ovocitaria, se evaluó inmediatamente después de la decumulación; los ovocitos individuales se clasificaron como ovocitos inmaduros en vesícula germinal (VG), ovocitos inmaduros o metafase I (MI) y ovocitos maduros que han extruido el primer corpúsculo polar o metafase II (MII).

#### **5.- Cuantificación de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular.**

El líquido folicular puede considerarse el resultado de la suma de elementos transferidos desde el plasma sanguíneo más los productos derivados de la actividad secretora del ovocito, células de la granulosa y células de la teca. Se aspiró el líquido folicular del total de folículos registrados en cada donante en el momento de la punción

ovocitaria en tubos de 10 ml; la aguja se extrajo y se vació por completo antes de cada punción y no se utilizó medio de cultivo en los tubos recuperados. Tras el aislamiento del complejo cúmulo-ovocito, el líquido folicular se centrifugó a 200g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante, se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta el análisis posterior de determinación de proteínas.

### **5.1.- Determinación de GDF-9.**

GDF-9 se cuantificó usando el kit comercial Quantikine® (R&D Systems, USA), basado en una técnica ELISA y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prepararon todas las diluciones de los estándares de calibración antes de comenzar el ensayo; todos los pocillos se hicieron por duplicado. La determinación se llevó a cabo en IVI Madrid (Madrid, España).

Brevemente, el kit proporciona una microplaca con 96 pocillos recubiertos de un anticuerpo de captura específico para GDF-9. Tras la incubación de las muestras experimentales, GDF-9 es capturado por el anticuerpo correspondiente; para completar el ELISA, se añade un anticuerpo de detección conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) que se une a un epítipo diferente de la proteína diana. Por último, se incorpora una solución de sustrato que genera una señal colorimétrica proporcional a la cantidad de GDF-9 unido. Para determinar la cantidad de GDF-9 presente en nuestras muestras de estudio se construye una curva de calibración trazando la media de absorbancia a 450 nm obtenida para cada una de las diluciones estándar.

La sensibilidad del ensayo está fijada en 0.0-4.4 pg/ml, siendo la dosis mínima detectable de 2.0 pg/ml. En cuanto a la especificidad, Quantikine® reconoce GDF-9 humana tanto natural como recombinante, no observándose ningún tipo de reactividad cruzada.

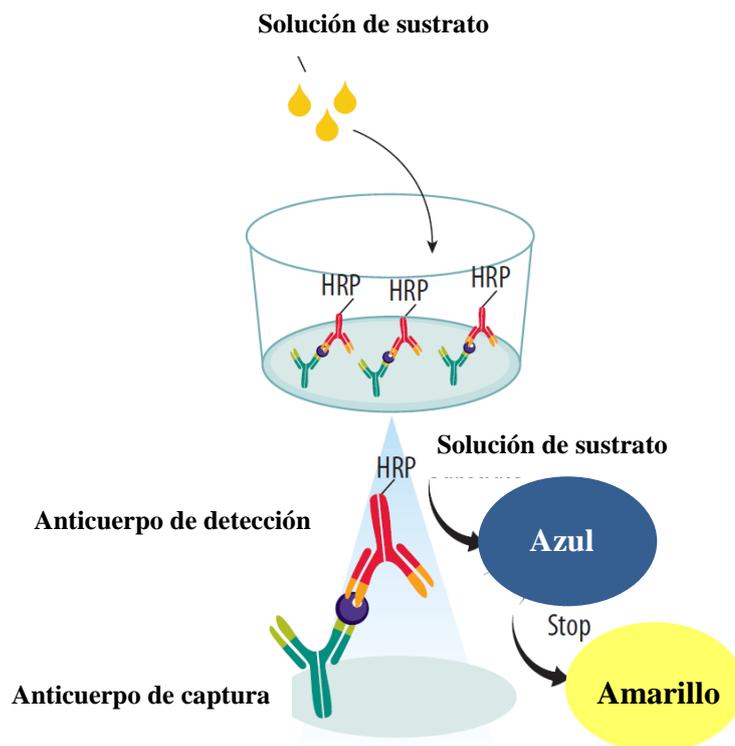


Figura 7. Esquema de un procedimiento de ELISA para la detección de GDF-9

## 5.2.- Determinación de BMP-15.

Primero, determinamos la concentración total de proteína en cada tratamiento mediante la técnica de Bradford la cual se basa en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante (Coomasie Blue G-250) cuando éste se une a las proteínas (absorbiendo así a 595 nm). Esta unión se realizó a través de grupos ionizados y se comprobó la proporcionalidad con la concentración de proteínas contenidas en la muestra. Se realizó una curva patrón con una muestra con BSA a una concentración inicial de 2 mg/ml y se midió la absorbancia a 595 nm en una placa de 96 pocillos. Al mismo tiempo, se registró también la absorbancia de las muestras de líquido folicular; como la concentración proteica era muy alta, se diluyeron todas las muestras 1/50. Una vez medida la absorbancia de todas las muestras y con los valores derivados de la construcción de la recta patrón, se calculó la concentración de proteínas de cada una de las muestras de líquido folicular procedentes de los tres tratamientos de estudio.

Posteriormente, mediante una técnica de “Western blot” se identificó la presencia de BMP-15 en las distintas muestras; las proteínas primero fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfirieron a

una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Se cargan 15µg de proteína en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida en condiciones no reductoras. Las proteínas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa aplicando una corriente de 290 mili-amperios durante una hora. Las “manchas” proteicas correspondientes a uniones inespecíficas se bloquean con incubación durante 1 hora a 4°C en una solución PBS-tween suplementada con 5% (w/v) de leche en polvo desnatada.

A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-BMP-15 (sc 28911, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluido 1:500 en PBS-tween suplementado con leche en polvo al 5% a 4°C, en agitación y durante toda la noche. Transcurrido este periodo, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos en PBS-Tween y se procedió a la hibridación con el anticuerpo secundario diluido 1:2000 en PBS-tween durante una hora y a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con PBS-tween.

Las densidades relativas de las bandas correspondientes a la forma madura de BMP-15 se cuantificaron con el equipo LAS3000 Fujifilm (Fujifilm España).

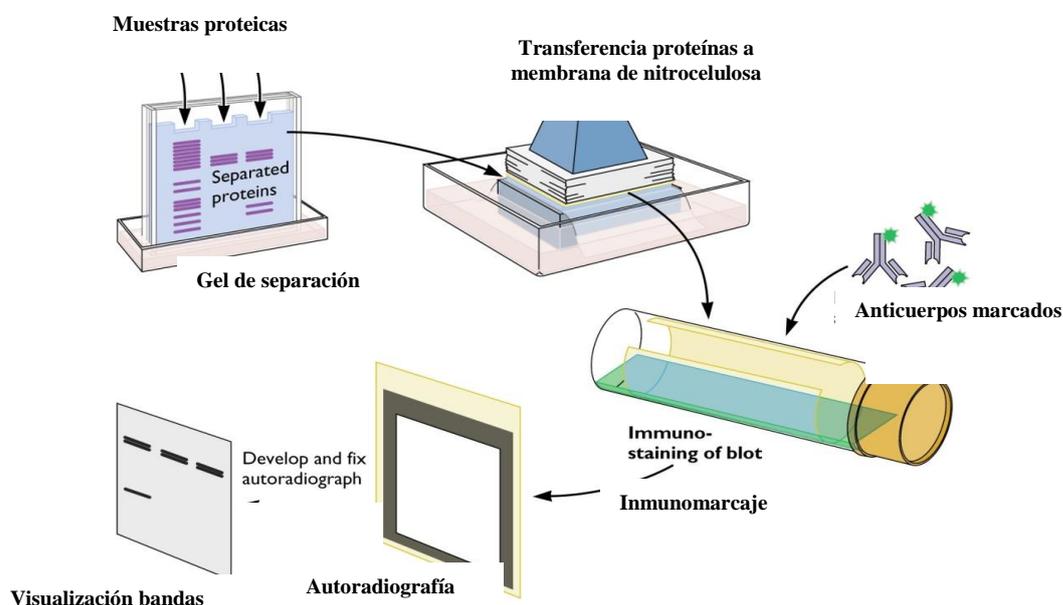


Figura 8. Técnica de "western blotting" para la detección y cuantificación de BMP-15

## **6.- Determinaciones hormonales en líquido folicular.**

Se determinaron las concentraciones de FSH, E2, P4 y T en líquido folicular. Específicamente, los niveles de FSH, E2 y P4 se cuantificaron en IVI Madrid, mientras que los registros de T se analizaron en el Centro de Análisis Sanitarios (Madrid, España).

Las determinaciones hormonales de FSH, E2 y P4 se realizaron a partir del líquido folicular obtenido el día de la punción. Las muestras se analizaron mediante quimioluminiscencia con el analizador automático Architect (Abbott Diagnostic, España). La determinación de FSH se efectuó con el Architect FSH assay, el cual se caracteriza por una sensibilidad de 0.05 mUI/ml, una especificidad del 99.9% y una interferencia potencial inferior al 10%; las concentraciones de E2 se cuantificaron con el Arquitect Estradiol Assay, caracterizado por una sensibilidad funcional de 25 pg/ml, una especificidad del 100% y una interferencia potencial inferior al 7%; por último, los niveles de P4 se determinaron con el ensayo Architect Progesterone Assay, con una sensibilidad de 0.1 ng/ml, una especificidad del 99% y una interferencia potencial inferior al 10%.

En el caso de la T, las muestras se analizaron con el equipo Advia Centauro (Siemens España), también basado en un sistema de quimioluminiscencia. Se aplicó el ADVIA Centaur® Testosterone Assay para la determinación de testosterona en líquido folicular, con una sensibilidad de 10 ng/dL y una especificidad del 100%.

## **7.- Citometría de flujo**

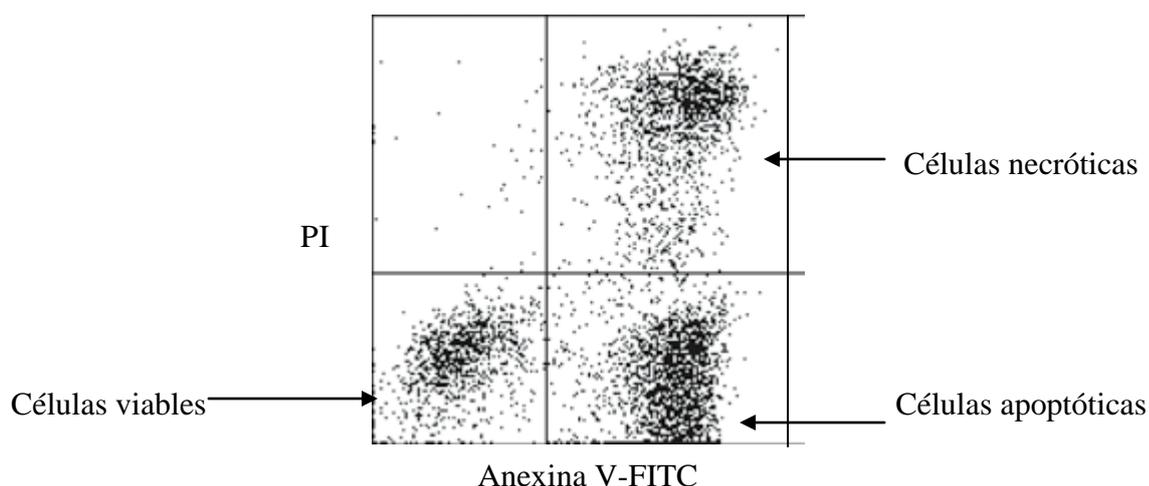
La determinación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas en cúmulo ovocitario en función del tipo de gonadotropina empleado en la estimulación ovárica se realizó en IVI Madrid, utilizando un FACScan (Becton Dickinson, USA).

En todos los casos se analizaron al menos 10000 células seleccionadas del total de la población de células viables que aparecen en los histogramas de tamaño/complejidad (FSC/granulosidad). Para definir la intensidad de fluorescencia basal (control negativo de marcaje) se analizaron muestras incubadas en las mismas condiciones pero en ausencia de fluorocromo; el porcentaje de células positivas (intensidad de fluorescencia mayor que el control negativo) se representó como el porcentaje celular con una fluorescencia mayor que el control negativo.

### 7.1.- Anexina V/yoduro de propidio (PI).

Esta técnica está basada en la relocalización de la fosfatidilserina (PS) desde la cara citoplásmica de la membrana hacia la región externa de la misma, permitiendo distinguir entre células apoptóticas, células no apoptóticas y células necróticas. La permeabilización de la membrana permite la entrada de otros materiales al interior celular, como es el caso del PI, un agente fluorescente de unión al DNA. Mediante el protocolo Annexin V-FITC (Miltenyi Biotech, USA) que aplica una metodología de marcaje doble, y siguiendo las instrucciones del fabricante, se distinguieron las siguientes poblaciones celulares:

- células no apoptóticas: anexina V negativa/ PI negativa
- células apoptóticas tempranas: anexina V positiva/ PI negativa
- células necróticas: anexina V positiva/ PI positiva



**Figura 9. Representación gráfica de una citometría de flujo**

Brevemente, después de dos lavados celulares se añadieron 3  $\mu\text{g/ml}$  de anexina-FITC y 400  $\text{ng/ml}$  de PI a la suspensión celular ( $10^6$  células/ $500 \mu\text{l}$ ) y se incubó la muestra durante 15 minutos en la oscuridad. Las células del cúmulo se analizaron durante una hora después del periodo de incubación en el citómetro de flujo (FACScan, Becton-Dickinson, NJ, USA) usando un láser de argón a 15mW que emite luz a 488 nm. Se fijaron los siguientes parámetros: 475 V en ambos foto-multiplicadores para el fluorocromo 1 (FITC) y para el fluorocromo 2 (PI). Los datos se analizaron con el software CellQuest (Becton-Dickinson, NJ, USA). Se analizaron un mínimo de 10000 células en cada tratamiento.

## **7.2. Fragmentación DNA (TUNEL).**

Para determinar la tasa de apoptosis tardía, nos basamos en el estudio de la fragmentación internucleosomal del DNA la cual está considerada como un marcador importante de la apoptosis, ya que durante este fenómeno las nucleasas activas degradan la estructura de la cromatina en fragmentos de 50-300 kilobases y en consecuencia, en pequeños segmentos de DNA de aproximadamente 200 pares de bases de longitud. Siguiendo el protocolo “In situ cell detection kit, Fluorescein” (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) que emplea enzimas transferasas terminales para catalizar la adición independiente de nucleótidos unidos a fluoresceína (fluoresceína-dUTPs) a los extremos 3'-OH libres de fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble, se obtuvieron fragmentos de DNA marcados capaces de ser identificados directamente con citometría de flujo.

La fijación y permeabilización celular son los pasos iniciales críticos que conducen al marcaje eficaz de las roturas en las cadenas de DNA. Después de ajustar la concentración celular a un valor de  $2 \times 10^7$ , fijamos las células en paraformaldehído 4% (v/v) durante 60 minutos a una temperatura entre 15°C y 25°C, lavamos intensivamente con PBS, permeabilizamos durante 2 minutos con Triton X-100 al 0,1% y se realizó un nuevo lavado con PBS. Como hemos comentado anteriormente, el análisis de la fragmentación del DNA se valoró mediante el kit “In Situ Cell Detection, Fluorescein” (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania); la fluorescencia se evaluó en el mismo dispositivo y en las mismas condiciones establecidas previamente.

## **8.- Análisis de microarrays.**

Los análisis de microarrays se llevaron a cabo en la Fundación IVI (Valencia, España).

### **8.1. Extracción del RNA.**

El RNA total de las células del cúmulo se extrajo mediante el método del Trizol (Trizol® Reagent, Inc., Gaithersburg, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un método que permite la obtención de un RNA de alta calidad a partir de pequeñas cantidades de material inicial.

Brevemente, las células se lisaron y homogeneizaron en 1 ml de reactivo por cada  $5-10 \times 10^6$  de células. Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de los complejos nucleoproteicos; posteriormente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de Trizol® y se incubaron nuevamente las muestras durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el periodo de incubación, se centrifugó a 12000g durante 15 minutos (4°C); tras la centrifugación, se observaron varias interfases: una fase inferior de color rojo, una fase de fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa e incolora, que es que la que contiene de forma exclusiva el RNA.

La fase acuosa se precipitó con un volumen igual de propanol, se mantuvo en hielo y posteriormente se centrifugó a 12000g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C; el pellet se lavó con etanol al 75% y con agua tratada con DEPC.

La integridad de las muestras de RNA se analizó con el dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, España); posteriormente, se cuantificó el RNA con el 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, España).

## **8.2.- Procesamiento de los arrays.**

El RNA total extraído de las células del cúmulo se procesó siguiendo las instrucciones de la plataforma “Whole Human Genome Microarray 4x44K” que incluye más de 44000 sondas de DNA (Agilent Technologies, España). Los protocolos para la preparación y posterior hibridación de las muestras se adaptaron del manual técnico (Agilent Technologies, España).

Brevemente, la primera hebra de DNA complementario se transcribió a partir de 1 mg de RNA total usando T7-Oligo(dT) Promotor Primer. Las muestras son transcritas *in vitro* y se marcan con Cy-3 y Cy-5 siguiendo las instrucciones del kit “Quick-AMP-labelling” (Agilent Technologies, España). La síntesis de RNA complementario rinde normalmente una cantidad de 10-15 µg. Tras una ronda de lavado (Qiagen, España), el RNA complementario se fragmentó en segmentos de 35-200 pares de bases (pb), hecho que se confirma posteriormente con la tecnología 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, España); las muestras fragmentadas de RNA complementario (1.65 µg) se hibridaron en las correspondientes plataformas “Whole Human Genome Microarray 4x44K” (Agilent Technologies, España) durante 17 horas a 65°C en rotación constante. Una vez finalizado el periodo de hibridación, los microarrays se lavaron en dos pasos

consecutivos con 1 ml de tampón de lavado (Agilent Technologies, España). Los microarrays hibridados se escanearon con el dispositivo Axon 4100A (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) y los datos se extrajeron con el software informático GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Estos paquetes informáticos permiten detectar si la transcripción de un gen en particular está presente o ausente y cuantificar sobre la señal registrada de cada sonda si existen diferencias significativas en los patrones de expresión entre las distintas condiciones de estudio.

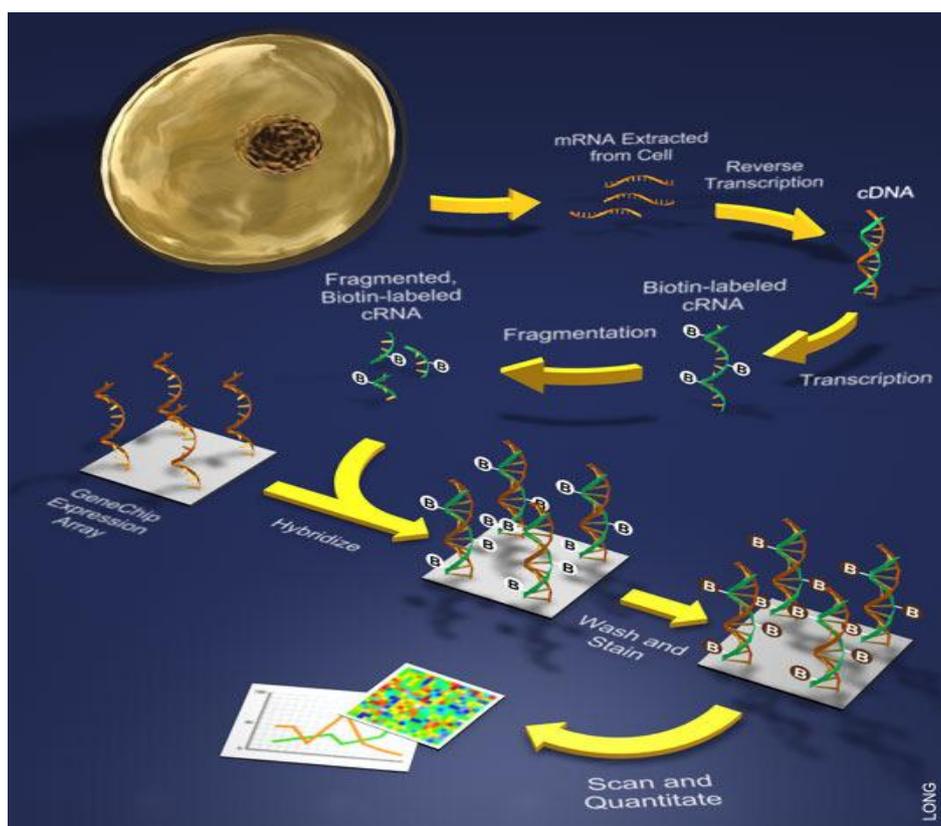


Figura 10. Esquema de un experimento con microarrays

### 8.3.- Análisis de los datos derivados de las plataformas de microarrays.

Uno de los fundamentos de los análisis de expresión génica es comparar la expresión de un conjunto de genes de una célula que se mantiene en condiciones particulares con el mismo conjunto de genes derivados de una célula de referencia en condiciones normales. En el caso que nos ocupa, se establecieron las siguientes comparativas entre los distintos tratamientos de estudio:

- FSH recombinante vs FSH urinaria; el tratamiento con FSH recombinante ejerce de control.

- FSH urinaria vs hMG; en este caso, las muestras derivadas de hMG se establecen como tratamiento control.

- FSH recombinante vs hMG; al igual que en el caso anterior, las muestras procedentes de tratamientos con hMG actúan como control.

