

# **TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**en**

## **Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida**

### **ESTUDIO NO INVASIVO DE MARCADORES DE CALIDAD OVOCITARIA, ¿CUÁLES SON LOS MÁS PROMETEDORES?**

**Autor:** Jesús Garzón Ganaza

**Tutoras:** Irene Rubio Palacios, Ana Isabel Rodríguez Learte

**Alcobendas, septiembre 2023**

# INDICE

<b>1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE</b> .....	<b>4</b>
<b>2. ABSTRACT AND KEY WORDS</b> .....	<b>4</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
3.1 TÉCNICAS NO INVASIVAS DE SELECCIÓN DE OVOCITOS.....	7
3.1.1 VALORACIÓN CONVENCIONAL DE PARÁMETROS MORFOLÓGICOS .....	7
3.1.2 ESTUDIO DEL HUSO MEIÓTICO .....	9
3.2 DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA PREDECIR LA CALIDAD OVOCITARIA .....	10
3.2.1 ESTUDIO DEL LÍQUIDO FOLICULAR .....	10
3.2.2 ESTUDIO DE CÉLULAS DEL CÚMULO.....	11
3.2.3 ESTUDIO DEL MEDIO DE CULTIVO .....	13
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>5. MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
6.1 LÍQUIDO FOLICULAR .....	16
6.1.1 ESTUDIO DEL ADN LIBRE EN EL LÍQUIDO FOLICULAR .....	16
6.1.2 ESTUDIO DE METABOLITOS PRESENTES EN EL LÍQUIDO FOLICULAR .....	19
6.1.3 PROTEÍNAS EN EL LÍQUIDO FOLICULAR .....	22
6.2 CÉLULAS DEL CÚMULO .....	24
6.2.1 ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO .....	25
6.2.2 DAÑO EN EL ADN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO.....	29
6.2.3 EL ADN MITOCONDRIAL Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD OVOCITARIA .....	31
6.3 MEDIO DE CULTIVO .....	32
6.3.1 EL CONSUMO DE OXÍGENO COMO BIOMARCADOR DE CALIDAD OVOCITARIA .....	32
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>37</b>

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Selección de artículos sobre el estudio del ADN libre en el líquido folicular .....	19
Tabla 2. Selección de artículos sobre el estudio del metaboloma y proteoma del líquido folicular .....	24
Tabla 3. Selección de artículos sobre estudio del transcriptoma de las células del cúmulo .....	29

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Etapas del desarrollo del folículo en el ovario .....	6
Figura 2. Parámetros morfológicos usados para analizar la calidad ovocitaria.....	9
Figura 3. Regulación de factores secretados por el ovocito sobre las células del cúmulo .....	12
Figura 4. Técnicas no invasivas de análisis de calidad ovocitaria .....	14
Figura 5. Extracción de metabolitos volátiles del líquido folicular.....	21
Figura 6. Análisis bioinformático del proteoma del líquido folicular .....	23
Figura 7. Expresión relativa de PTEN en células del cúmulo.....	27
Figura 8. Gráficas de expresión de $\gamma$ -H2AX y proteínas de reparación del ADN .....	31

## **RESUMEN Y PALABRAS CLAVE:**

Uno de los factores que más condiciona las tasas de éxito en los tratamientos de reproducción asistida es la calidad ovocitaria. El incremento de los casos de infertilidad en los últimos años, y la gran variabilidad de pacientes que acuden a consulta a someterse a un tratamiento hace que las tasas de éxito sean también muy variables. La selección de ovocitos de alta calidad, es decir, con un alto potencial de desarrollarse y generar un recién nacido vivo mediante técnicas de diagnóstico no invasivas que no comprometan este potencial, es cada vez más necesaria. En esta revisión analizaremos las últimas investigaciones realizadas en el desarrollo de técnicas no invasivas de análisis de calidad ovocitaria.

**Palabras clave:** Infertilidad, ovocito, calidad ovocitaria, técnicas de reproducción asistida, no invasivo.

## **ABSTRACT AND KEY WORDS:**

One of the factors that conditions the success rates in assisted reproduction treatments is oocyte quality. The increase in cases of infertility in recent years, and the great variability of patients who come to the clinic to undergo treatment means that the success rates are also highly variable. The selection of high quality oocytes (with a high potential to develop and generate a live newborn) by non-invasive diagnostic techniques that do not compromise this potential is increasingly necessary. In this review we will analyze the latest research carried out in the development of non-invasive techniques for the analysis of oocyte quality.

**Key words:** Infertility, oocyte, oocyte quality, assisted Reproduction techniques, non-invasive.

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema cada vez más común en nuestra sociedad debido a fenómenos sociales que han cambiado el estilo de vida de la población, particularmente la edad para tener descendencia. Esto ha causado un aumento considerable en la aplicación y desarrollo de tratamientos de reproducción asistida (TRA) (1). A pesar de ello, las tasas de éxito son muy variables en función del perfil de los pacientes, así como del centro en el que se realicen los tratamientos.

Las tasas de éxito de este tipo de tratamientos se ven muy afectadas, entre otros factores, por la calidad de los ovocitos, que determina en gran parte el desarrollo embrionario posterior a la fecundación (2). Por este motivo, un aspecto muy importante en la aplicación de estos tratamientos es la selección de los mejores ovocitos (es decir, los ovocitos de mejor calidad), lo que nos permitirá obtener embriones de alta calidad y tratar así de obtener mayores tasas de recién nacido vivo (1).

Cuando hablamos de calidad ovocitaria, hablamos de la capacidad del ovocito de llevar a cabo correctamente la meiosis y la capacidad de llevar a cabo un correcto desarrollo embrionario, que en conjunto se denomina competencia ovocitaria. La posibilidad de distinguir ovocitos con una mayor competencia del resto de ovocitos de la cohorte a la hora de realizar un TRA tiene muchos beneficios. Entre ellos, los más relevantes son: incrementar las tasas de recién nacido vivo, disminuir las tasas de aborto, la posibilidad de realizar tratamientos menos agresivos en los que se priorice la calidad a la cantidad de ovocitos recuperados tras una estimulación, generar una menor cantidad de embriones (que puedan generar un excedente que no se llega a utilizar) y reducir los costes de los tratamientos (ya que se reducirían los gastos de criopreservación y estimulación entre otros) (3).

En los tratamientos de reproducción asistida, los ovocitos se obtienen mediante punción ovárica y se encuentran detenidos en metafase II. En ellos se pueden distinguir diferentes estructuras: núcleo, citoplasma, membrana plasmática, corpúsculo polar, zona pelúcida y corona radiata (Figura 1).

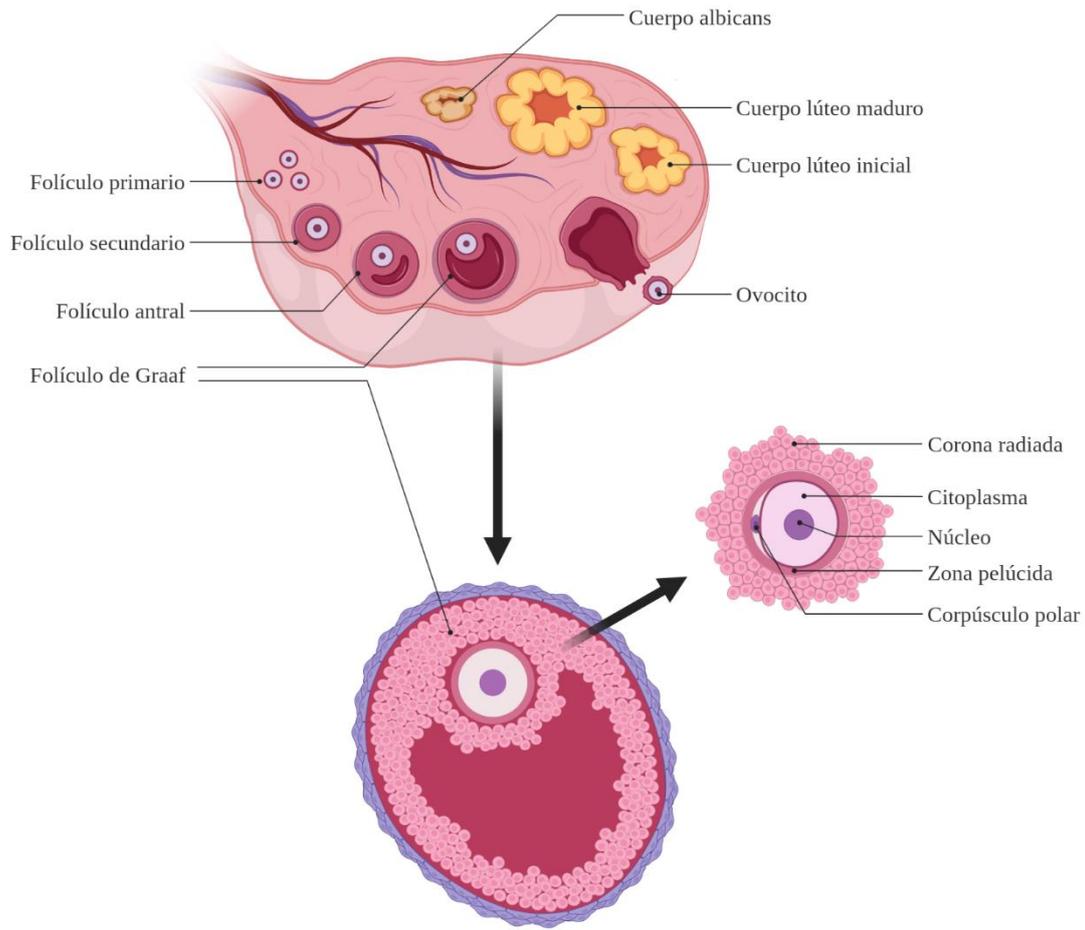


Figura 1. Representación gráfica de las diferentes etapas de desarrollo del folículo en el ovario y las distintas partes de las que se compone el ovocito (elaboración propia con BioRender.com).

Un problema a solventar de la estimulación ovárica es que en comparación con el proceso in vivo, donde la maduración ovocitaria y selección del folículo dominante se producen por acción de las hormonas endógenas, al suministrar gonadotropinas de forma exógena se suprime este proceso de selección intrínseca. Los ovocitos que de forma natural no llegarían a madurar por no tener las características óptimas, durante la estimulación si lo hacen, lo que podría provocar que al usarlos en el tratamiento no obtengamos los resultados esperados y se produzcan desde fallos de fecundación, hasta fallos en el desarrollo embrionario, llegando incluso a poder afectar a la salud de la descendencia en caso de producirse recién nacido vivo (3).

Para poder determinar cuáles de los ovocitos de una paciente son los que tienen una mayor competencia el embriólogo necesita contar con herramientas que le permitan hacer esa

valoración. Dentro de esas herramientas hay técnicas invasivas y no invasivas. Las primeras son las que implican la modificación o extracción parcial de la materia biológica a analizar, como puede ser la biopsia de los corpúsculos polares (en la que podemos analizar las posibles anomalías producidas en la primera y segunda división meiótica del ovocito); las segundas, o no invasivas, son las que implican la observación de parámetros morfológicos o cinéticos, o bien analizan el entorno del ovocito, pero sin alterar su integridad. A continuación, comenzaremos hablando de las técnicas no invasivas más clásicas, basadas en la evaluación de diferentes parámetros morfológicos del ovocito.

### **Técnicas no invasivas de selección de ovocitos:**

Las técnicas no invasivas de evaluación de ovocitos permiten realizar un cribaje que, a diferencia de otras técnicas como la biopsia de los corpúsculos polares, no afectan al ovocito ni a su capacidad de desarrollo. La mayoría se basan en el análisis de las propiedades morfológicas del ovocito y analizan tanto su forma, como las diferentes estructuras que lo componen (Figura 2) (2).

#### **1. Valoración convencional de parámetros morfológicos**

La valoración convencional de la calidad ovocitaria se suele hacer a dos niveles: durante la obtención de los ovocitos en la punción y aspiración folicular y tras la decumulación de las células de la granulosa.

