

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



**Valoración del intervalo de tiempo óptimo entre la
administración del acetato de triptorelina y la
punción folicular en los tratamientos de FIV**

TRABAJO FINAL DE GRADO
Curso Académico: 2017/2018

Autor: **María de los Desamparados Ruiz Carrión**
Tutor académico: **Prof. Dña. M^a Inmaculada Molina Botella**
Cotutores externos: **Dña. Sonia Herraiz Raya**
Cotutor externo colaborador: **Dña. M^a José Soriano Ortega**

Valencia, Julio 2018



TÍTULO

Valoración del intervalo de tiempo óptimo entre la administración del acetato de triptorelina y la punción folicular en los tratamientos de FIV

RESUMEN

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) son cada vez más empleadas en el tratamiento de la infertilidad, destacando la técnica de fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La realización de una FIV/ICSI implica la estimulación farmacológica del ovario de forma supra-fisiológica con gonadotropinas para la obtención de múltiples folículos. Una vez alcanzado el desarrollo multifolicular, se desencadena la maduración final del ovocito. Posteriormente, se realiza la punción folicular. Hoy en día, existen diferentes fármacos con este fin. Entre ellos destaca la gonadotropina coriónica humana (hCG). Como alternativa, existen los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa), capaces de provocar un ascenso hormonal similar al pico espontáneo de LH que se produce en la mitad de un ciclo natural para lograr la ovulación. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha sobre la dinámica hormonal apoyan que es lógico pensar que los tiempos necesarios para lograr la maduración ovocitaria podría ser distinto. El presente estudio aleatorizado, controlado y prospectivo pretende evaluar el intervalo de tiempo óptimo entre la administración del análogo de la GnRH acetato de triptorelina (Decapeptyl®) y la punción folicular en los tratamientos de FIV. Se incluirán pacientes de entre 18 y 37 años de edad afectadas de esterilidad primaria sometidas a ciclos de FIV o ICSI. Se establecerán dos grupos de estudio en los que se realizará la punción folicular a las 30h y a las 40h de la administración del fármaco Decapeptyl®. El grupo control estará formado por pacientes en las que la punción folicular se realiza a las 36h de la administración del fármaco. Además de las variables de respuesta recogidas en cada ciclo de FIV/ICSI, tales como el número de folículos totales mayores y menores de 16 mm, y los ovocitos maduros e inmaduros obtenidos, se recogerán las células de la granulosa. Dichas células envuelven el ovocito y juegan un papel muy importante en la ovulación, por lo que su perfil molecular podrá relevar diferencias en cuanto a la expresión de genes implicados en la maduración y ovulación, pudiendo así establecer qué tiempo de punción sería el óptimo para alcanzar la maduración ovocitaria final sin que llegue a producirse la ovulación espontánea.

PALABRAS CLAVE

Infertilidad, FIV, acetato de triptorelina, GnRha, hCG, estimulación ovárica controlada, punción folicular.

SUMMARY

Assisted Reproduction Techniques (ART) are increasingly being more employed in the treatment of infertility, highlighting the technique of in vitro fertilization (IVF) or the intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The use of IVF/ICSI requires a previous pharmacological stimulation of the ovary in a supra-physiological manner with gonadotropins in order to obtain a multiple follicle development. When a multifollicular development is achieved, final oocyte maturation is triggered. Subsequently, the follicular puncture is performed.

Nowadays, multiple drugs for this purpose are available. These include the hCG (human chorionic gonadotropin). As an alternative, there are also the gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa), which are capable of triggering a hormonal increase similar to the spontaneous LH peak that occurs in the middle of a natural cycle of ovulation.

However, studies conducted to date on hormone dynamics support that the time needed to achieve the oocyte maturation may be different. The present prospective, controlled and randomized study aims to evaluate the optimal time interval between the administration of GnRH analog, Triptorelin acetate (Decapeptyl®), and the follicular puncture in IVF treatments. Patients aged between 18 and 37 years old and affected by primary infertility undergoing cycles of IVF or ICSI will be included. Two study groups will be established in which follicular puncture will be held at 30 and 40h after of the administration of the drug Decapeptyl®. The control group will consist of patients in which follicular puncture is performed at 36h after of the administration of the drug. In addition to the typical response variables collected in each IVF/ICSI cycle, such as the number of total follicle with a size bigger than 16mm or smaller than 16mm and the number of mature oocytes, granulose cells will be collected. These cells surround the oocyte and play a very decisive role during ovulation, so its molecular profile can exhibit differences in ovulation and maturation gene related expression, and can thus establish which time would be the optimal to reach final oocyte maturation without it may result in spontaneous ovulation.

KEY WORDS

Infertility, IVF, triptorelin acetate, GnRHa, hCG, controlled ovarian stimulation, follicular puncture.

DATOS DEL TRABAJO

Alumna: Dña. M^a de los Desamparados Ruiz Carrión

Tutor académico: Prof. Dña. M^a Inmaculada Molina Botella

Cotutores externos: Dña. Sonia Herraiz Raya

Cotutor externo colaborador: Dña. M^a José Soriano Ortega

Valencia, Julio 2018

ÍNDICES

Pág.

Índice de Contenido	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	III

Índice de Contenido

Pág.

1. Introducción	1
1.1 Contextualización de las Técnicas de Reproducción Asistida	1
1.2 Técnicas de Reproducción Asistida. Indicaciones	1
1.3 El ciclo menstrual natural frente al ciclo de estimulación ovárica controlada	3
1.4. Inducción de la ovulación y fármacos inductores.....	5
1.5. Características de la inducción de la ovulación con GnRHa frente a hCG	7
1.6. Efecto del intervalo de tiempo entre la inducción de la ovulación y la recuperación ovocitaria	8
2. Justificación del estudio.....	9
3. Objetivos.....	10
4. Material y Métodos	11
4.1. Tipo y diseño del estudio	11
4.2. Población de estudio.....	11
4.3. Estimulación ovárica controlada y punción folicular	12
4.4. Recolección de células de la granulosa.....	12
4.5. Extracción y purificación de ARN de las células de la granulosa	13
4.6. Síntesis del ADN complementario (ADNc)	13
4.7. Preparación de las muestras: elaboración de los pools	14
4.8. PCR cuantitativa.....	15
4.9. Diseño experimental.....	16
4.10. Análisis Estadístico	17
5. Resultados.....	18
5.1. Número total de muestras.....	18
5.2. Análisis expresión génica	18
6. Discusión	29
7. Conclusiones.....	33
8. Referencias Bibliográficas	34
9. Anexos	39
Anexo I. Diseño Placa 1 PCR.....	39
Anexo II. Diseño Placa 2 PCR	40

Índice de figuras

Pág.

Figura1: Las Técnicas de Reproducción Asistida(TRA) de izquierda a derecha	2
Figura 2. Ciclo menstrual de la mujer	4
Figura 3. Ovario representativo de un ciclo natural frente a un ovario estimulado.....	5
Figura 4. Mecanismo Actuación de los análogos de la GnRH. A) El agonista de GnRH activa mediante la unión con su receptor la liberación de gonadotropinas (efecto <i>flare-up</i>) y saturan los receptores disponibles. B) La liberación de GnRH endógena encuentra todos los receptores ocupados e inhibe la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior	6
Figura 5. Esquema del diseño experimental de las distintas fases del estudio y el número de pacientes de cada fase completada.....	16

Índice de tablas

Pág.

Tabla 1: Indicaciones de las Técnicas de Reproducción Asistida	3
Tabla 2: Fold change de todos los grupos de muestras de los genes incluidos en el estudio a las 30 y 40h post-administración de GnRH_a.	20

Abreviaturas

ADAMTS9: desintegrina y metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 9 (*del inglés disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 9*)

ADNc: ADN complementario

AMH: Hormona Antimüllerianna (*del inglés Anti-Müllerian Hormone*)

AR: Ampiregulina

ARN: Ácido Ribonucleico

ASEBIR: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

BTC: Betacelulina

CYP19A1: Citocromo P450 de la familia 19 y subfamilia A, polipéptido 1

EEUU: Estados Unidos de América

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico (*del inglés Epidermal Growth Factor*)

EOC: Estimulación Ovárica Controlada

EREG: Epiregulina

FIV: Fecundación In Vitro

FSH: Hormona Folículoestimulante

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas (*del inglés Gonadotropin-Releasing Hormone*)

GnRH_a: Agonistas de la GnRH (*del inglés Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist*)

GnRH_{ant}: Antagonistas de la GnRH (*del inglés Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist*)

IA: Inseminación Artificial

IAD: Inseminación Artificial con semen Heterólogo o de Donante.

IAH: Inseminación Artificial con semen Homólogo o de la Pareja.

ICSI: Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides

IGF: Factor de Crecimiento Insulínico (*del inglés Insuline-like Growth Factor*)

IIU: Inseminación Intrauterina

IMC: Índice de Masa Corporal

LH: Hormona Luteinizante

REM: Recuento de Espermatozoides Móviles

RGS2: Regulador de la Proteína G Señalizadora 2 (*del inglés Regulator of G protein Signaling*)

SHEO: Síndrome Hiperestimulación Ovárica

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

UGP2: UDP-glucosa pirofosforilasa 2

1. Introducción

1.1 Contextualización de las Técnicas de Reproducción Asistida

Por diferentes razones, los problemas relacionados con la infertilidad tanto de origen femenino como masculino, han aumentado hasta afectar aproximadamente al 15% de las parejas (Evers, 2002; Soria *et al.*, 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tasa de infertilidad en España es un 5-10% superior que en otros países. La principal razón por la que la tasa de infertilidad se ha visto aumentada se debe a la inserción de la mujer en el mundo laboral, desencadenando de este modo el retraso del inicio de la maternidad. La avanzada edad de la mujer para llevar a cabo la primera gestación revela un envejecimiento ovárico que resulta en una significativa reducción del número de ovocitos (Richardson *et al.*, 2014), así como una peor calidad de los mismos, con la principal consecuencia de una mayor tasa de abortos debido a alteraciones genéticas en los gametos femeninos. Además, los hábitos de vida actuales en nuestra sociedad tales como el consumo de tabaco y alcohol, así como la exposición a contaminantes químicos y ambientales, también podrían estar afectando directamente a la fertilidad (Homan *et al.*, 2007).

Así pues, todo ello indica que la infertilidad se presenta como un problema cada vez más extendido en la sociedad y, por tanto, el futuro de ésta dependerá en su mayoría de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

1.2 Técnicas de Reproducción Asistida. Indicaciones

La aparición de las TRA en los años 70 indica que su inclusión en nuestra sociedad es relativamente reciente. Hoy en día, en España nacen aproximadamente 34.000 niños al año por TRA (ASEBIR), lo que nos sitúa a la cabeza en Europa y en el tercer lugar del mundo, sólo por detrás de Japón y Estados Unidos (EEUU).

Actualmente, las TRA se pueden englobar en dos grupos: las técnicas de baja complejidad, como la inseminación artificial (IA) o inseminación intrauterina (IIU), y las de mayor complejidad, como fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

- Inseminación artificial: consiste en capacitar el semen, es decir, inducir los cambios físico-químicos necesarios para obtener la capacidad de fecundar al ovocito, y depositarlo posteriormente en la cavidad uterina con la ayuda de una cánula de inseminación. Dependiendo del origen del semen existen dos tipos de IA:
 - Inseminación artificial con semen homólogo (IAH) o de la pareja.
 - Inseminación artificial con semen de donante (IAD) o heterólogo.
- Fecundación *in vitro*: se trata de recuperar los ovocitos mediante punción folicular para posteriormente llevar a cabo inseminación en el laboratorio con el semen de la pareja o de donante. Tras comprobar la correcta fecundación de los embriones se mantendrán en cultivo hasta que alcancen el desarrollo adecuado, momento en el cual se seleccionará el de mayor calidad y se realizará la transferencia a la paciente receptora.
- Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides: es una variante de la FIV mediante el cual un único espermatozoide es microinyectado directamente en el interior del ovocito. El proceso de desarrollo y transferencia posterior es exactamente el mismo que en el caso anterior.

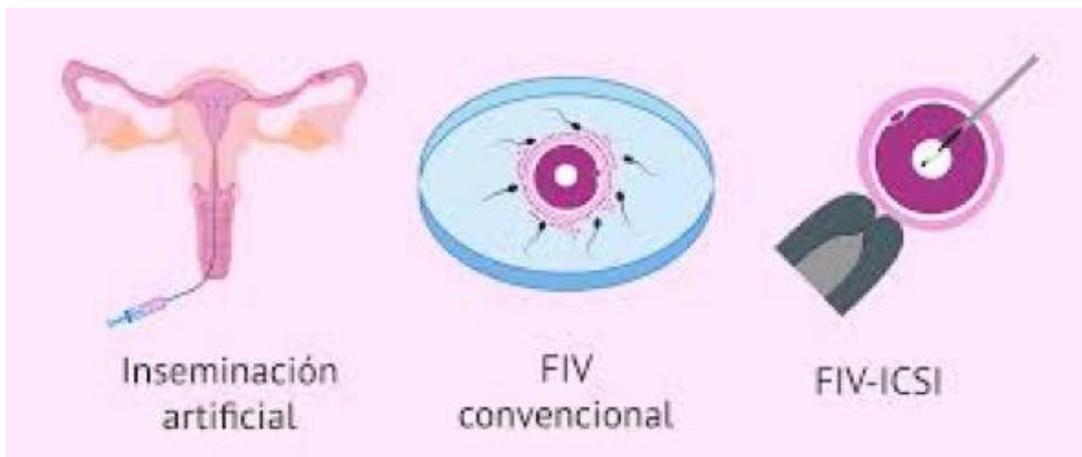


Figura1: Las Técnicas de Reproducción Asistida(TRA) de izquierda a derecha: Inseminación Artificial (IA o IUI), Fecundación *in vitro* (FIV) y Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Fuente: www.reproduccionasistida.org)

Las TRA tienen múltiples aplicaciones tanto para la infertilidad de origen femenino como masculino. En la **Tabla 1** se presentan las indicaciones más comunes (Matorras y Hernández, 2007):

Tabla 1: Indicaciones de las Técnicas de Reproducción Asistida

Abreviaturas: IA, Inseminación Artificial; FIV, Fecundación *In Vitro*; ICSI, Inyección Intracitoplasmática; IAC, Inseminación Artificial Conyugal

Inseminación Artificial (IA)	Fecundación in vitro (FIV)	Inyección Intracitoplasmática (ICSI)
Esterilidad de origen masculino:	Factor Tubárico	Fracaso inseminación conyugal en ausencia de patología tubárica (IAC)
Incapacidad para depositar el semen en vagina Factor masculino leve	Hidrosalpinx	
	Obstrucción tubárica bilateral multifocal o completa	Baja respuesta
Esterilidad femenina		Diagnóstico Preimplantacional
Origen cervical Origen uterino Endometriosis Trastornos ovulatorios Hostilidad del moco cervical	Endometriosis Cirugía pélvica previa	Fallo de fecundación
Esterilidad inmunológica	Factor masculino leve-moderado	Infertilidad por factor masculino severo y fallos en FIV
		Factor masculino leve-moderado
Esterilidad no explicada		Teratozoospermia moderada o severa Azoospermia
Otros: problemas de índole religioso	Baja respuesta	Espermatozoides de epidídimo o testículo

1.3 El ciclo menstrual natural frente al ciclo de estimulación ovárica controlada

El ciclo menstrual natural de una mujer se puede dividir en dos fases: folicular y secretora. La fase folicular transcurre durante aproximadamente 10-14 días, contando desde el primer día de la menstruación. A mediados del ciclo se produce la ovulación, lo que desencadena con el inicio de la fase lútea o secretora. Durante esta fase se formará el cuerpo lúteo y se secretará progesterona, cuya función consiste en ayudar a preparar el endometrio para que el ovocito que haya sido fecundado (denominado a partir de este momento como embrión), pueda implantar y lograr desarrollar el embarazo.