Para que los valores de expresión génica de los microarrays sean comparables entre sí, es necesario eliminar el efecto de los errores sistemáticos acumulados durante el experimento. El pre-procesamiento de los datos que permita ajustar los niveles de expresión entre las plataformas incluye tres pasos básicos: una corrección del *background* que minimiza los efectos de la hibridación no específica sobre la señal derivada de cada sonda; un tratamiento de normalización que recoge la información de las sondas de cada plataforma y las ajusta a un valor comparable, de manera que si alguna está sobre/infraexpresada con respecto al total, regula su valor de expresión génica; y por último, un proceso de resumen que proporciona para cada sonda un valor cuantitativo que representa el nivel relativo de expresión correspondiente a su transcripción genética.

Para el análisis de las imágenes derivadas de los microarrays y el cálculo de las medidas de intensidad de las distintas señales se utilizó el software GenePix Pro 6.0. Las medianas de la intensidad de la señal sin eliminar el “background” se transformaron a una escala logarítmica ( $\log_2$ ). Antes de la normalización de los cuartiles, los datos se representaron en un diagrama de cajas para conocer su distribución y extraer los datos considerados como erróneos de los microarrays; los datos son filtrados con el propósito de borrar las secuencias desconocidas y/o las sondas que carecen de una descripción génica. Con este objetivo y para análisis posteriores se trabaja con un paquete estadístico de lenguaje R.

Los perfiles de expresión génica se determinaron comparando los tratamientos experimentales con el grupo control (comparaciones dos a dos) mediante test paramétricos (Significance Analysis of Microarrays, SAM) y test no-paramétricos (Rank Product). Se establecieron dos criterios para definir a los genes diferencialmente expresados (GDE):

1.- cambios absolutos en la ratio de expresión (*fold-change* FC) de dos o más unidades.

2. – valor corregido de  $p < 0.05$ .

#### 8.4.- Análisis de “clustering”.

El poder real de un análisis de microarrays no procede del análisis de experimentos individuales sino del estudio de múltiples hibridaciones para identificar patrones comunes de expresión génica. En función de nuestro conocimiento de las rutas celulares, los genes que están contenidos en una ruta particular o que responden de igual manera a los cambios en el entorno, deben estar co-regulados y por tanto mostrar patrones similares de expresión.

Uno de los objetivos de este trabajo es identificar patrones de expresión génica entre los distintos grupos de tratamiento con el propósito de agrupar las muestras con perfiles similares de expresión y poder hacer inferencias biológicas significativas acerca de cada una de las muestras analizadas. Para ello, nos basamos en los métodos de “clustering” que ayudan a clasificar los datos en grupos de genes/muestras con perfiles similares de expresión génica. El “clustering” jerárquico tiene la ventaja de ser un método sencillo y fácilmente perceptible; en nuestro caso, aplicamos un método de jerarquización aglomerativo en el que los perfiles individuales de expresión génica se unieron para formar grupos, y así sucesivamente, hasta que se completó la formación de un único árbol jerárquico.

Hay que tener en cuenta que para comparar perfiles de expresión génica, se necesita una medida/parámetro (distancia) que cuantifique cómo de similares/diferentes son los patrones que se están considerando. Los datos se normalizaron por Z-score y se obtuvo un “clustering” jerárquico con el programa informático MeV4.2; se eligió la distancia Euclídea como medida de similaridad ya que se trata de la medida más común de determinación de distancias métricas.

Como se ha comentado previamente, uno de los objetivos fundamentales de los análisis de microarrays es identificar patrones de expresión génica; sin embargo, hay que contar con la posibilidad de que algunos de los datos obtenidos contengan información redundante. Las técnicas de PCA (*principal component analysis*) son técnicas matemáticas que explotan factores que extraen patrones de expresión de los datos al mismo tiempo que reducen la n-dimensionalidad de los mismos sin una pérdida significativa de la información; es decir, revelan la estructura interna de los datos de una manera que explica de la mejor forma posible la varianza entre ellos y aportan una “proyección” de conjuntos complejos de datos en un espacio reducido y fácilmente visible. Partiendo de una nube de puntos en un espacio tridimensional, es posible rotar los ejes de manera que se visualicen los datos desde diferentes perspectivas (programa

informático MeV 4.2.02); además, algunas rotaciones permiten la separación de los datos en grupos mejor que otras. Los análisis de PCA encuentran y aportan la representación gráfica que establece una mejor separación de los datos.

### **8.5.-Análisis de enriquecimiento funcional.**

Normalmente, los análisis de microarrays aportan largas listas de genes cuya interpretación requiere métodos sistemáticos de aproximación. El genoma de un organismo incluye una amplia cantidad de genes y elementos de regulación. Todos los genes y sus productos génicos interactúan como parte de una red compleja que define la biología del organismo a nivel molecular, por lo que se precisa de un modelo estructurado y formal de la función biológica para comprender estas interacciones. Las relaciones ontológicas aportan el conocimiento estructural mediante los términos GO (*Go Ontology*).

Los términos GO se diseñaron como una representación formal del conocimiento biológico, ya que relacionan genes con sus productos génicos (Ashburner et al. 2000); incluyen diferentes dominios de conocimiento que abarcan funciones moleculares (MF), procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y rutas metabólicas (KEGG). Estos términos describen las funciones biológicas de un producto génico individual: sus funciones moleculares, los procesos biológicos cuyas funciones ayudan a cumplir y en qué estructuras celulares se llevan a cabo. Los términos GO asociados a largas listas de genes aportarán importantes y nuevos puntos de vista que nos permitirán conocer los procesos biológicos subyacentes a los perfiles de expresión génica.

En este estudio, se trabajó con la base de datos DAVID Bioinformatics Resources, la cual nos permitió dividir las listas de genes en grupos funcionales. DAVID es un paquete informático basado en un análisis de enriquecimiento modular capaz de organizar y condensar un amplio rango de anotaciones heterogéneas en clases génicas. El enriquecimiento se valoró cuantitativamente mediante el test exacto de Fisher entre el número de anotaciones GO en todos los genes del microarray y los términos GO en la lista génica seleccionada, fijándose la significación estadística en un p-valor enriquecido inferior a 0,05.

## 9.- Análisis estadístico

El cálculo del tamaño muestral se basó en la comparación de tres proporciones, asumiendo una media de porcentaje de ovocitos maduros de 79.8% en el total de los tratamientos de estudio. Este análisis, basado en un nivel de significación de  $\alpha=0.05$  y un poder del 80%, reveló que se necesitan al menos 30 ciclos por cada uno de los protocolos a evaluar. Este estudio se diseñó para establecer una hipótesis de no-inferioridad entre tratamientos con FSH recombinante, FSH urinaria y hMG en términos de porcentaje de ovocitos maduros. La hipótesis de no-inferioridad se realizó en base a nuestros propios datos y en aquellas diferencias que fueron consideradas clínicamente relevantes.

Posteriormente, se comprobó la hipótesis de normalidad necesaria para asumir la fiabilidad del análisis de resultados. Para probar que la muestra analizada ha sido extraída de una población con distribución de probabilidad normal se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov al análisis de los datos derivados de la tasa de apoptosis, factores ovocitarios y determinaciones hormonales en función de cada uno de los tratamientos de estudio. Para los datos que cumplieron con las condiciones de distribución normal, se aplicó un test de naturaleza paramétrica (ANOVA) mientras que para los parámetros que no se ajustaron a una distribución de probabilidad normal se empleó una prueba de carácter no-paramétrico (test de Kruskal-Wallis). En ambos casos se fijó el valor límite para considerar la prueba significativa en  $p<0.05$ . El análisis estadístico se realizó mediante el programa Statistical Package for the Social Sciences 17,0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

# **RESULTADOS**

FSHr (n=29)	FSHu (n=25)	hMG (n=23)	p
-------------	-------------	------------	---

### 1.- Características de las donantes. Resultados clínicos.

Se seleccionaron 120 donantes del programa de donación de ovocitos, de las que 90 se distribuyeron entre los tres grupos de estudio a razón de 30 donantes por tratamiento (Tabla 1).

No se observaron diferencias significativas en los resultados clínicos en cada uno de los grupos de estudio, a excepción de los datos derivados del índice de masa corporal (IMC) (Tabla 2).

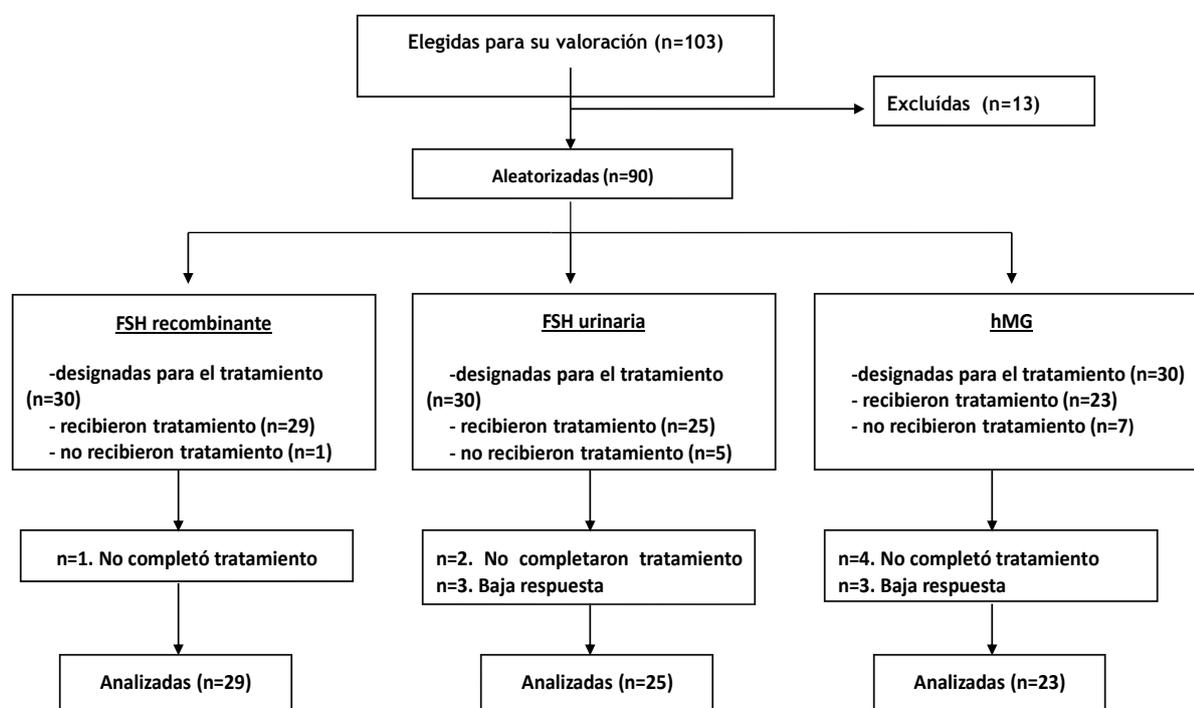


Tabla 1. Diagrama de flujo de donantes

<b>Edad (años)</b>	27,7±2,5	26,2±1,0	26,0±2,5	0,356
<b>IMC(Kg/m<sup>2</sup>)</b>	20,6±0,9	22,9±0,9	21,5±1,3	<b>0,005</b>
<b>Nº ovocitos obtenidos</b>	11,0±1,8	13,4±1,3	12,7±2,0	0,103
<b>Nº MII</b>	9,6±1,8	10,8±1,1	9,7±2,0	0,384
<b>Dosis FSH (UI)</b>	1537±194	1795±141	1836±233	0,083
<b>Días tratamiento</b>	10,3±0,6	10,3±0,5	10,0±0,7	0,705

Tabla 2.- Características demográficas y clínicas

## 2.- Determinación de GDF-9 y BMP-15 en líquido folicular dependiendo del tipo de gonadotropina.

### 2.1. Determinación de GDF-9.

No se observaron diferencias significativas en las cantidades de GDF-9 secretadas a líquido folicular en función de si los ciclos han sido estimulados con FSHu (0,4±0,2 ng/ml, n=25), FSHr (0,1±0,09 ng/ml, n=29) o hMG (0,3±0,2 ng/ml, n=23), p=0,290.

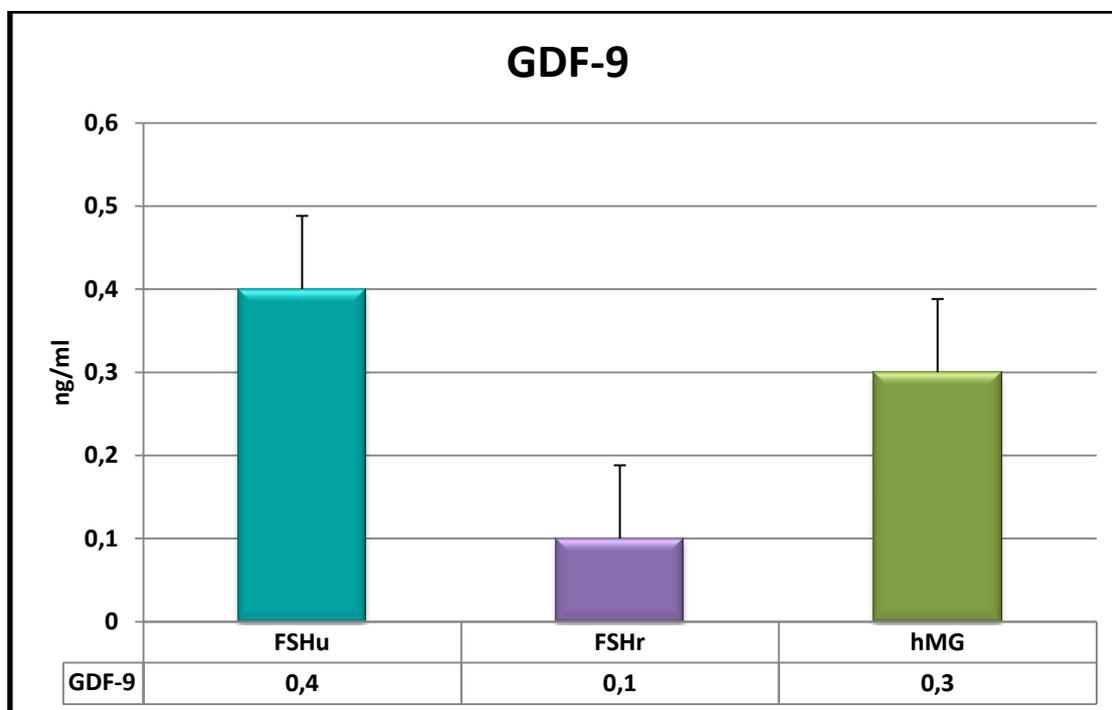


Figura 11. Concentración de GDF-9 en función del tipo de gonadotropina

## 2.2. Determinación de BMP-15.

Se analizaron n=8 muestras de líquido folicular por cada tratamiento de estudio. No se registraron diferencias significativas en las concentraciones totales de proteína dependiendo del tipo de gonadotropina aplicada; FSHu ( $0.626 \pm 0.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , n=8), FSHr ( $0.671 \pm 0.07 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , n=8) y hMG ( $0.620 \pm 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , n=8),  $p=0,714$ .

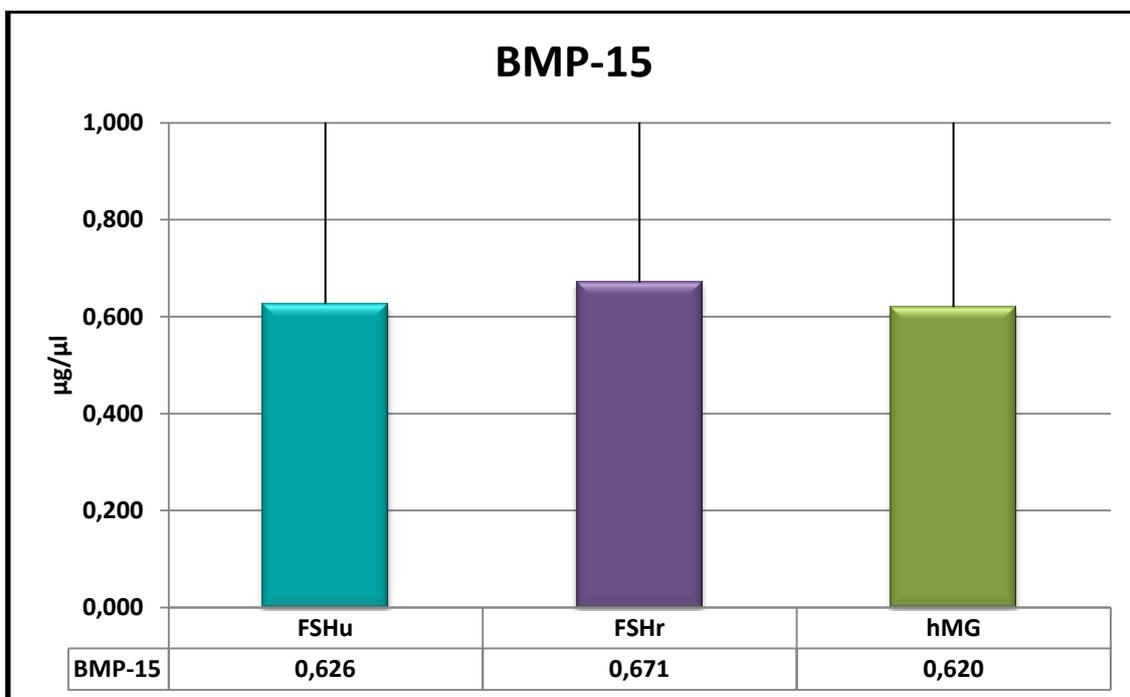
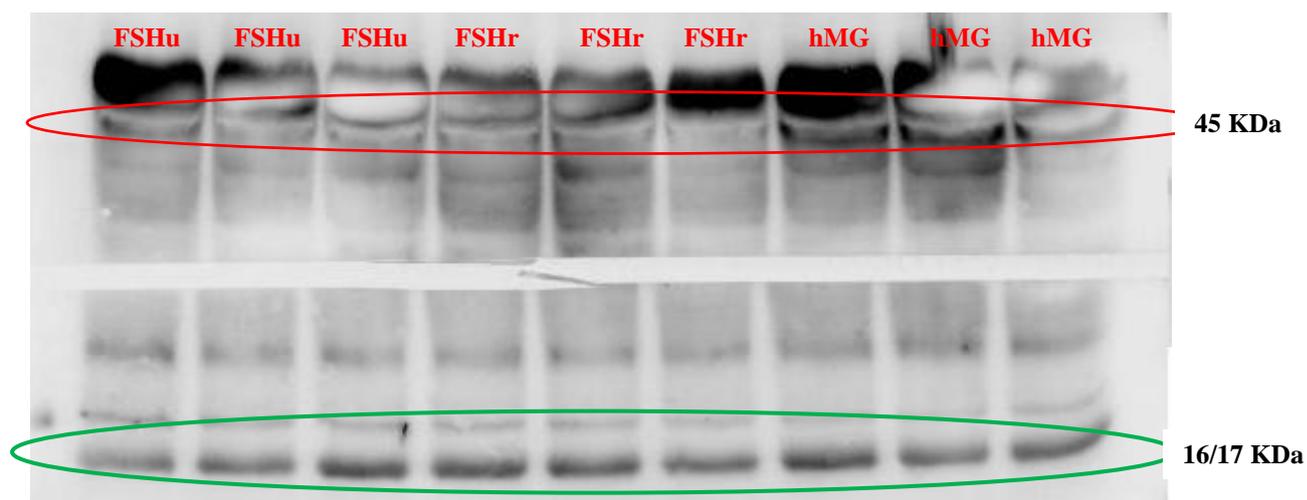


Figura 12. Concentración total de BMP-15 en función del tipo de gonadotropina

Posteriormente, se realizó un “Western Blot” contra la propia BMP-15 con el propósito de identificar la proteína buscada en las distintas muestras de análisis. Se cargan 15  $\mu\text{g}$  de proteína para identificar la forma madura e inmadura de BMP-15



**Figura 13. Western-blot para la identificación de BMP-15**

Al revelar el “Western Blot” se observaron dos bandas en 45 kDa y 16/17 kDa correspondientes a las formas inmadura y madura de BMP-15 respectivamente. Simultáneamente, se pueden apreciar uniones de carácter inespecífico a la altura de 50 KDa, que posiblemente correspondan a la albúmina. Los análisis densitométricos para determinar las diferencias cuantitativas no revelaron variaciones significativas entre los distintos tipos de tratamiento.

### 3. Niveles hormonales en líquido folicular en función del tipo de gonadotropina.

#### 3.1 FSH.

La determinación de los niveles de FSH en líquido folicular el día de la punción no reveló la presencia de diferencias significativas entre los ciclos estimulados con FSHu ( $9,4 \pm 2,8$  mUI/ml,  $n=25$ ), hMG ( $8,3 \pm 0,9$  mUI/ml,  $n=23$ ) y FSHr ( $7,7 \pm 1,0$  mUI/ml,  $n=29$ ),  $p=0,681$ .