- En primer lugar, tras la obtención de los ovocitos valoramos el complejo cúmulo ovocito; los parámetros morfológicos que muestran una mayor relación con la calidad ovocitaria son la presencia de coágulos de sangre y el nº de células apoptóticas, ambos asociados a ovocitos de peor calidad y peores resultados en TRA. También se puede valorar el grado de expansión de las células del cúmulo (en diferentes estudios se ha asociado la expansión de las células del cúmulo y de la granulosa a mejores resultados).
- A continuación, siempre que no se vaya a realizar una FIV (Fecundación *in vitro*) convencional, se decumulan los ovocitos. Este paso es crucial ya que durante la microinyección de espermatozoides podemos verificar visualmente que se ha realizado correctamente la técnica. La decumulación se lleva a cabo mediante

procesos químicos y mecánicos: primero se expone el COC a la enzima hialuronidasa y después se separa el ovocito del cúmulo haciéndolo pasar por una pipeta en diámetros de menor calibre cada vez (3).

Tras la decumulación, podemos estudiar otras estructuras como la zona pelúcida, en cuyo caso se suele estudiar la birrefringencia de su capa interna, que es el parámetro más informativo; se ha descrito que ovocitos con mayores índices de birrefringencia presentan mayor calidad embrionaria y mayores tasas de embarazo y RNV (Recién nacido vivo). También podemos estudiar las características del corpúsculo polar, de la membrana plasmática o del ooplasma: factores como la presencia de vacuolas, granulación, agregados SER (del inglés *Smooth Endoplasmic Reticulum*) y múltiples dimorfismos se asocian a ovocitos con peores resultados en TRA (1).

Actualmente, los parámetros morfológicos son los más utilizados para evaluar la calidad de los ovocitos. Por ejemplo, la guía de “Criterios ASEBIR de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos” (4), creada por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, es una de las más usadas en las clínicas para la evaluación de parámetros morfológicos. En el caso del ovocito, los parámetros presentes en la guía son:

a) Alteraciones morfológicas citoplasmáticas:

- Agrupación de orgánulos/granulosidad localizada en el centro del oocito.
- Agregación de retículo endoplasmático liso (AREL).
- Vacuolas.
- Inclusiones citoplasmáticas.

b) Alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas:

- Restos celulares en el espacio perivitelino.
- Anomalías de la zona pelúcida.
- Espacio perivitelino aumentado.
- Alteraciones del primer corpúsculo polar: fragmentación y tamaño.

c) Complejo cúmulo-corona radiata-ovocito (Anexo A)

Sin embargo, el estudio de estos parámetros es subjetivo y puede dar lugar a sesgos intra- e inter-observador (2). Por este motivo, desde hace ya años se investiga en la búsqueda

de nuevas técnicas no invasivas que permitan obtener la información necesaria para determinar la competencia ovocitaria sin afectar a su potencial de desarrollo (4).

## 2. Estudio del huso meiótico:

El desarrollo de la microscopía con luz polarizada ha permitido observar estructuras biológicas cuyas moléculas se encuentran ordenadas de un modo particular, como pueden ser la membrana o microtúbulos. Estas estructuras presentan propiedades birrefringentes que permiten estudiarlas bajo este tipo de microscopía, y dependiendo de sus propiedades físicas, medir su grado de ordenamiento.

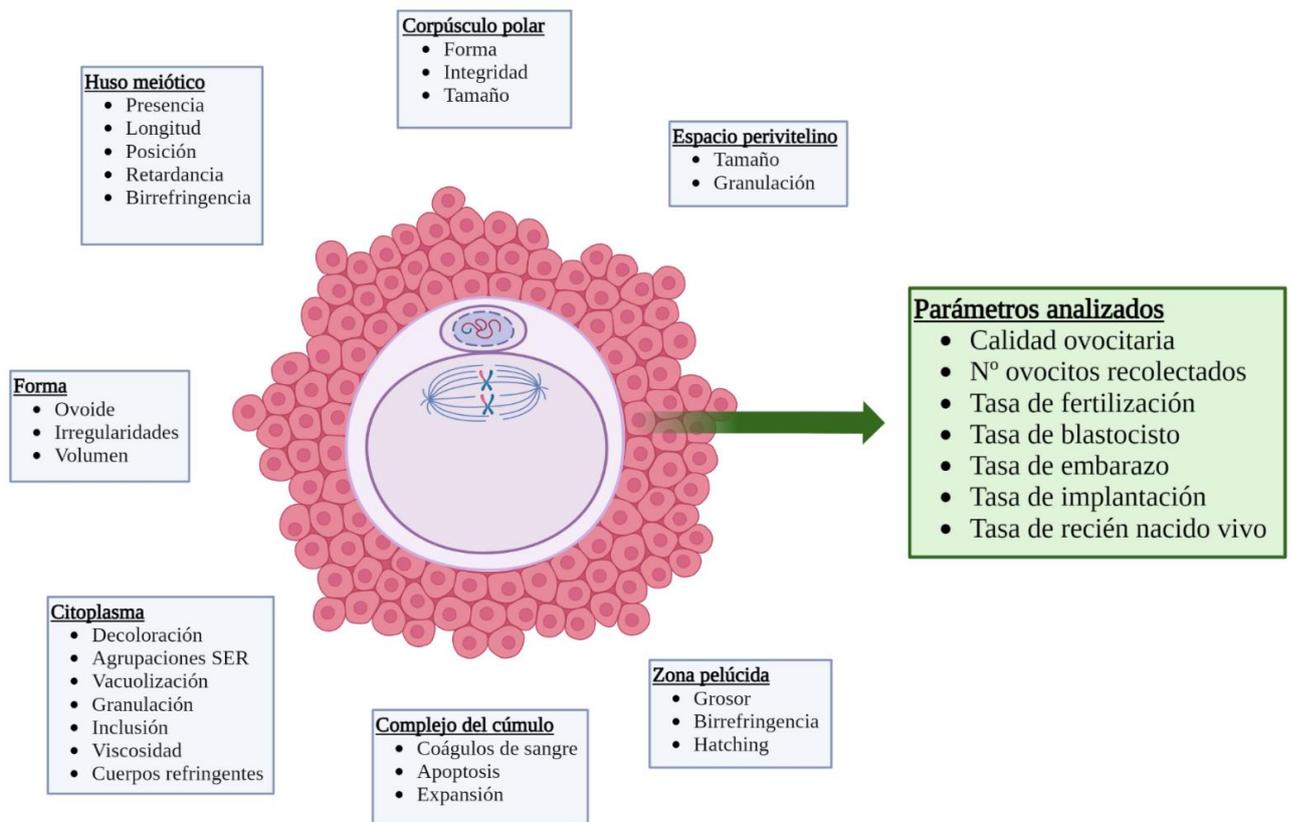


Figura 2. Parámetros morfológicos usados para analizar la calidad ovocitaria en TRA, elaboración propia con BioRender.com inspirada en (1).

Una de las estructuras que se pueden estudiar bajo este tipo de microscopía es el huso meiótico: mediante el uso de luz polarizada se analiza la presencia, tamaño, forma y retardancia, entre otros parámetros. En diferentes estudios se ha observado que ovocitos con husos mayores de 12  $\mu\text{m}$ , con mayor retardancia y una forma ordenada presentaban mejores resultados en el TRA (1).

## **Desarrollo de nuevas técnicas no invasivas para predecir la calidad ovocitaria:**

El desarrollo de estas nuevas técnicas viene de la mano del desarrollo de las tecnologías -ómicas. Estas tecnologías se caracterizan por manejar grandes cantidades de datos:

- **Genómica:** estudio del genoma de una célula. El genoma se definiría como el conjunto del material genético presente en una célula.
- **Transcriptómica:** estudio de los perfiles de expresión génica, al conjunto de moléculas de ARN (Ácido ribonucleico) presentes en una etapa determinada se denomina transcriptoma.
- **Metabolómica:** estudio de los metabolitos presentes en células o fluidos. El metaboloma sería el conjunto de los metabolitos presentes en una etapa determinada.
- **Proteómica:** estudio de todas las proteínas expresadas o presentes en una célula o fluido. Por lo tanto, al conjunto de proteínas presentes se le considera proteoma.

En la búsqueda de biomarcadores para conocer la calidad ovocitaria podemos trabajar sobre diferentes elementos en torno al ovocito. Los que vamos a desarrollar en este apartado son tres: el estudio del líquido folicular, el estudio de las células del cúmulo y el estudio del medio de cultivo (figura 4).

### **1. Estudio del líquido folicular:**

El líquido folicular rodea al óvulo y a las células de la granulosa, proporcionando un ambiente óptimo para que se produzca correctamente el desarrollo y maduración del ovocito. Está formado por las secreciones de distintos tipos celulares, entre los que se encuentran el propio ovocito, células de la granulosa y células de la teca, y por componentes del plasma sanguíneo (5).

La composición del líquido folicular es muy variada, principalmente proteínas, hormonas esteroideas y lípidos, entre otras moléculas. Esta composición es reflejo directo del metabolismo de las células a las que baña el líquido folicular, por lo que su estudio podría aportar información relevante acerca de la calidad del ovocito.

El desarrollo de tecnologías como la espectrofotometría de masas ha permitido realizar análisis cuantitativos de moléculas de bajo peso molecular de muestras de distinta

naturaleza (tejidos celulares, fluidos...), lo que nos permite realizar perfiles metabolómicos y, potencialmente, descubrir nuevos biomarcadores de calidad ovocitaria mediante el uso de métodos no invasivos como en este caso el análisis del líquido folicular (5).

Además de estas moléculas, recientemente se ha descubierto la presencia de fragmentos de ADN (Ácido desoxirribonucleico) libre en diferentes fluidos corporales como la sangre, orina, saliva y, también, líquido folicular. A pesar de no conocerse exactamente las razones por la que este ADN es liberado por las células, se sabe que puede ser de forma activa (como es el caso de algunas patologías como el cáncer) o de forma pasiva mediante procesos de apoptosis o necrosis. El análisis de estos fragmentos de ADN en el líquido folicular, al proceder del ovocito, células de la granulosa y células de la teca, podría servir como marcador para analizar el estado y calidad del ovocito (6).

## **2. Estudio de células del cúmulo:**

Los ovocitos y las células del cúmulo se encuentran estrechamente ligadas a lo largo de todo el proceso de desarrollo y maduración del ovocito, estando en constante intercambio de señales paracrinas y metabolitos a través de uniones gap comunicantes. La formación y correcto desarrollo del complejo cúmulo-ovocito es esencial, tanto es así que la correcta expansión de las células del cúmulo durante el periodo preovulatorio es fundamental para la ovulación (7).

En diferentes estudios se ha observado que los principales factores secretados por el ovocito que regulan las funciones de las células del cúmulo son factores pertenecientes a la superfamilia TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) y BMP15 (Polimorfismos de la proteína 15 morfogénica ósea), que inducen o regulan una gran cantidad de genes en las células del cúmulo, como por ejemplo PTGER2 (receptor de prostaglandina E2), HAS2 (hialuronano-sintasa 2) o CYP19A1 (gen que codifica la enzima aromatasas) entre otros genes. Estos dos factores son los reguladores clave en la diferenciación de las células del cúmulo. La comunicación entre ambos tipos celulares es muy compleja y dinámica, y parece tener una gran importancia en el desarrollo de la competencia ovocitaria (Figura 3) (7).