Las gonadotropinas hipofisarias son las hormonas encargadas de regular y controlar el ciclo menstrual. Entre ellas destacan la FSH, que estimula el crecimiento y el reclutamiento de los folículos donde se localizan los óvulos, y la LH, cuyo pico en el día 14 del ciclo desencadena la ovulación y formación del cuerpo lúteo. Ambas hormonas se liberan bajo el control de la GnRH, un decapeptido sintetizado y liberado en las neuronas del hipotálamo que circulará por

el torrente de los vasos portales hasta llegar a la hipófisis, donde estimulará la síntesis y secreción de FSH y LH.

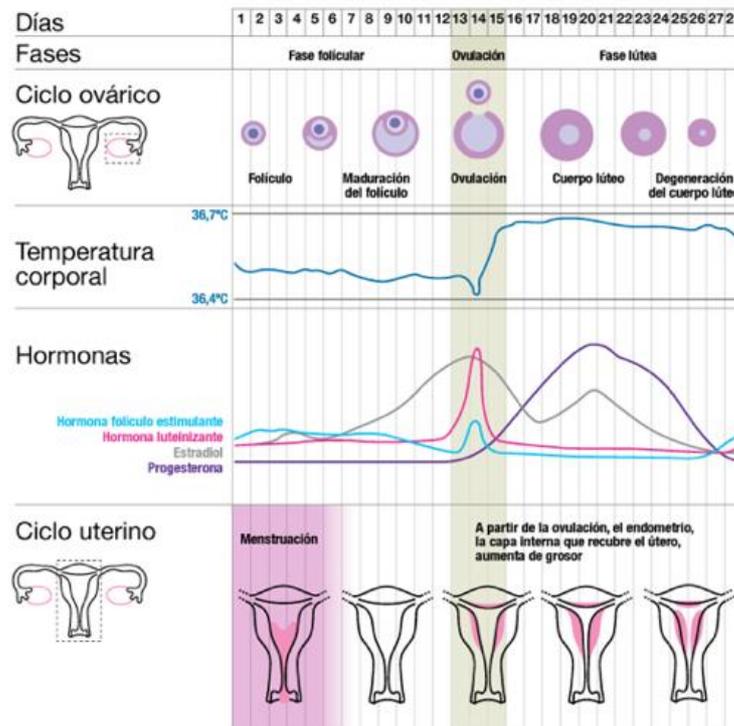


Figura 2. Ciclo menstrual de la mujer. (Fuente: www.santiagodexeus.com)

Durante un ciclo menstrual natural, solamente uno de los folículos es capaz de responder a la hormona FSH y, por tanto, desarrollarse hasta convertirse en un folículo preovulatorio de mayor tamaño, mientras que el resto de folículos degeneran (Hawkins y Matzuk, 2008).

Por el contrario, cuando se somete a las pacientes a un tratamiento de reproducción asistida es necesario asegurar, un desarrollo multifolicular que permita obtener el mayor número de ovocitos posible. De esta manera, se aumentará considerablemente las probabilidades de obtener un mayor número de embriones para conseguir el embarazo. Por otro lado, también se debe controlar el momento de la ovulación para poder realizar una exitosa punción folicular y recuperar de este modo el máximo número de ovocitos maduros.



Figura 3. Ovario representativo de un ciclo natural frente a un ovario estimulado.

(Fuente: www.reproduccionasistida.org)

Estimar el momento idóneo de la punción folicular resulta fundamental para prevenir una ovulación prematura espontánea, lo que implicaría la imposibilidad de recuperar los ovocitos.

1.4. Inducción de la ovulación y fármacos inductores

El desarrollo multifolicular se consigue mediante la administración inyectable de medicación hormonal de forma controlada y personalizada. Este proceso se conoce como estimulación ovárica controlada (EOC). Las dosis a administrar variarán en función de diversos factores como la edad de la mujer, el índice de masa corporal y tipo de técnica a la que va a ser sometida, siendo la IA la que menor carga hormonal requiere (Romero, 2010).

Existen diversos protocolos de EOC, la mayoría de ellos basados en tres pasos o etapas fundamentales:

- Inducir la maduración ovocitaria: los fármacos administrados a la mujer sustituyen la acción de las gonadotropinas hipofisarias. Los más habituales son aquellos que contienen FSH y LH recombinante.
 - Bloquear el control natural: con el objetivo de controlar el ciclo hormonal de forma exógena se administran análogos de la GnRH, ya sean agonistas o antagonistas. Esta medicación bloquea la acción de la GnRH natural, impidiendo de este modo la liberación de FSH y LH endógenas.
-
- Agonistas de la GnRH (GnRHa): son péptidos sintéticos en los que se ha modificado su estructura proteica para alterar su afinidad por el receptor de la GnRH. Actúan mediante un sistema de desensibilización, de forma que

el GnRHa administrado activa mediante la unión con su receptor la liberación masiva de gonadotropinas (efecto *flare-up*), pero al ser administrados de forma continua, terminan por saturar los receptores disponibles, impidiendo así la liberación de FSH y LH.

- Antagonistas de la GnRH (GnRHant): actúan mediante un sistema de inhibición competitivo de los receptores para GnRH. El bloqueo de la producción de FSH y LH es directo.

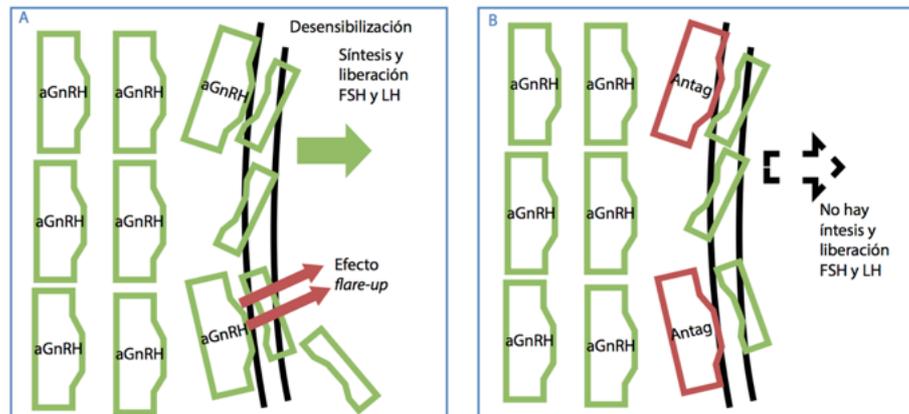


Figura 4. Mecanismo Actuación de los análogos de la GnRH. A) El agonista de GnRH activa mediante la unión con su receptor la liberación de gonadotropinas (efecto *flare-up*) y saturan los receptores disponibles. **B)** La liberación de GnRH endógena encuentra todos los receptores ocupados e inhibe la liberación de LH y FSH de la hipófisis anterior. (Fuente: Revista peruana ginecología obstetricia. 2012;58;191-199).

Abreviaturas: GnRH, Hormona Liberadora de Gonadotropinas

- Inducir la ovulación: generalmente, se desencadena mediante la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG), que simula la acción natural de la LH. La hCG induce la ovulación unas 36 horas después de su administración, por lo que la punción folicular debería realizarse pocas horas después para evitar la ovulación espontánea. Como alternativa, también se pueden utilizar los GnRHa para inducir la ovulación (Luis Ernesto Escudero Velando 2012).

1.5. Características de la inducción de la ovulación con GnRH α frente a hCG

La hCG representa el estándar en sustitución de la LH endógena, desde los estadios finales de maduración ovocitaria en los protocolos de hiperestimulación ovárica en fecundación in vitro (Humaidan *et al.*, 2011). Desafortunadamente, la hCG se encuentra estrechamente ligada al síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO). Una alternativa a la hCG exógena podría ser la administración de agonistas de GnRH, los cuales inducen un aumento en los niveles endógenos de LH y FSH debido al efecto *flare-up* inicial. En términos fisiológicos, la inducción con la administración de hCG exógena tiene un perfil más alejado al fisiológico en ciclos naturales y supone un riesgo más elevado de presentar SHEO debido a la elevada vida media de la LH en sangre (Farag *et al.*, 2015; Itskovitz *et al.*, 1991; Olivennes *et al.*, 1996). Como alternativa, los agonistas de la GnRH se plantean como una efectiva variante en estos tratamientos (Farag *et al.*, 2015).

Una de las principales características observadas en diversos estudios comparativos ha sido la dinámica del pico ovulatorio entre ambos tratamientos. Cuando se emplean GnRH α , se produce un aumento rápido de LH y se alcanza su pico máximo a las 4 horas desde la administración aproximadamente mientras que, por el contrario, cuando se realiza la estimulación con hCG, los niveles de esta hormona aumentan paulativamente y llegan a su máximo a las 17 horas. La principal diferencia es la larga vida media que tiene la hCG, que dista del pico ovulatorio fisiológico de LH (Beckers *et al.*, 2003; Fauser *et al.*, 2002, Griesinger *et al.*, 2006).

De esto se deduce que el pico ovulatorio que se obtiene con los GnRH α es más similar al pico natural de LH en un ciclo espontáneo y por tanto, la liberación conjunta de ambas hormonas (LH y FSH) empleando GnRH α aporta beneficios en la maduración del ovocito. Estudios relacionados demuestran que en los grupos con uso de GnRH α , los niveles de FSH y LH duplican las concentraciones con respecto a los grupos que empleaban la hCG (Humaidan *et al.*, 2005).

Por otro lado, se encuentran también diferencias en la cascada de los diferentes mediadores de la ovulación. Los principales mediadores propuestos como responsables de los mecanismos de la activación de la maduración ovocitaria desencadenada por la LH han sido el epidemial growth factor (EGF), factores mitógenos como la Ampiregulina (AR), Epiregulina (EREG) y la betacelulina (BTC), siendo los más importantes la AR y EREG estudiados en ensayos con humanos (Haas *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2004).

Así pues, algunos autores como Andersen *et al.* (2006), señalan el efecto beneficioso en cuanto a la calidad ovocitaria y embrionaria en los regímenes con inducción con GnRHa frente a la hCG debido a estos factores hormonales y moleculares.

1.6. Efecto del intervalo de tiempo entre la inducción de la ovulación y la recuperación ovocitaria

Conocer el intervalo de tiempo exacto a la hora de realizar la punción folicular es verdaderamente importante puesto que se debe de asegurar previamente que se hayan finalizado algunos procesos celulares como la expansión del cúmulo, el reinicio de la segunda división meiótica y que se haya iniciado la luteinización del folículo (Gudmundsson *et al.*, 1990).

Wang *et al.* (2011) encontraban ovocitos maduros metafase II y corroboraban que la punción a las 36h ha demostrado ser el intervalo de tiempo idóneo en los casos en los que se administra hCG. Pese a estos resultados, se ha visto que si bien prolongar este intervalo si puede aumentar el porcentaje de metafase II, el ratio de fertilidad, implantación y embarazo no se ve aumentado.

Por otro lado, algunos factores como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), la Angiotensina II o el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF) se han visto relacionados con el intervalo óptimo de tiempo de recolección de ovocitos después de administrar hCG. En grupos donde se realiza la punción más tarde de las 36h, se han observado niveles más elevados de VEGF. El VEGF puede aumentar la vascularización folicular y, por tanto, optimizar el transporte de oxígeno disuelto en el folículo promoviendo la maduración y calidad ovocitaria.

Finalmente, el intervalo óptimo de recolección de ovocitos maduros metafase II ha quedado respaldado por muchos autores como Mansour *et al.* (1994), entre otros, quienes concluyeron que la maduración ovocitaria se logra a las 36h post administración de la hCG y por lo tanto, la punción folicular no debería realizarse antes de las 36h. Por otro lado, se demuestra también que los ratios de fertilización y de implantación son significativamente mayores en los ovocitos recolectados pasadas las 36h respecto a los recolectados antes de las 36h.

2. Justificación del estudio

Tanto los GnRHa como la hCG han demostrado ser fármacos eficaces para lograr la maduración final de los ovocitos (Fauser *et al.*, 2002; Humaidan *et al.*, 2011; Orvieto, 2016). Sin embargo, su mecanismo de acción para lograrlo es diferente, puesto que la dinámica hormonal del pico ovulatorio y los perfiles moleculares difieren entre ambos fármacos, siendo los GnRHa los que mejor reproducirían las características fisiológicas de los ciclos naturales.

El intervalo de tiempo desde la administración del desencadenante de la ovulación y la aspiración del líquido folicular para la captación ovocitaria es sumamente importante porque en procesos como el inicio de la formación del cuerpo lúteo, el reinicio de la segunda división meiótica del ovocito, así como su liberación al líquido folicular deben haberse establecido antes de realizar la punción folicular. Además, debe mantenerse la integridad del folículo, puesto que si se completa la ovulación resulta imposible recuperar los ovocitos (Gudmundsson *et al.*, 1990; Park *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). Existen múltiples estudios que han evaluado el intervalo de tiempo óptimo tras la administración de hCG, estableciendo que el momento idóneo para la recuperación ovocitaria sería a las 36-38 horas de la inducción (Wang *et al.*). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado cuál sería el intervalo de tiempo óptimo entre la administración de los GnRHa y la aspiración folicular, por lo que se emplea de forma rutinaria el mismo intervalo de tiempo que para la hCG.