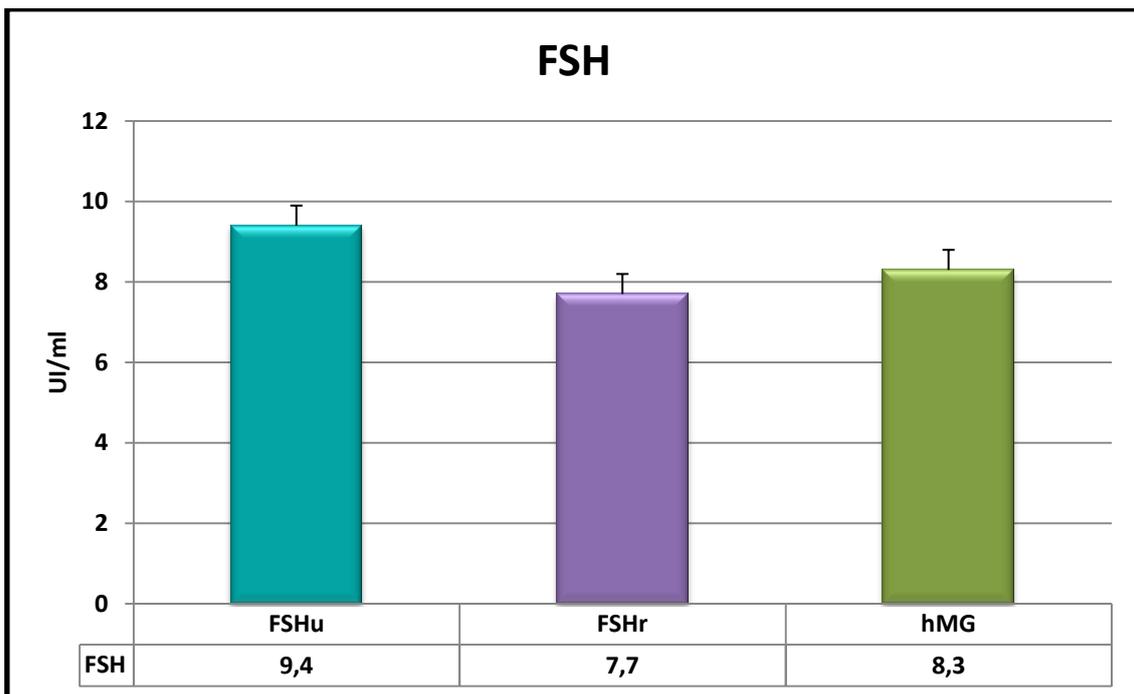


Figura 14. Concentración de FSH en función del tipo de gonadotropina

#### 3.2. Estradiol.

Las concentraciones de estradiol en líquido folicular alcanzaron niveles significativamente más altos en los ciclos estimulados con hMG ( $733484 \pm 157184$  ng/ml,  $n=23$ ), respecto a los tratamientos con FSHr ( $430388 \pm 141221$  ng/ml,  $n=29$ ), y FSHu ( $428435 \pm 65989$  ng/ml,  $n=25$ ),  $p<0,001$ .

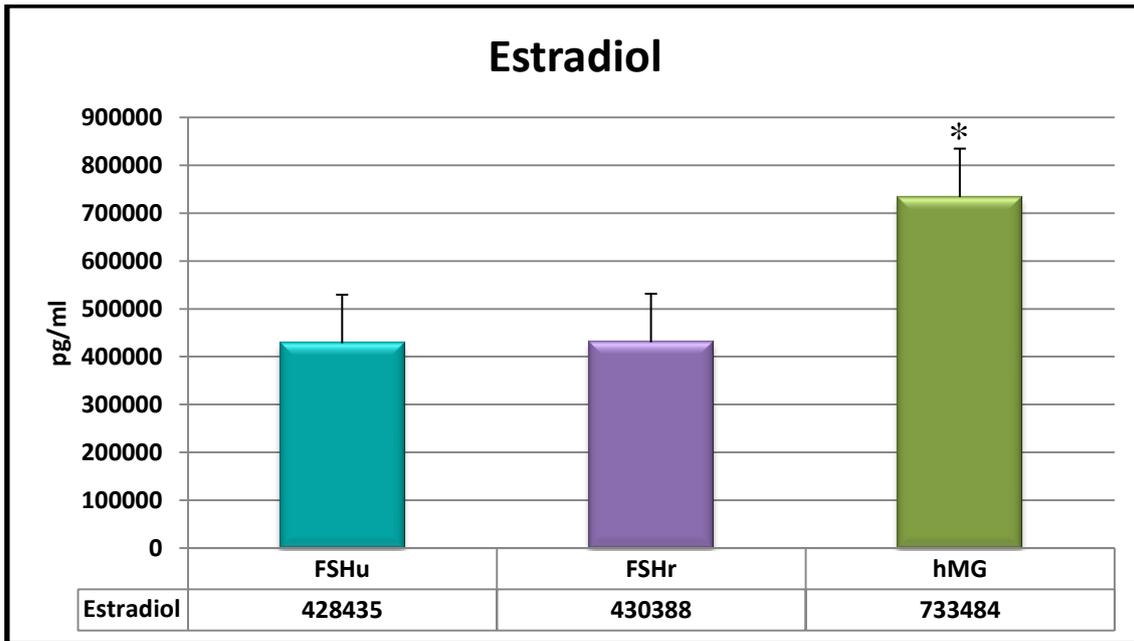


Figura 15. Concentración de estradiol en función del tipo de gonadotropina (\*,  $p < 0.001$ )

### 3.3. Testosterona.

Los resultados obtenidos revelaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con hMG ( $0.07 \pm 0.009$  ng/ml,  $n=23$ ) en comparación con los ciclos estimulados con FSHr ( $0.05 \pm 0.009$  ng/ml,  $n=29$ ), y FSH urinaria ( $0.04 \pm 0.004$  ng/ml,  $n=25$ ),  $p < 0.001$ .

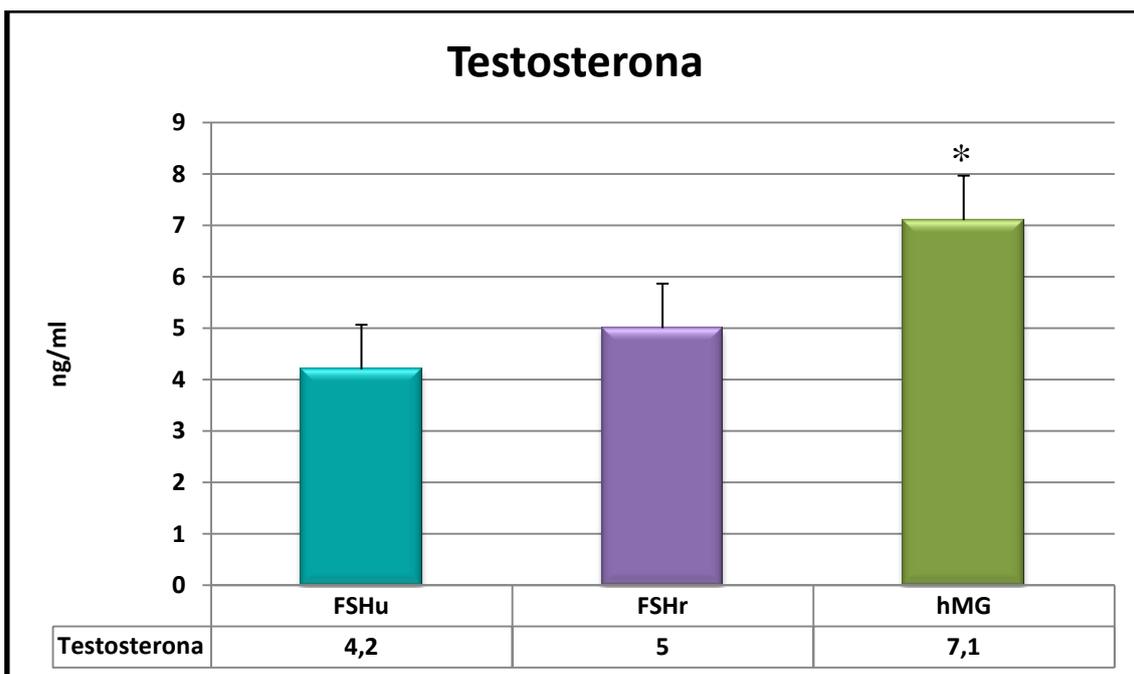


Figura 16. Niveles de testosterona en función del tipo gonadotropina (\*,  $p < 0.001$ )

### 3.4. Progesterona.

En cuanto a las concentraciones de progesterona, no se obtuvieron diferencias significativas entre los tres protocolos en estudio: FSHu ( $13802 \pm 1696$  ng/ml, n=25); hMG ( $12046 \pm 2669$  ng/ml, n=23); y FSHr ( $10364 \pm 3215$  ng/ml, n=29),  $p=0,2$ .

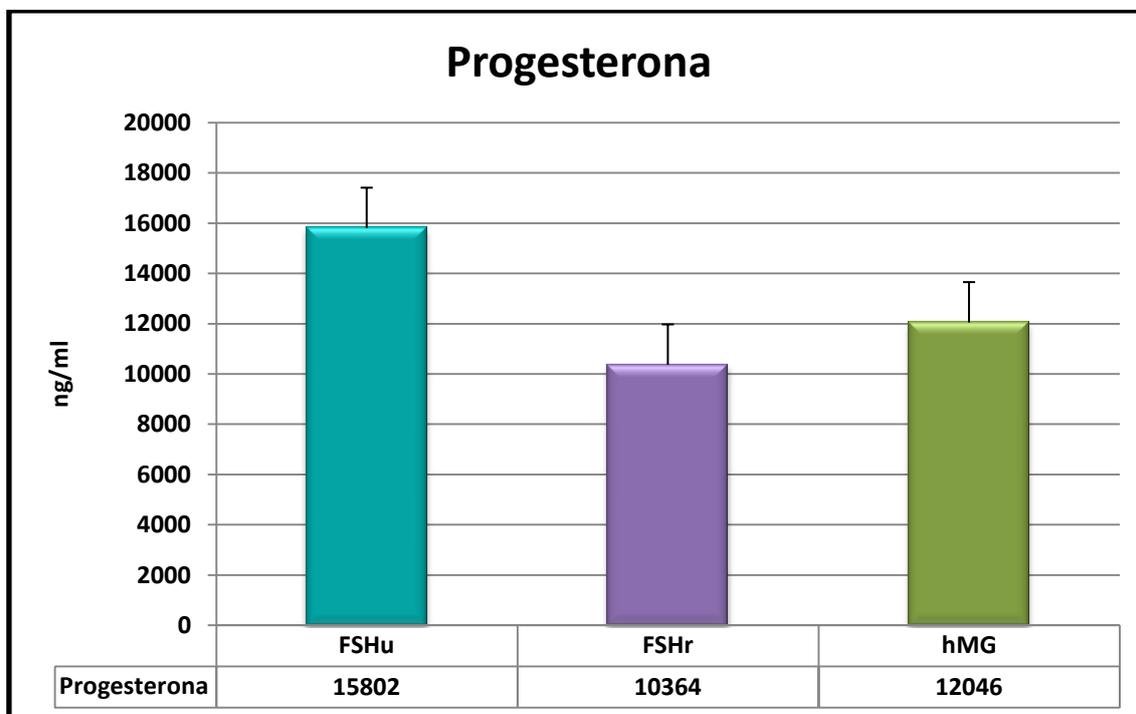


Figura 17. Niveles de progesterona en función del tipo de gonadotropina

## 4.- Determinación del porcentaje de apoptosis en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina.

### 4.1. Apoptosis precoz.

El análisis del porcentaje de células de la granulosa afectadas por las primeras etapas de la apoptosis mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio, obteniéndose los registros más bajos en los tratamientos con FSHu ( $32,0 \pm 3,8\%$ , n=25) en relación a los ciclos con FSHr ( $41,0 \pm 5,0\%$ , n=29) y hMG ( $47,0 \pm 5,0\%$ , n=23);  $p=0,045$ .

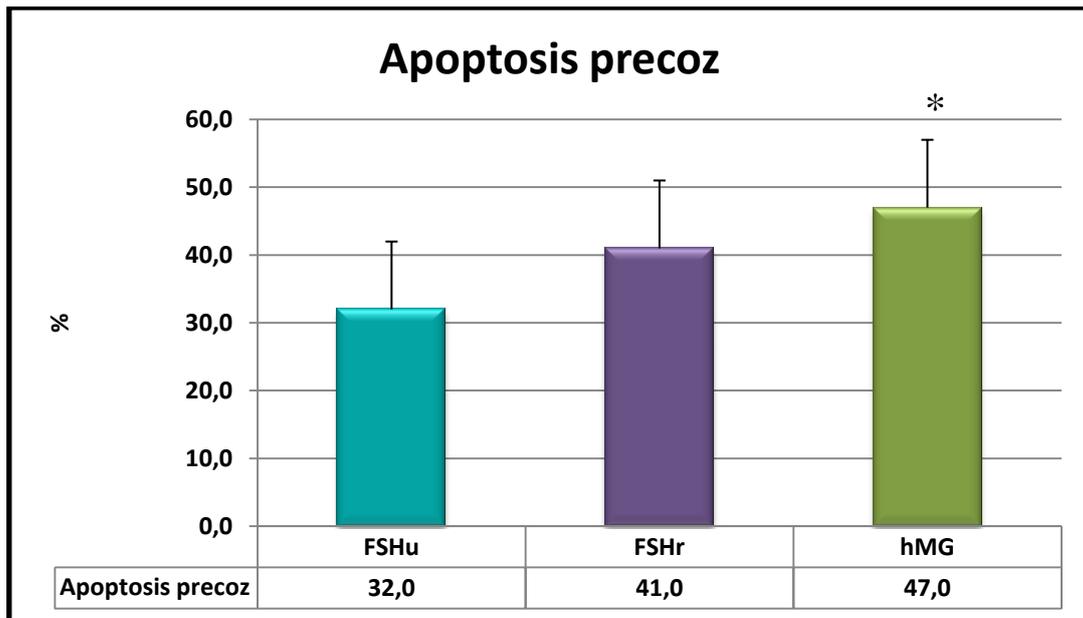


Figura 18. Porcentaje de actividad apoptótica precoz en células de la granulosa (\*,  $p=0.045$ )

#### 4.2. Apoptosis tardía.

La determinación de la actividad apoptótica tardía en células de la granulosa mediante el análisis del porcentaje de fragmentación del DNA reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los ciclos tratados con hMG ( $24,0 \pm 4,8\%$ ,  $n=23$ ), FSHu ( $6,8 \pm 3,2\%$ ,  $n=25$ ) y FSHr ( $8,9 \pm 6,7\%$ ,  $n=29$ ),  $p < 0,001$ .

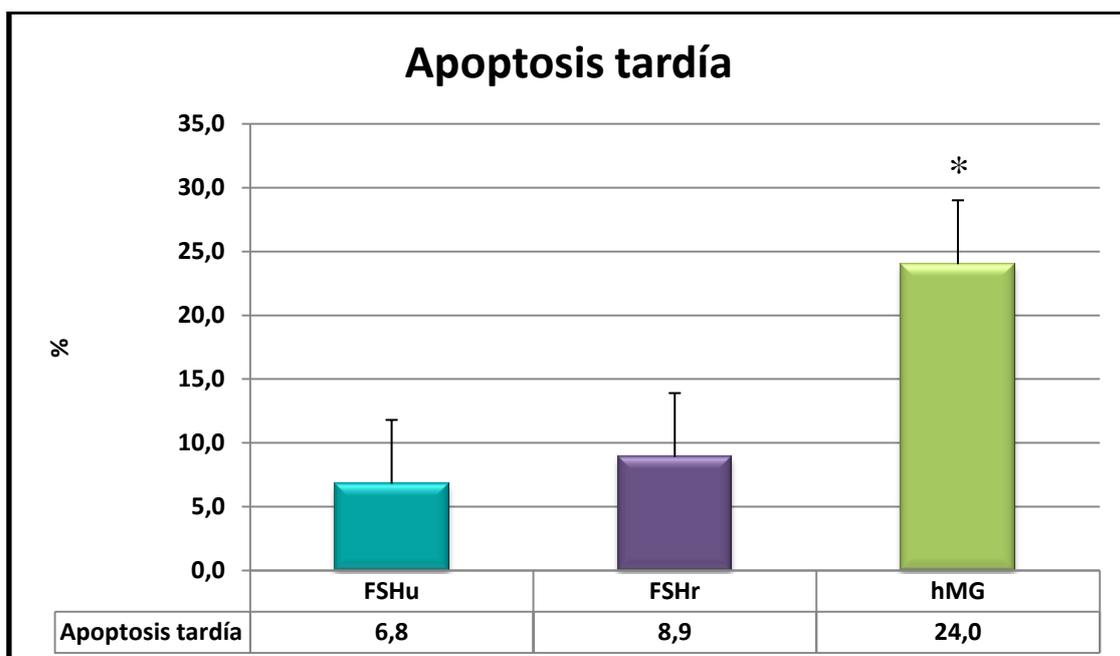


Figura 19. Porcentaje de actividad apoptótica tardía en células de la granulosa (\*,  $p < 0.001$ )

### 4.3.- Necrosis.

Por último, no se obtuvieron variaciones relevantes en los valores de células de la granulosa afectadas por la necrosis entre la FSHu ( $11,5 \pm 3,3\%$ ,  $n=25$ ), la hMG ( $8,0 \pm 2,8\%$ ,  $n=23$ ) y la FSHr ( $6,0 \pm 3,0\%$ ,  $n=29$ ),  $p=0,632$ , lo que sugiere que el tipo de preparado gonadotrópico carece de toxicidad celular. El hecho de trabajar con una muestra de tamaño limitado podría explicar la ausencia de diferencias significativas, a pesar de las notables diferencias observadas, en el porcentaje de necrosis entre la FSHu y la FSHr

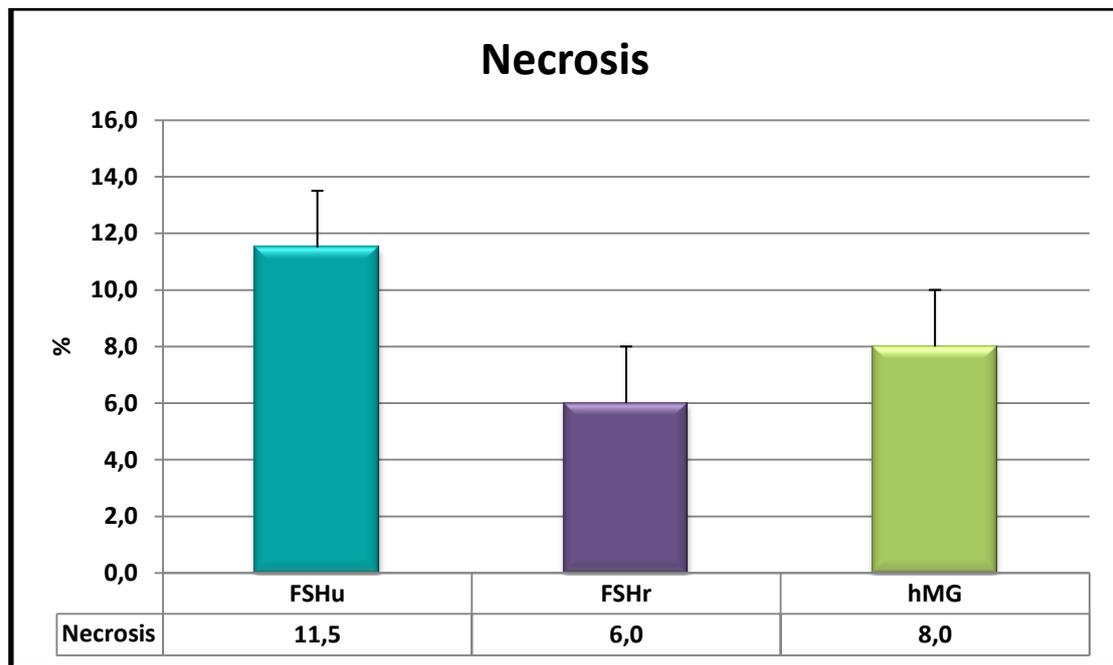


Figura 20. Porcentaje de necrosis en células de la granulosa

## 5.- Análisis de las diferencias en los patrones de expresión génica en células del cúmulo en función del tipo de gonadotropina

Se analizaron un total de n=17 muestras de células del cúmulo que se distribuyeron de la siguiente manera en función de los tres grupos de estudio: FSHr (n=6), FSHu (n=5) y hMG (n=6).

### 5.1.- FSH urinaria vs hMG (hMG como control).

El número total de transcritos expresados cuando se comparan los perfiles de expresión génica entre ciclos estimulados con FSH urinaria y tratamientos con hMG asciende a 681 transcritos, de los que 157 están diferencialmente expresados (DE).