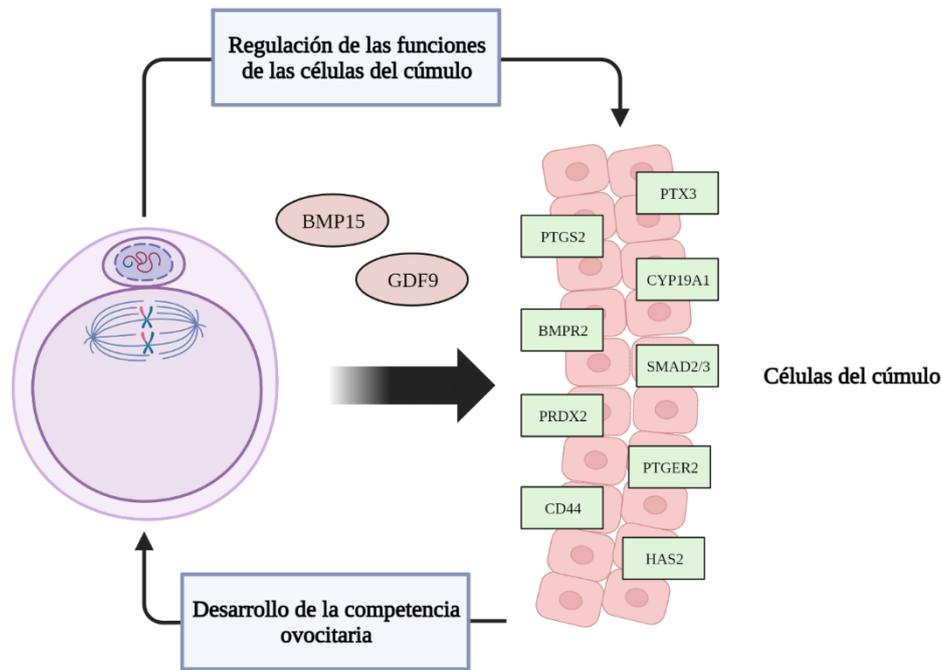


Figura 2. Regulación de factores secretados por el ovocito en diferentes genes de las células del cúmulo, elaboración propia con BioRender.com inspirada en (7).

Los recientes avances en las tecnologías -ómicas han permitido comenzar a estudiar las células del cúmulo y descubrir el importante papel que este tipo celular ejerce sobre el correcto desarrollo del ovocito. Gracias a esto se están descubriendo nuevos biomarcadores que potencialmente podrían relacionarse con la calidad ovocitaria (3).

Los avances más relevantes se han producido en el estudio del transcriptoma y del proteoma de las células del cúmulo:

- En recientes estudios se ha descubierto la posible relación entre la expresión de genes individuales y la maduración ovocitaria, viabilidad embrionaria y tasa de recién nacido vivo. Actualmente, los estudios se centran en crear modelos basados en un pool de genes que permita clasificar los ovocitos en función de su potencial.
- Al igual que con el transcriptoma, al estudiar el proteoma de las células del cúmulo se han descubierto diversas proteínas diferencialmente expresadas en complejos cúmulo ovocito, y podría ser de gran utilidad desarrollar modelos predictores de calidad ovocitaria (3).

### 3. Estudio del medio de cultivo:

El ovocito se encuentra en un estrecho contacto con el medio que lo rodea, con un constante intercambio de moléculas entre ambos. Por lo tanto, los metabolitos producidos en el interior del ovocito se pueden encontrar en el medio en el que se encuentra. (3).

Tras el protocolo de estimulación de la paciente y la punción ovárica, y hasta que los ovocitos sean fecundados, se deben mantener en las condiciones óptimas para que su calidad no se vea mermada, por eso se mantienen en incubadoras de cultivo. En este periodo, suelen estar depositados en placas o en gotas en medio de cultivo específico, y en él seguiría ocurriendo ese intercambio de metabolitos que ocurría en el líquido folicular. En algunos casos, normalmente en el contexto de trabajos de investigación o en países donde su regulación lo permite, aquellos que no son MII en el momento de la decumulación se someten a un protocolo de IVM (de las siglas en inglés *in vitro maturation*).

En diferentes estudios se ha postulado que la función celular podría estudiarse a partir de la concentración de los metabolitos presentes en el medio de cultivo, y el hecho de que el metaboloma sea en comparación al genoma y al transcriptoma, mucho más pequeño, muestra un gran potencial como método no invasivo de análisis. Esto es posible gracias al desarrollo de plataformas de análisis de metabolitos, como pueden ser las técnicas de resonancia magnética nuclear y la espectrofotometría de masas. Con estas técnicas podríamos llegar a desarrollar perfiles metabolómicos del ovocito que nos permitan distinguir entre aquellos de alta y de baja calidad (3). Podríamos decir que el desarrollo de perfiles metabolómicos del medio de cultivo podría ser un método no invasivo para seleccionar aquellos ovocitos de mejor calidad en tratamientos de reproducción asistida.

Aparte del estudio directo de los metabolitos producidos por el ovocito, también se puede estudiar su metabolismo con otras técnicas. Una de las técnicas que podían parecer prometedoras y se desarrollaron en la historia reciente fue el estudio del consumo de oxígeno como marcador de calidad ovocitaria (8). Lo veremos también más adelante en el trabajo.

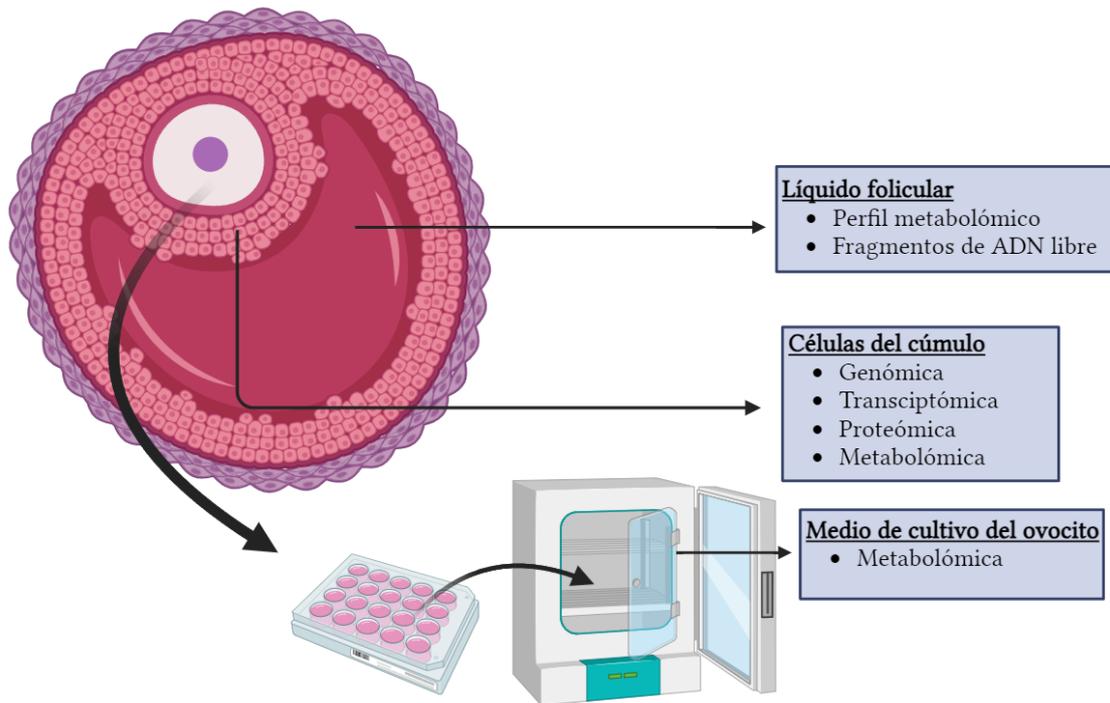


Figura 3. Esquema de los tipos de técnicas no invasivas de análisis de calidad ovocitaria que se abordarán en la revisión. Elaboración propia, creada con BioRender.com

## OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión es conocer el estado actual de las diferentes técnicas no invasivas de análisis de la calidad ovocitaria y los últimos avances que se han logrado en el desarrollo de estas técnicas. Además, se pretende comparar las distintas opciones y discutir cuales de ellas parecen más prometedoras para su futuro uso en el día a día de los laboratorios de reproducción asistida.

## MÉTODOS

Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica, se realizó una búsqueda de artículos científicos entre el 1 de febrero y el 30 de abril del 2023. La búsqueda se realizó en las bases de datos Pubmed y Medline, priorizando aquellos artículos publicados después del 2018, siempre realizando la búsqueda en inglés e incluyendo en la revisión solo aquellos artículos que estuvieran publicados en este idioma.

En las bases de datos se realizó una búsqueda avanzada en la que se utilizaron palabras clave utilizando los términos “*oocyte quality*”, “*non-invasive*”, “*biomarkers*” junto al uso de operadores booleanos, en este caso AND, para obtener una visión general para abordar

el tema, y después se concretó más la búsqueda añadiendo a los términos utilizados anteriormente los términos “*cumulus cells*”, “*follicular fluid*” y “*culture media*”. Además, tras la lectura y análisis de determinados artículos se revisó la bibliografía de estos como búsqueda adicional.

Los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículos en inglés</li> <li>• Artículos relacionados con el estudio de técnicas no invasivas para estudiar la calidad ovocitaria.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Artículos en idiomas diferentes al inglés.</li> <li>• Artículos publicados con anterioridad al 2010.</li> <li>• Estudios no realizados en seres humanos.</li> <li>• Artículos no disponibles.</li> </ul>

Se extrajeron los datos relevantes de cada estudio, se organizó y sintetizó la información utilizando tablas para una mejor comprensión y presentación de los datos.

En resumen, se llevó a cabo una revisión de la literatura científica utilizando criterios de inclusión y exclusión predefinidos. Se extrajeron los datos relevantes de cada estudio seleccionado y se realizó una evaluación crítica de la calidad metodológica de los mismos. Los resultados obtenidos se sintetizaron y se presentaron de manera clara y concisa para responder a los objetivos planteados en esta revisión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado organizaremos los artículos estudiados en función de la muestra biológica en la que se estudien los potenciales biomarcadores para predecir la calidad ovocitaria: líquido folicular, medio de cultivo donde se cultivan los ovocitos y células del cúmulo.

### 1. Líquido folicular:

El líquido folicular se encuentra en íntimo contacto con el ovocito a lo largo del proceso de desarrollo y maduración de este, y además se puede obtener de una manera muy

sencilla cuando se realiza la punción ovárica en un tratamiento de reproducción asistida. Este medio presenta un gran potencial como marcador de calidad del ovocito, debido tanto a su estrecha relación con el mismo como su fácil obtención.

#### **A) Análisis del ADN libre en el líquido folicular:**

El ADN libre en el líquido folicular liberado por las células del complejo cúmulo-ovocito ha sido uno de los componentes más estudiados en los últimos años por su gran potencial como marcador del estado de desarrollo del complejo. Las investigaciones se han centrado principalmente en la medición de los niveles globales de ADN libre, el origen de los fragmentos de ADN presentes en el líquido folicular y en la ratio ADN mitocondrial/ADN nuclear para descubrir la posible relación que pudiera existir entre el ADN libre presente en el líquido folicular y el éxito del TRA.

El grupo de Casteleiro y colaboradores realizó un estudio con muestras de líquido folicular obtenidas en pacientes menores de 39 años con infertilidad sometidas a TRA. Obtuvieron un total de 178 muestras de pacientes. Se extrajo el ADN de las muestras y se cuantificó el ADN libre mediante una rt-qPCR (del inglés *real time polymerase chain reaction*) con el “primer” ALU115 para amplificar fragmentos cortos (de origen apoptótico) y largos (de origen no apoptótico o necrótico), y el “primer” ALU247 para amplificar solamente fragmentos largos. De esta manera se calculó la ratio q247/q114 para analizar la integridad del ADN. Observaron que las muestras de líquido folicular de mujeres mayores de 35 años tenían una concentración de ADN libre mayor que muestras de mujeres menores de 35 ( $9.7 \pm 1.1$  vs  $10.1 \pm 1.2$   $p < 0.05$ ) (ratio q247/q115). Además, se encontraron niveles de q247 (niveles de fragmentos largos no apoptóticos de ADN) más altos en mujeres con un factor asociado a infertilidad que en mujeres con infertilidad no específica ( $p < 0.05$ ), y la misma situación se observó al comparar mujeres que no consiguieron embarazo con aquellas en las que si se confirmó el embarazo tras el TRA ( $p < 0.05$ ). También observaron que en **embriones con mayores tasas de fragmentación los niveles de ADN libre eran significativamente mayores que en embriones con bajas tasas de fragmentación** ( $9.5 \pm 1$  vs  $10.2 \pm 1.2$   $p < 0.05$ ) (ratio q247/q115) (6).