Debido a que existen diferencias descritas entre la inducción de la ovulación con hCG y los GnRHa, cabe la posibilidad de que el tiempo preciso para lograr la maduración ovocitaria podría ser diferente entre ambos fármacos y, por lo tanto, el momento óptimo para realizar la punción folicular después de la administración de los GnRHa podría ser diferente de las 36 horas descritas para la hCG. Por este motivo, resulta necesario realizar un estudio del intervalo de tiempo óptimo entre la punción y la administración de Decapeptyl®.

Con este fin, se han analizado los genes ADAMTS9, AREG, BTC, CYP19A1, EFNB2, EREG, PHLDA1, RGS2 Y UGP2 debido a que todos juegan un papel importante en alguno de los estadios de la maduración ovocitaria o folicular (Borgbo *et al.*, 2013; Haas *et al.*, 2016; Uyar *et al.*, 2013; Wissing *et al.*, 2014) y por tanto, el estudio de su expresión génica en las células de la granulosa puede ayudar a determinar el intervalo óptimo de tiempo para realizar la punción folicular con el uso de un agonista de GnRH como es el Decapeptyl®.

3. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo consiste en determinar el intervalo de tiempo óptimo entre la administración del análogo de la GnRH Acetato de Triptorelina (Decapeptyl®) y la punción-aspiración de los ovocitos en los tratamientos de FIV. Para ello, se evalúa la expresión diferencial de genes implicados en el proceso de maduración y ovulación en las células de la granulosa.

Objetivos Secundarios:

- Análisis de la expresión de los genes seleccionados atendiendo los siguientes parámetros; maduración ovocitaria (reinicio segunda meiosis), expansión del cumulus (tamaño folicular >16 o <16mm) y horas desde el tratamiento de EOC hasta la punción ovocitaria (grupo 30h, grupo 36h o grupo 40h).

4. Material y Métodos

4.1. Tipo y diseño del estudio

Se trató de un estudio unicéntrico, prospectivo, aleatorizado, controlado y ciego para determinar el intervalo de tiempo que permite obtener el mayor número de ovocitos MII tras la administración del Acetato de Triptorelina (Decapeptyl®, NCT02244151).

El estudio constó de una única fase controlada en la que se evaluaron tres diferentes intervalos de tiempo tras la administración del fármaco inductor de la ovulación. Se establecieron dos intervalos de tiempo en investigación, a las 30 y 40 horas, los cuales se compararon con el grupo considerado como control en el que se indujo la ovulación a las 36 horas.

De este modo, las pacientes que presentaron una respuesta normal al tratamiento de estimulación ovárica fueron aleatorizadas el día de la inducción de la ovulación en uno de los siguientes grupos:

- Grupo 1: punción folicular a las 30 horas de la administración de Decapeptyl®.
- Grupo 2: punción folicular a las 40 horas de la administración de Decapeptyl®.
- Grupo 3: grupo control. Punción folicular a las 36 horas de la administración de Decapeptyl®.

4.2. Población de estudio

En el estudio se incluyeron 206 pacientes afectas de esterilidad primaria subsidiarias de tratamiento mediante FIV o ICSI que acudieron a la Unidad de Reproducción Humana del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- Consentimiento informado firmado previamente a la realización de cualquier procedimiento relacionado con el ensayo clínico.
- Mujeres entre 18 y 37 años de edad en el momento de la aleatorización.
- Concentración sanguínea de FSH basal <10 mUI/ml en día 3 de ciclo menstrual.
- Concentración sérica de AMH >5 y <45 pmol/l.
- Número de folículos antrales >6 y <24 entre ambos ovarios.
- Ecografía vaginal que documente la visualización correcta de ambos ovarios y ausencia de patología ovárica significativa en el momento de inicio de la estimulación ovárica.
- Número de folículos mayores o iguales a 16mm \geq 5 el día de la inducción de la ovulación.

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

- Diagnóstico de endometriosis severa.
- Ausencia de un ovario debido a cirugía previa.
- Presencia de patología uterina definida como miomas submucosos o pólipo endometrial.
- Diagnóstico de ovarios poliquísticos.
- Historia de baja respuesta en ciclos previos de estimulación ovárica, definidos como la obtención de menos de 3 ovocitos MII.
- Parejas con factor masculino severo definido como recuento de espermatozoides móviles (REM) menor a 1 millón de espermatozoides o azoospermia.
- Haber participado en un ensayo clínico con medicamentos en un periodo inferior a un mes.
- Alergia conocida al fármaco Decapeptyl.

4.3. Estimulación ovárica controlada y punción folicular

El proceso de EOC se llevó a cabo siguiendo el protocolo con antagonistas de la GnRH (Cetrorelix; Merck Serono). A partir del tercer día del ciclo menstrual se administraron dosis diarias de FSH recombinante (Gonal-F, Merck-Serono) y hMG (Menogon; Ferring). La dosis hormonal inicial se estableció según la edad, índice de masa corporal (IMC) e historia clínica de las pacientes. Cuando al menos tres folículos alcanzaron un tamaño ≥ 16 mm de diámetro, las pacientes recibieron el fármaco experimental Decapeptyl® 0,1 mg por vía subcutánea para inducir la ovulación. Los periodos desde la administración de la medicación hasta la punción folicular variaron según el grupo en el que fue incluida la paciente, como ya se comentó anteriormente.

4.4. Recolección de células de la granulosa

Las células de la granulosa se obtuvieron durante el proceso de denudación o decumulación de los ovocitos en las primeras etapas de la ICSI. Brevemente, tras la recuperación ovocitaria, los ovocitos fueron desprovistos de las células del cúmulo que los rodean mediante hialuronidasa. Posteriormente, las células se recogieron en un tubo eppendorf con 0.5 ml tampón fosfato salino (PBS) y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se almacenó en un criovial a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

4.5. Extracción y purificación de ARN de las células de la granulosa

Para la extracción del ARN de las células de la granulosa se empleó el kit RNeasy® Mini Kit, de la casa comercial Qiagen®. Tras descongelar las muestras a temperatura ambiente, se realizó un lavado con PBS y se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos con el fin de eliminar el PBS. A continuación, y siguiendo los pasos del protocolo, se añadieron 350 µl del tampón RLT (tampón de lisis para lisar células y tejidos antes del aislamiento del ARN). Con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml con aguja de 25G se facilitó la ruptura y homogeneización de las células. Para ello, se aspiró y soltó ininterrumpidamente entre 20 y 25 veces el contenido del eppendorf. Seguidamente, se añadieron 350 µl de etanol al 70% y se homogeneizó nuevamente. Los 700 µl se transfirieron a una columna que contiene una membrana (RNeasy Mini spin column), encajada en un tubo de recogida de 2 ml (collection tube), y se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron 700 µl del tampón RW1 (cuya función consiste en lavar el ARN unido a la membrana), y se volvió a centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µl del tampón RPE (tampón de lisis para lisar células y tejidos antes del aislamiento del ARN). Tras descartar el sobrenadante, se añadieron nuevamente 500 µl del mismo tampón y se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos. Posteriormente, la columna se colocó en un eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 31 µl de agua libre de RNasa (RNase-free water), directamente sobre la membrana de la columna. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto para eludir el ARN. Los eppendorfs se mantuvieron en hielo hasta el momento de medir la concentración y pureza del ARN extraído en el NanoDrop. Tras ello, se almacenaron correctamente identificados en condiciones de -80°C.

4.6. Síntesis del ADN complementario (ADNc)

La transcripción reversa (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN, usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN. Para este fin, se utilizó el protocolo PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time), de la compañía Takara. Brevemente, tras realizar los cálculos oportunos, se añadió en tubos eppendorf de 200 µl el volumen de ARN correspondiente para tener 500 ng. El máximo volumen de ARN permitido por el protocolo es de 7 µl. En las muestras cuyo volumen total de ARN no alcanzaba los 7 µl, se completó con agua libre de RNasas. A continuación, se añadieron 3 µl de máster mix a cada uno de los tubos, para lograr un volumen final de 10 µl. El máster mix está compuesto por:

Reactivo	Cantidad
5X PrimeScript Buffer	2 μ l
PrimeScript RT Enzyme Mix	0,5 μ l
Oligo dT Primer	0,5 μ l
Total	3 μ l

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

37°C durante 15 minutos para realizar la transcripción reversa.

85°C durante 5 segundos para realizar la inactivación de la transcripción reversa.

4°C para el mantenimiento de las muestras.

Una vez finalizado el programa de la RT, se midió la concentración de ADNc en el NanoDrop y se realizaron los cálculos necesarios para alcanzar una concentración final de 200 ng/ μ l, concentración ideal para realizar la PCR cuantitativa. Para ello, se diluyeron las muestras con el correspondiente volumen de agua libre de RNasa. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C.

4.7. Preparación de las muestras: elaboración de los pools

Con el objetivo de facilitar el desarrollo experimental y puesto que en algunos casos se disponía de poca cantidad de ARNm, se decidió hacer pools de las muestras de las células de la granulosa. Dada la dificultad para reclutar a las pacientes con las características específicas requeridas para el estudio, no se pudieron recoger el mismo número de muestras para cada grupo de estudio.

Para la obtención de los pools, se realizaron los cálculos correspondientes, añadiendo la misma cantidad de muestra por cada paciente, que fue de 100 ng/ μ l, hasta completar un volumen total de 120 μ l por pool. Esto no supuso ningún problema a la hora de realizar la qPCR puesto que las sondas Taqman funcionan perfectamente con una concentración de 100 ng/ μ l.

Se obtuvieron un total de 12 pools de muestras de los cuales se realizaron 3 réplicas por cada grupo de estudio, a las 30, 36 y 40h para los 10 genes estudiados en este ensayo.

4.8. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (en inglés, quantitative polymerase chain reaction, qPCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el ADN o ADNc. Se utilizaron sondas TaqMan para los siguientes genes relacionados con el proceso de maduración ovocitaria y posterior ovulación: AREG, EREG, BTC, FNB2, CD24, ADAMTS9, CYP19A1, UGP2, RGS2, PHLDA1 y 18S como gen housekeeping.

De forma resumida, el primer paso del protocolo de la qPCR consistió en preparar el máster mix para cada una de las sondas de los diferentes genes. El master mix está formado por los siguientes elementos:

Reactivo	Volumen/reacción
H ₂ O libre de RNasa	3,5 µl
Tampón TaqMan™ Gene Expression Master Mix	5 µl
Sonda 20X AOD	0,5 µl

El volumen total de cada master mix depende del número total de reacciones por gen. Se prepararon tantos masters mix como genes a estudiar. En primer lugar, se añadió el agua libre de RNasas, posteriormente el tampón y finalmente, la sonda del gen correspondiente. Tras un spin, los masters mix se mantuvieron en hielo hasta el momento de cargar la placa de 384 pocillos de PCR.

Tras establecer el diseño correspondiente de la placa PCR (anexo I y II), se añadieron 9 µl de cada master mix a cada pocillo. Todos los pocillos del mismo master mix se cargaron con la misma punta. A continuación, se añadió 1 µl de la muestra de ADNc a cada pocillo, según correspondía con el diseño preestablecido. Cada muestra se cargó por triplicado, cambiando de punta en cada pocillo. Los controles negativos carecían de muestra. En su lugar, se añadió 1 µl de agua. Tras cargar la placa, se protegió con un film transparente para evitar la evaporación de los pocillos durante el proceso, se homogeneizó el contenido mediante un spin y se introdujo en el instrumental de PCR (QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems, AppliedBiosystems). El programa que se utilizó fue el siguiente:

Etapa de pre-calentamiento	Tiempo
50°C	2 minutos
95°C	10 minutos
Etapa PCR (45 ciclos)	
95°C	15 segundos
60°C	1 minuto

4.9. Diseño experimental

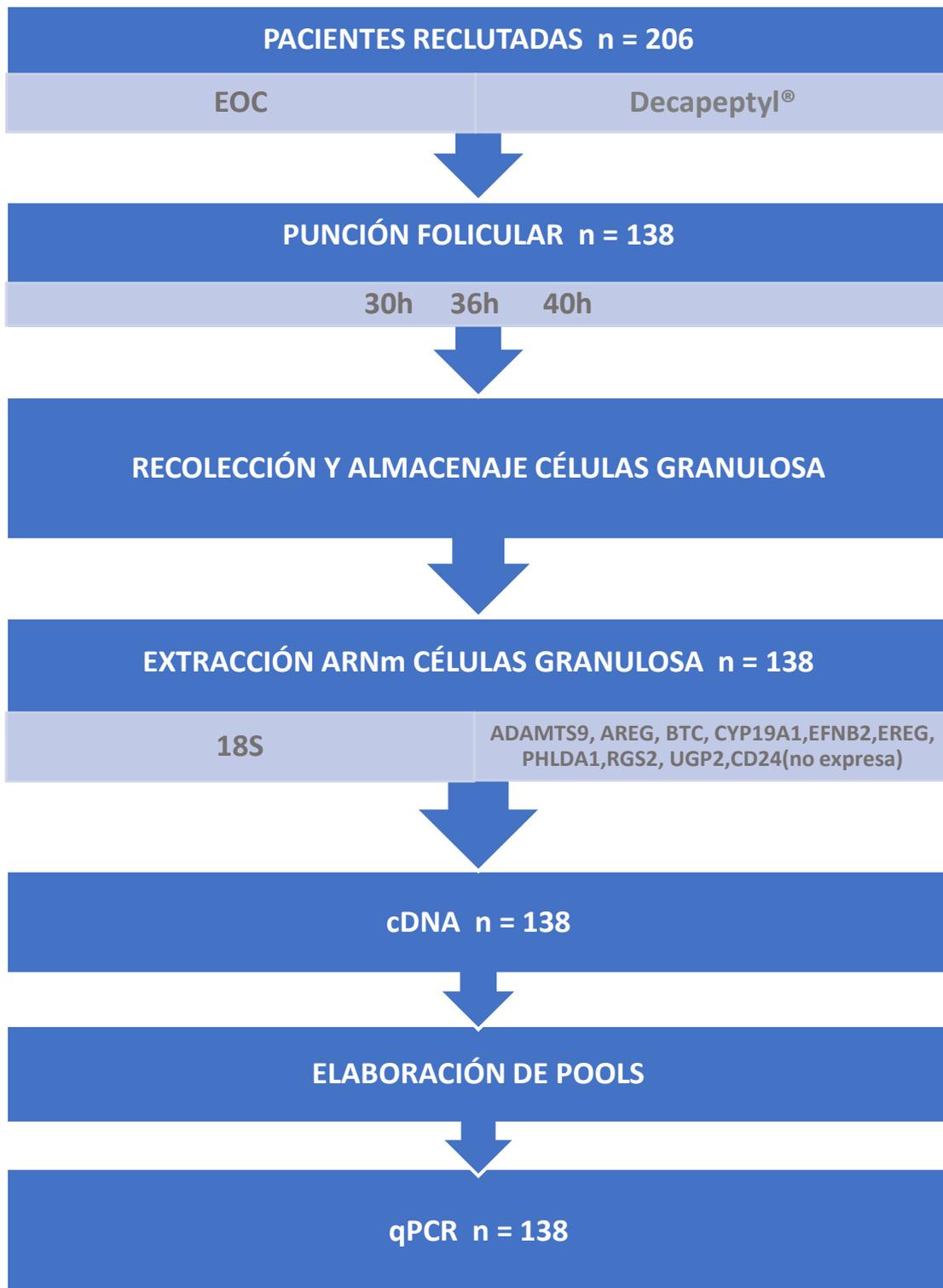


Figura 5. Esquema del diseño experimental de las distintas fases del estudio y el número de pacientes de cada fase completada. Abreviaturas: EOC, Estimulación Ovárica Controlada; n, tamaño de la muestra; ARNm, Ácido Ribonucleico mensajero; cDNA, Ácido Desoxirribonucleico complementario; qPCR, Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

4.10. Análisis Estadístico

Para analizar los genes expresados de forma diferencial se empleó la metodología del fold-change. El fold-change (o veces que más se expresa) viene dado por la expresión:

$$\text{Fold - change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Puesto que se partió de pools de muestras para realizar la qPCR, resultó imposible aplicar análisis estadísticos de mayor complejidad. Por ello, se empleó el análisis descriptivo para determinar, junto con el fold-change, qué genes presentaban diferencia de expresión.