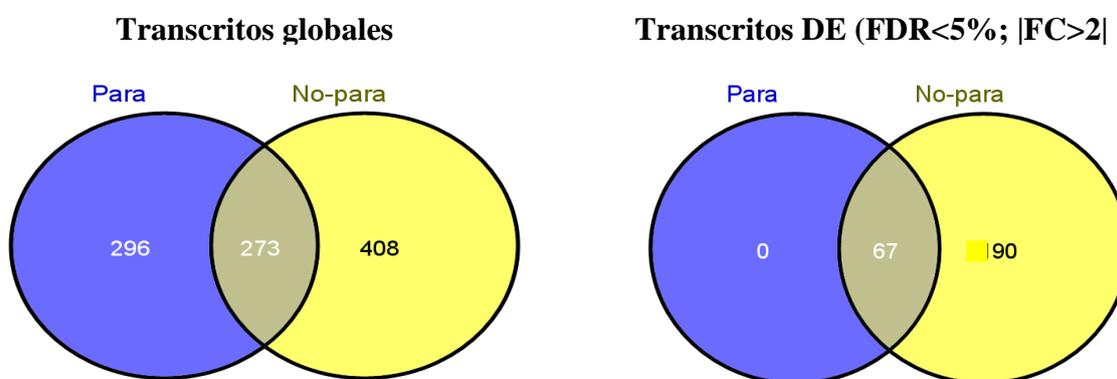


Figura 21. Expresión global y de genes DE entre FSH urinaria y hMG

DE.- *diferencialmente expresados*

FDR.- *false discovery rate o valor corregido de p*

FC.- *fold-change*

Tabla 3. Genes DE entre ciclos estimulados con hMG y FSH urinaria

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>	<b>ACCN</b>	<b>FC</b>	<b>pdf</b>
<b>MT3</b>	metalotioneína	NM_005954	<b>7,70</b>	0,0000
<b>LEFTY2</b>	factor 2 determinación derecha-izquierda	NM_003240	<b>5,37</b>	0,0000
<b>HLA-DRB5</b>	MHC-II, DR beta 5	NM_002125	<b>4,54</b>	0,0000
<b>GAL</b>	galanina	NM_015973	<b>4,52</b>	0,0000
<b>E2F7</b>	factor 7 transcripción-E2F7	NM_203394	<b>4,48</b>	0,0000
<b>C20orf103</b>	cromosoma 20; marco lectura abierta 103	NM_012261	<b>4,13</b>	0,0000
<b>HLA-DRB1</b>	MHC-II, DR beta 1	NM_002124	<b>3,86</b>	0,0000
<b>TNC</b>	tenascina C	NM_002160	<b>3,60</b>	0,0000
<b>DUOX2</b>	dual oxidasa 2	NM_014080	<b>3,48</b>	0,0000
<b>PRB4</b>	proteína BstNI rica en prolina, subfamilia 4	NM_002723	<b>3,45</b>	0,0000
<b>DPYSL4</b>	dihidropirimidinas-like 4	NM_006426	<b>3,18</b>	0,0000
<b>HLA-DRB4</b>	MHC-II, DR beta 4	NM_021983	<b>3,18</b>	0,0000
<b>C1orf165</b>	cromosoma 1; marco lectura abierta 165	NM_024603	<b>3,13</b>	0,0000
<b>LOC92196</b>	proteína asociada a muerte LOC92196	NM_001017920	<b>3,09</b>	0,0000
<b>PFKFB4</b>	6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 4	NM_004567	<b>2,99</b>	0,0000
<b>SLIT2</b>	homólogo 2 slit (Drosophila)	NM_004787	<b>2,93</b>	0,0000
<b>FAM77C</b>	familia con secuencia 77 de similaridad, miembro C	NM_024522	<b>2,84</b>	0,0000
<b>GCG</b>	glucagon	NM_002054	<b>2,75</b>	0,0000
<b>SERPINA5</b>	alfa-1 antiproteinasas, miembro 5	NM_000624	<b>2,73</b>	0,0000
<b>CYP19A1</b>	aromatasa	NM_031226	<b>2,70</b>	0,0000
<b>GSTA3</b>	glutación-S-transferasa A3	NM_000847	<b>2,67</b>	0,0000
<b>PNPLA3</b>	dominio fosfolipasa patatin-like	NM_025225	<b>2,63</b>	0,0000
<b>HMGCS1</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 1	NM_002130	<b>2,56</b>	0,0000
<b>IFITM1</b>	proteína 1 transmembrana inducida por interferón	NM_003641	<b>2,56</b>	0,0000
<b>PCSK9</b>	pro-proteína subtilisina convertasa/kexina tipo 9	NM_174936	<b>2,55</b>	0,0000
<b>KIF26A</b>	familia kinesina, miembro 26A	BC009415	<b>2,54</b>	0,0000
<b>RYR2</b>	receptor 2 rianodina	NM_001035	<b>2,52</b>	0,0000

<b>PPFIA4</b>	proteín tirosín fosfatasa, tipo receptor, polipéptido f	NM_015053	<b>2,47</b>	0,0000
<b>ACAT2</b>	acetil-CoA acetiltransferasa 2	NM_005891	<b>2,47</b>	0,0000
<b>TMEM45A</b>	proteína transmembrana 45A	NM_018004	<b>2,47</b>	0,0000
<b>HMGCR</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	NM_000859	<b>2,40</b>	0,0000
<b>ENO2</b>	enolasa 2	NM_001975	<b>2,38</b>	0,0000
<b>INSIG1</b>	gen 1 inducido por insulina	NM_198336	<b>2,38</b>	0,0000
<b>ADAMTS4</b>	metalopeptidasa ADAM con trombospondina tipo1, motivo 4	NM_005099	<b>2,37</b>	0,0000
<b>LOXL2</b>	lisil oxidasa-like 2	NM_002318	<b>2,36</b>	0,0000
<b>GRK5</b>	receptor kinasa 5 acoplado a proteína G	NM_005308	<b>2,36</b>	0,0000
<b>IDI1</b>	isopentenil-difosfato deta isomerasa 1	NM_004508	<b>2,35</b>	0,0000
<b>ZNF185</b>	clon CTONG2007613, muy simila a la proteína 185 en dedos de zinc	AK095258	<b>2,35</b>	0,0000
<b>CD83</b>	molécula CD83, variante 1	NM_004233	<b>2,35</b>	0,0000
<b>LAMA4</b>	laminina, alfa 4	NM_002290	<b>2,33</b>	0,0000
<b>VWF</b>	factor von Willebrand	NM_000552	<b>2,33</b>	0,0000
<b>WNT3A</b>	familia sitios integración tipo MMTV	NM_033131	<b>2,31</b>	0,0000
<b>C7</b>	componente 7 del complemento	NM_000587	<b>2,31</b>	0,0000
<b>LRP8</b>	recetos lipoproteico baja densidad relacionado con proteína 8	NM_033300	<b>2,30</b>	0,0000
<b>DIRAS3</b>	familia DIRAS, RAS-like 3 unión a GTP	NM_004675	<b>2,28</b>	0,0000
<b>ITM2A</b>	proteína integral de membrana 2A	NM_004867	<b>2,28</b>	0,0000
<b>HK2</b>	hexokinasa 2	NM_000189	<b>2,27</b>	0,0000
<b>CDH11</b>	cadherina 11	NM_001797	<b>2,26</b>	0,0000
<b>PNCK</b>	CaM kinasa expresada no-ubicuamente sobre-expresada por gestación.	NM_001039582	<b>2,25</b>	0,0000
<b>HLA-DRB3</b>	MHC-II, DR beta 3	NM_022555	<b>2,23</b>	0,0000
<b>MRO</b>	maestro	NM_031939	<b>2,23</b>	0,0000
<b>ACTG2</b>	actina, gamma2, músculo liso	NM_001615	<b>2,22</b>	0,0000
<b>FDPS</b>	farnesil-difosfato sintasa	NM_002004	<b>2,22</b>	0,0000
<b>PLOD2</b>	procolágeno-lisina 2, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	NM_182943	<b>2,21</b>	0,0003
<b>PDLIM3</b>	dominio 3 PDZ y LIM	NM_014476	<b>2,19</b>	0,0000

<b>GK</b>	glicerol kinasa	NM_000167	<b>2,19</b>	0,0000
<b>SFRP4</b>	proteína 4 relacionada con la secreción	NM_003014	<b>2,18</b>	0,0000
<b>DHCR7</b>	dehidrocolesterol- reductasa 7	NM_001360	<b>2,18</b>	0,0000
<b>IL7R</b>	receptor interleukina 7	NM_002185	<b>2,17</b>	0,0000
<b>MT1JP</b>	mRNA completo MTB	AF348994	<b>2,16</b>	0,0000
<b>MVD</b>	mevalonato (difosfo) decarboxilasa	NM_002461	<b>2,14</b>	0,0000
<b>TMEM97</b>	proteína transmembrana 97	NM_014573	<b>2,14</b>	0,0000
<b>FDFT1</b>	farnesil-difosfato farnesiltransferasa 1	NM_004462	<b>2,11</b>	0,0000
<b>HBB</b>	hemoglobina beta	NM_000518	<b>2,11</b>	0,0000
<b>FDPSL4</b>	similar a farnesil difosfato sintasa	XR_018717	<b>2,10</b>	0,0000
<b>FDPSL2A</b>	FDPSL2A en cromosoma 7	NR_003262	<b>2,10</b>	0,0000
<b>HLA-DRA</b>	MHC-II, DR alfa	NM_019111	<b>2,10</b>	0,0000
<b>LGALS12</b>	lectina soluble 12	NM_033101	<b>2,10</b>	0,0005
<b>DOK5</b>	proteína docking 5	NM_018431	<b>2,09</b>	0,0003
<b>LDLR</b>	receptor lipoproteico baja densidad	NM_000527	<b>2,09</b>	0,0003
<b>CHGB</b>	cromogranina B	NM_001819	<b>2,09</b>	0,0005
<b>HLA-DQB2</b>	MHC-II, DQ beta 2	NM_182549	<b>2,09</b>	0,0003
<b>DKFZP564C152</b>	clon cDNA	AL049980	<b>2,08</b>	0,0004
<b>ELOVL6</b>	elongación ácidos grasos de cadena larga, miembro 6	NM_024090	<b>2,08</b>	0,0000
<b>LOC645745</b>	proteína metalotioneína 1H-like	NM_001039954	<b>2,08</b>	0,0003
<b>C8orf57</b>	clon cDNA	AL136588	<b>2,07</b>	0,0000
<b>KL</b>	klotho	NM_153683	<b>2,07</b>	0,0000
<b>BHLHB2</b>	dominio con hélice-bucle-hélice, clase B	NM_003670	<b>2,05</b>	0,0005
<b>CD200</b>	molécula CD200, variante 2	NM_001004196	<b>2,05</b>	0,0005
<b>RHOBTB3</b>	dominio BTB relacionado con Rho	NM_014899	<b>2,05</b>	0,0004
<b>RP1-93H18.5</b>	proteína hipotética LOC441168	NM_001010919	<b>2,05</b>	0,0005
<b>AK3L1</b>	adenilato kinasa 3-like 1	NM_001005353	<b>2,04</b>	0,0004
<b>APOA1</b>	apolipoproteína A1	NM_000039	<b>2,03</b>	0,0004

<b>AREG</b>	anfiregulina	NM_001657	<b>2,02</b>	0,0005
<b>RAB33A</b>	miembro de la familia RAS de oncogenes	NM_004794	<b>2,01</b>	0,0004
<b>RASAL1</b>	proteína activadora RAS-like 1	NM_004658	<b>2,01</b>	0,0010
<b>IL33</b>	interleukina 33	NM_033439	<b>2,00</b>	0,0005
<b>LSS</b>	lanosterol sintasa	NM_001001438	<b>2,00</b>	0,0003
<b>AACS</b>	acetoacetil-CoA sintetasa	NM_023928	<b>2,00</b>	0,0004
<b>HLA-DQB1</b>	MHC-II, DQ beta	M20432	<b>2,00</b>	0,0004
<b>CYP51A1</b>	citocromo P450, familia 51, subfamilia A, polipéptido 1	NM_000786	<b>2,00</b>	0,0005
<b>ALDOC</b>	aldolasa C	NM_005165	<b>2,00</b>	0,0005
<b>TCAP</b>	teletonina	NM_003673	<b>-2,00</b>	0,0002
<b>LRRC2</b>	repetición rica en leucina	NM_024750	<b>-2,01</b>	0,0011
<b>NTS</b>	neurotensina	NM_006183	<b>-2,01</b>	0,0002
<b>CXCR7</b>	receptor 7 quimiocinas	NM_001047841	<b>-2,02</b>	0,0002
<b>SFRP5</b>	proteína 5 relacionada con la secreción	NM_003015	<b>-2,02</b>	0,0000
<b>SFN</b>	estratífina	NM_006142	<b>-2,03</b>	0,0006
<b>MED19</b>	mediador de la RNA polimerasa II	NM_153450	<b>-2,03</b>	0,0101
<b>DKFZP761M1511</b>	clon cDNA	AK096661	<b>-2,03</b>	0,0000
<b>PLA2G4A</b>	fosfolipasa A2	NM_024420	<b>-2,05</b>	0,0000
<b>FGD4</b>	dominio 4 con FYVE, Rho y PH	NM_139241	<b>-2,05</b>	0,0000
<b>PIK3R5</b>	fosfoinosítido -3-kinasa, subunidad reguladora 5	NM_014308	<b>-2,06</b>	0,0064
<b>KRTAP4-14</b>	proteína asociada a queratina 4-14	NM_033059	<b>-2,07</b>	0,0002
<b>MYH11</b>	miosina 11	NM_001040113	<b>-2,07</b>	0,0000
<b>SNPH</b>	sintafilina	NM_014723	<b>-2,07</b>	0,0000
<b>L1TD1</b>	dominio con transposasa tipo LINE-1	NM_019079	<b>-2,08</b>	0,0000
<b>ENST00000380901</b>	clon cDNA	ENST00000380901	<b>-2,09</b>	0,0002
<b>CXCL1</b>	ligando 1 quimiocinas	NM_001511	<b>-2,09</b>	0,0000
<b>SPSB2</b>	receptor rianodina/splA con dominio con caja SOCS	NM_032641	<b>-2,10</b>	0,0000
<b>SLURP1</b>	dominio con PLAUR/LY6 secretado	NM_020427	<b>-2,12</b>	0,0002

<b>RHOBTB1</b>	dominio con BTB relacionado con Rho	NM_014836	<b>-2,17</b>	0,0000
<b>CAMK2N1</b>	proteín-kinasa II inhibidor dependiente de Ca-CaM	NM_018584	<b>-2,18</b>	0,0000
<b>ANPEP</b>	alanil (membrana) aminopeptidasa	NM_001150	<b>-2,19</b>	0,0000
<b>FLJ10154</b>	proteína hipotética FLJ10154	NM_018011	<b>-2,20</b>	0,0000
<b>LOC641522</b>	proteína ADP-ribosilación- like	NM_001039083	<b>-2,20</b>	0,0000
<b>ECEL1</b>	enzima-like 1 conversora de endotelina	NM_004826	<b>-2,21</b>	0,0000
<b>RBM22</b>	proteínas 22 de unión a RNA	NM_018047	<b>-2,21</b>	0,0012
<b>ALOX15B</b>	araquidonato 15-lipooxigenasa, tipo B	NM_001141	<b>-2,28</b>	0,0000
<b>GPR78</b>	receptor 78 acoplado a proteína G	NM_080819	<b>-2,30</b>	0,0017
<b>GRB14</b>	proteína 14 unida a receptor de factor de crecimiento	NM_004490	<b>-2,33</b>	0,0000
<b>RAP1GAP</b>	proteína activadora RAPI-GTPasa	NM_002885	<b>-2,35</b>	0,0011
<b>MAGEA6</b>	familia A,6 de antígenos de melanoma	NM_175868	<b>-2,35</b>	0,0000
<b>VCAM1</b>	molécula 1 de adhesión vascular	NM_001078	<b>-2,36</b>	0,0000
<b>ANKRD22</b>	dominio repetición ankirina 22	NM_144590	<b>-2,40</b>	0,0000
<b>LOC63928</b>	antígeno 520 carcinoma hepatocelular	NM_022097	<b>-2,40</b>	0,0000
<b>AGC1</b>	agrecan 1	NM_013227	<b>-2,42</b>	0,0000
<b>PEX6</b>	factor 6 biogénesis peroxisomal	NM_000287	<b>-2,44</b>	0,0000
<b>SLC9A3R1</b>	familia 9 transportador solutos	NM_004252	<b>-2,45</b>	0,0056
<b>HIST1H1D</b>	cluste 1 histonas	NM_005320	<b>-2,46</b>	0,0000
<b>ENST00000361567</b>	NADH-ubiquinona oxidoreductasa cadena 5	ENST00000361567	<b>-2,48</b>	0,0000
<b>AKAP12</b>	proteín-kinasa A de anclaje	NM_144497	<b>-2,49</b>	0,0000
<b>GSTT1</b>	glutación-s-transferasa theta 1	NM_000853	<b>-2,57</b>	0,0000
<b>CISH</b>	proteína con citokina SH2-inducible	NM_145071	<b>-2,60</b>	0,0000
<b>MGLL</b>	monoglicérido-lipasa, variante 1	NM_007283	<b>-2,63</b>	0,0000
<b>SCARNA17</b>	RNA 17-específico de cuerpos de Cajal	NR_003003	<b>-2,67</b>	0,0000
<b>HS6ST1</b>	heparán-sulfato6-O-sulfotransferasa 1	NM_004807	<b>-2,70</b>	0,0000
<b>RNF150</b>	proteína 150 dedos en anillo	NM_020724	<b>-2,70</b>	0,0019
<b>FLJ10916</b>	proteína hipotética FLJ101916	NM_018271	<b>-2,74</b>	0,0000

<b>RP11-167P23.2</b>	proteína XAGE-4	XR_015427	<b>-2,75</b>	0,0010
<b>WDR21C</b>	dominio 21C con repetición WD	NM_152418	<b>-2,76</b>	0,0010
<b>ACIN1</b>	inductor 1 condensación apoptótica de la cromatina	NM_014977	<b>-2,78</b>	0,0000
<b>CCDC66</b>	clon cDNA	AK095688	<b>-2,81</b>	0,0000
<b>WDR67</b>	dominio 67 con repetición WD	NM_145647	<b>-2,83</b>	0,0000
<b>CD86</b>	molécula CD86, variante 2	NM_006889	<b>-2,90</b>	0,0000
<b>IRX5</b>	proteína 5 iroquois	NM_005853	<b>-2,93</b>	0,0000
<b>C10orf116</b>	cromosoma 10; marco lectura abierta 116	NM_006829	<b>-3,06</b>	0,0000
<b>OXTR</b>	receptor oxitocina	NM_000916	<b>-3,11</b>	0,0000
<b>SAPS1</b>	familia dominio SAPS, miembro 1	NM_014931	<b>-3,75</b>	0,0000
<b>RPA4</b>	proteína A4 replicación	NM_013347	<b>-4,67</b>	0,0000
<b>OSTbeta</b>	transportador solutos orgánicos beta	NM_178859	<b>-5,07</b>	0,0000
<b>CGB1</b>	gonadotropina coriónica, beta polipéptido 1	NM_033377	<b>-5,15</b>	0,0000
<b>SLC45A4</b>	familia 45, miembro 4 de transportador de solutos	BC033223	<b>-5,27</b>	0,0000
<b>VPS18</b>	proteína homóloga 18 (S.cerevisiae)	NM_020857	<b>-5,88</b>	0,0000
<b>CABP7</b>	proteína 7 unión a calcio	NM_182527	<b>-7,32</b>	0,0000

En cuanto a la relación de términos ontológicos destacados entre estos dos tratamientos, una vez aplicados los análisis bioinformáticos a los patrones de expresión génica de ambos protocolos se registraron 16 procesos biológicos, 7 componentes celulares y 2 funciones moleculares significativamente afectadas. En cuanto a las rutas metabólicas se describió una amplia variedad, entre las que podemos destacar a la diabetes tipo I o la enfermedad tiroidea autoinmune. En cada figura se representan los términos GO (*Go Ontology*) con un p-valor significativo ( $p < 0.05$ ), el número de genes implicados en cada proceso y el porcentaje que representan con respecto a la cantidad total de genes descritos para dicho término en la especie *Homo sapiens*.

Cabe destacar la amplia variedad de procesos biológicos significativamente afectados, con especial atención en las rutas relacionadas con las hormonas esteroideas como la biosíntesis de lípidos, biosíntesis de colesterol y biosíntesis de esteroides. Además, una de las funciones más afectadas se relaciona con los genes que regulan el desarrollo de estructuras anatómicas, registrándose también una actividad secretora y extracelular importante.