En otro estudio en el que también se analizó el ADN libre en el líquido folicular, Latif Khan y colaboradores obtuvieron 895 muestras de líquido folicular de 3.255 mujeres con infertilidad sometidas a TRA. Al igual que en el anterior estudio obtuvieron las muestras mediante punción ovárica guiada y analizaron los niveles de melatonina y  $17\beta$ -estradiol;

extrajeron el ADN libre para cuantificarlo mediante rt-qPCR con los “primers” ALU115 y ALU247. Los niveles de ADN libre fueron mayores en muestras de mujeres que no quedaron embarazadas en comparación con muestras de mujeres que si lo consiguieron ( $2.85\pm 0.49$  vs  $1.93\pm 0.87$   $p<0.05$ ) (ng/ml). En cuanto al análisis de los niveles de melatonina, se observó que los niveles intrafoliculares de melatonina eran significativamente más elevados en mujeres que habían conseguido embarazo que en las que no ( $96,34\pm 110,3$  vs  $73.61\pm 70.36$   $p<0.05$ ) (pg/ml). Además, observaron que embriones de división lenta con menos de 6 células en día 3 presentaban menores niveles de melatonina ( $p<0.001$  en grupo de embarazadas y no embarazadas) y estradiol intrafolicular, y a su vez mayores niveles de ADN libre en el líquido folicular que embriones con más de 6 células en día 3 ( $p<0.001$  en grupo de embarazadas y no embarazadas) (9).

Los diferentes estudios mostraron que los **niveles de ADN libre más bajos estaban asociados a ovocitos de alta calidad** (a menores niveles, mayor calidad del ovocito), ya que la concentración de ADN libre en el líquido folicular incrementaba con la edad y también en pacientes que no quedaban embarazadas. En consonancia, igualmente se evidenció que la proporción de fragmentos no apoptóticos estaba correlacionada positivamente con la infertilidad.

Por otra parte, el estudio de Latif Khan y colaboradores mostró que los **niveles de melatonina eran más elevados en pacientes que quedaron embarazadas respecto a las que no lo consiguieron.**

Estos resultados muestran que la cuantificación del ADN libre en el líquido folicular podría ser un marcador no invasivo usado para la selección de ovocitos de alta calidad y con mayor potencial para usar en los TRA.

Otro de los estudios incluidos se centró en el estudio del ADN mitocondrial (ADNm) libre en el líquido folicular; dirigido por Liu y colaboradores, recogieron 225 muestras de 92 pacientes que estaban siendo sometidas a TRA, en las que se extrajo el ADNm libre y se realizó una rt-qPCR donde se utilizaron “primers” para amplificar  $\beta$ -globina (gen del genoma nuclear) y ND1 (gen del genoma mitocondrial). **La ratio ADN libre mitocondrial/ADN libre nuclear (ND1/ $\beta$ -globina) era significativamente menor en embriones con mejor llegada a blastocisto que en aquellos que no habían llegado a desarrollarse hasta esa etapa** ( $2.84(1.53-6.99)$  vs  $7.8(4.66-10.34)$   $p<0.05$ ) (ratio

qND1/q  $\beta$ -globina). También se observó que esta ratio era significativamente menor en el grupo de pacientes <38 años respecto al >38 años ( $0.22 \pm 0.0855$   $p < 0.05$ ) (Coeficiente de regresión  $\beta$ ) (10).

Huo y colaboradores realizaron un estudio con 30 pacientes control y 30 pacientes con endometriosis sometidas a fecundación *in vitro*, de las que se recolectaron muestras de líquido folicular en el momento de la punción ovárica. Realizaron rt-qPCR con “primers” para la detección de  $\beta$ -actina y ND1 y también los niveles de ADN mitocondrial en las células de la granulosa (granulosa mural y cúmulo) de las mismas muestras, usando la misma técnica que en el líquido folicular. Los resultados mostraron que las muestras de líquido folicular de pacientes con endometriosis contenían niveles de ADN libre mitocondrial mayores que las muestras control ( $0.53 \pm 0.22$  vs  $0.42 \pm 0.16$   $p < 0.05$ ). A su vez, los niveles de ADN mitocondrial en las células de la granulosa resultaron ser menores en las muestras de pacientes con endometriosis que en el grupo control ( $1.09 \pm 0.30$  vs  $1.55 \pm 0.34$   $p < 0.05$  en células de la granulosa mural) ( $1.95 \pm 0.62$  vs  $2.47 \pm 0.60$   $p < 0.01$  en células del cúmulo). Estos resultados muestran la relación inversamente proporcional que existe entre los niveles de ADN mitocondrial libre y los de las células de la granulosa (11).

Por tanto, los niveles de ADN libre mitocondrial en el líquido folicular parecen estar asociados a la calidad del ovocito, ya que los resultados de ambos estudios sugieren que **bajos niveles de ADN libre mitocondrial estaban asociados a embriones de mejor calidad** y a pacientes menores de 38 años. Se vieron también niveles más elevados de ADN mitocondrial en pacientes con endometriosis, mostrando el potencial que este marcador podría tener para predecir la calidad ovocitaria.

Autor y año de publicación	Diseño	Tamaño muestral (n)	Edad	Limitaciones del estudio	Conclusión
Casteleiro et al (2023) (6)	Estudio prospectivo	178 pacientes	>39 años	El uso de gonadotropinas externas interfiere con la esteroidogénesis folicular, y podría causar que la concentración de ADN libre sea más elevada.	La concentración de ADN libre en el líquido folicular podría reflejar el estado del ovocito en el COC y podría ser usado como biomarcador no invasivo para seleccionar los ovocitos de mayor calidad.
Latif Khan et al (2019) (9)	Estudio prospectivo	325 pacientes	30.01 ± 0.39	“	Altos niveles de ADN libre podrían estar asociados a peores resultados en TRA y a ovocitos de peor calidad. La melatonina podría ser útil como biomarcador no invasivo, ya que altos niveles en el líquido folicular parecen estar asociados a mejores resultados.
Liu et al (2019) (10)	Estudio prospectivo	92 pacientes	≥38 años	Tamaño muestral pequeño. La evaluación embrionaria se realizó mediante observación estática y no mediante tecnología Time-Lapse.	Cambios en la concentración relativa de ADN libre mitocondrial están asociados con la edad y con el correcto desarrollo embrionario.
Huo et al (2020) (11)	Estudio de casos y controles	60 pacientes	30.6 ± 3.5 años vs 30,5 ± 3.3 años	Tamaño muestral pequeño. Uso de pocos marcadores en el estudio.	Mitocondrias disfuncionales en células de la granulosa podrían provocar que estas células liberen ADN mitocondrial al líquido folicular y por tanto altos niveles estén asociados a ovocitos de peor calidad.

Tabla 4. Tabla resumen de los artículos seleccionados sobre el estudio de los niveles de ADN libre en el líquido folicular. Elaboración propia.

## B) Estudio de metabolitos presentes en el líquido folicular:

De la misma manera que con el ADN libre, el estudio de los metabolitos presentes en el líquido folicular ha sido un campo en auge en los últimos años bajo la idea de que ciertos componentes presentes en el entorno en el que se desarrolla y madura el ovocito podrían ser usados como biomarcadores para seleccionar los ovocitos con mayor potencial de fecundación y desarrollo embrionario.

El grupo de Guan y colaboradores estudió los metabolitos en el líquido folicular y en el medio de cultivo del embrión en busca de metabolitos que pudieran predecir el resultado del TRA en mujeres con y sin SOP (síndrome del ovario poliquístico). Para realizar la

investigación, recogieron muestras de 60 pacientes sometidas a TRA, 30 como grupo control y 30 con SOP. Las muestras se sometieron a cromatografía líquida de ultra alta presión y espectrofotometría de masas para analizar los metabolitos presentes en ellas. Se analizaron distintos parámetros para evaluar el resultado del tratamiento: tasa de embarazo, recién nacido vivo y aborto. Vieron que 11 metabolitos estaban expresados diferencialmente en el líquido folicular comparando pacientes con y sin SOP. A partir de estos metabolitos, realizaron una regresión logística para analizar cuales estaban relacionados con los resultados del tratamiento a partir de curvas ROC. Los metabolitos en el líquido folicular que mostraron ser predictores del potencial del ovocito tanto en el grupo control como en el grupo con SOP en el tratamiento fueron los siguientes: (12)

- **LPE:** marcador predictor de embarazo y recién nacido vivo para pacientes control (AUC=0.733) y marcador predictor de aborto de pacientes con SOP (AUC=0.824).
- **Ácido lisofosfatídico:** marcador de embarazo (AUC=0.89) y de recién nacido vivo (AUC=0.88) para pacientes con SOP.
- **Linoleil carnitina:** marcador de aborto en pacientes con SOP (AUC=0.706).
- **Sulfato de Androsterona:** marcador de aborto en pacientes con SOP (AUC=0.941).
- **DG (18:2(9Z,12Z)/15:0/0:0):** marcador de embarazo (AUC=0.733) y de recién nacido vivo (AUC=0.733) para pacientes control y de aborto (AUC=0.706) para pacientes con SOP (12)

La volatolómica es una rama de la metabolómica centrada en el estudio de los VOCs (del inglés *volatile organic compounds*) producidos por un fluido, como en este caso, el líquido folicular. El estudio de estos VOCs ha mostrado gran relevancia en diferentes patologías como el cáncer o la esquizofrenia, asociados a determinados patrones volatolómicos que podrían servir como biomarcadores de estas enfermedades. En la búsqueda de metabolitos que pudieran servir de biomarcadores de calidad ovocitaria, el grupo de Brinca y colaboradores realizó un estudio en el que analizaron el perfil volatolómico de mujeres control y de mujeres diagnosticadas con distintas causas de infertilidad. Recolectaron muestras de líquido folicular de 52 pacientes que estaban siendo sometidas a TRA; de ellas 17 fueron controles y 35 tenían alguna causa de infertilidad: 15 pacientes con SOP, 8 con endometriosis y 12 con fallo ovárico precoz.

Una vez obtuvieron las muestras, extrajeron los metabolitos volátiles con una aguja de microextracción en fase sólida (Figura 5) y realizaron una GC-MS (del inglés *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) (13).

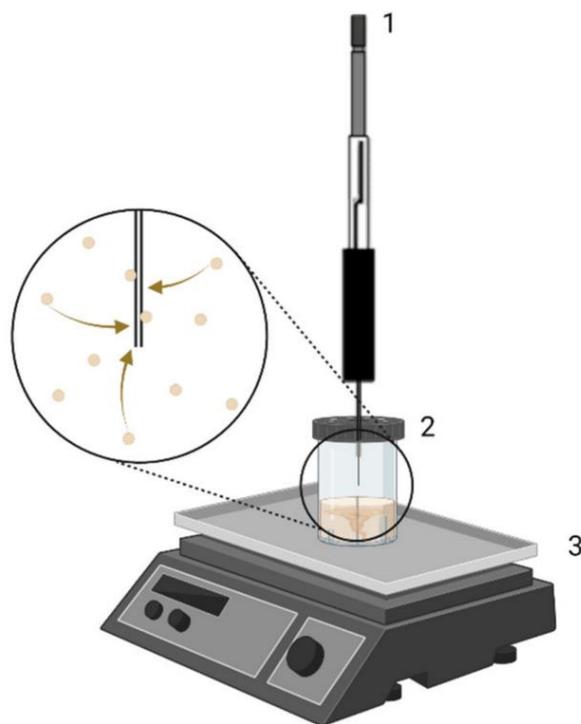


Figura 5. Representación esquemática de la extracción de metabolitos volátiles del líquido folicular; (1) Aguja de micro extracción en fase sólida; (2) Recipiente con la muestra de líquido folicular; (3) Base calefactable (13)

Se identificaron un total de 136 VOCs en las muestras, de los cuales 37 estaban presentes en todas ellas. El análisis estadístico multivariante que se realizó en estos 37 compuestos mostró que estaban diferencialmente expresados en muestras de diferentes patologías, creando perfiles metabólicos definidos y asociados a cada una de ellas. (13) Esta investigación concluyó que se podían desarrollar perfiles metabólicos asociados a las distintas causas de infertilidad. A pesar de ser necesario realizar más investigaciones en este campo, los resultados de este estudio muestran que si sería posible identificar biomarcadores de calidad ovocitaria a partir del estudio de los metabolitos volátiles del líquido folicular.