Con el fin de determinar el correcto funcionamiento de la qPCR y analizar la posible variabilidad en el procedimiento de carga de las placas, se calculó el coeficiente de variación (CV). Esto se puede comprobar ya que en ambas placas se ha utilizado el gen 18S como gen housekeeping y las muestras son las mismas, por lo que la expresión génica debería ser la misma. Por este motivo se realizó un CV de los datos que se obtienen de la PCR sobre el Ct. El Ct (cycle threshold), es el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo. El CV ha sido calculado como el cociente entre la desviación estándar/media del Ct para cada una de las muestras.

5. Resultados

5.1. Número total de muestras

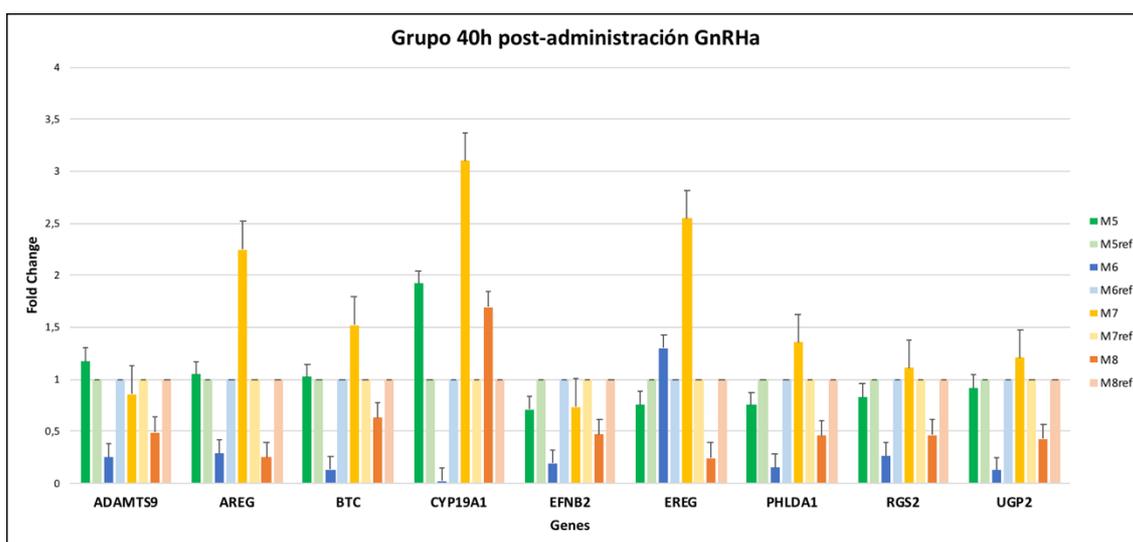
Se extrajo correctamente ARNm de un total de 206 muestras, siendo eliminadas 68 de ellas por presentar una cantidad de ARNm insuficiente, es decir, muestras con una concentración inferior a 2,5 ng/ μ l. Esto se debió a que la mínima concentración de ARN que había en una muestra es de 2.6 ng/ μ l. Se consideraron muestras con una pureza óptima aquellas que presentaban un ratio de valor de pureza 260/280 aceptable con valores entre 1.6-1.79 y óptima para valores entre 1.8-2.0, mientras que las que presentaban contaminación por ARN con un valor de pureza superior a 2.1 fueron eliminadas. También se eliminaron del estudio muestras en las que había presencia de compuestos alifáticos con un ratio de pureza inferior al 1.6.

Para los siguientes procedimientos de RT, dilución del cDNA y qPCR se contabilizaron un total de 138 muestras válidas.

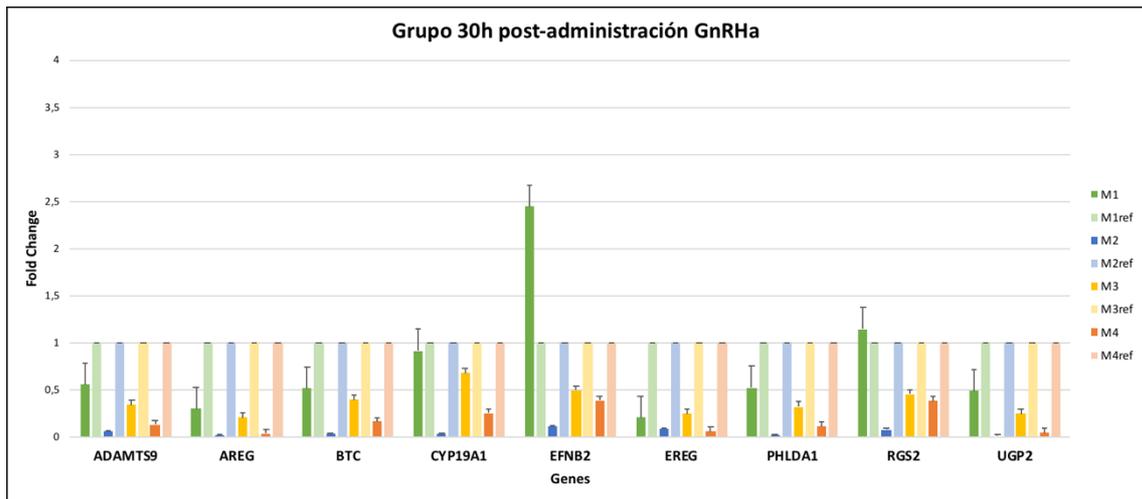
5.2. Análisis expresión génica

Para realizar el análisis de la expresión génica, los resultados se englobaron en 3 grupos atendiendo los siguientes parámetros; horas transcurridas desde el tratamiento de EOC hasta la recuperación ovocitaria (grupo 30h o grupo 40h), maduración ovocitaria (reinicio segunda meiosis) y expansión del *cumulus* (tamaño folicular >16 (79muestras) o <16mm (58 muestras)).

a) Grupo horas desde el tratamiento de EOC:



M5: Folículos maduros >16mm, punción a las 40h
M6: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 40h
M7: Folículos maduros <16mm, punción a las 40h
M8: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 40h
M5ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M6ref: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 36h
M7ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M8ref: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 36h



M1: Folículos maduros >16mm, punción a las 30h
M2: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 30h
M3: Folículos maduros <16mm, punción a las 30h
M4: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 30h
M1ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M2ref: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 36h
M3ref: Folículos maduros <16mm, punción a las 36h
M4ref: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 36h

Tabla 2: Fold change de todos los grupos de muestras de los genes incluidos en el estudio a las 30 y 40h post-administración de GnRHα.

Target Name	30h								40h							
	M1	M1ref	M2	M2ref	M3	M3ref	M4	M4ref	M5	M5ref	M6	M6ref	M7	M7ref	M8	M8ref
ADAMTS9	0,56	1,00	0,06	1,00	0,34	1,00	0,13	1,00	1,17	1,00	0,25	1,00	0,86	1,00	0,49	1,00
AREG	0,30	1,00	0,02	1,00	0,21	1,00	0,04	1,00	1,05	1,00	0,29	1,00	2,25	1,00	0,25	1,00
BTC	0,52	1,00	0,03	1,00	0,40	1,00	0,16	1,00	1,02	1,00	0,13	1,00	1,52	1,00	0,63	1,00
CYP19A1	0,91	1,00	0,03	1,00	0,68	1,00	0,25	1,00	1,92	1,00	0,02	1,00	3,10	1,00	1,69	1,00
EFNB2	2,45	1,00	0,11	1,00	0,50	1,00	0,39	1,00	0,71	1,00	0,20	1,00	0,74	1,00	0,47	1,00
EREG	0,21	1,00	0,08	1,00	0,24	1,00	0,06	1,00	0,76	1,00	1,30	1,00	2,55	1,00	0,24	1,00
PHLDA1	0,52	1,00	0,02	1,00	0,32	1,00	0,11	1,00	0,75	1,00	0,15	1,00	1,35	1,00	0,46	1,00
RGS2	1,15	1,00	0,08	1,00	0,46	1,00	0,38	1,00	0,83	1,00	0,26	1,00	1,11	1,00	0,47	1,00
UGP2	0,49	1,00	0,01	1,00	0,25	1,00	0,05	1,00	0,92	1,00	0,12	1,00	1,21	1,00	0,43	1,00

Para identificar los genes que se mostraron diferencialmente expresados se necesitaba elegir un estadístico que permitiera ordenar la evidencia de expresión diferenciada de mayor a menor. Para ello se obtuvo el parámetro Fold Change para cada uno de los genes estudiados (ADAMTS9, AREG, BTC, CYP19A1, EFN2, EREG, PHLDA1, RGS2 y UGP2) en cada uno de los grupos experimentales (M1->M8) a las 30 y 40h post-administración de GnRHα. Se consideró que un gen presentaba una variación significativa en su expresión cuando su fold change era mayor o igual a 2, de manera que los genes que presenten sobreexpresión con un significado biológico tendrán un valor del fold change ≥ 2 . Este parámetro se calcula teniendo en cuenta la expresión diferencial de un gen en una condición dada respecto a la condición control o de referencia y por definición, en análisis de expresión génica se utiliza el $\log_2 Fc$.

Esto se debe a que a la hora de visualizar los datos obtenidos se puede separar visualmente de manera más sencilla aquellos genes sobreexpresados y los que no han tenido

una sobreexpresión, ya que permite una simetría de los valores en el gráfico en ambas direcciones.

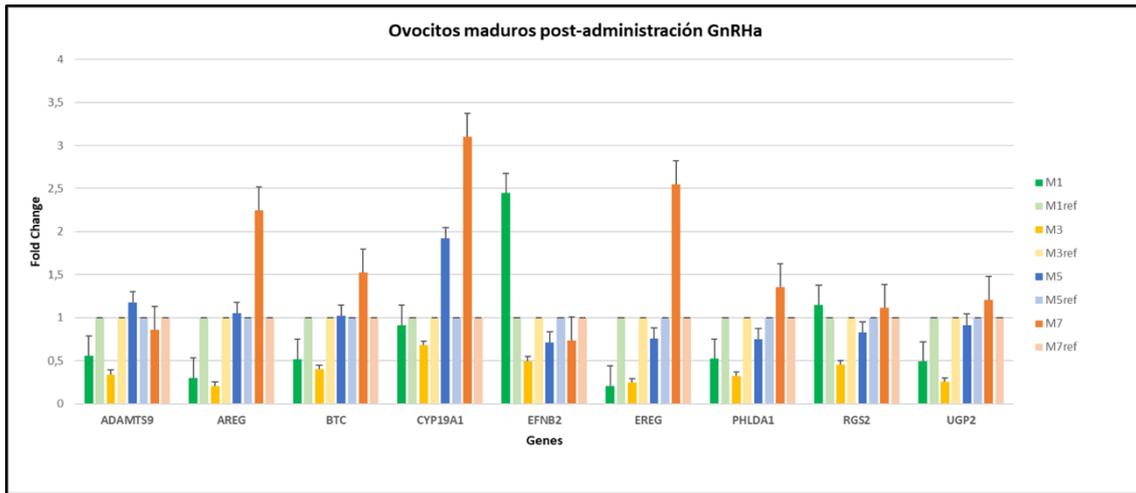
Teniendo este criterio en cuenta, se consideraron únicamente diferencialmente expresados y por tanto, significaron un cambio biológico relevante, aquellos genes que mostraron un valor del fold change igual o superior a 2. Para aquellos genes cuyo fold change fue superior a 1.5 se han comentado ya que desempeñan funciones biológicas relacionadas directamente con la ovulación.

En el grupo de punción a las 30h post-administración, se observó una sobreexpresión de la expresión del mRNA del gen EFN2 (2.45 vs. 1) para el grupo de muestras M1 (Folículos maduros>16mm) mientras que para el resto de grupos de muestras de los genes restantes se observó una menor expresión respecto a la referencia.