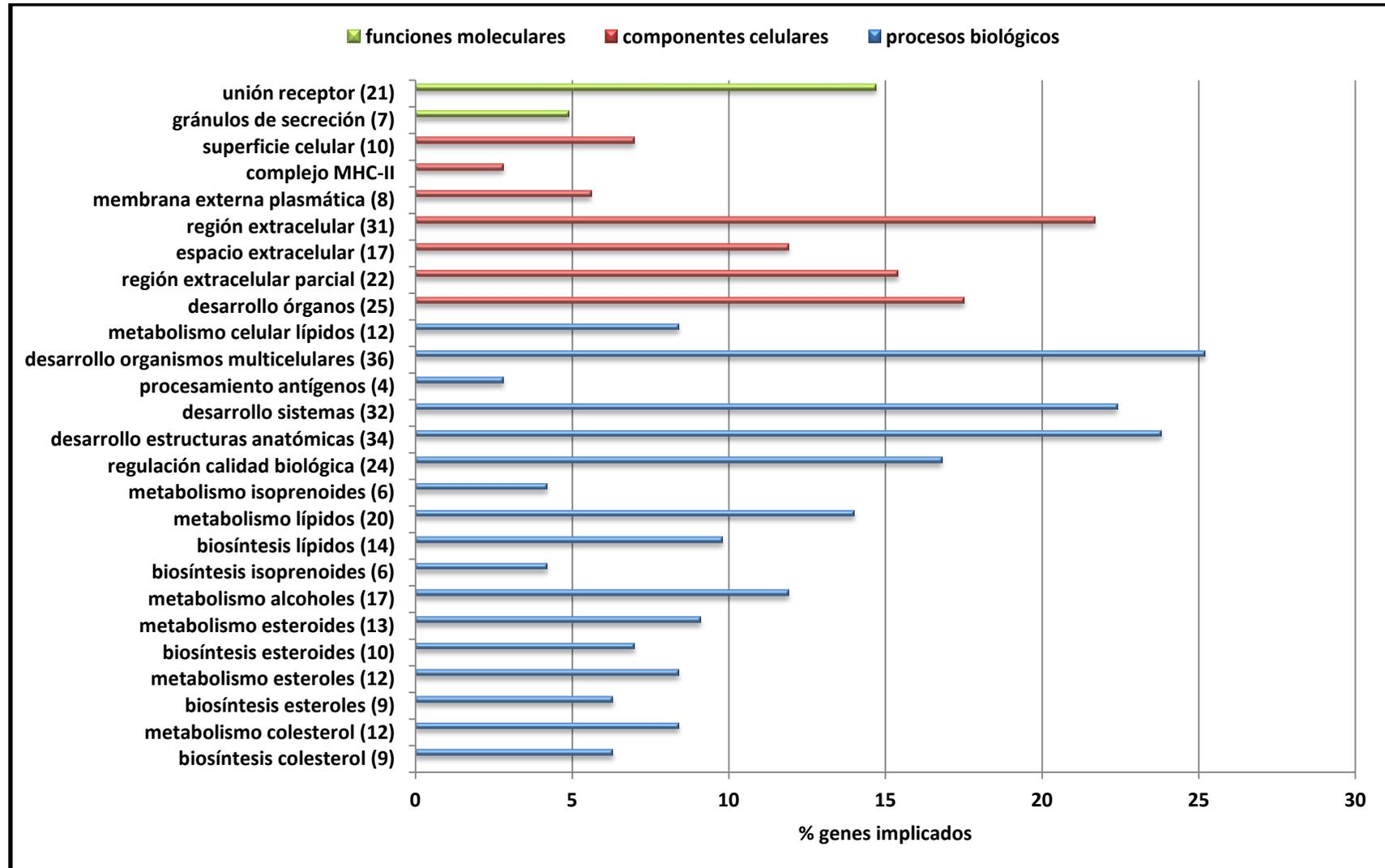


Figura 22. Análisis de enriquecimiento de genes DE en células del cúmulo (FSH urinaria vs hMG)

## 5.2.- FSH urinaria vs FSH recombinante (FSH recombinante como control).

En el análisis comparativo entre FSH urinaria y FSH recombinante se registró la expresión de 392 genes de los que 43 presentan expresión diferencial entre ambos tipos de tratamiento

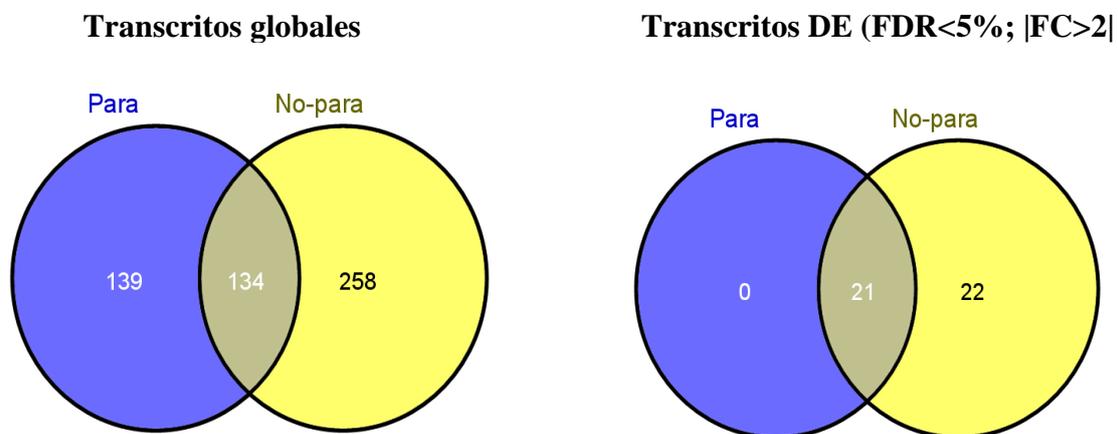


Figura 23. Expresión global y de genes DE entre FSH recombinante y FSH urinaria

DE.- *diferencialmente expresados*

FDR.- *false discovery rate o valor corregido de p*

FC.- *fold-change*

**Tabla 4. Genes DE entre ciclos estimulados con FSH recombinante vs FSH urinaria**

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>	<b>ACCN</b>	<b>FC</b>	<b>pdfp</b>
<b>LEFTY2</b>	factor 2 determinación derecha-izquierda	NM_003240	<b>4,66</b>	0,0000
<b>C7</b>	componente 7 del complemento	NM_000587	<b>3,81</b>	0,0000
<b>ITM2A</b>	proteína integral de membrana 2A	NM_004867	<b>3,76</b>	0,0000
<b>C10orf10</b>	cromosoma10; marco abirto de lectura 10	NM_007021	<b>2,73</b>	0,0000
<b>GCG</b>	glucagón	NM_002054	<b>2,67</b>	0,0000
<b>CLU</b>	clusterina, variante 2	NM_203339	<b>2,62</b>	0,0000
<b>LOC441257</b>	proteína hipotética LOC441257	NM_001023562	<b>2,36</b>	0,0000
<b>FN1</b>	fibronectina 1, variante 1	NM_212482	<b>2,29</b>	0,0000
<b>NBPF14</b>	familia rotura neuroblastoma, miembro 14	NM_015383	<b>2,17</b>	0,0000
<b>LOC148709</b>	pseudogen de actina en cromosoma 1	NR_002929	<b>2,16</b>	0,0000
<b>TNC</b>	tenascina C	NM_002160	<b>2,15</b>	0,0000
<b>C1orf165</b>	cromosoma 1; marco lectura abierto 165	NM_024603	<b>2,10</b>	0,0020
<b>ACTC1</b>	actina alfa1, músculo cardíaco	NM_005159	<b>2,04</b>	0,0008
<b>PRR17</b>	mRNA rico en prolina	NM_207349	<b>-2,01</b>	0,0000
<b>CPNE7</b>	copina VII, variante 2	NM_014427	<b>-2,02</b>	0,0000
<b>RBM22</b>	proteína 22 unión RNA	NM_018047	<b>-2,06</b>	0,0000
<b>GPT</b>	alanina aminotransferasa	NM_005309	<b>-2,07</b>	0,0005
<b>MAB21L2</b>	mab-21-like 2 (C.elegans)	NM_006439	<b>-2,11</b>	0,0000
<b>MAPK4</b>	proteín-kinasa 63 Kda relacionada con ERK3 de rata	X59727	<b>-2,11</b>	0,0000
<b>NPM3</b>	nucleoplasmina/nucleofosmina 3	NM_006993	<b>-2,15</b>	0,0000
<b>CSF1R</b>	receptor para el facot estimulante de colonias 1	NM_005211	<b>-2,22</b>	0,0000
<b>NTS</b>	neurotensina	NM_006183	<b>-2,30</b>	0,0000
<b>C10orf116</b>	cromosoma 10; marco abierto de lectura 116	NM_006829	<b>-2,33</b>	0,0000
<b>IFI30</b>	proteína 30 inducible por gamma interferón	NM_006332	<b>-2,38</b>	0,0000
<b>CISH</b>	proteína con citokina SH2-inducible	NM_145071	<b>-2,38</b>	0,0000

<b>FKBP10</b>	proteína 10 de 65 Kda de unión a FK506	NM_021939	<b>-2,39</b>	0,0000
<b>MAGEA6</b>	familia A,6 de antígenos de melanoma	NM_175868	<b>-2,40</b>	0,0000
<b>LRRC2</b>	repetición rica en leucina	NM_024750	<b>-2,40</b>	0,0000
<b>TYROBP</b>	proteína de unión a la proteín-tirosín-kinasa TYRO	NM_003332	<b>-2,47</b>	0,0000
<b>MGLL</b>	monoglicérido lipasa, variante 1	NM_007283	<b>-2,54</b>	0,0000
<b>CCDC66</b>	clon Cdna	AK095688	<b>-2,63</b>	0,0000
<b>SLURP1</b>	dominio con PLAUR/LY6 secretado	NM_020427	<b>-2,64</b>	0,0000
<b>GSTT1</b>	glutatió-S-transferasa theta 1	NM_000853	<b>-2,66</b>	0,0000
<b>GPR78</b>	receptor 78 acoplado a proteína G	NM_080819	<b>-2,69</b>	0,0000
<b>OSTbeta</b>	trasnportador solutos orgánicos beta	NM_178859	<b>-2,70</b>	0,0000
<b>IRX5</b>	proteína 5 iroquois	NM_005853	<b>-2,72</b>	0,0000
<b>CD86</b>	molécula CD86, variante 2	NM_006889	<b>-2,74</b>	0,0000
<b>SLC45A4</b>	familia 45, miembro 4 de transportador de solutos	BC033223	<b>-3,12</b>	0,0000
<b>CGB1</b>	gonadotropina coriónica, beta polipéptido 1	NM_033377	<b>-3,47</b>	0,0000
<b>SAPS1</b>	familia dominio SAPS, miembro 1	NM_014931	<b>-3,62</b>	0,0000
<b>VPS18</b>	proteína homóloga 18 (S.cerevisiae)	NM_020857	<b>-5,27</b>	0,0000
<b>RPA4</b>	proteína A4 replicación	NM_013347	<b>-6,44</b>	0,0000
<b>CABP7</b>	proteína 7 unión a calcio	NM_182527	<b>-8,99</b>	0,0000

La evaluación de los términos ontológicos y de las rutas metabólicas estadísticamente significativas entre los tratamientos con FSH recombinante y FSH urinaria mostró la ausencia de diferencias significativas en relación a procesos biológicos, funciones moleculares y rutas metabólicas; sin embargo, sí se registraron tres componentes celulares significativamente afectados con una actividad claramente secretora.

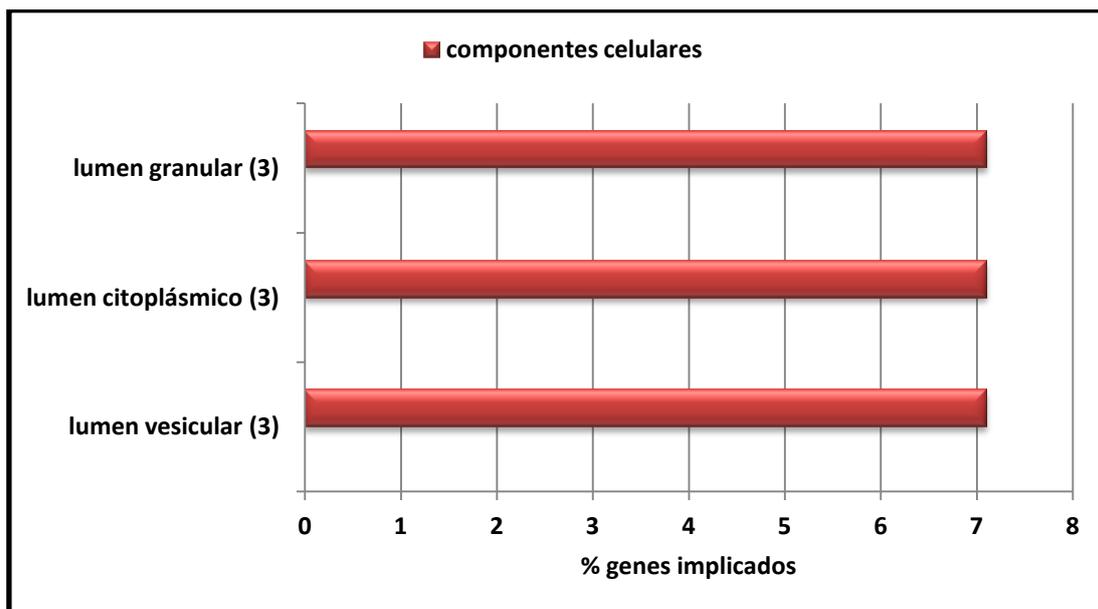


Figura 24. Análisis de enriquecimiento de genes DE en células del cúmulo (FSH recombinante vs FSH urinaria)

### 5.3.- FSH recombinante vs hMG (hMG como control).

Por último, en el estudio de los ciclos estimulados con FSH recombinante o hMG, el análisis de transcritos reveló la expresión global de 464 genes con una cantidad de 75 transcritos con diferencias significativas en sus niveles de expresión

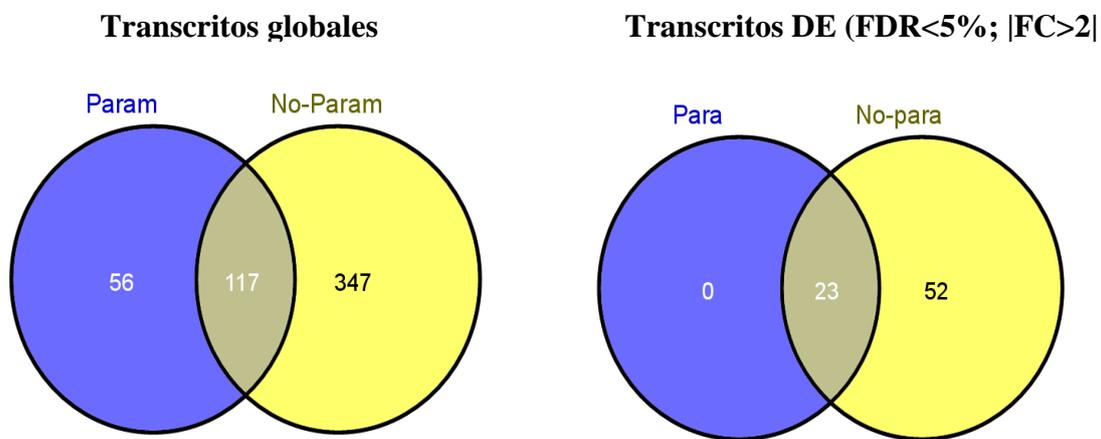


Figura 25. Expresión global y de genes DE entre FSH recombinante y hMG

DE.- diferencialmente expresados

FDR.- *false discovery rate* o valor corregido de *p*

FC.-*fold-change*

Tabla 5. Genes DE entre ciclos estimulados con hMG vs FSH recombinante

Símbolo	Definición	ACCN	FC	pdf
<b>MT3</b>	metalotioneína 3	NM_005954	<b>5,29</b>	0,0000
<b>E2F7</b>	factor 7 transcripción-E2F7	NM_203394	<b>4,44</b>	0,0000
<b>LGALS12</b>	lectina soluble 12	NM_033101	<b>3,70</b>	0,0000
<b>MAPK4</b>	proteín-kinasa 63 Kda relacionada con ERK3 de rata	X59727	<b>3,37</b>	0,0000
<b>PRB4</b>	proteína BstNI rica en prolina, subfamilia 4	NM_002723	<b>2,97</b>	0,0000
<b>IL27</b>	interleukina 27	NM_145659	<b>2,82</b>	0,0000
<b>HLA-DRB1</b>	MHC-II, DR beta 1	NM_002124	<b>2,77</b>	0,0000
<b>FAM77C</b>	familia con secuencia 77 de similaridad, miembro C	NM_024522	<b>2,75</b>	0,0000
<b>ACTG2</b>	actina, gamma 2, músculo liso	NM_001615	<b>2,73</b>	0,0000
<b>PRSS36</b>	proteasa, serina 36	NM_173502	<b>2,69</b>	0,0000
<b>GAL</b>	galanina	NM_015973	<b>2,67</b>	0,0000
<b>SPRR2G</b>	proteína 2G rica en prolina	NM_001014291	<b>2,67</b>	0,0000
<b>RASAL1</b>	proteína activadora RAS-like 1	NM_004658	<b>2,63</b>	0,0000
<b>KIF26A</b>	familia kinesina, miembro 26A	BC009415	<b>2,57</b>	0,0000
<b>PRB2</b>	proteína BstNI rica en prolina, subfamilia 2	NM_006248	<b>2,57</b>	0,0000
<b>LRP8</b>	receptor lipoproteico baja densidad relacionado con proteína 8	NM_033300	<b>2,49</b>	0,0000
<b>GRK5</b>	receptor kinasa 5 acoplado a proteína G	NM_005308	<b>2,42</b>	0,0000
<b>INHBA</b>	inhibina, beta A	NM_002192	<b>2,42</b>	0,0000
<b>LAMA4</b>	laminina, alfa 4	NM_002290	<b>2,41</b>	0,0000
<b>FLJ20701</b>	proteína hipotética FLJ20701	NM_017933	<b>2,41</b>	0,0000
<b>HBA1</b>	hemoglobina alfa 1	NM_000558	<b>2,38</b>	0,0000
<b>OSBPL6</b>	proteína-like 6 de unión a oxisterol	NM_032523	<b>2,38</b>	0,0000
<b>ANGPTL4</b>	angiopoyetina-like 4, variante 1	NM_139314	<b>2,37</b>	0,0000
<b>C20orf103</b>	cromosoma 20; marco lectura abierta 103	NM_012261	<b>2,37</b>	0,0000
<b>CD83</b>	molécula CD83, variante 1	NM_004233	<b>2,34</b>	0,0000
<b>LTB</b>	linfotoxina beta	NM_002341	<b>2,31</b>	0,0000
<b>CD200</b>	molécula CD200, variante 2	NM_001004196	<b>2,25</b>	0,0000

<b>HBB</b>	hemoglobina beta	NM_000518	<b>2,21</b>	0,0000
<b>NR4A3</b>	receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembro 3	NM_173199	<b>2,19</b>	0,0000
<b>PRB3</b>	proteína BstNI rica en prolina, subfamilia 3	NM_006249	<b>2,17</b>	0,0000
<b>WNT3A</b>	familia sitios integración tipo MMTV	NM_033131	<b>2,16</b>	0,0000
<b>ZNF331</b>	proteína 331 en dedos de zinc	NM_018555	<b>2,14</b>	0,0000
<b>RP1-93H18.5</b>	proteína hipotética LOC44168	NM_001010919	<b>2,13</b>	0,0000
<b>ADAMTS4</b>	metalopeptidasa ADAM con trombospondina tipo1, motivo 4	NM_005099	<b>2,12</b>	0,0000
<b>GPT</b>	alanina aminotransferasa	NM_005309	<b>2,12</b>	0,0000
<b>DUOX2</b>	dual oxidasa 2	NM_014080	<b>2,12</b>	0,0000
<b>DIRC1</b>	rota en carcinoma renal 1	NM_052952	<b>2,11</b>	0,0002
<b>FKBP10</b>	proteína 10 de 65 Kda de unión a FK506	NM_021939	<b>2,11</b>	0,0000
<b>ENST00000327591</b>	fragmento proteína S26	ENST00000327591	<b>2,11</b>	0,0000
<b>HBA2</b>	hemoglobina alfa 2	NM_000517	<b>2,10</b>	0,0000
<b>HLA-DRB3</b>	MHC-II, DR beta 3	NM_022555	<b>2,10</b>	0,0000
<b>TUBA1</b>	tubulina, alfa 1	NM_006000	<b>2,06</b>	0,0000
<b>MRO</b>	maestro	NM_031939	<b>2,03</b>	0,0000
<b>VWF</b>	factor von Willebrand	NM_000552	<b>2,03</b>	0,0000
<b>CCDC3</b>	dominio anillado 3	NM_031455	<b>2,03</b>	0,0000
<b>KRTAP5-8</b>	proteína 5-8 asociada a keratina	NM_021046	<b>2,02</b>	0,0003
<b>S100A8</b>	proteína A8 de unión a calcio S100	NM_002964	<b>2,02</b>	0,0000
<b>MT1F</b>	metalotioneína 1F	NM_005949	<b>2,01</b>	0,0000
<b>ESPNL</b>	espin-like	NM_194312	<b>2,01</b>	0,0000
<b>CXorf6</b>	cromosoma X; marco abierto de lectura 66	NM_005491	<b>2,01</b>	0,0002
<b>COL1A1</b>	colágeno pre-pro-alfa 1	Z74615	<b>2,00</b>	0,0002
<b>TNFSF11</b>	superfamilia factor necrosis tumoral, miembro 11	NM_003701	<b>-2,00</b>	0,0009
<b>UNC84B</b>	homólogo B, unc-84 (C.elegans)	NM_015374	<b>-2,01</b>	0,0013
<b>FLJ20160</b>	proteína FLJ20160	NM_017694	<b>-2,06</b>	0,0011
<b>ACSM3</b>	acil-CoA sintetasa, miembro 3 cadenas moderadas	NM_202000	<b>-2,10</b>	0,0011

<b>SHC2</b>	proteína 2 transformadora SHC	ENST00000264554	<b>-2,12</b>	0,0015
<b>FGD4</b>	dominio con FYVE, RhoGEF y PH	NM_139241	<b>-2,13</b>	0,0012
<b>AKAP12</b>	proteín-kinasa A de anclaje	NM_144497	<b>-2,13</b>	0,0032
<b>CYP3A7</b>	citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 7	NM_000765	<b>-2,14</b>	0,0013
<b>SESTD1</b>	dominio 1 SEC14 y espectrina	NM_178123	<b>-2,15</b>	0,0084
<b>WDR67</b>	dominio 67 con repetición WD	NM_145647	<b>-2,21</b>	0,0128
<b>GRB14</b>	proteína 14 unida a receptor de factor de crecimiento	NM_004490	<b>-2,24</b>	0,0014
<b>SOX4</b>	caja 4; región determinante de sexo SRY	NM_003107	<b>-2,26</b>	0,0017
<b>SNPH</b>	sintafilina	NM_014723	<b>-2,28</b>	0,0018
<b>LOC63928</b>	antígeno 520 carcinoma hepatocelular	NM_022097	<b>-2,29</b>	0,0022
<b>OXTR</b>	receptor oxitocina	NM_000916	<b>-2,33</b>	0,0013
<b>CYP3A4</b>	citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4	NM_017460	<b>-2,34</b>	0,0000
<b>ECAT8</b>	transcrito 8 asociado a célula	ENST00000311695	<b>-2,34</b>	0,0020
<b>WNT5A</b>	familia sitios integración tipo MMTV	NM_003392	<b>-2,43</b>	0,0000
<b>HS3ST1</b>	heparán sulfato 3-O- sulfotransferasa 1	NM_005114	<b>-2,46</b>	0,0000
<b>CXCR7</b>	receptor 7 quimiocina	NM_001047841	<b>-2,51</b>	0,0000
<b>CXCL1</b>	ligando 1 quimiocina	NM_001511	<b>-2,73</b>	0,0000
<b>MUM1L1</b>	antígeno 1-like asociado a melanoma	NM_152423	<b>-3,03</b>	0,0000
<b>MYH11</b>	miosina 11	NM_001040113	<b>-3,89</b>	0,0000

En relación a los términos GO con diferencias relevantes entre estos protocolos de estimulación, se identificaron 4 procesos biológicos, 5 componentes celulares y 4 funciones moleculares. En cuanto a las rutas metabólicas únicamente se vio significativamente afectada la miocarditis viral. En este último análisis comparativo, los términos GO significativamente afectados están relacionados con la regulación de procesos del desarrollo y el desarrollo de estructuras anatómicas así como con funciones moleculares asociadas al transporte de oxígeno.