Siguiendo la línea de estos trabajos, el grupo de Ílhan y colaboradores estudiaron los niveles de citoquinas pro- y antiinflamatorias, y el índice de estrés oxidativo (OSI, del inglés *Oxidative Stress Index*) en el líquido folicular de mujeres con reserva ovárica disminuida y su posible uso como biomarcadores de calidad, capacidad de fecundación,

desarrollo embrionario y de conseguir un embarazo de los ovocitos. Recogieron muestras de un total de 23 mujeres infértiles con reserva ovárica disminuida, de las que se analizaron un total de 79 muestras de líquido folicular. De las muestras de líquido folicular se analizaron la capacidad antioxidante total (TAS, del inglés *Total Antioxidative Status*), capacidad oxidante total (TOS, del inglés *Total Oxidant Status*), OSI (índice calculado con TOS/TAS), niveles de tiol, IL-6, IL-8 (citoquinas proinflamatorias) e IL-10 (citoquinas antiinflamatorias). Todos estos marcadores del estado del ambiente folicular analizados en las muestras se compararon con distintos parámetros de los ovocitos: calidad ovocitaria, calidad embrionaria y tasa de embarazo. Observaron que **niveles bajos de TOS** ( $50.98 \pm 12.69$  vs  $57.03 \pm 8.51$   $p < 0.05$ ) y de IL6 ( $1.08 \pm 0.10$  vs  $1.43 \pm 0.55$   $p < 0.05$ ) **estaban asociados a obtención de ovocitos más maduros en la punción**. Además, observaron que **niveles bajos de IL8 estaban significativamente asociados a embarazo** ( $95.42 \pm 10.21$  vs  $84.11 \pm 2.17$   $p\text{-valor} < 0.05$ ) (14).

El estudio del metabolismo de las células del COC (del inglés *Cumulus oocyte complex*) a partir de las moléculas presentes en el líquido folicular parece tener un gran potencial como biomarcador de calidad ovocitaria y como marcadores para diagnosticar posibles causas de infertilidad. Al tratarse de una técnica no invasiva, el desarrollo de perfiles metabólicos para la selección de ovocitos con mayor potencial podría ser de gran utilidad a la hora de mejorar los resultados de los tratamientos en mujeres infértiles.

### **C) Proteínas en el líquido folicular:**

Como hemos visto anteriormente, el líquido folicular contiene una gran cantidad de componentes que pueden afectar de forma positiva o negativa a la maduración del ovocito. Su composición es dinámica, y la concentración de muchos de sus componentes podría ser utilizada para predecir la calidad de los ovocitos. Al igual que con otros componentes como el ADN libre o los metabolitos, se ha sugerido que las proteínas presentes en el líquido folicular podrían estar relacionadas con el proceso de maduración del ovocito y por tanto ser predictores de la calidad de este.

Wang y colaboradores realizaron un estudio en el que trataron de encontrar proteínas diferencialmente expresadas en muestras de líquido folicular que se pudieran relacionar con el grado de madurez de los ovocitos. Para ello, recogieron muestras de 62 pacientes,

30 control y 32 con reserva ovárica disminuida, que estaban siendo sometidas a TRA. De las muestras se extrajeron las proteínas, se digirieron con tripsina y las mezclas de péptidos fueron cuantificadas mediante análisis iTRAQ-2D LC-MS/MS. Observaron

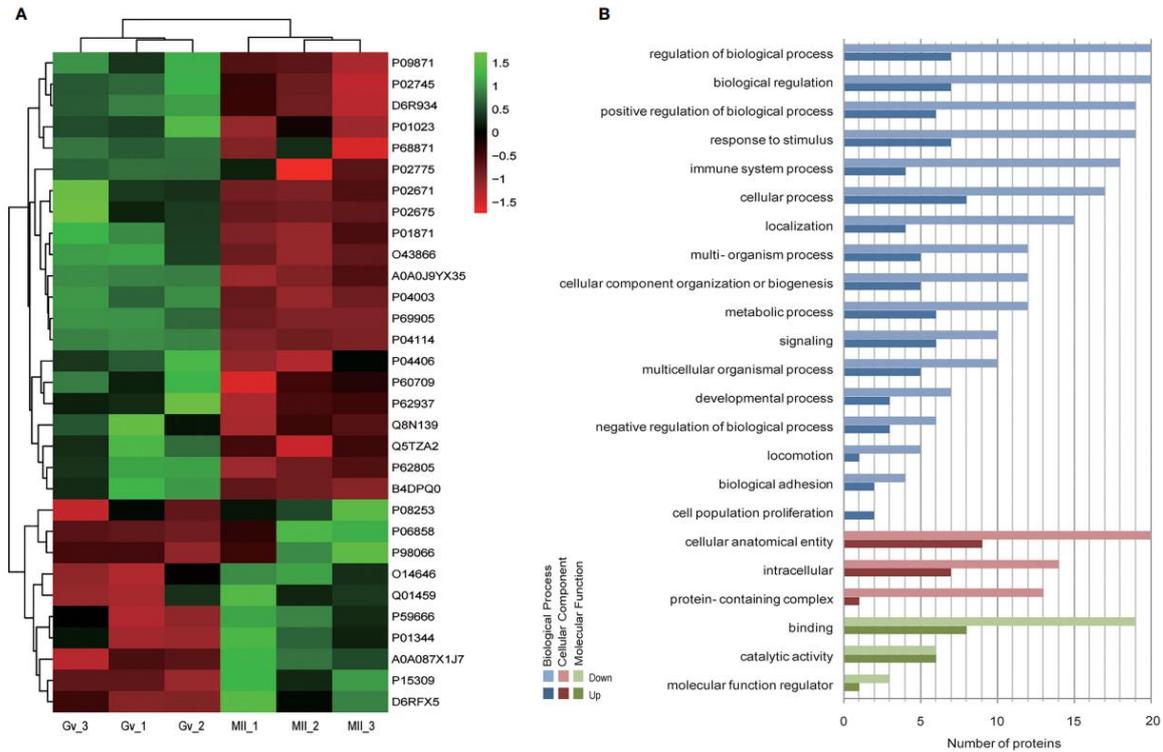


Figura 6. Análisis bioinformático de las distintas proteínas que se encontraban diferencialmente expresadas y que podrían ser utilizadas como biomarcadores de calidad ovocitaria. A) Análisis de grupos para la expresión diferencial de proteínas entre ambos grupos. B) Análisis de la ontología génica de las proteínas diferencialmente expresadas (15).

diferencias significativas en la expresión de 31 proteínas entre ambos grupos, incluyendo un total de 10 proteínas sobre expresadas en el grupo control ( $p < 0.05$ ) y 21 infra expresadas ( $p < 0.05$ ) (Figura 6) (15).

Un total de **41 proteínas se encontraron diferencialmente expresadas entre ambos grupos**, siendo las proteínas relacionadas con la proliferación celular las más dispares. Estudios realizados con anterioridad mostraron que las proteínas **ACPP** (del inglés *Prostatic acid phosphatase*) y **CD5L** (glicoproteína secretada por macrófagos) podrían tener un gran potencial como proteínas marcadoras de calidad ovocitaria. En este estudio mediante una prueba ELISA observaron que estaban diferencialmente expresadas entre ovocitos inmaduros y maduros, estando ACPP sobre expresado en ovocitos maduros y CD5L en ovocitos inmaduros (ACPP  $p$  valor  $< 0.0001$ ; CD5L  $p$  valor  $< 0.0001$ ). Además, al comparar la expresión de estas 2 proteínas en el grupo control y el grupo de pacientes

con reserva ovárica disminuida, observaron que ACPP tenía una expresión relativa mayor en el grupo control ( $p$  valor $<0.001$ ) y CD5L se encontraba en mayor cantidad en el grupo con reserva ovárica disminuida ( $p$  valor $<0.0001$ ), aunque este último resultado no era estadísticamente significativo al estudiar la expresión relativa (15).

Autor y año de publicación	Diseño	Tamaño muestral (n)	Edad	Limitaciones del estudio	Conclusión
Guan et al (2022) (12)	Estudio de casos y controles	60	$\geq 35$ años	El estudio se realizó en un centro con un tamaño muestral pequeño.	Los metabolitos encontrados en el líquido folicular eran diferentes en el grupo control y el grupo con SOP. Múltiples metabolitos lipídicos sirvieron como biomarcadores de los resultados del TRA.
Brinca et al (2022) (13)	Estudio de casos y controles	52	-	Estudio piloto para futuras investigaciones.	37 metabolitos diferencialmente expresados en las muestras de pacientes con distintas patologías mostraron era posible desarrollar perfiles metabolómicos asociados a estas y usar determinados metabolitos como biomarcadores para los distintos tipos de infertilidad.
Ílhan et al (2023) (14)	Estudio prospectivo	23	23-45 años	Tamaño muestral muy pequeño por estrictos criterios de inclusión y exclusión.	El estado oxidativo y las citoquinas proinflamatorias del líquido folicular estaban asociados al grado de madurez de los ovocitos y embarazo.
Wang et al (2022) (15)	Estudio de casos y controles	62	$34.56 \pm 4.72$ años vs $32.30 \pm 4.15$ años	Tamaño muestral pequeño.	Un total de 31 proteínas mostraron estar relacionadas con la madurez del ovocito. ACPP y CD5L podrían tener un papel crucial en la calidad del ovocito.

Tabla 2. Tabla resumen de los artículos seleccionados sobre el estudio del metaboloma y proteoma del líquido folicular. Elaboración propia.

## 2. Células del cúmulo

Las células del cúmulo juegan un papel crucial en el proceso de maduración ovocitaria y foliculogénesis. En los últimos años son muchos los estudios en los que se ha correlacionado la expresión génica de las células del cúmulo con variables como la madurez ovocitaria o tasas de fecundación, de desarrollo embrionario, de implantación o de embarazo (16).

### A) Estudio del transcriptoma de las células del cúmulo:

El equipo de Kahraman y colaboradores estudió la relación entre la expresión génica en las células del cúmulo, el tamaño folicular y el desarrollo embrionario. Para ello analizaron la expresión de 5 genes que en estudios previos habían demostrado estar regulados por señales ovocitarias relacionadas con el metabolismo de las células del cúmulo y del proceso de expansión:

- Hialuronano sintasa 2 (HAS2): juega un papel importante en la formación y expansión del cúmulo.
- Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (PTGS2): relacionada con la competencia ovocitaria y la expansión del cúmulo.
- Proteína relacionada con la pentraxina 3 (PTX3): interacciona con HAS2 en la matriz del cúmulo expandido.
- Factor de necrosis tumoral inducida por alfa 3 (TNFAIP6): sintetizado por células del cúmulo y granulosa en folículos preovulatorios.
- Factor de crecimiento 9 (GDF9): factor secretado por el ovocito que juega un papel importante en el desarrollo folicular.

Recogieron muestras de 2.495 COCs de 184 pacientes que estaban siendo sometidas a TRA. El tamaño de los folículos se midió en el momento de la punción, y se clasificaron como pequeños aquellos <17mm. Tras la punción se decumularon los ovocitos, se midió el desarrollo de los embriones hasta la implantación y de las células del cúmulo se extrajeron el ARN; generaron copias de ADNc con un kit de transcripción de alta fidelidad. Finalmente realizaron una RT-PCR para cuantificar los niveles de expresión de los distintos genes en cada muestra. Los resultados del estudio mostraron que los ovocitos de folículos de mayor tamaño llegaban más a blastocisto que los de folículos de pequeño tamaño (45% vs 32%  $p<0.05$ ). Observaron que **PTGS2 estaba más expresado en folículos de mayor que de menor tamaño** ( $p<0.05$ ). Además, los resultados mostraron que **HAS2 y PGTS2 estaban sobre expresados en folículos de gran tamaño que llegaron a blastocisto comparado con los que no lo hicieron** ( $p<0.05$ ) (16).