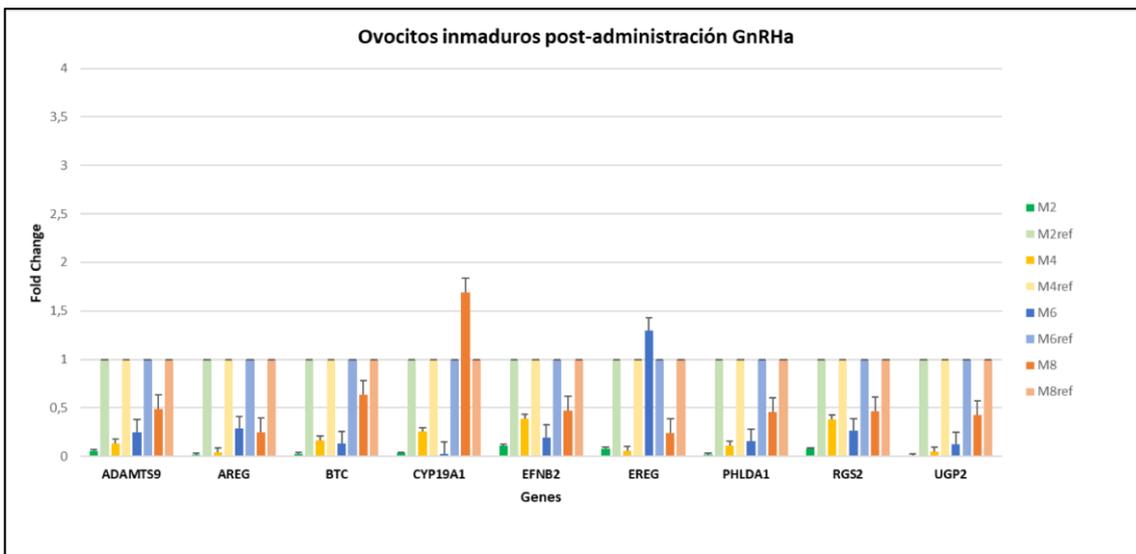
Por otro lado, en el grupo de punción a las 40h post-administración hubo sobreexpresión significativa en el grupo de muestras M5 (Folículos maduros>16mm) para el gen CYP19A1 (1.92 vs. 1). En el grupo de punción M6 (Folículos inmaduros>16mm) a las 40h no se observó sobreexpresión significativa para ningún gen mientras que fue, para el grupo de muestras M7 (Folículos maduros<16mm), donde se observó una mayor expresión del ARNm biológicamente relevante de los genes AREG (2.25 vs. 1), BTC (1.52 vs. 1), CYP19A1 (3.10 vs. 1) y EREG (2.55 vs. 1), comparado con el resto de muestras que mostraron sobreexpresión. En el grupo M8 (Folículos inmaduros<16mm) el gen CYP19A1 (1.69 vs. 1) se mostró sobreexpresado.

b) Grupo maduración ovocitaria:

Se analizaron también los resultados obtenidos atendiendo al parámetro de maduración ovocitaria, es decir, si se trataban de ovocitos metafase I, inmaduros, u ovocitos metafase II, maduros.



M1: Folículos maduros >16mm, punción a las 30h
M3: Folículos maduros <16mm, punción a las 30h
M5: Folículos maduros >16mm, punción a las 40h
M7: Folículos maduros <16mm, punción a las 40h
M1ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M3ref: Folículos maduros <16mm, punción a las 36h
M5ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M7ref: Folículos maduros <16mm, punción a las 36h



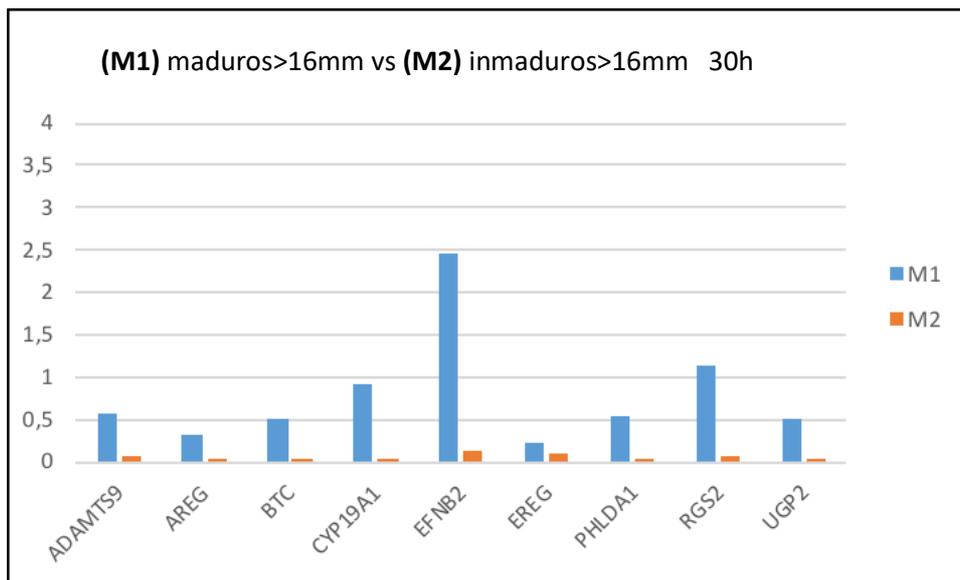
M2: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 30h
M4: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 30h
M6: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 40h
M8: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 40h
M2ref: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 36h
M4ref: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 36h
M6ref: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 36h
M8ref: Folículos maduros <16mm, punción a las 36h

En el grupo de ovocitos inmaduros únicamente se observó sobreexpresión significativa en el grupo de muestras M8 (Folículos inmaduros<16mm, punción a las 40h) para el gen CYP19A1 (1.69 vs. 1).

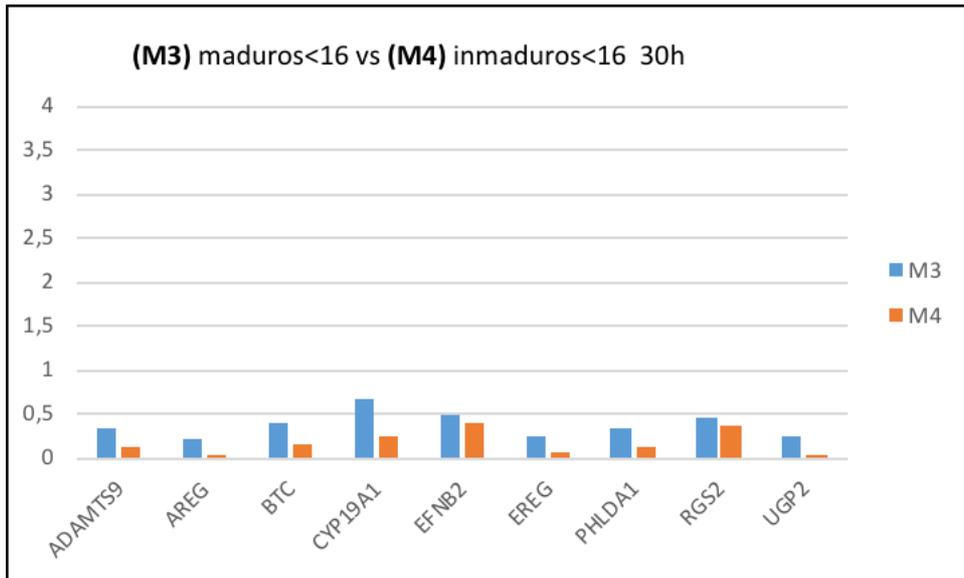
Se pudo comprobar cómo en el grupo de ovocitos maduros post-administración GnRHa había mayor número de genes, AREG (2.25 vs. 1), BTC (1.52 vs. 1), CYP19A1 (3.10 vs. 1), EREG (2.55 vs. 1) que presentaban sobreexpresión para el grupo M7 (Folículos maduros<16mm,

punción a las 40h) siendo éste el grupo donde mayor número de genes se sobreexpresaban entre todos los grupos que mostraron sobreexpresión significativa, mientras que, para el grupo de muestras M5 (Folículos maduros>16mm, punción a las 40h), únicamente se observó una sobreexpresión relevante del gen CYP19A1 (1.92 vs. 1). De la misma manera, para el grupo de muestras M1 (Folículos maduros>16mm, punción a las 30h) se observó sobreexpresión significativa del gen EFNB2 (2.45 vs. 1). No se observó sobreexpresión en el grupo M3 (Folículos maduros<16, punción a las 30h).

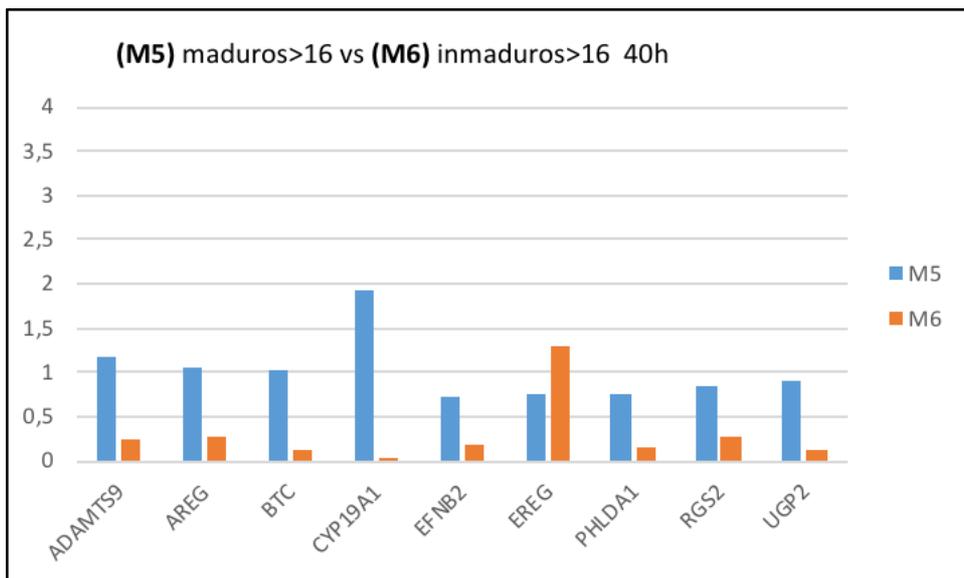
Para ver cómo podía variar la expresión en cada grupo de muestras se realizaron varias graficas comparando la expresión génica diferencial de los genes de ovocitos MII (ovocitos maduros) vs. MI (ovocitos inmaduros); maduros>16mm vs. inmaduros>16mm a las 30 y 40h y, por otro lado, maduros<16mm vs. inmaduros<16mm a las 30 y 40h, obteniéndose las siguientes gráficas:



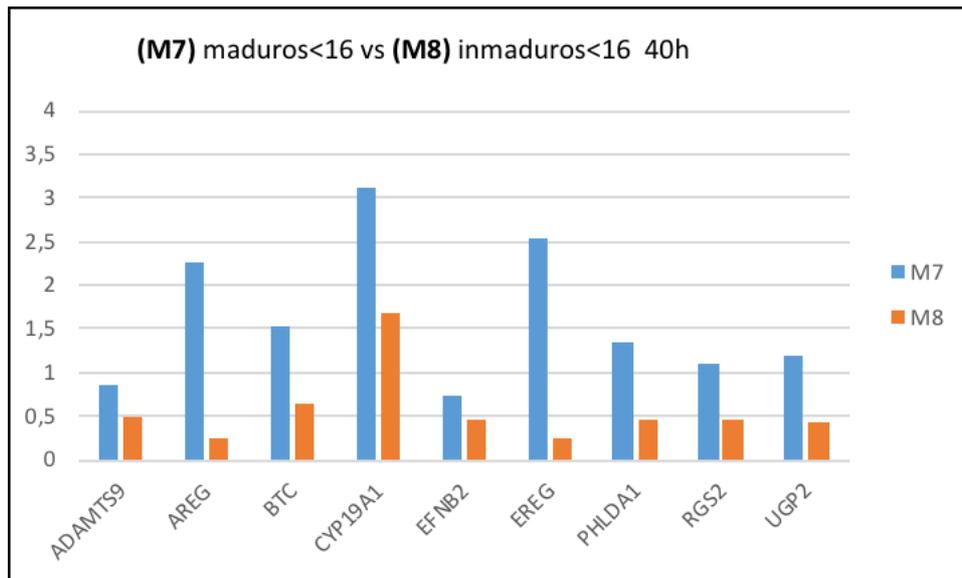
Abreviaturas: M1, folículos maduros mayores de 16mm, punción folicular a las 30h; M2, folículos inmaduros mayores de 16mm, punción folicular a las 30h.



Abreviaturas: M3, folículos maduros menores de 16mm, punción folicular a las 30h; M4, folículos inmaduros menores de 16mm, punción folicular a las 30h.



Abreviaturas: M5, folículos maduros mayores de 16mm, punción folicular a las 40h; M6, folículos inmaduros mayores de 16mm, punción folicular a las 40h.

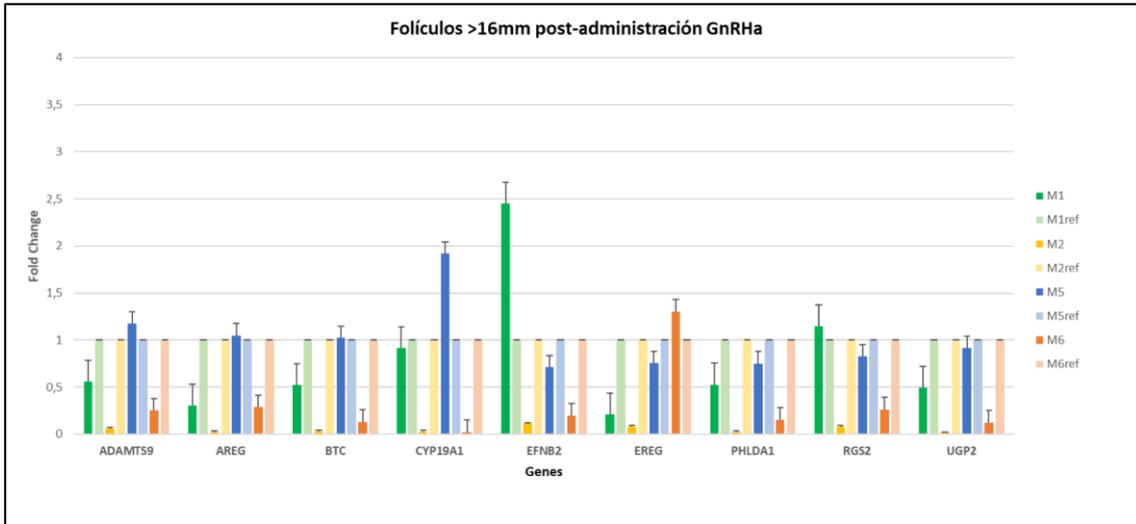


Abreviaturas: M7, folículos maduros menores de 16 mm, punción folicular a las 40h; M8, folículos inmaduros menores de 16mm, punción a las 40h.