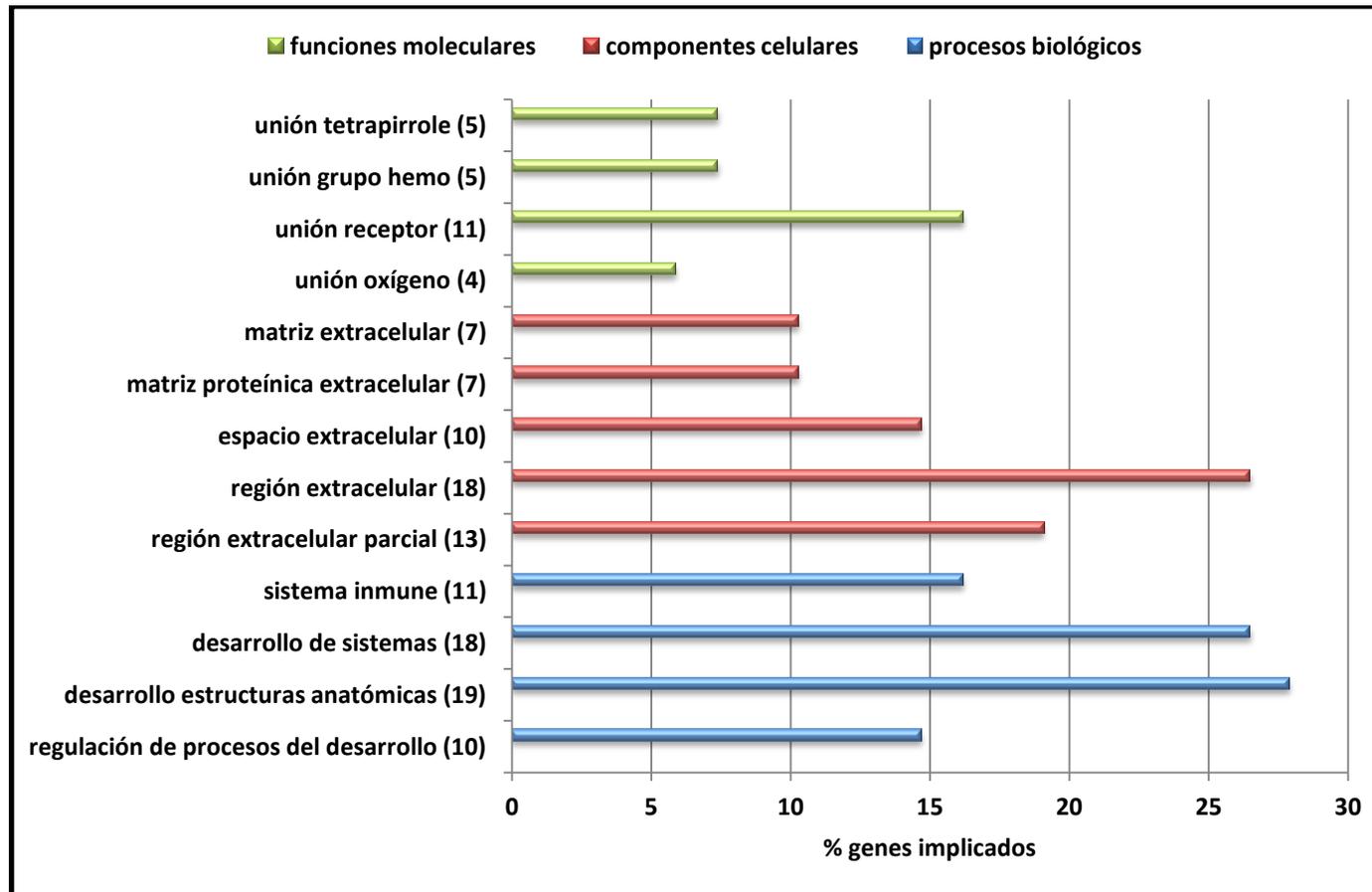
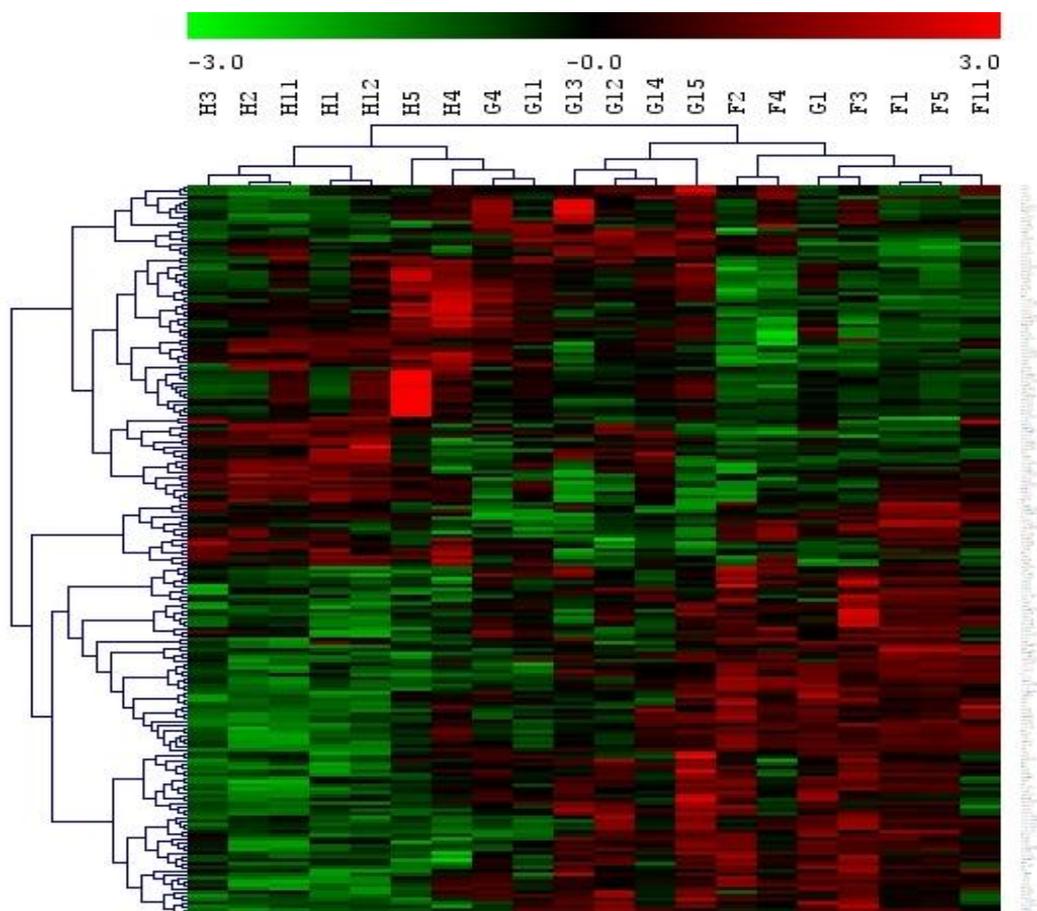


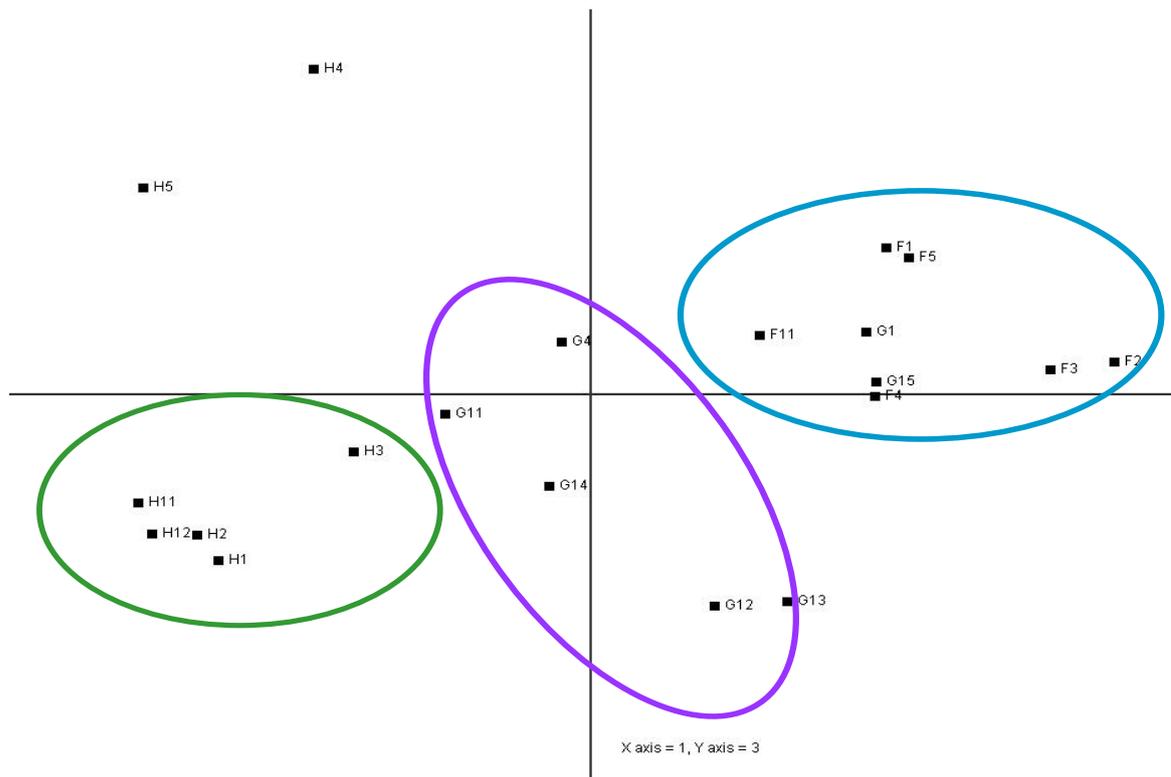
Figura 26. Análisis de enriquecimiento de genes DE en células del cúmulo 8FSH recombinante vs hMG)

Como se deduce de estos resultados, las principales diferencias se observan entre los tratamientos con FHS urinaria y hMG, donde el análisis de los perfiles de expresión génica muestra la mayor cantidad de genes diferencialmente expresados. Estos datos se confirman con el análisis de “clustering” en el que los niveles de expresión para cada gen están estandarizados para que tengan un valor medio de 0 y una desviación estándar de 1. Los valores en rojo representan los niveles de expresión por encima de la media y los valores en verde, niveles de expresión inferiores a la media.



**Figura 27. "Cluster" jerárquico de genes DE en los tres tratamientos de estudio**

Las representaciones gráficas derivadas de los análisis de PCA (*Principal Component Analysis*) ratifican los resultados anteriores: las grandes diferencias en los patrones de expresión génica entre los protocolos de estimulación con FSH urinaria y los tratamientos con hMG así como el comportamiento intermedio de la FSH recombinante.



**Figura 28. Análisis de PCA de los genes DE para la determinación de diferencias en los patrones de expresión génica (H: ciclos estimulados con hMG; F: ciclos estimulados con FSH urinaria); G: ciclos estimulados con FSH recombinante).**

# **DISCUSIÓN**

Las tasas de gestación obtenidas en los ciclos de fecundación *in vitro* han progresado paralelamente a los avances tecnológicos, aunque se ha mantenido como práctica habitual la transferencia de más de un embrión, hecho que se traduce en una amplia proporción de gestaciones múltiples con los riesgos que conlleva en concepto de partos prematuros y complicaciones obstétricas y pediátricas. Como consecuencia de los riesgos asociados a este tipo de gestaciones, uno de los mayores desafíos a los que se enfrentan los clínicos es aumentar la proporción de embarazos únicos después de un tratamiento de reproducción; sin embargo, las reticencias que acompañan a las políticas de transferencia de un solo embrión debido a las menores tasas de gestación por transferencia, ponen de manifiesto la necesidad de identificar nuevos factores de calidad ovocitaria asociados a un aumento de la calidad embrionaria.

A pesar de los logros evidentes de la medicina reproductiva, el desafío es saber cómo aumentar cuantitativa y cualitativamente, en cuanto a disminución de la tasa de gestaciones múltiples, los resultados clínicos. La calidad ovocitaria ha sido reconocida como el principal factor limitante de la fertilidad femenina, por lo que el gameto femenino se encuentra en el centro de numerosas investigaciones que tratan de esclarecer sus intrincados mecanismos de regulación (Sirard et al. 2006). La interacción bidireccional entre el ovocito y las células somáticas circundantes es indispensable para la adquisición de la competencia ovocitaria, que se define como la capacidad del ovocito para completar con éxito las etapas sucesivas de maduración, fecundación y desarrollo embrionario hasta culminar en un recién nacido vivo. Aunque se han utilizado varios parámetros para evaluar la competencia ovocitaria, se caracterizan por ser poco fiables y muy subjetivos (Krisher 2004) debido a la falta de conocimientos relacionados con los procesos moleculares subyacentes. Ante esta aparente incapacidad para estimar con garantías el potencial reproductivo de un ovocito dentro de una cohorte mediante los criterios actuales de selección, el escenario que se perfila para los investigadores está estrechamente relacionado con la búsqueda de nuevos marcadores, que completen la información derivada de los análisis morfológicos con el propósito de aumentar las tasas globales de gestación al mismo tiempo que se reducen los riesgos asociados a un embarazo múltiple.

El uso de gonadotropinas en los tratamientos de infertilidad y especialmente los aspectos relacionados con las técnicas de reproducción asistida han supuesto una mejora considerable de los resultados clínicos. Un aspecto de la hMG que cada vez resulta más evidente es que su actividad LH procede fundamentalmente de la hCG que lleva

incorporada; en este punto es importante destacar que la LH y la hCG tienen igual bioactividad pero distintos perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos (Casarini et al. 2012), especialmente cuando una se aplica como fármaco y la otra se considera endógenamente (Baer and Loumaye 2003). La actividad LH se ha eliminado con el desarrollo y síntesis de la FSHu altamente purificada y posteriormente de los productos que contienen FSHr; sin embargo, en paralelo a este hecho, se observa un incremento en el uso de fármacos que contienen actividad LH, bien en forma de hMG bien como LH recombinante (Al-Inany et al. 2009, Platteau et al. 2008).

Por otra parte, conocer las diferencias estructurales entre moléculas y la implicación a nivel funcional y clínico es de especial importancia para comprender e individualizar el protocolo de estimulación. Estas diferencias estructurales y moleculares influyen en las interacciones de las gonadotropinas con su receptor aplicadas en términos de inducción de la respuesta biológica; las isoformas de carácter básico, dominantes en los productos recombinantes, tienen mayor afinidad de unión por su receptor lo que se traduce en una respuesta ovárica más intensa mientras que las isoformas ácidas, mayoritarias en los derivados urinarios, presentan una vida media más prolongada (Yding Andersen 2002). Las proporciones relativas de isoformas ácidas/básicas presentes en los preparados gonadotrópicos comerciales dependen del fabricante y del material original. A consecuencia de su perfil específico en isoformas de la FSH, las preparaciones comerciales pueden enviar distintas señales cuantitativas/cualitativas al folículo contribuyendo a la aparición de distintos resultados clínicos.

También hay que tener en cuenta que durante mucho tiempo ha existido la percepción de que el ovocito actúa como un elemento pasivo en términos de su relación con las células foliculares somáticas circundantes; sin embargo, la tendencia actual sugiere que el ovocito opera como un regulador central de la función de las células foliculares, desempeñando un papel clave en la ovogénesis, ovulación y posterior potencial de fecundación (Eppig 2001). El ovocito logra este estatus secretando factores solubles de crecimiento, que actúan sobre las células foliculares vecinas para regular un amplio espectro de funciones. Por lo tanto, la identificación de las moléculas clave y de las rutas de señalización que participan en el bucle ovocito-células foliculares será de vital importancia, a la hora de profundizar en los mecanismos subyacentes a la adquisición de competencia ovocitaria y en el descubrimiento de nuevos factores de calidad.

*Análisis del perfil hormonal y de los factores de secreción ovocitaria en función del tipo de gonadotropina.*

Tradicionalmente, los estudios que examinan el control del desarrollo folicular se han centrado fundamentalmente en la regulación endocrina del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Sin embargo, los factores intraováricos también son importantes desde un punto de vista autocrino/paracrino; en los últimos años, la atención se ha centrado en dos miembros de la superfamilia TGF $\beta$ : GDF-9 y BMP-15, y en sus funciones potenciales como reguladores locales de la actividad ovárica y la fertilidad. Los factores secretados por el ovocito regulan distintas funciones de las células foliculares somáticas como la proliferación, esteroidogénesis, diferenciación y expansión (Hussein et al. 2006). Entre las funciones de GDF-9 destaca que actúa promoviendo la síntesis de colesterol (Su et al. 2008), hecho que garantiza un aporte metabólico al ovocito y cierta relación con la síntesis de progesterona inducida por gonadotropinas (Elvin et al. 1999, McNatty et al. 2005b), aunque este efecto no se observa de forma consistente (Otsuka et al. 2000, Yamamoto et al. 2002); además, estimula la proliferación de las células de la granulosa, disminuye la expresión de receptores para LH/hCG e inhibe la esteroidogénesis inducida por FSH al bloquear la actividad aromatasa (Otsuka et al. 2011). En relación a BMP-15, éste desempeña un papel integral en la regulación de la foliculogénesis ovárica y en la función folicular donde actúa como un potente estimulador de la mitosis en las células de la granulosa, inhibe la expresión de receptores de FSH lo que en última instancia supone un descenso de la síntesis de progesterona inducida por FSH y estimula la expresión del ligando de kit en células de la granulosa (Moore et al. 2003).

En cuanto al papel de las hormonas esteroideas, éste está perfectamente establecido en la fertilidad femenina. Cuando se evalúa la actividad farmacodinámica de las gonadotropinas, una de las medidas más sensibles es la actividad esteroidogénica del ovario; al contrario de lo que ocurre con los folículos y ovocitos, que son variables finitas, las concentraciones esteroideas son capaces de revelar cambios y diferencias muy sutiles durante la estimulación ovárica dependiendo de las gonadotropinas exógenas administradas (Porchet et al. 1994), de modo que en ciclos sometidos a distintos protocolos de estimulación los niveles séricos de estradiol y progesterona aportan evidencias claras del impacto de las gonadotropinas sobre la estimulación ovárica.

Durante la esteroidogénesis, la FSH actúa sobre las células de la granulosa promoviendo la división celular y la síntesis de esteroides a partir de colesterol; el paso limitante en esta ruta es la conversión del colesterol en pregnenolona y progesterona, de modo que se asume que tanto las células de la granulosa como de la teca son activas productoras de progesterona. Esta progesterona se cataboliza a andrógenos por la influencia trófica de la LH sobre las células de la teca, y los andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa a través de la aromatización inducida por la FSH (Fleming and Jenkins 2010). De estas afirmaciones se deduce que a mayor señal de la LH, mayor es la actividad catabólica que convierte a la progesterona en andrógenos y que un déficit de LH podría suponer que llegue más progesterona a la circulación general. Sin embargo, el papel de la LH en la regulación de los niveles de progesterona es objeto de un controvertido debate debido a la complejidad del efecto que ejerce sobre la biosíntesis hormonal durante la fase folicular (Miller and Auchus 2011):

- la LH actúa constitutivamente sobre los receptores de las células de la teca para estimular al complejo enzimático CYP17A1 ( $17\alpha$ -hidroxilasa), responsable de convertir a la progesterona/pregnenolona en productos hidroxilados y andrógenos siendo el resultado un descenso en los niveles de progesterona; por otro lado, la LH actúa sobre la enzima  $3\beta$ HSD que cataliza el paso de pregnenolona a progesterona. En consecuencia, los efectos globales de la LH sobre la síntesis de progesterona en las células de la teca dependen del equilibrio entre estas dos enzimas.

- en las células de la granulosa la LH actúa sobre sus correspondientes receptores, inducidos por la FSH al final de la fase folicular. La LH tiene un efecto sinérgico con la FSH en las células de la granulosa para estimular la síntesis de progesterona (Lindeberg et al. 2007), siendo incluso más potente que la FSH en la actividad esteroidogénica de las células de la granulosa (Yong et al. 1994)

Como parte de este estudio que comparó cómo influye el tipo de gonadotropinas sobre la calidad ovocitaria, se evaluó el perfil endocrino y la concentración de factores de secreción ovocitaria (GDF-9 y BMP-15) en líquido folicular con el propósito de valorar si la estructura molecular de la isoforma de la FSH y/o la presencia de actividad LH desde el inicio de la estimulación afectarían a estos factores y en consecuencia al grado de maduración ovocitaria.

De acuerdo a nuestros datos, se observó una relación directamente proporcional entre las concentraciones de FSH y las de GDF-9, obteniéndose los registros más elevados para ambas moléculas en los ciclos con FSHu, seguido de los tratamientos con

hMG y por último, con FSHr; se podría pensar que el predominio de isoformas ácidas de la FSHu que prolonga la vida media de esta gonadotropina en plasma estimularía de forma más potente la síntesis de factores ovocitarios. Por otra parte, en este estudio, los ciclos estimulados con **FSHu** presentan concentraciones más altas de progesterona en líquido folicular en relación al resto de tratamientos; se podría pensar que este incremento podría estar relacionado con los mayores niveles de GDF-9 desde diferentes puntos de vista:

- GDF-9 estimula la proliferación de las células de la granulosa, el folículo aumenta de tamaño y se potencia la síntesis de progesterona.

- la disminución en la expresión de receptores de LH/hCG como consecuencia de un aumento en las concentraciones de GDF-9, podría reducir la función de la LH endógena residual en la conversión de la progesterona en androstenediona

- GDF-9 bloquea la actividad aromatasa lo que explicaría las concentraciones altas de progesterona con unos niveles disminuidos de andrógenos y estradiol.