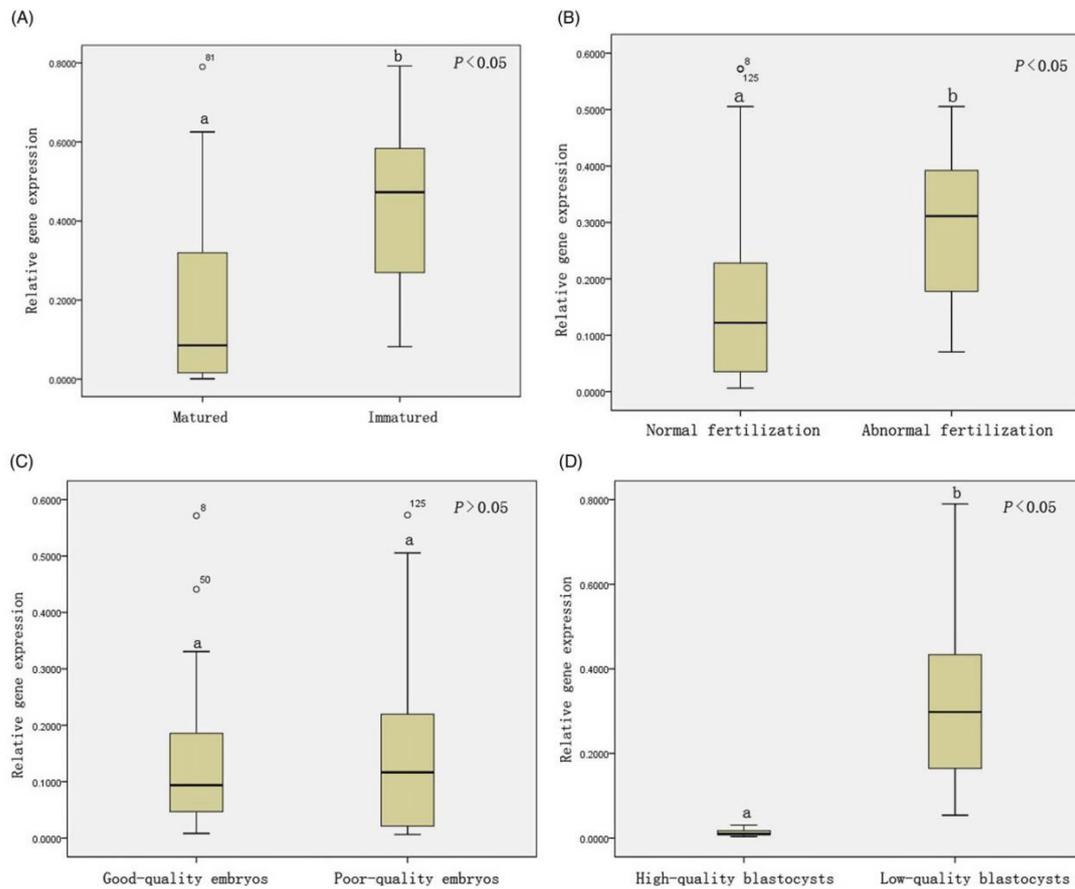
En un estudio similar, Tiegs y colaboradores estudiaron el perfil transcriptómico de células del cúmulo de embriones euploides, de embriones con monosomía 21 y de embriones con trisomía 21, y de esta manera comparar estos perfiles para hallar que genes se encuentran diferencialmente expresados en los distintos grupos. Para esta investigación

recogieron muestras de un total de 24 pacientes (8 para cada grupo), para lo que se realizó un PGT-A a los embriones y una vez conocidos los resultados, se clasificó cada muestra en su respectivo grupo. Después, se aisló el ARN y se usó un kit de transcripción para obtener copias de ADNc del ARNm de las muestras, para así cuantificar las muestras mediante una RT-qPCR. Un total de 3.122 genes se encontraron diferencialmente expresados en células del cúmulo de embriones con monosomía 21 y 19 en el caso de embriones con trisomía 21 ( $p < 0.055$ ). 13 de estos genes estaban diferencialmente expresados respecto a los embriones euploides en ambos, en monosomía 21 y trisomía 21 ( $p < 0.05$ ). Entre estos genes, encontramos 3 genes implicados en el desarrollo embrionario sobre expresados en ambos casos, que podrían ser usados como técnica de diagnóstico no invasiva:

- **DVL2** (del inglés *dishevelled segment polarity protein 2*) ( $p=0.04$ ).
- **CCN1/CYR61** (del inglés *cellular communication network factor 1*) ( $p=0.04$ ).
- **SRF** (del inglés *serum response factor*) ( $p=0.01$ ) (16)

Yao y colaboradores estudiaron la relación entre la expresión del gen PTEN (del inglés *phosphatase and tensin homolog*) en las células del cúmulo y la calidad embrionaria de los ovocitos del mismo complejo. Este gen es un mediador apoptótico que ha demostrado ser crucial en la reproducción, ya que en estudios previos se ha especulado que la sobreexpresión de este gen promovería la apoptosis de estas células y por tanto comprometería el desarrollo folicular, afectando de esta manera la calidad ovocitaria. Recogieron muestras de un total de 52 ciclos de ICSI (del inglés *Intracytoplasmic sperm injection*) (198 muestras en total) en las que se evaluaron distintos parámetros como el estado nuclear del ovocito en día 0 o la calidad del embrión en día 3. De las muestras de células del cúmulo recolectadas en la punción se realizó una extracción de ARN y con un kit de transcripción se sintetizó el ADNc de los transcritos de ARN presentes en las muestras. Finalmente se realizó una rt-qPCR para PTEN y  $\beta$ -Actina como marcador para normalizar los resultados. Los resultados mostraron que la expresión de PTEN era significativamente inferior en células del cúmulo de ovocitos maduros que se encontraban en metafase II que en las de ovocitos inmaduros ( $0.084 \pm 0.1843$  vs.  $0.4582 \pm 0.1967$   $p < 0.001$ ). Los niveles de expresión de PTEN también fueron significativamente inferiores en los casos en los que la fecundación se produjo de forma normal comparada con los casos en la que la fecundación fue anormal ( $0.3122 \pm 0.1374$  vs  $0.1223 \pm 0.1422$   $p = 0.015$ ). Finalmente, los resultados mostraron que los **niveles de expresión eran**

**significativamente mayores en células del cúmulo de ovocitos que se desarrollaron en blastocistos de baja calidad respecto a aquellos que se desarrollaron en blastocistos de alta calidad ( $0.2886 \pm 0.1744$  vs  $0.0125 \pm 0.0070$   $p < 0.001$ ) (Figura 7) (18).**



*Figura 7. Expresión relativa de PTEN en células del cúmulo de ovocitos. A) Células del cúmulo de ovocitos maduros vs inmaduros. B) Células del cúmulo de ovocitos con fertilización normal vs ovocitos con fertilización anómala. C) Células del cúmulo de ovocitos que se desarrollaron en embriones de buena calidad vs mala calidad en día 3. D) Células del cúmulo de ovocitos que se desarrollaron en blastocistos de alta calidad vs blastocistos de baja calidad. Los resultados se expresan en forma de media  $\pm$  desviación estándar de la expresión de PTEN normalizada con la expresión del gen  $\beta$ -ACTIN (18)*

Por otro lado, el equipo de Martínez-Álvaro y colaboradores estudiaron el transcriptoma de las células del cúmulo del del folículo y su potencial como predictor de la competencia ovocitaria. Para ello recolectaron células del cúmulo de ovocitos de donante y se analizaron un total de 15 muestras, que se agruparon en tres grupos en función de los resultados del TRA del ovocito del que provenía la muestra: aquellos que no llegaron a desarrollarse a blastocisto (B1-), aquellos que sí llegaron a blastocisto, pero no lograron producir embarazo (P-) y finalmente aquellos que si llegaron a embarazo (P+).

A las muestras se les realizó una extracción de ARN, y el ARN purificado fue cuantificado y después secuenciado. Un total de 17.469 genes se mostraron expresados en las muestras, y aquellos que demostraron estar diferencialmente expresados entre los 3 grupos con un p valor  $<0.05$  fueron:

- P- vs P+: 10 genes diferencialmente expresados.
- P+ vs Bl-: 11 genes diferencialmente expresados.
- P- vs Bl-: 5 genes diferencialmente expresados.

De estos genes, **el único que mostró estar expresado diferencialmente de forma consistente en el grupo P+ respecto a los otros dos fue EPN3**. Este fue el único gen con potencial como marcador de embarazo. Otros genes como **CHAC1, CENPE o CD93** mostraron estar diferencialmente expresados entre los grupos con llegada a blastocisto del grupo sin llegada a blastocisto. Este estudio demostró que a pesar de que el análisis transcriptómico de las células del cúmulo podría tener gran potencial como biomarcador no invasivo asociado a la competencia ovocitaria, los resultados no fueron muy esclarecedores y por tanto es necesario seguir investigando este campo (19).

Autor y año de publicación	Diseño	Tamaño muestral (n)	Edad	Limitaciones del estudio	Conclusión
Kahraman et al (2018) (16)	Estudio prospectivo	184	≤ 39 años	-	El tamaño del folículo y la expresión de los genes HAS2 y GDF9 estaban correlacionados con la calidad del blastocisto.
Tiegs et al (2021) (17)	Estudio de casos y controles	24	18-44 años	Tamaño muestral pequeño. Sería conveniente repetir el estudio con un modelo de cohortes.	El estudio de la expresión génica en células del cúmulo podría ser usado para analizar la calidad ovocitaria en pacientes sometidas a TRA.
Yao et al (2022) (18)	Estudio prospectivo	52	-	Tamaño muestral pequeño.	La expresión del gen PTEN podría tener un papel crucial en el desarrollo folicular, y su expresión podría tener efectos negativos en la maduración folicular, fertilización y calidad embrionaria.
Martínez-Moro et al (2023) (19)	Estudio prospectivo	15	≤ 37 años donante y ≤ 50 receptora	Tamaño muestral muy pequeño.	El análisis transcriptómico de las células del cúmulo reveló genes con potencial para predecir la competencia ovocitaria, pero no se encontraron marcadores útiles para predecir el embarazo.

Tabla 3. Tabla resumen de los artículos seleccionados sobre el estudio del transcriptoma de las células del cúmulo. Elaboración propia.

## B) Daño en el ADN de las células del cúmulo:

Cuando avanza la edad, la capacidad reproductiva se ve disminuida en parte por el incremento del daño en el ADN que se produce con la edad en los ovocitos y en las células de la granulosa. Este daño se puede medir mediante moléculas como la histona H2AX fosforilada en la posición SER139, o mediante la expresión de proteínas de reparación del ADN. Los niveles de estas proteínas en las células del cúmulo podrían ser útiles como biomarcadores de envejecimiento ovárico y por tanto predecir la calidad de los ovocitos de esos folículos de una forma no invasiva (20).