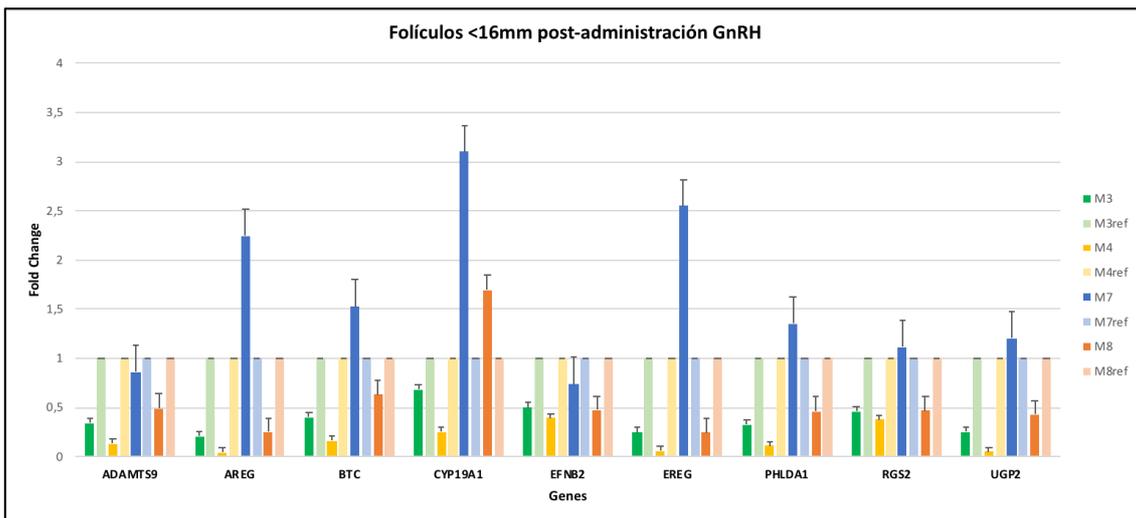
Se comprobó que se cumplía el patrón observado; había una mayor expresión de los genes en los grupos de muestras que tenían ovocitos maduros, siendo esta mayor además en los grupos de 40h y tamaño folicular <16mm a excepción del gen EREG del grupo de muestras M6 (Folículos inmaduros>16mm, punción a las 40h), que era el único gen en ese grupo sobreexpresado. Esto podía ser debido a que, como se ha observado en la literatura, el gen EREG participa en los procesos de maduración ovocitaria, expansión del *cumulus* y reinicio de la meiosis (Feuerstein et al) y su expresión se ve aumentada en momentos posteriores tras una EOC (Wissing et al. y Zamah et al., 2010). Así pues, que sea el único gen que se estuviera expresando más en el grupo M6 (Folículos inmaduros>16mm, punción a las 40h) que en el grupo M5 (Folículos maduros>16mm, punción a las 40h) hacía pensar que ese folículo se encontraba en el intervalo de tiempo en el que aún estaba madurando y el tiempo de recolección de estos ovocitos coincidió con el momento de máxima expresión de este gen durante el proceso final de maduración ovocitaria del gen EREG.

c) Grupo expansión del cumulus:

Por último, se obtuvieron las gráficas de los resultados teniendo en cuenta el parámetro de expansión del *cumulus* (Folículos>16mm o <16mm):



M1: Folículos maduros >16mm, punción a las 30h
M2: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 30h
M5: Folículos maduros >16mm, punción a las 40h
M6: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 40h
M1ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M2ref: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 36h
M5ref: Folículos maduros >16mm, punción a las 36h
M6ref: Folículos inmaduros >16mm, punción a las 36h



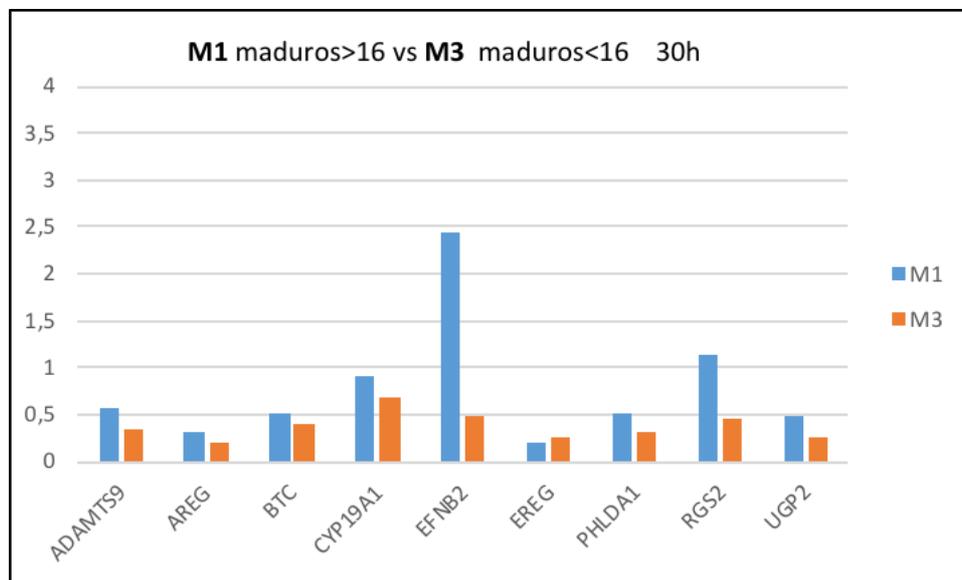
M3: Folículos maduros <16mm, punción a las 30h
M4: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 30h
M7: Folículos maduros <16mm, punción a las 40h
M8: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 40h
M3ref: Folículos maduros <16mm, punción a las 36h
M4ref: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 36h
M7ref: Folículos maduros <16mm, punción a las 36h
M8ref: Folículos inmaduros <16mm, punción a las 36h

Fue en el grupo de Folículos<16mm donde se obtuvo más expresión de un mayor número de genes para el grupo de muestras M7 (Folículos maduros<16mm, punción a las 40h), AREG (2.24 vs. 1), BTC (1.52 vs. 1), CYP19A1 (3.10 vs. 1), EREG (2.55 vs. 1), que respecto al grupo de Folículos>16mm. Dentro del grupo de Folículos<16mm se obtuvo sobreexpresión significativa también del gen CYP19A1 (1.69 vs. 1) para el grupo de muestras M8 (Folículos inmaduros<16mm, punción a las 40h). En los grupos restantes M3 (Folículos maduros<16mm,

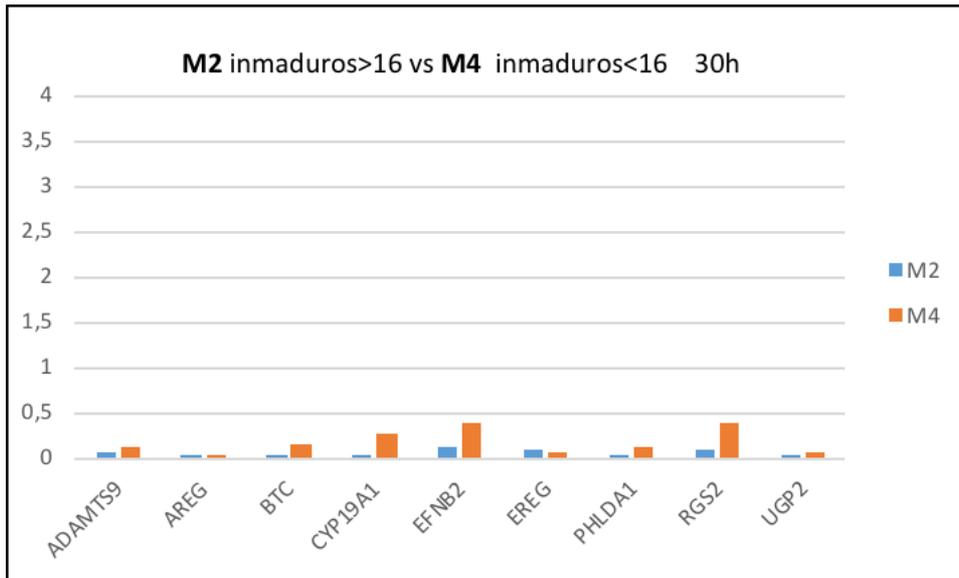
punción 30h) y M4 (Folículos inmaduros<16mm, punción a las 30h) no se obtuvo sobreexpresión.

Como mencionado anteriormente, en el grupo de Folículos>16mm se observó un menor número de genes con una sobreexpresión significativa. Para el grupo de muestras M5 (Folículos maduros>16mm, punción a las 40h) la expresión del RNAm del gen CYP19A1 fue 1.92 vs. 1. Para el grupo de muestras M1 (Folículos maduros>16mm, punción a las 30h) únicamente se observó sobreexpresión para el gen EFNB2 (2.44 vs. 1), mientras que para los grupos de muestras M2 (Folículos inmaduros>16mm, punción a las 30h) y M6 (Folículos inmaduros>16mm, punción a las 40h) no se observó sobreexpresión significativa.

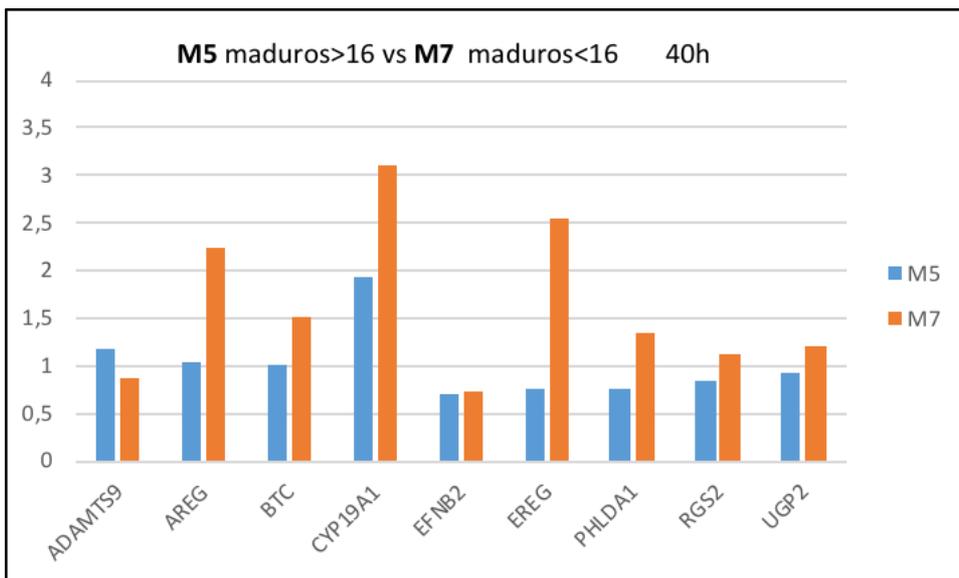
Para ver cómo podía variar la expresión en cada grupo de muestras se realizaron varias graficas comparando la expresión génica diferencial de los genes. Se compararon los grupos de ovocitos maduros>16mm y maduros<16mm a las 30 y 40h, y por otro lado se compararon los grupos de ovocitos inmaduros>16mm e inmaduros<16mm a las 30 y 40h, obteniéndose las siguientes gráficas:



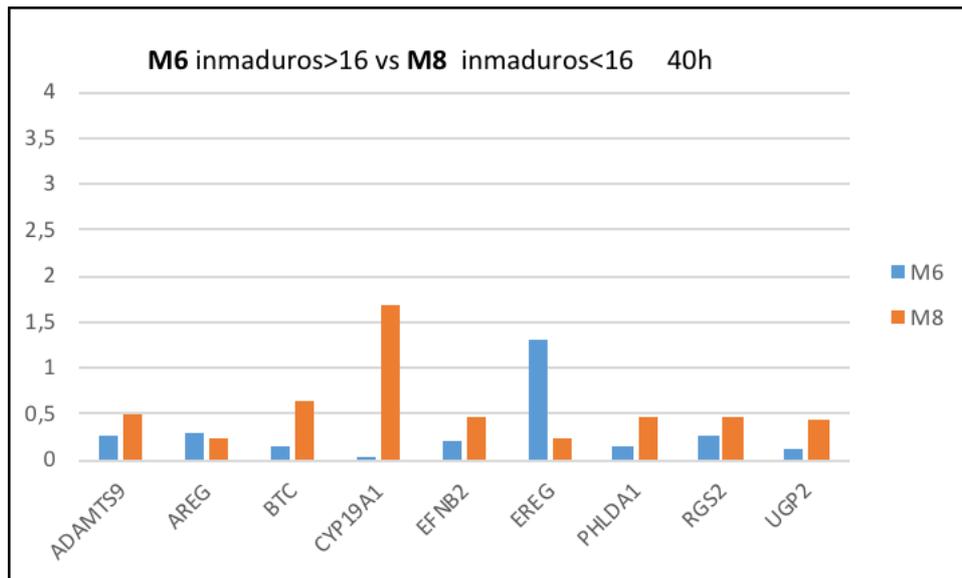
Abreviaturas: M1, folículos maduros mayores de 16mm, punción folicular a las 30h; M3, folículos maduros menores de 16mm, punción folicular a las 30h.



Abreviaturas: M2, folículos inmaduros mayores de 16mm, punción folicular a las 30h; M4, folículos inmaduros menores de 16 mm, punción folicular a las 30h.



Abreviaturas: M5; folículos maduros mayores de 16mm, punción folicular a las 40h; M7, folículos maduros menores de 16mm, punción folicular a las 40h.



Abreviaturas: M6, folículos inmaduros mayores de 16mm, punción folicular a las 40h; M8, folículos inmaduros menores de 16mm, punción folicular a las 40h.

Observando las gráficas se vio que se cumplía el patrón de expresión mostrado anteriormente; para el grupo M7 (Folículos maduros <16mm, punción a las 40h) era donde se obtenía una mayor sobreexpresión significativa de los genes que intervienen en los procesos de maduración ovocitaria coincidiendo como anteriormente según los otros parámetros de estudio (maduración ovocitaria y horas transcurridas desde la administración de GnRHa hasta la punción folicular).

6. Discusión

El presente estudio pretende discernir si el momento idóneo para la recuperación ovocitaria tras un ciclo de estimulación ovárica controlada sería a las 36h tal y como se ha estado llevando a cabo en los protocolos convencionales de hCG o si, por el contrario, en el caso de utilizar un análogo de GnRH, más concretamente, un agonista (GnRHa) como es el caso de este estudio, este intervalo de tiempo para la recuperación ovocitaria sería diferente.