- el incremento en los niveles de GDF-9 asociados a la presencia de FSH urinaria estimulan la ruta  $\Delta 4$  de la síntesis de progesterona, la cual no puede ser catabolizada a andrógenos por acción de la enzima CYP17A1. En humanos, la amplia mayoría de andrógenos derivan de la ruta biosintética  $\Delta 5$  que incluye a la pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona (DHEA) (Miller 2008). Por lo tanto, la preferencia de la enzima CYP17A1 por los metabolitos  $\Delta 5$  excluye a las células de la teca de convertir a la progesterona en andrógenos, ya que ésta no puede convertirse en pregnenolona desde la ruta  $\Delta 4$ ; según estos argumentos, la progesterona sintetizada en las células de la granulosa no puede metabolizarse a andrógenos en las células de la teca considerándose a la pregnenolona el único precursor de la ruta metabólica esteroidea (Yding Andersen et al. 2011).

La ausencia de diferencias significativas en nuestro estudio tanto en las concentraciones de GDF-9 como en los niveles de FSH y de progesterona no valida estas interacciones; sin embargo, la relación señalada entre ambas moléculas unida al hecho de que la prolongada vida media de la isoforma de la FSH presente en los ciclos estimulados con FSHu es capaz de mantener durante más tiempo el efecto trófico de la gonadotropina, podría explicar los registros ligeramente elevados de progesterona observados en este tipo de tratamientos.

La regulación de la respuesta esteroideogénica desempeñada por BMP-15 es FSH-dependiente. El hallazgo de que BMP-15 producía una marcada disminución de la

síntesis de progesterona inducida por FSH, mientras no afectaba a la síntesis de estradiol, indicó que las rutas bioquímicas que conducen eventualmente a la síntesis de progesterona están inhibidas por BMP-15. La capacidad de BMP-15 para inhibir selectivamente la síntesis de progesterona sugiere cierta función de la proteína en los procesos de luteinización. El equilibrio alcanzado en las concentraciones de BMP-15 y GDF-9 explicaría la mayor concentración de progesterona en los protocolos estimulados con FSHu junto a niveles relativamente bajos de estradiol.

En referencia al análisis del perfil hormonal obtenido en nuestro estudio en los ciclos estimulados con **hMG**, se observó que la combinación FSH:LH característica de este preparado gonadotrópico se traduce en un entorno con niveles significativamente más altos de estradiol y testosterona y una disminución en los niveles de progesterona con respecto a los tratamientos con FSHu. En este punto es importante recordar que la preparación comercial utilizada en los ciclos estimulados con hMG incluye una gonadotropina no purificada, de modo que a pesar de incluir una isoforma de la FSH con una prolongada vida media, su menor grado de purificación podría explicar el hecho de que en estos tratamientos se obtuvieran concentraciones de GDF-9 ligeramente más bajas que en los tratamientos con FSHu, y por tanto menores niveles de progesterona, aunque tampoco hay que descartar la posible influencia de la actividad LH dirigida por la hCG en la secreción de factores ovocitarios y en la determinación del perfil hormonal. En cuanto a las concentraciones de testosterona y estradiol, una estimulación ovárica continuada con LH conduce a un aumento en las concentraciones de estas hormonas por varias razones:

- por una parte, la LH estimula la síntesis de androstenediona en las células de la teca interna (McNatty et al. 1984), que se convierte a testosterona y posteriormente a estradiol en las células de la granulosa por acción de la aromatasa. El estradiol es secretado a líquido folicular de modo que concentraciones elevadas de andrógenos se traducen en una mayor presencia de estradiol, hecho que coincide con nuestros resultados.

- la LH estimula la actividad aromatasa en las células de la granulosa de folículos maduros (Yong et al. 1994); niveles elevados de estradiol y testosterona potencian el efecto de la FSH sobre la actividad aromatasa, lo que eleva la producción de estrógenos y su presencia en líquido folicular.

Todos los efectos descritos para la LH apuntarían hacia una misma dirección: la presencia de LH desde el inicio de la estimulación se traduce en mayores

concentraciones de testosterona y estradiol. A pesar de la influencia de de la FSHu sobre la síntesis de factores ovocitarios y el impacto posterior que éstos podrían tener sobre las determinaciones hormonales, el hecho de administrar una gonadotropina no purificada y la presencia de actividad LH atenuaría de alguna manera estos efectos, lo que explicaría la disminución de los niveles de progesterona y el aumento significativo de la carga androgénica y estrogénica con respecto a los ciclos con FSHu.

Respecto a los ciclos estimulados con **FSHr**, los puntos de partida son la ausencia de actividad LH y la presencia de isoformas de FSH poco acídicas caracterizadas por una mayor actividad biológica (Yding Andersen 2002). Tradicionalmente, los procedimientos con FSHr se han caracterizado por niveles de progesterona significativamente elevados que, inicialmente, se habían asociado a un pico prematuro de LH pero que trabajos recientes atribuyen a la propia acción de la FSH (Filicori et al. 2002a); a pesar de estos argumentos, los datos derivados de este trabajo revelan que en estos ciclos, las concentraciones de progesterona son más bajas que en el resto de tratamientos analizados. Como se ha comentado previamente, la isoforma FSH presente en los productos recombinantes se caracteriza por ejercer un efecto biológico más intenso que, sin embargo, no se refleja en las correspondientes concentraciones hormonales. Esta circunstancia podría deberse no sólo a que la ventana de actuación de la FSHr es más limitada, sino también a que se administraron menores dosis de esta gonadotropina durante el estudio en comparación con los otros tratamientos, explicando la ausencia de diferencias significativas en lo que a niveles de progesterona se refiere.

Finalmente, y en base a los resultados obtenidos, podríamos asumir que el perfil endocrino derivado de la estimulación con distintos preparados gonadotrópicos está condicionado por la presencia o no de actividad LH durante todo el periodo de estimulación ,y por las características bioquímicas derivadas de las isoformas de la FSH presentes en cada protocolo evaluado. En este punto, es importante recordar que en todos los protocolos de estimulación se ha inducido la ovulación con hCG, por lo que podríamos descartar el posible sesgo introducido por este motivo, de modo que los perfiles endocrinos derivados de cada uno de los tratamientos en estudio se explican por la administración o no de LH desde el inicio de la estimulación.

La actividad LH dependiente de hCG parece influir positivamente sobre la foliculogénesis y la ovogénesis permitiendo la consiguiente actividad esteroideogénica desde el colesterol hasta los estrógenos. Aparentemente estos hallazgos parecen no tener mucha importancia, aunque si se toman en el contexto de una estimulación ovárica

donde la esteroidogénesis es un determinante principal de éxito o fracaso, estos resultados se vuelven significativos. Se podría plantear que la actividad LH derivada de la hCG reproduce fielmente el ambiente endocrino característico de un ciclo natural, es decir, niveles relativamente altos de estradiol, concentraciones relativamente bajas de progesterona y una esteroidogénesis potente; sin embargo, todas estas circunstancias no se vieron reflejadas en nuestro estudio en un mayor porcentaje de ovocitos metafase II en relación al resto de tratamientos.

***Análisis de la tasa de apoptosis en células de la granulosa en función del tipo de gonadotropina.***

El desarrollo del folículo ovárico es un proceso regulado por factores autocrinos, paracrinos y endocrinos que actúan coordinadamente para seleccionar los folículos que van a ovular. La amplia mayoría de folículos (más del 99% del total) no alcanzan el estadio pre-ovulatorio, sino que sufren un proceso degenerativo denominado atresia (Billig et al. 1996, Kaipia and Hsueh 1997, Markstrom et al. 2002). Después de que se describieran los mecanismos endocrinos que regulan la activación del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico, las células de la granulosa se convirtieron en el centro de interés de numerosos estudios que examinaban los mecanismos de crecimiento y atresia folicular. A partir de experimentos *in vivo/in vitro* se estableció que los factores secretados por las células de la granulosa, incluyendo esteroides sexuales, citokinas y factores de crecimiento eran esenciales para su propia supervivencia y para el eventual crecimiento folicular. Además, también se determinó que las células de la granulosa eran las primeras poblaciones celulares que sufrían apoptosis en los folículos atrésicos, antes que los ovocitos y las células de la teca, sugiriendo su papel como iniciadores de la atresia folicular.

La apoptosis se asocia con la atresia folicular en ciclos naturales y estimulados; se trata de un proceso fisiológico y activo de muerte celular que implementa una disposición eficaz de las células en los tejidos (Kerr et al. 1972). La apoptosis se caracteriza por un conjunto uniforme de cambios morfológicos que finaliza con la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos que contienen citoplasma, cromatina condensada y orgánulos, y que son engullidos y digeridos bien por las células vecinas bien por macrófagos, y que posteriormente son eliminados del tejido correspondiente sin causar respuesta inflamatoria. La apoptosis es diferente de la necrosis o muerte

celular accidental, la cual se caracteriza por la autólisis nuclear y desintegración celular; la necrosis deriva de una agresión intensa que causa pérdida de la integridad de membrana y disrupción celular. Durante la necrosis, el DNA celular se degrada inespecíficamente y el contenido celular se extiende por el tejido circundante, generando una reacción inflamatoria (Majno and Joris 1995).

La atresia folicular es un proceso regulado hormonalmente con una respuesta diferencial por parte de los folículos que depende del estadio de desarrollo en el que se encuentren. Los principales factores fisiológicos que regulan la supervivencia celular son las gonadotropinas; la eliminación de las gonadotropinas séricas como consecuencia de una hipofisectomía conduce a una apoptosis masiva de las células de la granulosa en los folículos en desarrollo resultando en la atresia del propio folículo, mientras que el tratamiento con gonadotropinas de los folículos antrales tempranos y pre-ovulatorios previene la atresia folicular espontánea en cultivo (Chun et al. 1994). Como se ha comentado previamente, las células de la granulosa son especialmente sensibles a los procesos apoptóticos, de modo que la mayoría de folículos seleccionados durante la vida reproductiva de una mujer se descartan por atresia no siendo capaces de evolucionar hasta la etapa de folículo dominante. Las células somáticas de los folículos que logran ovular se sostienen por rutas metabólicas específicas que garantizan la supervivencia; estas rutas son activadas por las gonadotropinas y factores de crecimiento que previenen el resultado apoptótico (Quirk et al. 2004).

Uno de los objetivos planteados en este estudio, es verificar la eficacia de distintos tipos de gonadotropinas a lo largo de un ciclo controlado de estimulación ovárica mediante la identificación de marcadores no morfológicos de calidad ovocitaria; en este caso en particular, se analiza el impacto de diferentes preparados gonadotrópicos en relación al porcentaje de apoptosis/necrosis en células de la granulosa.

Los resultados de este trabajo indicaron la presencia de diferencias significativas en cuanto al porcentaje de apoptosis registrado en células de la granulosa sometidas a distintos protocolos de estimulación; en ciclos estimulados con hMG, y por tanto con una administración continuada de LH desde el inicio del tratamiento, el porcentaje de actividad apoptótica, tanto precoz como tardía, es significativamente mayor en comparación con los ciclos estimulados con FSHu o FSHr. Por el contrario, el análisis de la influencia del tipo de gonadotropinas sobre la proporción de células necróticas no revela diferencias significativas entre ninguno de los tres preparados evaluados, lo que sugiere la ausencia de efecto citotóxico de la farmacología empleada.

El uso de un determinado tipo de gonadotropina condiciona los niveles de FSH registrados el día de la punción folicular. En este caso, se observó que los ciclos estimulados con FSHu, y que registran las mayores concentraciones de FSH en líquido folicular, presentaban menor porcentaje de células apoptóticas cuando se analizó la presencia de anexina V (apoptosis precoz) y cuando se determinaron los niveles de fragmentación del DNA (apoptosis tardía). Estos resultados coinciden con otros trabajos (Billig et al. 1996, Chun et al. 1994, Chun et al. 1996, Hussein et al. 2005) que han demostrado que el tratamiento con gonadotropinas suprime la apoptosis tanto en folículos antrales tempranos como en folículos pre-ovulatorios, confirmando la función de la FSH como factor de supervivencia.

El grado de apoptosis en las células de la granulosa de folículos pre-ovulatorios podría estar inversamente relacionado con la calidad embrionaria. El mayor porcentaje de apoptosis observado en nuestro estudio en los ciclos estimulados con hMG no coincide con los resultados obtenidos en trabajos previos (Ruvolo et al. 2007) que sugieren una menor tasa de apoptosis en presencia de actividad LH. En el artículo de Ruvolo se aplicó un protocolo con FSHr y posteriormente LHr a partir del día 8 de estimulación, mientras que en nuestro estudio la LH está presente desde el inicio de la estimulación por lo que los resultados no son comparables. Es más, el hecho de que la LH sea responsable de la síntesis de andrógenos en el metabolismo esteroideo explicaría por qué los tratamientos con hMG, y con niveles significativamente más elevados de testosterona, se vean más afectados por procesos apoptóticos ya que se ha determinado que un aumento de la carga androgénica eleva la actividad apoptótica (Billig et al. 1993). Tampoco hay que descartar la presencia de impurezas adicionales en el preparado comercial de la hMG al tratarse de una gonadotropina no purificada; se han publicado estudios (Bassett et al. 2009, Bassett and Dribergen 2005) que muestran que la mayoría de gonadotropinas de origen urinario contienen contaminantes proteicos adicionales que varían tanto en identidad como en cantidad entre lotes. Teniendo en cuenta estos argumentos, podríamos pensar que la variabilidad en las proteínas no-gonadotrópicas es capaz de ejercer un efecto más acusado sobre la actividad apoptótica, hecho que nos conduciría a las diferencias registradas entre los distintos tipos de gonadotropinas y que se hacen especialmente evidentes en el caso de la hMG con respecto a los otros tratamientos examinados.

Otra línea de análisis estaría basada en el carácter anti-apoptótico de GDF-9 y en su función como inhibidor de la apoptosis en células de la granulosa (Orisaka et al.

2006). Los resultados de nuestro estudio coinciden con los de publicaciones anteriores al observarse que los tratamientos con mayores concentraciones de GDF-9 son los menos afectados por la apoptosis folicular; según los resultados descritos previamente, concentraciones elevadas de FSH suponen un aumento en la expresión de GDF-9 ovocitario y en consecuencia un descenso de la actividad apoptótica y de la atresia folicular. GDF-9 media este efecto de supervivencia a través de la activación de la ruta PI3K/Akt. Las gonadotropinas y determinados factores de crecimiento activan esta ruta que previene la apoptosis en células de la granulosa y folículos en cultivo; PI3K cataliza la síntesis de IP3 que activa a otras kinasas, incluyendo Akt, que a su vez fosforila a moléculas pro-apoptóticas las cuales ven suprimidas sus funciones. En el ovario, las gonadotropinas aumentan el contenido en Akt fosforilado (p-Akt) en las células de la granulosa inhibiendo la apoptosis tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que la eliminación del aporte gonadotrópico disminuye la fosforilación de este ligando e induce apoptosis (Blume-Jensen and Hunter 2001).

En lo que respecta al papel de los esteroides sexuales, éstos actúan como importantes reguladores intra-ováricos de la atresia folicular. Los análisis *in situ* de fragmentación del DNA han demostrado que la apoptosis inducida por falta de estrógenos está confinada a las células de la granulosa (Billig et al. 1993), mientras que el aumento de la carga androgénica, se relaciona con un incremento de la actividad apoptótica. En conjunto, se demuestra que los esteroides sexuales desempeñan un papel importante en la regulación de la apoptosis folicular con los estrógenos previniendo la apoptosis, y los andrógenos antagonizando los efectos de los estrógenos.

De acuerdo a esta información, los resultados obtenidos con la hMG resultan controvertidos, puesto que a pesar de contar con las mayores concentraciones de estradiol, los datos derivados de la citometría de flujo indican que se trata de los tratamientos más afectados por la apoptosis. Esta situación puede explicarse por la presencia de LH, que desempeña un papel marginal en la regulación de la apoptosis folicular, pero que influye significativamente en el perfil endocrino del folículo al estimular la síntesis de andrógenos en las células de la teca. En los ciclos estimulados con hMG la concentración periférica de testosterona es significativamente mayor, de modo que aunque también se registren variaciones significativas en las concentraciones de estradiol, las diferencias relevantes obtenidas en estos ciclos en relación a la actividad apoptótica se explicarían por una dominancia de los andrógenos sobre los estrógenos, con el consiguiente aumento de la atresia folicular.

Aunque se han llevado a cabo numerosas investigaciones centradas en el efecto de varios factores de crecimiento sobre la supervivencia de las células de la granulosa, la función de la progesterona como modulador potencial de la apoptosis en células de la granulosa ha recibido poca atención. El concepto de que la progesterona puede actuar como factor autocrino/paracrino intraovárico se propuso hace más de 30 años (Schreiber and Hsueh 1979) y desde entonces, numerosas publicaciones han demostrado el efecto de la progesterona como factor de supervivencia en el periodo peri-ovulatorio y en las células lúteas, ya que se ha descrito que el tratamiento de células de la granulosa luteínicas con antagonistas frente a este receptor suponen un aumento en la fragmentación internucleosomal del DNA y en la actividad de las caspasas (Svensson et al. 2000).

Un hecho fundamental del desarrollo folicular es la expresión de receptores para FSH por parte de los folículos antrales los cuales se vuelven dependientes de esta gonadotropina para su supervivencia. El folículo que sobrevive comienza a expresar receptores para LH, requisito indispensable para la ovulación; junto al pico ovulatorio de LH, se observa una sobre-expresión transitoria de receptores de progesterona en las células de la granulosa, cuya estimulación está implicada en la regulación de la supervivencia de las células de la granulosa luteínicas (Rolaki et al. 2005). En línea con lo expuesto anteriormente, los tratamientos con FSHu caracterizados por niveles de progesterona y FSH más elevados, aunque no significativos, explicarían que estos ciclos se vieran menos afectados por los procesos de atresia folicular. En resumen, podríamos pensar que o bien la administración de una gonadotropina no purificada, o bien la presencia de LH desde el inicio de la estimulación, podrían actuar como factores probables de los porcentajes significativamente elevados de atresia folicular observada en los tratamientos con hMG. Por último, la ausencia de diferencias significativas en cuanto a la proporción de células necróticas es sugestiva de que los preparados gonadotrópicos empleados en los protocolos de estimulación ovárica controlada carecen de efecto citotóxico significativo.

#### ***Análisis de los patrones de expresión génica en células del cúmulo en función del tipo de gonadotropina.***

Desde hace relativamente poco tiempo, las estrategias de evaluación global que incluyen genéricamente a las “-ómicas” han comenzado a aplicarse con éxito en el campo de la medicina reproductiva. Estas nuevas tecnologías aportan herramientas

capaces de evaluar directamente y de manera no-invasiva la competencia reproductiva de un embrión considerado individualmente. Específicamente, la transcriptómica permite la monitorización de los cambios en la expresión génica para la identificación de genes o grupos de genes funcionalmente relacionados con un fenotipo celular o tisular. Con el desarrollo de la tecnología de microarrays, el interés se ha centrado en el análisis de la expresión génica en ovocitos humanos (Assou et al. 2006), células del cúmulo (Assou et al. 2010), desarrollo embrionario temprano (Zhang et al. 2009) y endometrio (Haouzi et al. 2009) para aumentar los conocimientos en relación a eventos pobremente definidos que ocurren durante la ovogénesis, embriogénesis e implantación; además, el análisis de la maduración ovocitaria con esta técnica ayuda a la identificación de genes implicados en el proceso de maduración citoplásmica y nuclear y de puntos de control que regulan la adquisición de la competencia ovocitaria (Gasca et al. 2007). El análisis transcriptómico en el contexto de gametos puede servir a diferentes propósitos; puede usarse para determinar el fenotipo de una célula con el objetivo de comprender un fenómeno fisiológico, con propósitos diagnósticos donde el fin es determinar el mejor ovocito, que posteriormente derive en el mejor embrión para transferir y/o para evaluar la respuesta a la estimulación hormonal. Puesto que no tenemos una imagen claramente definida de la fisiología normal de un folículo no estimulado, todavía estamos lejos de comprender la de un folículo estimulado; los análisis transcriptómicos ayudan a describir las diferencias observadas y eventualmente aportan respuestas sobre las causas de estas variaciones.

Aunque en las últimas décadas se ha desarrollado una importante labor investigadora, el espectro completo de los genes modulados por LH y FSH todavía no se ha descrito. Hay que tener en cuenta que el ovario está compuesto de varios tejidos y tipos celulares que no necesariamente contienen el mismo repertorio de expresión génica (Amsterdam et al. 1989), hecho que a su vez influye en los cambios modulados por gonadotropinas durante estadios específicos de la diferenciación de las células foliculares. Existen numerosos estudios que comparan la eficacia clínica de los distintos preparados gonadotrópicos (Al-Inany et al. 2008, Coomarasamy et al. 2008, Van Wely et al. 2008) aunque los resultados son ambiguos y difíciles de interpretar debido a la gran cantidad de variables de confusión; Sin embargo, hay muy pocos trabajos que hayan investigado el impacto de gonadotropinas específicas sobre la fisiología de las células foliculares. Comprender las diferencias en la expresión génica de las células del

cúmulo podría tener amplias indicaciones en la maduración ovocitaria y en el desarrollo embrionario temprano y por tanto, en los resultados clínicos.

### ***-FSHu vs hMG***

Cuando analizamos las diferencias en los patrones de expresión génica entre FSH urinaria y hMG observamos el mayor número de genes con expresión diferencial, en proporción con las representaciones gráficas obtenidas en los análisis de “clustering” y de PCA. Estos datos pueden resultar sorprendentes ya que ambas gonadotropinas comparten la misma isoforma de FSH, por lo que las diferencias pueden deberse bien a la actividad LH en forma de hCG, bien a las impurezas adicionales presentes en las gonadotropinas de origen urinario. A la vista de los resultados obtenidos, podríamos descartar la influencia de la LH ya que las diferencias registradas entre la FSH recombinante y la hMG, con más contrastes estructurales, son menos acusadas. Por lo tanto, es posible asumir que la variabilidad en las proteínas no-gonadotrópicas y otros productos urinarios ejerce un efecto más destacado en los patrones de expresión génica.