El grupo de Sun y colaboradores estudió cuales eran los efectos de la edad avanzada en células del cúmulo, para ello estudiaron la activación de los mecanismos de reparación de roturas de cadena doble (DSB del inglés *Double Stand Break*) y estudiar su valor como

posible marcador de calidad ovocitaria. Para el estudio recogieron muestras de las células del cúmulo en el momento de la punción de un total de 660 pacientes que estaban siendo sometidas a TRA (338 pacientes de edad avanzada y 322 pacientes jóvenes). Estudiaron distintos parámetros de las muestras:

- Apoptosis y  $\gamma$ -H2AX: tiñeron las células apoptóticas con un kit comercial (*FITC Annexin V Apoptosis Detection kit, BD Pharmingen™, USA*) y usaron anticuerpos anti-H2AX conjugados con un fluoróforo para detectar las células que expresaban la histona H2AX fosforilada ( $\gamma$ -H2AX), un marcador usado por las células para reclutar la maquinaria de reparación cuando se producen roturas en el ADN. Después fueron contabilizadas mediante citometría de flujo.
- $\gamma$ -H2AX y proteínas de reparación de DSB: mediante un análisis de Western Blot se estudiaron los niveles de  $\gamma$ -H2AX y de 4 proteínas de reparación de DSB; BRCA1, ATM, RAD51 y MRE11.
- Expresión de proteínas de reparación de DSB: estudiaron los niveles de expresión de las 4 proteínas de reparación de DSB mencionadas en el apartado anterior mediante una RT-qPCR

Los resultados mostraron que el grupo de las pacientes jóvenes obtenía mejores resultados en los tratamientos (menores tasas de aborto, mayores tasas de embarazo y de implantación...). Observaron que el **grupo de pacientes de edad materna avanzada presentaban mayor porcentaje de células  $\gamma$ -H2AX positivas respecto al grupo de pacientes jóvenes** ( $24.33 \pm 4.55$  vs.  $12.40 \pm 2.31$   $p < 0.05$ ), al igual que el porcentaje de células del cúmulo apoptóticas, que resultó ser superior en el grupo de edad materna avanzada ( $21.95 \pm 3.83\%$  vs.  $13.85 \pm 2.34\%$   $p < 0.05$ ). De la misma forma, el **grupo de pacientes de edad avanzada presentó mayores niveles de expresión de genes reparación de DSB, mayores niveles de  $\gamma$ -H2AX y mayores niveles de proteínas de reparación de DSB en las células del cúmulo** (Figura 8) (20). Los resultados de este estudio mostraron que el daño en el ADN y la activación de los mecanismos de reparación de estos estaban asociados al envejecimiento ovárico y a la reserva ovárica. A pesar de no haber estudiado la relación entre los resultados de los TRA y estos marcadores para analizar su utilidad como biomarcadores no invasivos, este estudio demuestra el gran potencial que puede tener el análisis del daño en el ADN de las células del cúmulo para predecir la calidad ovocitaria (20).

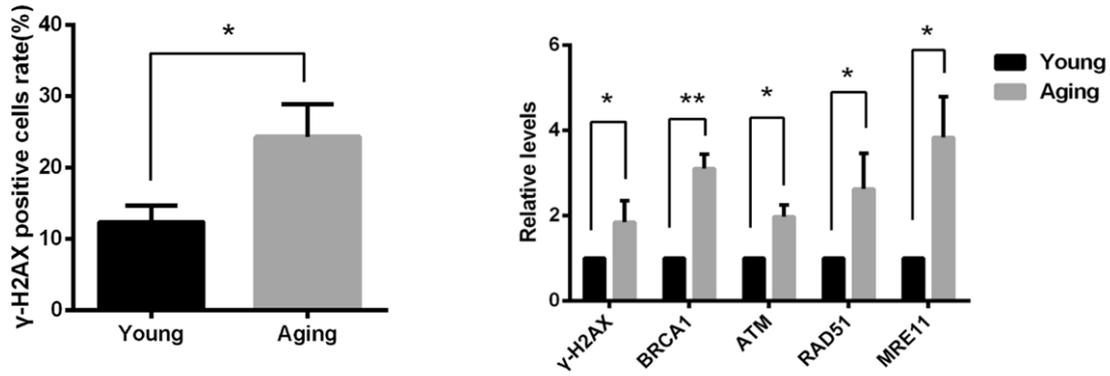


Figura 8. Representación en gráficas de barras del porcentaje de células  $\gamma$ -H2AX positivas en el grupo de pacientes jóvenes y en el de edad materna avanzada (\* $p$  valor $<$ 0.05) y de los niveles relativos de  $\gamma$ -H2AX, BRCA1, ATM, RAD51 y MRE11 en ambos grupos (\* $p$  $<$ 0.05, \*\* $<$ 0.01) (20).

### C) El ADN mitocondrial y su relación con la calidad ovocitaria

Un aporte de energía adecuado es un factor muy importante que contribuye a la viabilidad embrionaria. La mayoría de este aporte energético proviene de la mitocondria, por lo que en los últimos años ha surgido el estudio del número de copias ADN mitocondrial como marcador no invasivo para medir la función embrionaria (20)

El grupo de Yang y colaboradores estudió la ratio de ADN mitocondrial respecto al nuclear en células del cúmulo como biomarcador de calidad embrionaria en TRA. Para este estudio se incluyeron 144 pacientes sometidas a TRA, de las que se extrajeron muestras de las células del cúmulo en la punción. Las muestras fueron sometidas a una extracción de ADN mitocondrial y nuclear, y después a una rt-qPCR con primers para el ADN mitocondrial (“primers” para el gen mtMinARC localizado en el genoma mitocondrial) y para el ADN nuclear (“primers” para el gen  $\beta$ 2M localizado en el genoma nuclear). De esta manera se calculó la ratio ADNmit/ADNnuc. Para evaluar si este último podía ser usado como biomarcador para predecir la calidad embrionaria, se dividieron las muestras en función de si habían sido o no fertilizadas, y de la calidad del embrión en día 3. Los resultados mostraron que la **ratio ADNmit/ADNnuc era significativamente superior en embriones de buena calidad respecto a los de baja calidad** ( $0.66\pm 0.03$  vs  $0.61\pm 0.03$   $p$  $<$ 0.05). Por lo tanto, la ratio ADNmit/ADNnuc podría ser usada como marcador no invasivo para evaluar la calidad ovocitaria y potencial embrionario (21).

### 3. Medio de cultivo:

#### A) El consumo de oxígeno como biomarcador de calidad ovocitaria

El estudio del consumo de oxígeno está enfocado en la medición de la función mitocondrial como una manera de seleccionar ovocitos mayor calidad y viabilidad en los TRA.

Tejera y colaboradores estudiaron el consumo de oxígeno de los ovocitos antes de la fecundación y su posible uso como marcador de calidad ovocitaria. Para realizar el estudio utilizaron un total de 349 ovocitos obtenidos de 56 donantes cultivados en un incubador time-lapse (*EmbryoScope*) con un sensor de oxígeno electroquímico embebido en él. Analizó el consumo de oxígeno 3 veces cada 20 minutos a lo largo de una hora y calculando la media de las 3 medidas. Estas medidas se tomaron hasta 3 horas después de la punción e inmediatamente antes de la decumulación de los ovocitos. Estudiaron la relación del consumo de oxígeno con la fecundación, la calidad embrionaria y la implantación. Los resultados mostraron que existían diferencias significativas entre el consumo de oxígeno entre los ovocitos que posteriormente fecundaron de los que no lo hicieron, siendo superior el consumo en aquellos que llegaron a ser fecundados (OR=1.34; 95% IC= 1.04–1.73 p=014). **El consumo de oxígeno de los ovocitos que se desarrollaron en embriones que llegaron a implantar fue estadísticamente superior que el de los ovocitos que se desarrollaron en embriones que no implantaron** ( $p<0.05$ ) (8).

En numerosos estudios se ha demostrado el papel crucial de las mitocondrias en el proceso de maduración ovocitaria, la fecundación y en el desarrollo embrionario, y, por tanto, el estudio del consumo de oxígeno para analizar la función mitocondrial podría ser una herramienta muy útil para seleccionar aquellos ovocitos de mayor calidad y con mayor potencial de desarrollo embrionario (21). A pesar de este potencial, este campo de estudio surgió a principios de la anterior década, pero actualmente se ha dejado en el olvido (8).

## CONCLUSIÓN

En los últimos años la investigación de marcadores de calidad ovocitaria no invasivos ha sido cada vez mayor, principalmente debido a la necesidad de mejorar el pronóstico en los resultados de los tratamientos realizados sobre pacientes infértiles. En esta revisión hemos centrado el estudio en aquellas investigaciones que han usado el líquido folicular, las células del cúmulo y el medio de cultivo para tratar de hallar marcadores estadísticamente significativos que fueran capaces de predecir la calidad ovocitaria, sin embargo, este campo de investigación es muy amplio y no debería solamente limitarse a estos.

A pesar de mostrar un gran potencial, sigue siendo necesario realizar más estudios, preferiblemente estudios multicéntricos y con tamaños muestrales mayores, ya que en la actualidad la mayor parte de los estudios realizados una de sus mayores limitaciones es el tamaño muestral, lo que resta validez y hace que los resultados no sean tan fiables. Esta puede ser la causa de la disparidad entre los resultados de diferentes estudios, que no permite sacar conclusiones fiables en este campo de estudio.

El estudio del líquido folicular y de las células del cúmulo parecen ser los campos más prometedores, probablemente debido a que ambos se encuentran en estrecho contacto con el ovocito en todas sus etapas de desarrollo y maduración hasta que el ovocito abandona el folículo. En cuanto al estudio del medio de cultivo, a pesar de que podría ser de gran utilidad debido a la facilidad con la que se puede analizar y su disponibilidad a lo largo de todo el proceso de cultivo de los ovocitos, la bibliografía todavía es escasa.

Encontrar marcadores de calidad ovocitaria no invasivos fiables podría suponer un antes y un después en los tratamientos de reproducción asistida, pudiendo mejorar los resultados de los tratamientos a los que se someten las pacientes. Sin embargo, actualmente los parámetros morfológicos siguen siendo los más utilizados, principalmente por su sencillez y bajo coste, por lo que para que la aplicación de estas nuevas tecnologías se imponga, el beneficio que aporten sobre los resultados en los tratamientos debería superar el coste añadido que supondrían en los mismos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction and Development*, 87(10), 1021-1036. <https://doi.org/10.1002/mrd.23420>
2. Lemseffer, Y., Terret, M., Campillo, C., & Labrune, E. (2022). Methods for Assessing Oocyte Quality: A Review of Literature. *Biomedicines*, 10(9), 2184. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092184>
3. Sciorio, R., Miranian, D., & Smith, G. A. (2022). Non-invasive oocyte quality assessment. *Biology of Reproduction*, 106(2), 274-290. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac009>
4. Hurtado de Mendoza y Acosta, M. V., & Cuadros Fernández, J. (2015). Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. ASEBIR, 3º Edición.
5. Dabaja, M. Z., Santos, A. N. D., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., De Oliveira, D. L., De Oliveira, A. H. C., Melo, C. F. O. R., Guerreiro, T. M., & Catharino, R. R. (2022). Comparative metabolomic profiling of women undergoing in vitro fertilization procedures reveals potential infertility-related biomarkers in follicular fluid. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24775-5>
6. Alves, M. D. S., Oliani, L., Almeida, M., Cardoso, H. J., Oliani, A. H., Breitenfeld, L., & Ramalhinho, A. C. (2023). Cell-Free DNA as a New Biomarker of IVF Success, Independent of Any Infertility Factor, Including Endometriosis. *Diagnostics*, 13(2), 208. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020208>
7. Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J., & Hamamah, S. (2010). Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular human reproduction*, 16(8), 531-538. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq032>
8. Tejera, A., Herrero, J., De Los Santos, M., Garrido, N., Ramsing, N. B., & Meseguer, M. (2011). Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertility and Sterility*, 96(3), 618-623.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.059>
9. Khan, H., Bhatti, S., Khan, Y., Abbas, S., Munir, Z., Sherwani, I., Suhail, S., Hassan, Z., & Aydin, H. H. (2020). Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro

- fertilization treatment. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 49(1), 101624. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2019.08.007>
10. Liu, Y., Shen, Q., Zhao, X., Zou, M., Shao, S., Li, J., Ren, X., & Zhang, L. (2019). Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: a promising bio-marker of blastocyst developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0495-6>
  11. Huo, P., Zhang, N., Zhang, P., & Wu, X. (2020). The levels of follicular fluid cell-free mitochondrial DNA could serve as a biomarker for pregnancy success in patients with small ovarian endometriosis cysts. *Medicine*, 99(48), e23348. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000023348>
  12. Guan, S., Liu, Y., Guo, Y., Shen, X., Liu, Y., & Jin, H. (2022). Potential biomarkers for clinical outcomes of IVF cycles in women with/without PCOS: Searching with metabolomics. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.982200>
  13. Brinca, A., Anjos, O., Alves, M. D. S., Sousa, Â., Oliani, A. H., Breitenfeld, L., Passarinha, L. A., Ramalhinho, A. C., & Gallardo, E. (2022). Volatilomics as an Emerging Strategy to Determine Potential Biomarkers of Female Infertility: A Pilot Study. *Biomedicines*, 10(11), 2852. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112852>
  14. İlhan, G., İlhan, G., Vuruşkan, A. K., Eken, M. K., Karasu, A. F. G., Bilgiç, B. E., & Küçükyurt, A. K. (2023). The effect of individual oocyte matched follicular fluid oxidant, antioxidant status, and pro- and anti-inflammatory cytokines on IVF outcomes of patients with diminished ovarian reserve. *Medicine*, 102(4), e32757. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000032757>
  15. Wang, C., Fei, X., Zhang, H., Zhou, W., Cheng, Z., & Feng, Y. (2022). Proteomic Analysis of the Alterations in Follicular Fluid Proteins During Oocyte Maturation in Humans. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.830691>
  16. Kahraman, S., Çetinkaya, C. P., Çetinkaya, M., Tufekci, M., Ekmekçi, C. G., & Montag, M. (2018). Is there a correlation between follicle size and gene expression in cumulus cells and is gene expression an indicator of embryo development? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0388-0>