Estudios previos evaluaron ya la necesidad de establecer un periodo de tiempo óptimo para la recolección ovocitaria en los casos de pacientes con una maduración ovocitaria y folicular anormal, sin que ninguno obtuviese resultados concluyentes que permitieran establecer y estandarizar este periodo (Orvieto 2015, 2016). En ellos se presupuso el intervalo a las 40h con GnRHa como el más indicado para pacientes con problemas de fertilidad, y había también quienes abogaban por el tiempo de recolección ovocitaria a las 34h para aquellas pacientes bajas respondedoras, a las 36h para las normo y altas respondedoras y por último, a las 40h a las pacientes con problemas anormales de maduración ovocitaria (Lin *et al.*, 2013; Orvieto 2015), ya que un acortamiento del intervalo entre el tratamiento de EOC y la punción folicular podría disminuir el porcentaje de ovocitos maduros (Humaidan *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011)

Con este fin, se procedió al análisis de la expresión génica en las células de la granulosa de los genes seleccionados reportados previamente en estudios relacionados con la ovulación en ciclos de reproducción asistida (Brown *et al.*, 2010; Fortune *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2014, 2016; Wissing *et al.*, 2014). Las células de la granulosa son las que envuelven al ovocito y son importantes durante la ovulación, de manera que su perfil molecular podría relevar diferencias en cuanto a la expresión de genes implicados en la maduración y ovulación, pudiendo así establecer qué tiempo de punción sería el óptimo para alcanzar la maduración ovocitaria final sin que llegue a producirse la ovulación espontánea (Haas *et al.*, 2014, 2016). Los genes seleccionados en base a literatura previa que están presentes en este estudio son ADAMTS9, AREG, BTC, CYP19A1, EFN2, EREG, PHLDA1, RGS2 y UGP2.

Se obtuvieron perfiles de expresión génica para cada grupo de estudio y para los 10 genes estudiados en el ensayo atendiendo a tres parámetros; horas transcurridas desde el tratamiento de EOC hasta la recuperación ovocitaria (grupo de 36h o grupo control y los grupos 30h y 40h), maduración ovocitaria (reinicio segunda meiosis) y expansión del cúmulo (tamaño folicular >16o <16mm).

En términos generales, se vió una mayor sobreexpresión de un mayor número de genes relacionados con la maduración y ovulación en el grupo de folículos maduros < 16mm (M7) a las 40h, como son AREG, BTC, CYP19A1, EREG, PHLDA1, RGS2 y UGP2. Por el contrario, en el perfil de expresión que mostraba el grupo a las 30h se ha observado una represión generalizada respecto a la referencia.

Atendiendo a las diversas funciones que llevan a cabo los genes seleccionado, el gen CYP19A1 (Citocromo P450 de la familia 19 y subfamilia A, polipéptido 1) es una aromatasa implicada en el proceso de la foliculogénesis inducido por la FSH. La aromatasa es una enzima responsable de la conversión de los andrógenos derivados de la teca a estrógenos en las células de la granulosa que estimula la proliferación de la células de la granulosa resultando en un crecimiento y expansión del folículo (Mendoza *et al.*, 2008; Wissing *et al.*, 2014). Como se observó en los resultados, este gen se vió sobreexpresado en el grupo M7(folículos<16mm, punción a las 40h) por lo que indicaba que, teniendo en cuenta el papel lleva a cabo durante la maduración ovocitaria y el desarrollo folicular (crecimiento y expansión del folículo), en el grupo de ovocitos donde hubiera mayor expresión de CYP19A1, el tiempo óptimo para realizar la punción folicular debía estar comprendido entre las 36 y 40 horas puesto que el folículo estaría empezando a prepararse para expulsar el ovocito maduro.

Los genes BTC, AREG y EREG participan en la maduración ovocitaria (Marina Ramos Montesdeoca 2017). AREG y EREG forman parte ambos de la familia de los factores de crecimiento epidérmicos y se inducen mediante LH y hCG en las células mural de la granulosa y en las células del cúmulo. La expresión de ambos, EREG y AREG, se vió aumentada tras ciclos de estimulación ovárica controlada (Wissing *et al.*, 2014; Zamah *et al.*, 2010). AREG, EREG y BTC inducen la expresión de la PTGS2, una prostaglandina sintetasa también llamada COX2, el TNF- α P6(el Factor Necrosis Tumoral alfa) y HAS2 (Hialuronano Sintasa 2), los cuales son necesarios para la síntesis y estabilización de la matriz extracelular de las células del *cumulus*, de la expansión del cúmulo y de la subsiguiente ovulación (Uyar *et al.*, 2013; Wissing *et al.*, 2014). Según se observó en los resultados obtenidos, había mayor expresión de los genes AREG y EREG en las células de la granulosa del grupo de ovocitos maduros pertenecientes a las pacientes a las que se les había realizado la punción folicular a las 40h y en folículos <16mm, es decir, el grupo de muestras M7, pudiendo significar que el tiempo óptimo para realizar la punción folicular debería estar comprendido entre las 36 y 40h debido a que, precisamente, ya se habría realizado la expansión del cúmulo y el ovocito recuperado en la punción folicular, instantes previos a la ovulación, sería un ovocito maduro.

Feuerstein *et al.* 2007 obtuvieron resultados en los que se asociaba un aumento de la expresión de los genes AREG, EREG y BTC después del reinicio de la meiosis y un aumento de la expresión de AREG con la maduración nuclear de las células del cúmulo.

Por otro lado, los genes UGP2 (UDP-glucosa pirofosforilasa 2) y RGS2 (Regulador de la proteína G Señalizadora 2) se han agrupado como posibles biomarcadores de embarazo en humanos (Ramos, 2017). Según otros autores como Royere *et al.* (2007) y Wissing *et al.* (2014), los genes UGP2 y RGS2 se vieron relacionados con el proceso final de maduración y se mostraban sobreexpresados después de un ciclo de EOC.

Otro de los resultados analizados fué la expresión génica atendiendo la maduración ovocitaria. Este parámetro se estudió anteriormente observándose un mayor número de ovocitos maduros con el uso de agonistas de GnRH para desencadenar la ovulación (Atef *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2015). Según este parámetro se analizaron los ovocitos en base a que fueran metafase II (maduros) o metafase I (inmaduros). Se pudo comprobar que se compartía un patrón de expresión común, siendo el grupo M7 (folículos maduros<16mm, punción a las 40h) el que de nuevo mostraba una sobreexpresión respecto al resto de grupos. Esto se corroboró mediante el análisis comparativo de los grupos de ovocitos maduros vs. inmaduros, a las 30 y 40 horas. Con estas graficas se pudo comprobar la apreciación respecto a los resultados anteriormente nombrados; hubo una mayor expresión en aquellos grupos clasificados como ovocitos maduros y por otro lado, el grupo de muestras M7 (folículos maduros<16mm, punción a las 40h) fue, de nuevo, el grupo que mayor número de genes involucrados en la maduración ovocitaria y ovulación presentaba sobreexpresados respecto al resto de grupo de muestras.

Atendiendo al tamaño folicular, se comprobó, primeramente, que el grupo de muestras con una mayor sobreexpresión era el grupo con un tamaño folicular<16mm de ovocitos maduros, de nuevo, el grupo M7. Se realizó un análisis más específico comparando los grupos de ovocitos maduros con diferentes tamaños foliculares, es decir, ovocitos maduros con un tamaño folicular mayor de 16mm y menor, a las 30, 36 y 40h.

Se repetía el patrón de expresión encontrado anteriormente; era a las 40h en el grupo de ovocitos maduros con un tamaño folicular menor de 16mm donde se encontraba una mayor sobreexpresión significativa de un mayor número de genes.

Por lo tanto, uno de los resultados más importantes obtenidos en el estudio fue poder seleccionar de entre todos los genes incluidos en el estudio, cuáles eran (AREG, BTC, CYP19A1,

EREG, PHLDA1, RGS2 y UGP2) los que dentro de un determinado grupo de muestras mostraban una mayor expresión génica en las células de la granulosa y por tanto, conocer si esta sobreexpresión podía conducir a determinar el momento más cercano a producirse la ovulación.

En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio revelaron que cuando se procedía a realizar un ciclo de estimulación ovárica controlada, el intervalo óptimo de tiempo que se debería de establecer desde que se administra a la paciente el agonista de la GnRH α , acetato de triptorelina, y se realiza la punción folicular, sería el de las 40 horas ya que es cuando los ovocitos han llevado a cabo la expansión del cúmulo y el reinicio de la segunda meiosis y, por consiguiente, presentan una madurez ovocitaria adecuada. Además, este intervalo de tiempo aseguraría que se realiza la recuperación ovocitaria antes de que tuviera lugar una ovulación espontánea de las pacientes y pudieran correr el riesgo de no obtener ovocitos al realizar la punción folicular puesto que éstos ya habrían sido liberados al exterior del folículo.

7. Conclusiones

En resumen, este estudio experimental se determina cual podría ser el intervalo óptimo de recolección ovocitaria en los tratamientos con Decapeptyl puesto que:

- ✓ Se determina que, de todos los genes incluidos en el estudio, aquellos que han permitido establecer el intervalo óptimo para realizar la punción folicular tras la administración de Decapeptyl, por la relación entre su patrón de expresión (Fold change \geq 2) en los distintos grupos de estudio (30, 36 y 40h) y el papel que desempeñan relacionado con el objetivo principal, son: AREG, EREG, CYP19A1 y BTC.
- ✓ A las 40h se han completado los procesos indispensables antes de la punción folicular como:
 - inicio de la formación del cuerpo lúteo
 - reinicio de la segunda división meiótica del ovocito, así como su liberación al líquido folicular
 - mantenimiento de la integridad del folículo
- ✓ El patrón de expresión reiterativo del grupo M7 (Folículos $<$ 16mm, punción a las 40h) obtenido en los resultados atendiendo a los 3 parámetros analizados (horas tras la administración del GnRH α , tamaño folicular y maduración ovocitaria) confirma la hipótesis de que se podría establecer el intervalo óptimo de tiempo para la punción folicular tras la administración de Decapeptyl como las 40h.

8. Referencias Bibliográficas

- Atef, A. , François, P. , Christian, V. and Marc-André, S. (2005), The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, 71: 358-367. doi:10.1002/mrd.20281
- Andersen CY, Humaidan P, Ejdrup HB, Bungum L, Grøndahl ML, Westergaard LG. Hormonal characteristics of follicular fluid from women receiving either GnRH agonist or hCG for ovulation induction. *Hum Reprod* 2006;**21**:2126–2130.
- Beckers NGM, Macklon NS, Eijkemans MJ, Ludwig M, Felberbaum RE, Diedrich K, Bustin S, Loumaye E, Fauser BCJM. Nonsupplemented Luteal Phase Characteristics after the Administration of Recombinant Human Chorionic Gonadotropin, Recombinant Luteinizing Hormone, or Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Agonist to Induce Final Oocyte Maturation in *in Vitro Ferti. J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:4186–4192.
- Borgbo T, Povlsen BB, Andersen CY, Borup R, Humaidan P, Grøndahl ML. Comparison of gene expression profiles in granulosa and cumulus cells after ovulation induction with either human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist trigger. *Fertil Steril* 2013;**100**:994–1001.e2.
- Brown HM, Robker RL, Russell DL. Development and hormonal regulation of the ovarian lymphatic vasculature. *Endocrinology* 2010;**151**:5446–5455.
- Buckett WM, Bentick B, Shaw RW. Induction of the endogenous gonadotrophin surge for oocyte maturation with intra-nasal gonadotrophin-releasing hormone analogue (buserelin): effective minimal dose. *Hum Reprod* 1998;**13**:811–814.
- ErnEsto EscudEro VELando Resumen L, Ernesto Escudero Correo electrónico L V, ErnEsto EscudEro VELando L. Revista Peruana de Ginecología y obstetricia 197. *Rev peru ginecol Obs* 2012;**58**:191–199.
- Evers JLH. Female subfertility. In: *Lancet*. Vol 360. Elsevier, 2002, 151–159.

- Farag AH, El-deen MHN, Hassan RM. Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonist versus human chorionic gonadotropin in polycystic ovarian syndrome. A randomized trial. *Middle East Fertil Soc J* 2015;**20**:217–223.
- Fauser BC, De Jong D, Olivennes F, Wramsby H, Tay C, Itskovitz-Eldor J, Van Hooren HG. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:709–715.
- Fortune JE, Willis EL, Bridges PJ, Yang CS. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod* 2009;**6**:60–71.
- Griesinger G, Diedrich K, Devroey P, Kolibianakis EM. GnRH agonist for triggering final oocyte maturation in the GnRH antagonist ovarian hyperstimulation protocol: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:159–168.
- Gudmundsson J, Fleming R, Jamieson ME, McQueen D, Coutts JRT. Luteinization to oocyte retrieval delay in women in whom multiple follicular growth was induced as part of an in vitro fertilization/gamete intrafallopian transfer program. *Fertil Steril* 1990;**53**:735–737.
- Haas J, Ophir L, Barzilay E, Machtinger R, Yung Y, Orvieto R, Hourvitz A. Standard human chorionic gonadotropin versus double trigger for final oocyte maturation results in different granulosa cells gene expressions: a pilot study. *Fertil Steril* 2016;**106**:653–659.e1.
- Haas J, Ophir L, Barzilay E, Yerushalmi GM, Yung Y, Kedem A, Maman E, Hourvitz A. GnRH agonist vs. hCG for triggering of ovulation - Differential effects on gene expression in human granulosa cells. *PLoS One* 2014;**9**:1–10.
- Hawkins S, Matzuk M. Menstrual Cycle : Basic Biology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;**1135**:10–18.
- Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod* 2007;**13**:209–223.
- Humaidan P, Bredkjær HE, Bungum L, Bungum M, Grøndahl ML, Westergaard L, Andersen CY.

GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: A prospective randomized study. *Hum Reprod* 2005;**20**:1213–1220.

Humaidan P, Kol S, Papanikolaou EG. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: Time for a change of practice? *Hum Reprod Update* 2011;**17**:510–524.

Itskovitz J, Boldes R, Levron J, Erlik Y, Kahana L, Brandes JM. Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist**Presented in part at the International Symposium on GnRH Analogues in Cancer and Human Reproduction, Geneva,. *Fertil Steril* 1991;**56**:213–220.

Lin MH, Shao-Ying Wu F, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lin SY, Hwu YM. Dual trigger with combination of gonadotropin-releasing hormone agonist and human chorionic gonadotropin significantly improves the live-birth rate for normal responders in GnRH-antagonist cycles. *Fertil Steril* 2013;**100**:1296–1302.

Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI. Study of the optimum time for human chorionic gonadotropin---Ovum pickup interval in in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1994;**11**:478–481.

Matorras R, Hernández J. *Estudio y tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Asociación Española de Andrología y de la Sociedad Es.* 2007.