Se han publicado estudios (Bassett et al. 2009, Bassett and Drievergen 2005) que muestran que la mayoría de gonadotropinas de origen urinario contienen contaminantes proteicos adicionales que varían tanto en identidad como en cantidad entre lotes; por ejemplo, se ha demostrado que la FSH urinaria y la hMG tienen contaminantes muy distintos; aunque ambos productos contienen proteína C inhibidora, alfa 2-antiplasmina e IGFBP7. La hMG contiene además albúmina sérica humana, antitrombina III y alfa 1-antitripsina no presentes en la FSH urinaria (Bassett et al. 2009). La relevancia biológica de estas impurezas proteicas se desconoce, aunque ciertos estudios con modelos animales han revelado que las gonadotropinas urinarias ejercen efectos perjudiciales sobre la expresión génica en el periodo peri-implantatorio (Sibug et al. 2007).

La principal barrera para mejorar la calidad de las gonadotropinas urinarias se localiza en el control del material de partida. Además de las diferencias introducidas en los patrones de expresión génica por la presencia de contaminantes adicionales, otro factor a tener en cuenta podría estar relacionado con las diferencias en el propio componente de la FSHu; como hemos comentado anteriormente, la FSHu incluida en los ciclos estimulados con hMG no está purificada. Así, otro punto de variación de la expresión génica podría explicarse en función de las diferencias introducidas por la propia gonadotropina a pesar de que ambos preparados comparten la misma isoforma de

FSH. Esta combinación de factores de variabilidad conduce a las diferencias registradas entre gonadotropinas y que se hacen especialmente evidentes entre la hMG y la FSHu.

En cuanto al análisis detallado de los patrones génicos, podríamos destacar las variaciones observadas en la expresión de enzimas implicadas en rutas biosintéticas, donde se registran diferencias significativas a favor de la FSHu en enzimas como HMGCR, MVD, DHCR7, HSD3B1 y la aromataasa poniendo de manifiesto las diferencias introducidas por la combinación de la actividad LH con las diferencias en el contenido de contaminantes proteicos. El resultado es la consiguiente disminución, aunque no significativa, en la concentración de progesterona en los ciclos estimulados con hMG con respecto a la FSHu. Además, estas notables diferencias en los patrones de expresión génica se correlacionan con los datos obtenidos en los análisis de enriquecimiento funcional, con una amplia variedad de procesos biológicos significativamente afectados, entre los que destacan aquéllos relacionados con rutas biosintéticas y metabólicas asociadas a las hormonas esteroideas.

En resumen, las diferencias estructurales y en los procesos de purificación y síntesis tanto de la FSH urinaria como de la hMG explicarían las diferencias existentes en los perfiles de expresión génica que determinan el equilibrio hormonal final.

#### ***-FSHu vs FSHr***

En lo que respecta a las diferencias en los perfiles de expresión génica entre FSHr y FSHu, que comparten la ausencia de actividad LH y que varían en la isoforma FSH, son los tratamientos que más se parecen entre sí desde el punto de vista génico, lo que se demuestra por la ausencia de los genes implicados en rutas de síntesis de colesterol y hormonas esteroideas. Además, este hecho también podría explicar la similitud en los perfiles hormonales derivados de cada uno de los protocolos evaluados en lo que a concentraciones de progesterona, testosterona y estradiol se refiere.

Los análisis de enriquecimiento funcional confirman las explicaciones anteriores al no encontrarse diferencias significativas en los procesos biológicos relacionados con la síntesis y metabolismo de lípidos, esteroides y hormonas esteroideas, viéndose únicamente afectados componentes celulares relacionados con la actividad secretora de la célula, y que favorecen a los ciclos estimulados con FSHu.

### ***-FSHr vs hMG***

Como ya hemos comentado anteriormente, las preparaciones gonadotrópicas que difieren en su contenido en LH están asociadas a diferentes perfiles endocrinos y paracrin. La administración de FSHr o de hMG modifica de forma significativa la expresión de 75 genes en células del cúmulo peri-ovulatorias. Recordar que la principal diferencia entre ambos tipos de gonadotropinas reside en la ausencia o presencia de actividad LH, aunque también hay que tener en cuenta las diferencias en la isoforma de FSH, con una actividad FSH específica que puede contribuir a las diferencias observadas en el perfil génico.

A pesar de las profundas diferencias estructurales entre ambas moléculas y en el perfil endocrino derivado de cada una de ellas, resulta interesante destacar la ausencia de diferencias significativas en los niveles de expresión génica de enzimas que participan en la modulación del entorno hormonal y metabólico del ovocito.

En consonancia con estos resultados, se observó que la mayoría de genes DE estaban relacionados con procesos de regulación del desarrollo (MT3, IL27, ANGPTL4 o CD83) y con componentes celulares implicados en el transporte de moléculas extracelulares como así lo demuestra la amplia variedad de receptores con diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (CXCR7, CXCL1, OXTR, GRB14). Estos resultados demuestran que la estimulación con gonadotropinas afecta a múltiples aspectos de las rutas de señalización de las células de la granulosa, aunque todavía están por definir si estas diferencias afectan a la función ovocitaria.

### ***-Patrones de expresión de genes implicados en procesos apoptóticos.***

La modulación de los genes implicados en apoptosis también se ve afectada por el tipo de gonadotropina empleado durante la estimulación ovárica.

Por ejemplo, en este trabajo se observan diferencias significativas en la expresión de NR4A3, gen implicado en la supervivencia folicular, a favor de los tratamientos con FSHu y FSHr con respecto a los procedimientos con hMG, hecho que se correlaciona con unos mayores registros de actividad apoptótica.

Otro gen diferencialmente expresado es GAL, que codifica para galanina y que está implicado en procesos de supervivencia y regeneración, ya que se ha descrito que la exposición a valores elevados de la proteína inhibe la apoptosis (Tofighi et al. 2008); nuestros datos muestran que la expresión de GAL es significativamente menor en los

protocolos con hMG, lo que explicaría por qué las tasas de apoptosis son significativamente mayores en estos ciclos.

Otros marcadores apoptóticos evaluados son SDC2, TNFSF11 y TNFSF4, que al igual que en los casos mencionados anteriormente, aparecen más expresados en los tratamientos con hMG.

En conjunto, estos resultados confirman la influencia del tipo de gonadotropina sobre los patrones de expresión de genes implicados en procesos de muerte celular, ya que la presencia de variaciones significativas en determinados genes está correlacionada con los resultados obtenidos de la evaluación de la tasa de apoptosis en células de la granulosa en función del protocolo de estimulación. Sin embargo, a pesar de las ventajas derivadas del patrón de expresión génica obtenido en los ciclos estimulados con FSHu y FSHr, no se obtuvieron diferencias significativas a favor de estos tratamientos en cuanto a porcentaje de ovocitos maduros. Por tanto, a pesar del efecto diferencial del protocolo de estimulación sobre la expresión génica, no es posible describir una clara correlación entre el análisis transcriptómico y una mejora sustancial de la calidad ovocitaria, de modo que en pacientes jóvenes con buen pronóstico parece que se podría aplicar cualquier tipo de gonadotropina sin comprometer los resultados del tratamiento.

Nuestros resultados muestran que ninguno de los genes identificados previamente como posibles marcadores de calidad ovocitaria (Cillo et al. 2007, Feuerstein et al. 2007, Gasca et al. 2007, Ouandaogo et al. 2011) presenta diferencias significativas en los distintos análisis comparativos. Esta circunstancia podría deberse a que no se expresan diferencialmente, que sus niveles de expresión se encuentran por debajo del umbral de detección de la plataforma de microarrays o a la presencia de variaciones experimentales en el procesamiento de la muestra. En cualquier caso, podríamos considerar que los genes descritos en este trabajo también pueden considerarse como marcadores de la calidad ovocitaria ya que participan en rutas metabólicas y procesos biológicos que definen las condiciones óptimas de maduración ovocitaria.; sin embargo, dada la complejidad de las interacciones observadas y del limitado conocimiento acerca de la función de los genes expresados en células del cúmulo, es difícil explicar la totalidad de las correlaciones biológicas.

En resumen, se demuestra que el tipo de gonadotropina empleado durante un protocolo de estimulación ovárica afecta a los patrones de expresión génica en células

del cúmulo, confirmando los resultados obtenidos en cuanto a diferencias en el perfil endocrino y en tasas de apoptosis.

# **CONCLUSIONES**

Los resultados de los diferentes trabajos recogidos en esta memoria han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1.- No existen diferencias significativas en los niveles de GDF-9 y BMP-15 entre los tres tratamientos de estudio.

2.- El tipo de gonadotropina determina el posterior perfil hormonal, registrándose diferencias significativas en las concentraciones de estradiol y testosterona en los ciclos estimulados con hMG.

3.- El tipo de gonadotropina afecta notablemente a la tasa apoptótica en las células de la granulosa aunque se descarta un efecto citotóxico de los fármacos empleados al no registrarse diferencias significativas en los porcentajes de necrosis.

4.- La gonadotropina administrada durante un protocolo de estimulación afecta significativamente a los patrones de expresión génica en las células del cúmulo.

5.- No se observó ninguna correlación entre los tres parámetros usados como marcadores de calidad ovocitaria (factores de secreción ovocitaria y perfil endocrino, tasas de apoptosis y necrosis y patrones de expresión génica) y los criterios de madurez ovocitaria basados en la proporción de ovocitos en metafase II.

6.- Resulta evidente la necesidad de buscar nuevos parámetros no-invasivos de evaluación de la calidad ovocitaria. Una mayor comprensión de estas herramientas nos ayudará a definir parámetros cuantitativos y objetivos con el propósito de establecer una evaluación cualitativa del gameto femenino más fiable y precisa.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ and Liu K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 2010;19:397-410.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E and Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001;121:647-653.

Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar MA, Mansour RT and Serour GI. Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:372-378.

Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar MA, Mansour RT and Serour GI. Efficacy and safety of human menopausal gonadotrophins versus recombinant FSH: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2008;16:81-88.

Amsterdam A, Rotmensch S and Ben-Ze'ev A. Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: the granulosa cell model. *Trends Biochem Sci* 1989;14:377-382.

Aschheim,S.&Zondek,B. Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon in Harn von Schwangeren. *Klin Wschr* 1927;6:1322.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000;25:25-29.

Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrour T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J and Hamamah S. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 2006;21:1705-1719.

Assou S, Haouzi D, De Vos J and Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod* 2010;16:531-538.

Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, Reme T, Dechaud H, De Vos J and Hamamah S. A non-invasive test for assessing embryo

potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 2008;14:711-719.

Baer G and Loumaye E. Comparison of recombinant human luteinising hormone (r-hLH) and human menopausal gonadotropin (hMG) in assisted reproductive technology. *Curr Med Res Opin* 2003;19:83-88.

Bassett R, Lispi M, Ceccarelli D, Grimaldi L, Mancinelli M, Martelli F and Van Dorsselaer A. Analytical identification of additional impurities in urinary-derived gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* 2009;19:300-313.

Bassett RM and Dribergen R. Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reprod Biomed Online* 2005;10:169-177.

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K and Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996;2:103-117.

Billig H, Furuta I and Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993;133:2204-2212.

Blume-Jensen P and Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-365.

Bosco L, Ruvolo G, Morici G, Manno M, Cittadini E and Roccheri MC. Apoptosis in human unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2005;84:1417-1423.

Bromer JG and Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:234-241.

Casarini L, Lispi M, Longobardi S, Milosa F, La Marca A, Tagliasacchi D, Pignatti E and Simoni M. LH and hCG action on the same receptor results in quantitatively and qualitatively different intracellular signalling. *PLoS One* 2012;7:e46682.

Casper RF. Are recombinant gonadotrophins safer, purer and more effective than urinary gonadotrophins?. *Reprod Biomed Online* 2005;11:539-540.

Chen L, Russell PT and Larsen WJ. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 1993;34:87-93.

Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiri A and Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994;135:1845-1853.

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E and Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996;137:1447-1456.

Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G and Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 2007;134:645-650.

Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D, van der Veen F, Bossuyt PM and van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23:310-315.

Devroey P, Boostanfar R, Koper NP, Mannaerts BM, Ijzerman-Boon PC, Fauser BC and ENGAGE Investigators. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod* 2009;24:3063-3072.

Diaz FJ, O'Brien MJ, Wigglesworth K and Eppig JJ. The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev Biol* 2006;299:91-104.

Diaz FJ, Wigglesworth K and Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* 2007;120:1330-1340.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N and Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531-535.

Donini P, Puzzuoli D and D Alessio I. Purification of Gonadotrophin from Menopausal Urine by Gel Filtration on Sephadex. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1964;45:329-334.

el-Fouly MA, Cook B, Nekola M and Nalbandov AV. Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 1970;87:286-293.

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM and Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999;13:1035-1048.

Elvin JA, Yan C and Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10288-10293.

Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001;122:829-838.

Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S and Wigglesworth K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 1997;12:127-132.

Feinberg EC, Bromer JG and Catherino WH. The evolution of in vitro fertilization: integration of pharmacology, technology, and clinical care. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:935-942.

Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R and Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 2007;22:3069-3077.

Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Tabarelli C, Spettoli D, Taraborrelli S and Ciampaglia W. Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotrophin administration. *Hum Reprod* 2002a;17:2009-2015.

Filicori M, Cognigni GE, Samara A, Melappioni S, Perri T, Cantelli B, Parmegiani L, Pelusi G and DeAloysio D. The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction. *Hum Reprod Update* 2002b;8:543-557.

Filicori M, Cognigni GE, Tabarelli C, Pocognoli P, Taraborrelli S, Spettoli D and Ciampaglia W. Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002c:87:1156-1161.

Fleming R. Progesterone elevation on the day of hCG: methodological issues. *Hum Reprod Update* 2008:14:391-392.

Fleming R and Jenkins J. The source and implications of progesterone rise during the follicular phase of assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online* 2010:21:446-449.

Fortune JE and Eppig JJ. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. *Endocrinology* 1979:105:760-768.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW *et al.* Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000:25:279-283.

Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecol Endocrinol* 2002:16:505-521.

Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, Anahory T, Dechaud H, De Vos J and Hamamah S. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online* 2007:14:175-183.

Gasca S, Reyftmann L, Pellestor F, Reme T, Assou S, Anahory T, Dechaud H, Klein B, De Vos J and Hamamah S. Total fertilization failure and molecular abnormalities in metaphase II oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008:17:772-781.

Gebhardt KM. Identification of molecular markers of pregnancy success for assisted reproduction 2010:.

Gemzell CA, Diczfalusy E and Tillinger G. Clinical effect of human pituitary follicle-stimulating hormone (FSH). *J Clin Endocrinol Metab* 1958:18:1333-1348.

Giampietro F, Sancilio S, Tiboni GM, Rana RA and Di Pietro R. Levels of apoptosis in human granulosa cells seem to be comparable after therapy with a gonadotropin-releasing hormone agonist or antagonist. *Fertil Steril* 2006;85:412-419.

Gilchrist RB, Lane M and Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update* 2008;14:159-177.

Giudice E, Crisci C, Eshkol A and Papoian R. Composition of commercial gonadotrophin preparations extracted from human post-menopausal urine: characterization of non-gonadotrophin proteins. *Hum Reprod* 1994;9:2291-2299.

Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A and Sirard MA. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008;23:1118-1127.

Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Reme T, Dewailly D and Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009;24:198-205.

Harris SE & Picton HM. Metabolism of follicles and oocytes during growth and maturation. In SL Tan, RC Chian & WM Buckett (ed) *In-Vitro Maturation of Human Oocytes – Basic Science to Clinical Application*. 2007. Oxon, UK, pp. 15-36.

Hassun Filho PA, Ribeiro MA, da Rocha AM, Allegreti JR, Serafini PC and da Motta EL. Effect of GnRH down-regulation on cumulus cell viability and apoptosis as measured by fluorescence-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet* 2008;25:467-471.

Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, Levkov L, Ek I, Suikkari AM, Hovatta O and Fridstrom M. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Hum Reprod* 2003;18:2131-2136.

Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG and Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J Cell Sci* 2005;118:5257-5268.

Hussein TS, Thompson JG and Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 2006;296:514-521.

Hyttel P, Callesen H and Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil* 1986;76:645-656.

Juengel JL and McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005;11:143-160.

Kaipia A and Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997;59:349-363.

Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:21.

Kaneko T, Saito H, Takahashi T, Ohta N, Saito T and Hiroi M. Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:580-585.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

Knight PG and Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006;132:191-206.

Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004;82 E-Suppl:E14-23.

Kumar TR, Wang Y, Lu N and Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997;15:201-204.

Lam X, Gieseke C, Knoll M and Talbot P. Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol Reprod* 2000;62:579-588.

Lindeberg M, Carlstrom K, Ritvos O and Hovatta O. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod* 2007;22:401-406.

Lucidi P, Bernabo N, Turriani M, Barboni B and Mattioli M. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:45.

Lunenfeld B, Van Steirteghem A and Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update* 2004;10:317-326.

Macklon NS and Fauser BC. Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. *Arch Med Res* 2001;32:595-600.

Majno G and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.

Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B and Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002;123:23-30.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM and Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 2002;296:2178-2180.

McDonald E. A global perspective on infertility: an under recognized public health issue. *Carolina Papers* 2004:18.

McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P and Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;19:2869-2874.

McNatty KP, Heath DA, Lun S, Fannin JM, McDiarmid JM and Henderson KM. Steroidogenesis by bovine theca interna in an in vitro perifusion system. *Biol Reprod* 1984;30:159-170.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 2005a:129:473-480.

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP *et al.* Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction* 2005b:129:481-487.

Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005:130:791-799.

Miller WL. Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev* 2008:13:1-18.

Miller WL and Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011:32:81-151.

Moor RM and Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1977:49:101-109.

Moore RK, Otsuka F and Shimasaki S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 2003:278:304-310.

Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T and Hiroi M. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 1997:68:312-317.

Oktay K, Briggs D and Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997:82:3748-3751.

Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F and Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol* 2006:20:2456-2468.

Otsuka F, McTavish KJ and Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 2011:78:9-21.

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF and Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000:275:39523-39528.

Ouandaogo ZG, Haouzi D, Assou S, Dechaud H, Kadoch IJ, De Vos J and Hamamah S. Human cumulus cells molecular signature in relation to oocyte nuclear maturity stage. *PLoS One* 2011:6:e27179.

Palumbo A and Yeh J. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol Reprod* 1994:51:888-895.

Platteau P, Nyboe Andersen A, Loft A, Smits J, Danglas P and Devroey P. Highly purified HMG versus recombinant FSH for ovarian stimulation in IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 2008:17:190-198.

Porchet HC, le Cotonnec JY and Loumaye E. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone. III. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling after repeated subcutaneous administration. *Fertil Steril* 1994:61:687-695.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives. *Fertil Steril* 2008:90:S13-20.

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL and Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 2004:82 E-Suppl:E40-52.

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL *et al.* Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008:319:611-613.

Richards JS. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 2001:15:209-218.

Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D and Makrigiannakis A. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2005;11:93-103.

Ruvolo G, Bosco L, Pane A, Morici G, Cittadini E and Roccheri MC. Lower apoptosis rate in human cumulus cells after administration of recombinant luteinizing hormone to women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization procedures. *Fertil Steril* 2007;87:542-546.

Schoenfelder M and Einspanier R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod* 2003;69:269-277.

Schreiber JR and Hsueh JW. Progesterone "receptor" in rat ovary. *Endocrinology* 1979;105:915-919.

Sibug RM, Datson N, Tijssen AM, Morsink M, de Koning J, de Kloet ER and Helmerhorst FM. Effects of urinary and recombinant gonadotrophins on gene expression profiles during the murine peri-implantation period. *Hum Reprod* 2007;22:75-82.

Sirard MA, Desrosier S and Assidi M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology* 2007;68 Suppl 1:S71-6.

Sirard MA, Richard F, Blondin P and Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006;65:126-136.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005;11:461-471.

Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM and Eppig JJ. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 2008;135:111-121.

Suh CS, Jee BC, Choi YM, Kim JG, Lee JY, Moon SY and Kim SH. Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:209-214.

Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL and Zeleznik AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:228-232.

Svensson EC, Markstrom E, Andersson M and Billig H. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 2000;63:1457-1464.

Thomas FH and Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4:19.

Tofighi R, Joseph B, Xia S, Xu ZQ, Hamberger B, Hokfelt T and Ceccatelli S. Galanin decreases proliferation of PC12 cells and induces apoptosis via its subtype 2 receptor (GalR2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2717-2722.

van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL and Ayoubi TA. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod* 2008;14:157-168.

van Santbrink EJ, Hop WC, van Dessel TJ, de Jong FH and Fauser BC. Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1995;64:37-43.

Van Wely M, Wetergaard LG, Bossuyt PMM and Van der Veen F. Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles (Review). *The Cochrane Library* 2008:.

Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann N Y Acad Sci* 1988;541:259-274.

Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM and Strauss JF,3rd. Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2849-2856.

Yding Andersen C. Effect of FSH and its different isoforms on maturation of oocytes from pre-ovulatory follicles. *Reprod Biomed Online* 2002;5:232-239.

Yding Andersen C, Bungum L, Nyboe Andersen A and Humaidan P. Preovulatory progesterone concentration associates significantly to follicle number and LH concentration but not to pregnancy rate. *Reprod Biomed Online* 2011;23:187-195.

Yong EL, Hillier SG, Turner M, Baird DT, Ng SC, Bongso A and Ratnam SS. Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage (P450scc) and aromatase (P450arom) enzyme mRNA expression by gonadotrophins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J Mol Endocrinol* 1994;12:239-249.

Zhang P, Zucchelli M, Bruce S, Hambiliki F, Stavreus-Evers A, Levkov L, Skottman H, Kerkela E, Kere J and Hovatta O. Transcriptome profiling of human pre-implantation development. *PLoS One* 2009;4:e7844.