17. Tiegs, A. W., Titus, S., Mehta, S., Garcia-Milian, R., Seli, E., & Scott, R. T. (2021). Cumulus cells of euploid versus whole chromosome 21 aneuploid embryos reveal differentially expressed genes. *Reproductive Biomedicine Online*, 43(4), 614-626. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.015>
18. Yao, J., Li, M., Lin, X., Li, Y., Zhuang, J., Huang, Y., Peng, W., Lian, J., Huang, R., & Yang, X. (2022). PTEN expression in human cumulus cells is associated with embryo development competence. *Zygote*, 30(5), 611-618. <https://doi.org/10.1017/s096719942200003x>
19. Martínez-Moro, Á., González-Brusi, L., Lamas-Toranzo, I., González-Dosal, P., Rodríguez-Juárez, F., & Bermejo-Alvarez, P. (2023). The human cumulus cell transcriptome provides poor predictive value for embryo transfer outcome. *Reproductive Biomedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.01.012>
20. Sun, X., Jiang, H., Han, D., Fu, Y., Liu, J., Gao, Y., Hu, S., Zhang, J., & Zhang, J. (2018). The activated DNA double-strand break repair pathway in cumulus cells from aging patients may be used as a convincing predictor of poor outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer treatment. *PLOS ONE*, 13(9), e0204524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204524>
21. Yang, S. H., Yu, E., Park, J. Y., Kim, T. Y., Eum, J. H., Paek, S. K., Hwang, J. H., Lyu, S. W., Kim, J., Lee, W. J., Yoon, T. K., Song, H., & Lee, H. C. (2021). The Ratio of Mitochondrial DNA to Genomic DNA Copy Number in Cumulus Cell May Serve as a Biomarker of Embryo Quality in IVF Cycles. *Reproductive Sciences*, 28(9), 2495-2502. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00532-3>

## ANEXOS

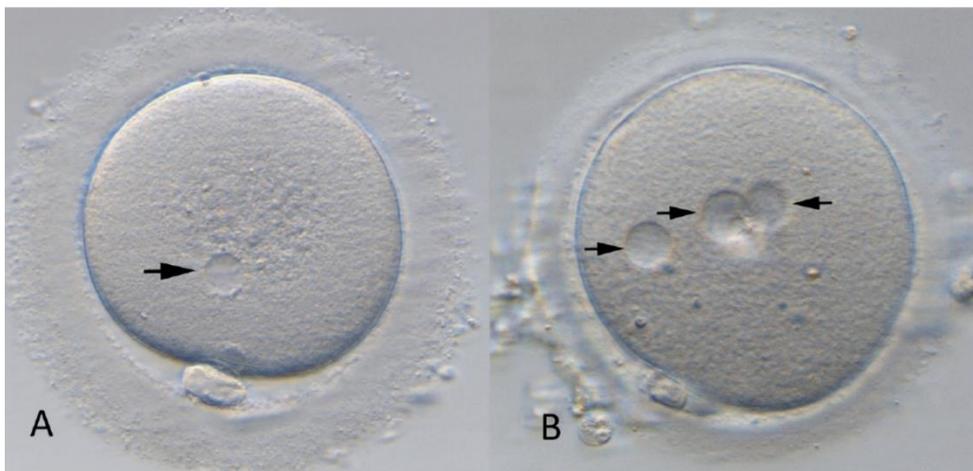
**Anexo A:** Alteraciones morfológicas citoplasmáticas y extracitoplasmáticas utilizadas para la evaluación de la calidad ovocitaria (4).



*Imagen 1. Granulosidad localizada en el centro del oocito (flecha).*



*Imagen 2. Presencia de AREL (R) y pequeñas vacuolas (V) en el oocito.*



*Imagen 3. (A);(B) Presencia de vacuolas en el oocito.*

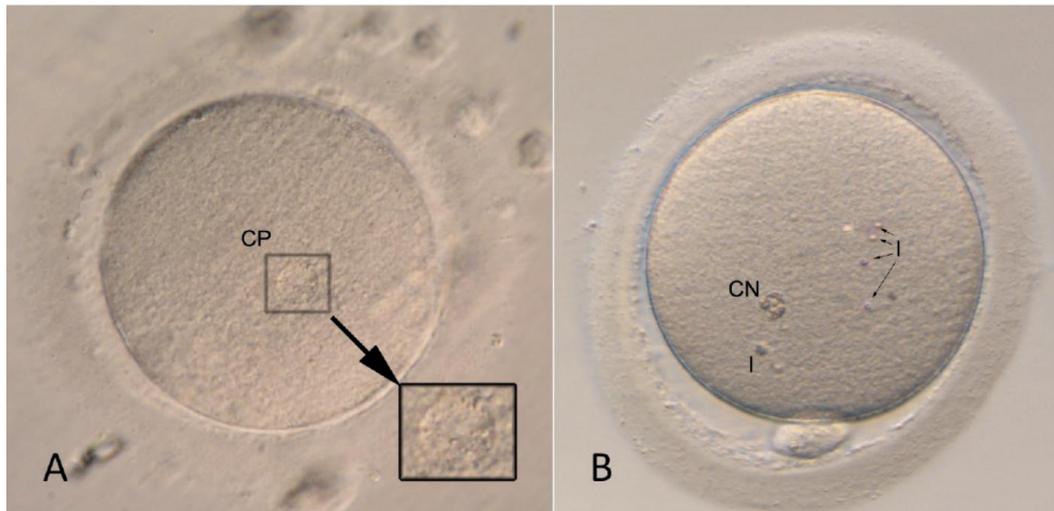


Imagen 4. Presencia de inclusiones. (A) Cuerpo picnótico (CP) (B) Cuerpo necrótico (CN), cuerpos refringentes (I).



Imagen 5. (A);(B) Detritus en el espacio perivitelino.

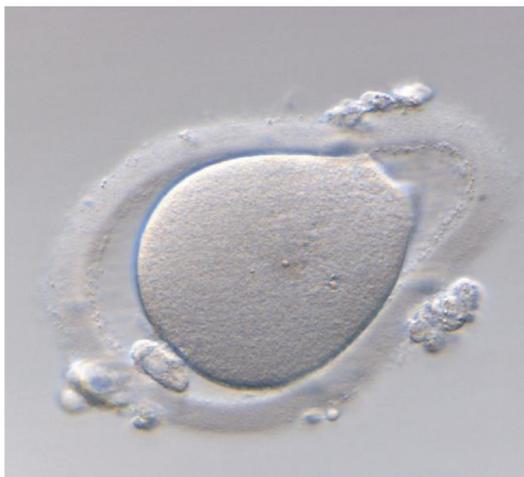


Imagen 6. Zona pelúcida no circular.



Imagen 7. Zona pelúcida oscura.



Imagen 8. Zona pelúcida gruesa (>20  $\mu\text{m}$ ).



Imagen 9. Zona septada (flechas).

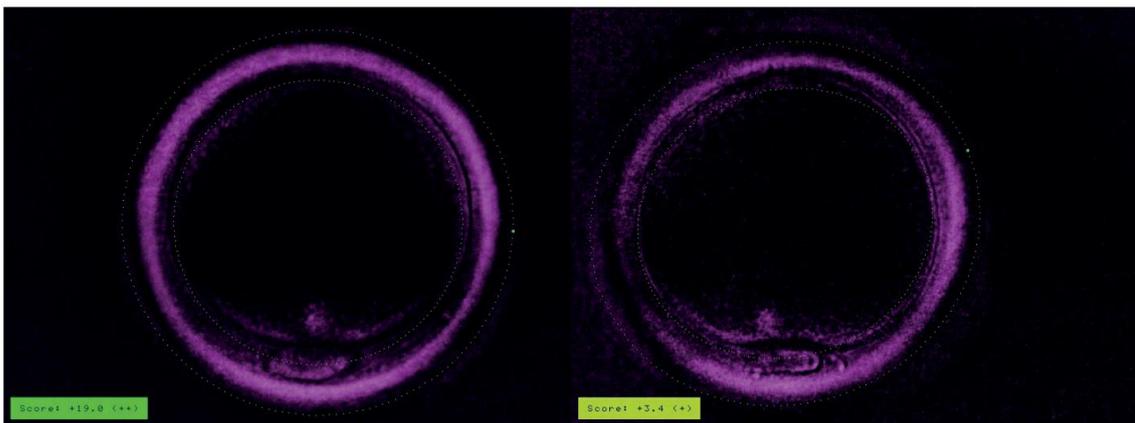


Imagen 10. Zona pelúcida al microscopio de luz polarizada. A la izquierda, la ZP se muestra regular. En la imagen de la derecha se observa una ZP irregular.



*Imagen 11. Espacio perivitelino aumentado.*



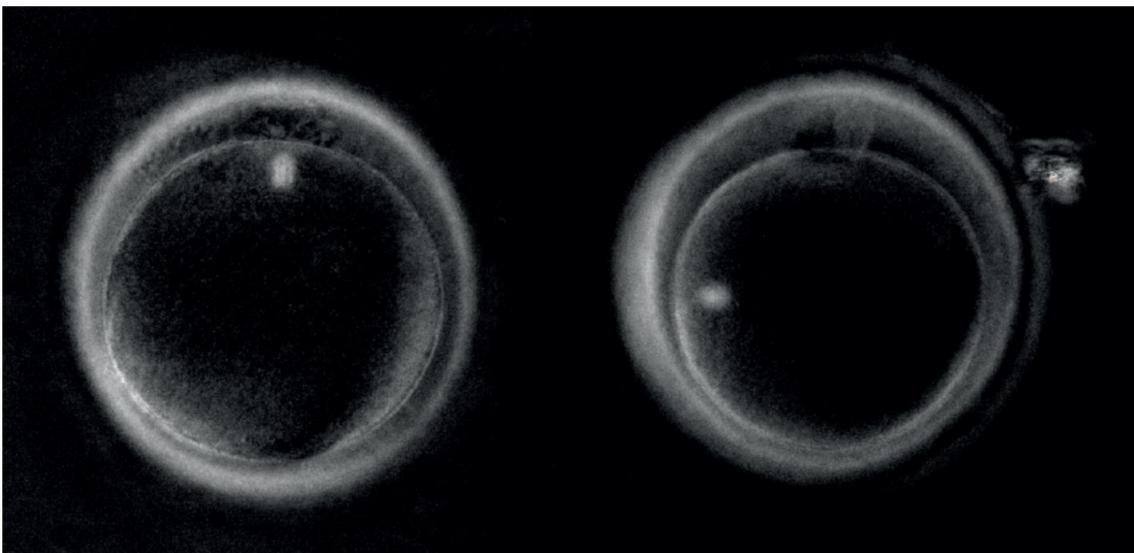
*Imagen 12. Diferentes tamaños de corpúsculo polar. (A) Grande; (B) Normal; (C) Pequeño.*



*Imagen 13. Corpúsculo polar doble (Flechas).*



*Imagen 14. Corpúsculo polar fragmentado.*



*Imagen 15. Huso meiótico. A la izquierda, el huso se encuentra en su posición correcta, respecto del 1<sup>er</sup> CP. En la imagen de la derecha, el huso se encuentra desplazado 90°.*