Mendoza N, Morón F, Santalla Á. Genética de la osteoporosis posmenopáusica: nuevos conocimientos y nuevos conceptos sobre su relación con los polimorfismos genéticos en la ruta estrogénica. *Rev Esp Enfermedades Metab Oseas* 2008;**17**:106–111.

Miller I, Chuderland D, Ron-El R, Shalgi R, Ben-Ami I. GnRH agonist triggering modulates PEDF to VEGF ratio inversely to hCG in granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;**100**:E1428–E1436.

Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, Taieb J, Frydman R. Triggering of ovulation by a

- gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist in patients pretreated with a GnRH antagonist. *Fertil Steril* 1996;**66**:151–153.
- Orvieto R. A simplified universal approach to COH protocol for IVF: Ultrashort flare GnRH-agonist/GnRH-antagonist protocol with tailored mode and timing of final follicular maturation. *J Ovarian Res* 2015;**8**:4–9.
- Orvieto R. Triggering final follicular maturation—hCG, GnRH-agonist or both, when and to whom? *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:1415–1416.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SLC, Conti M. EGF-Like Growth Factors As Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. *Science (80-)* 2004;**303**:682–684.
- Ramos Montesdeoca M, Ávila Marrero Rebeca González Fernández Grado Biología JT. Analysis of gene expression in granulosa cells of ovarian follicles related to optimal oocyte maturation. 2017.
- Richardson RB, Allan DS, Le Y. Greater organ involution in highly proliferative tissues associated with the early onset and acceleration of ageing in humans. *Exp Gerontol* 2014;**55**:80–91.
- Romero FR. Artículo de revisión Estimulación ovárica controlada. Tiempo de reevaluar. 2010;**3**:1–9.
- Royere D, Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F. GENE expression in human cumulus cells: a way to approach oocyte competence. *Fertil Steril* 2007;**88**:S105.
- Soria M, Pradillo G, García J, Ramón P, Castillo A, Jordana C, Paricio P. Pregnancy predictors after intrauterine insemination: Analysis of 3012 cycles in 1201 couples. *J Reprod Infertil* 2012;**13**:158–166.
- Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 2013;**99**:1–31.
- Wang W, Zhang XH, Wang WH, Liu YL, Zhao LH, Xue SL, Yang KH. The time interval between

hCG priming and oocyte retrieval in ART program: A meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:901–910.

Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Høst T, Borup R, Grøndahl ML.
Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Hum Reprod* 2014;**29**:997–1010.

Zamah AM, Hsieh M, Chen J, Vigne JL, Rosen MP, Cedars MI, Conti M.
Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 2010;**25**:2569–2578.

9. Anexos

Anexo I. Diseño Placa 1 PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24						
A	M1 UGP2	M1 UGP2	M1 UGP2	M2 UGP2	M2 UGP2	M2 UGP2		M3 UGP2	M3 UGP2	M3 UGP2	M4 UGP2	M4 UGP2	M4 UGP2		M5 UGP2	M5 UGP2	M5 UGP2	M6 UGP2	M6 UGP2	M6 UGP2										
B	M7 UGP2	M7 UGP2	M7 UGP2	M8 UGP2	M8 UGP2	M8 UGP2		Mref1 UGP2	Mref1 UGP2	Mref1 UGP2	Mref2 UGP2	Mref2 UGP2	Mref2 UGP2		Mref3 UGP2	Mref3 UGP2	Mref3 UGP2	Mref4 UGP2	Mref4 UGP2	Mref4 UGP2										
C																														
D	M1 RGS2	M1 RGS2	M1 RGS2	M2 RGS2	M2 RGS2	M2 RGS2		M3 RGS2	M3 RGS2	M3 RGS2	M4 RGS2	M4 RGS2	M4 RGS2		M5 RGS2	M5 RGS2	M5 RGS2	M6 RGS2	M6 RGS2	M6 RGS2										
E	M7 RGS2	M7 RGS2	M7 RGS2	M8 RGS2	M8 RGS2	M8 RGS2		Mref1 RGS2	Mref1 RGS2	Mref1 RGS2	Mref2 RGS2	Mref2 RGS2	Mref2 RGS2		Mref3 RGS2	Mref3 RGS2	Mref3 RGS2	Mref4 RGS2	Mref4 RGS2	Mref4 RGS2										
F																														
G	M1 ADAMTS9	M1 ADAMTS9	M1 ADAMTS9	M2 ADAMTS9	M2 ADAMTS9	M2 ADAMTS9		M3 ADAMTS9	M3 ADAMTS9	M3 ADAMTS9	M4 ADAMTS9	M4 ADAMTS9	M4 ADAMTS9		M5 ADAMTS9	M5 ADAMTS9	M5 ADAMTS9	M6 ADAMTS9	M6 ADAMTS9	M6 ADAMTS9										
H	M7 ADAMTS9	M7 ADAMTS9	M7 ADAMTS9	M8 ADAMTS9	M8 ADAMTS9	M8 ADAMTS9		Mref1 ADAMTS9	Mref1 ADAMTS9	Mref1 ADAMTS9	Mref2 ADAMTS9	Mref2 ADAMTS9	Mref2 ADAMTS9		Mref3 ADAMTS9	Mref3 ADAMTS9	Mref3 ADAMTS9	Mref4 ADAMTS9	Mref4 ADAMTS9	Mref4 ADAMTS9										
I																														
J	M1 EFNB2	M1 EFNB2	M1 EFNB2	M2 EFNB2	M2 EFNB2	M2 EFNB2		M3 EFNB2	M3 EFNB2	M3 EFNB2	M4 EFNB2	M4 EFNB2	M4 EFNB2		M5 EFNB2	M5 EFNB2	M5 EFNB2	M6 EFNB2	M6 EFNB2	M6 EFNB2										
K	M7 EFNB2	M7 EFNB2	M7 EFNB2	M8 EFNB2	M8 EFNB2	M8 EFNB2		Mref1 EFNB2	Mref1 EFNB2	Mref1 EFNB2	Mref2 EFNB2	Mref2 EFNB2	Mref2 EFNB2		Mref3 EFNB2	Mref3 EFNB2	Mref3 EFNB2	Mref4 EFNB2	Mref4 EFNB2	Mref4 EFNB2										
L																														
M	M1 18S	M1 18S	M1 18S	M2 18S	M2 18S	M2 18S		M3 18S	M3 18S	M3 18S	M4 18S	M4 18S	M4 18S		M5 18S	M5 18S	M5 18S	M6 18S	M6 18S	M6 18S										
N	M7 18S	M7 18S	M7 18S	M8 18S	M8 18S	M8 18S		Mref1 18S	Mref1 18S	Mref1 18S	Mref2 18S	Mref2 18S	Mref2 18S		Mref3 18S	Mref3 18S	Mref3 18S	Mref4 18S	Mref4 18S	Mref4 18S										
O																														
P																					C- 18S	C- EFNB2	C- ADAMTS9	C- RGS2	C- UGP2					
	TOTAL REACCIONES POR GEN						40	UGP2			RGS2			ADAMTS9			EFNB2													
								total reacciones por gen			40			total reacciones por gen			40			total reacciones por gen			40							
PROGRAMA	18s		µl 1 reacción				gen1		µl 1 reacción			gen2		µl 1 reacción			gen3		µl 1 reacción			gen4		µl 1 reacción						
50º 2 MIN	c DNA		1				c DNA		1			c DNA		1			c DNA		1			c DNA		1						
95º 10 MIN	H2O		3,5			140	H2O		3,5			140	H2O		3,5			140	H2O		3,5			140	H2O		3,5			140
	Taqman		5			200	Taqman		5			200	Taqman		5			200	Taqman		5			200	Taqman		5			200
45 CICLOS	20X AOD		0,5			20	20X AOD		0,5			20	20X AOD		0,5			20	20X AOD		0,5			20	20X AOD		0,5			20
95º 15 SEG																														
60º 1 MIN																														

Anexo II. Diseño Placa 2 PCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24					
A	M1 AREG	M1 AREG	M1 AREG	M2 AREG	M2 AREG	M2 AREG		M3 AREG	M3 AREG	M3 AREG	M4 AREG	M4 AREG	M4 AREG		M5 AREG	M5 AREG	M5 AREG	M6 AREG	M6 AREG	M6 AREG									
B	M7 AREG	M7 AREG	M7 AREG	M8 AREG	M8 AREG	M8 AREG		Mref1 AREG	Mref1 AREG	Mref1 AREG	Mref2 AREG	Mref2 AREG	Mref2 AREG		Mref3 AREG	Mref3 AREG	Mref3 AREG	Mref4 AREG	Mref4 AREG	Mref4 AREG									
C	M1 EREG	M1 EREG	M1 EREG	M2 EREG	M2 EREG	M2 EREG		M3 EREG	M3 EREG	M3 EREG	M4 EREG	M4 EREG	M4 EREG		M5 EREG	M5 EREG	M5 EREG	M6 EREG	M6 EREG	M6 EREG									
D	M7 EREG	M7 EREG	M7 EREG	M8 EREG	M8 EREG	M8 EREG		Mref1 EREG	Mref1 EREG	Mref1 EREG	Mref2 EREG	Mref2 EREG	Mref2 EREG		Mref3 EREG	Mref3 EREG	Mref3 EREG	Mref4 EREG	Mref4 EREG	Mref4 EREG									
E	M1 CD24	M1 CD24	M1 CD24	M2 CD24	M2 CD24	M2 CD24		M3 CD24	M3 CD24	M3 CD24	M4 CD24	M4 CD24	M4 CD24		M5 CD24	M5 CD24	M5 CD24	M6 CD24	M6 CD24	M6 CD24									
F	M7 CD24	M7 CD24	M7 CD24	M8 CD24	M8 CD24	M8 CD24		Mref1 CD24	Mref1 CD24	Mref1 CD24	Mref2 CD24	Mref2 CD24	Mref2 CD24		Mref3 CD24	Mref3 CD24	Mref3 CD24	Mref4 CD24	Mref4 CD24	Mref4 CD24									
G	M1 PHLDA1	M1 PHLDA1	M1 PHLDA1	M2 PHLDA1	M2 PHLDA1	M2 PHLDA1		M3 PHLDA1	M3 PHLDA1	M3 PHLDA1	M4 PHLDA1	M4 PHLDA1	M4 PHLDA1		M5 PHLDA1	M5 PHLDA1	M5 PHLDA1	M6 PHLDA1	M6 PHLDA1	M6 PHLDA1									
H	M7 PHLDA1	M7 PHLDA1	M7 PHLDA1	M8 PHLDA1	M8 PHLDA1	M8 PHLDA1		Mref1 PHLDA1	Mref1 PHLDA1	Mref1 PHLDA1	Mref2 PHLDA1	Mref2 PHLDA1	Mref2 PHLDA1		Mref3 PHLDA1	Mref3 PHLDA1	Mref3 PHLDA1	Mref4 PHLDA1	Mref4 PHLDA1	Mref4 PHLDA1									
I	M1 BTC	M1 BTC	M1 BTC	M2 BTC	M2 BTC	M2 BTC		M3 BTC	M3 BTC	M3 BTC	M4 BTC	M4 BTC	M4 BTC		M5 BTC	M5 BTC	M5 BTC	M6 BTC	M6 BTC	M6 BTC									
J	M7 BTC	M7 BTC	M7 BTC	M8 BTC	M8 BTC	M8 BTC		Mref1 BTC	Mref1 BTC	Mref1 BTC	Mref2 BTC	Mref2 BTC	Mref2 BTC		Mref3 BTC	Mref3 BTC	Mref3 BTC	Mref4 BTC	Mref4 BTC	Mref4 BTC									
K	M1 CYP19A1	M1 CYP19A1	M1 CYP19A1	M2 CYP19A1	M2 CYP19A1	M2 CYP19A1		M3 CYP19A1	M3 CYP19A1	M3 CYP19A1	M4 CYP19A1	M4 CYP19A1	M4 CYP19A1		M5 CYP19A1	M5 CYP19A1	M5 CYP19A1	M6 CYP19A1	M6 CYP19A1	M6 CYP19A1									
L	M7 CYP19A1	M7 CYP19A1	M7 CYP19A1	M8 CYP19A1	M8 CYP19A1	M8 CYP19A1		Mref1 CYP19A1	Mref1 CYP19A1	Mref1 CYP19A1	Mref2 CYP19A1	Mref2 CYP19A1	Mref2 CYP19A1		Mref3 CYP19A1	Mref3 CYP19A1	Mref3 CYP19A1	Mref4 CYP19A1	Mref4 CYP19A1	Mref4 CYP19A1									
M	M1 18S	M1 18S	M1 18S	M2 18S	M2 18S	M2 18S		M3 18S	M3 18S	M3 18S	M4 18S	M4 18S	M4 18S		M5 18S	M5 18S	M5 18S	M6 18S	M6 18S	M6 18S									
N	M7 18S	M7 18S	M7 18S	M8 18S	M8 18S	M8 18S		Mref1 18S	Mref1 18S	Mref1 18S	Mref2 18S	Mref2 18S	Mref2 18S		Mref3 18S	Mref3 18S	Mref3 18S	Mref4 18S	Mref4 18S	Mref4 18S									
O																													
P																		C- 18S	C- CYP19A1	C- BTC	C- PHLDA1	C- CD24	C- EREG	C- AREG					
TOTAL REACCIONES POR GEN						40	AREG			EREG			CD24			PHLDA1													
							total reacciones por gen			total reacciones por gen			total reacciones por gen			total reacciones por gen													
PROGRAMA	18s		µl 1 reacción			gen1			µl 1 reacción			gen2			µl 1 reacción			gen3			µl 1 reacción			gen4			µl 1 reacción		
50º 2 MIN	c DNA		1			c DNA			1			c DNA			1			c DNA			1			c DNA			1		
95º 10 MIN	H2O		3,5			H2O			3,5			H2O			3,5			H2O			3,5			H2O			3,5		
	Taqman		5			Taqman			5			Taqman			5			Taqman			5			Taqman			5		
45 CICLOS	20X AOD		0,5			20X AOD			0,5			20X AOD			0,5			20X AOD			0,5			20X AOD			0,5		
95º 15 SEG																													
60º 1 MIN																													
						BTC			CYP19A1																				
						total reacciones por gen			total reacciones por gen			total reacciones por gen			total reacciones por gen														
						gen5			µl 1 reacción			gen6			µl 1 reacción														
						c DNA			1			c DNA			1														
						H2O			3,5			H2O			3,5														
						Taqman			5			Taqman			5														
						20X AOD			0,5			20X AOD			0,5														