

TRABAJO DE FIN DE MASTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la  
Reproducción Humana Asistida

**Polimorfismos del receptor de FSH como marcadores  
genéticos aplicados a la estimulación suave.**

Autor: ALEJANDRO BARTOLOMÉ ESPINOSA

Tutor: MARÍA CRUZ PALOMINO

Cotutor: DAVID CASTRO GONZÁLEZ

ALCOBENDAS, SEPTIEMBRE 2022

# ÍNDICE.

Glosario:.....	3
1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
2.1. Medicina personalizada.....	5
2.2. Estimulación suave.....	5
2.3. Farmacogenética.....	6
3. Objetivos.....	9
3.1. Objetivo principal:.....	9
3.2. Objetivos secundarios:.....	9
4. Materiales y métodos.....	10
4.1. Pregunta de investigación.....	10
4.2. Búsqueda de datos:.....	10
4.3. Visualización de proteína y cambios en modelo 3D.....	11
5. Resultados.....	11
5.1. Estimulación suave.....	11
5.2. Receptor de la FSH.....	13
5.3. Revisión bibliográfica.....	17
6. Argumentación crítica de los resultados.....	23
7. Conclusiones.....	29
8. Bibliografía.....	33

## Glosario:

Abreviatura:	Término completo.
FSH	Hormona folículo estimulante.
FSHR	Receptor de la hormona folículo estimulante.
CC	Citrato de Clomifeno
SOP	Síndrome de ovarios poliquísticos.
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido.
OR	Odds Ratio.
AMH	Hormona Anti-Mulleriana.
RNV	Recién Nacido Vivo.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
RNA	Ácido ribonucleico.
EOC	Estimulación Ovárica Controlada.
LD	Desequilibrio de Ligamiento.
hCG	Gonadotropina Coriónica humana.
cAMP	Adenosín-monofosfato cíclico.
ERK/MAPK	Vía de las Proteín-kinasas Activadas por Mitógenos.

## **1. Resumen.**

La medicina personalizada está adquiriendo más importancia en los últimos años, especialmente por tener en cuenta las características del paciente y utilizarlas para adaptar los tratamientos. En el ámbito de la reproducción asistida, la aplicación de este concepto trata de encontrar tratamientos de estimulación ovárica más efectivos y con menos efectos secundarios para las pacientes. Durante muchos años se han estudiado varias aproximaciones a biomarcadores que permitan encontrar nuevos parámetros que puedan predecir la respuesta ovárica y en función de estos, modificar los tratamientos para hacerlos más efectivos; en este sentido, la farmacogenética ha ganado muchos enteros para encontrar nuevos marcadores. En el campo de la estimulación ovárica controlada, el gen del receptor de la FSH es un candidato a establecerse como biomarcador pronóstico del resultado de la estimulación. Las investigaciones realizadas durante muchos años han determinado que mutaciones (SNPs) en este gen son causantes de alteraciones en la FSH basal y en los resultados de la estimulación ovárica, en concreto, el número de ovocitos obtenidos. Estos resultados hacen indicar que el polimorfismo FSHR-Rs6166 es resistente a la FSH y por tanto, se necesitan mayores cantidades de FSH para lograr los mismos resultados. También destaca un efecto negativo en los tratamientos con citrato de clomifeno, las variantes son resistentes al uso de este fármaco; importante en tratamientos frente a SOP o estimulación suave. Este concepto de estimulación suave está muy relacionado con la medicina personalizada, por tanto, los resultados concluidos se han extrapolado a las estimulaciones suaves demostrando que estas pueden verse beneficiadas por la aplicación de estos nuevos marcadores, haciendo las estimulaciones más eficientes y consiguiendo un número de ovocitos mayor, ya que este es el parámetro que más disminuido se ve en este tipo de estimulaciones.

### **Palabras clave:**

Medicina personalizada; Farmacogenética; Estimulación ovárica controlada; Estimulación suave; Receptor de la Hormona Folículo Estimulante, Estimulación ovárica; Marcadores genéticos.

## **2. Introducción.**

### **2.1. Medicina personalizada.**

Actualmente, las pacientes que acuden a una clínica de reproducción asistida tienen un objetivo muy claro, obtener un RNV lo antes posible con los menores efectos adversos que puedan afectar tanto a su salud como a la del recién nacido que tanto ansían. Para que esto sea posible, las nuevas corrientes de tratamientos tienen que adaptarse a lo que las pacientes demandan: rapidez, seguridad y eficiencia. Estos tres términos tienen un elemento en común: son las bases de la medicina personalizada.

El término medicina personalizada tiene varias acepciones, haciendo una definición global podemos decir que esta es: un modelo médico que propone la personalización de las decisiones médicas teniendo en cuenta las características genéticas, fenotípicas y ambientales u otros tipos de características para prevenir, detectar y tratar distintas enfermedades (1); este modelo no implica la creación de nuevos medicamentos exclusivos para cada paciente, sino la elección de los tratamientos disponibles en función de la clasificación que hayamos hecho de los pacientes.

Aplicando esto a un contexto de medicina reproductiva, la medicina personalizada busca adaptar los tratamientos a las características de las pacientes; y esto va más allá de la medicación utilizada en la estimulación ovárica, también hay variantes en la aplicación de las distintas técnicas de laboratorio, realización pruebas diagnósticas y técnicas de fecundación. En conjunto, un tratamiento de reproducción asistida se compone de un gran número de variables, las cuales hay que valorar a la hora de plantear un tratamiento para que este se adecue a las características de nuestras pacientes.

### **2.2. Estimulación suave**

Una de las tendencias en el ámbito de la reproducción asistida es ir hacia estimulaciones más suaves; las mujeres ven en esta variante del tratamiento un método más cómodo y con el que pueden obtener resultados de manera más eficiente, sin someter al cuerpo a tanta medicación. Este tipo de estimulación reduce la medicación a usar en la paciente, disminuyendo las dosis y cantidades de gonadotropinas utilizadas (FSH) y se incluyen otros fármacos como el Citrato de Clomifeno (CC) que es un inhibidor de la retroalimentación hipofisaria negativa que causa la síntesis de mayores cantidades de FSH endógena. Este tipo de estimulación opta por perder cantidad de ovocitos por

umentar su calidad. No obstante, hay que tener claro que las pacientes deben tener unas características concretas para beneficiarse de este tipo de tratamiento, ya que, actualmente, muchas de estas pacientes son de edad avanzada o con varios intentos fallidos en tratamientos previos.

Hoy en día no hay un consenso sobre cuáles son las características ideales para incluir a las pacientes en un protocolo de estimulación suave; aun así, existen unas pautas a seguir para que la efectividad de esta técnica sea mayor. Estas pautas son: mujeres menores de 38 años, con buen pronóstico, es decir, buena reserva ovárica y valores hormonales por encima de los valores estipulados ( $AMH > 1,5$  ng/ml y  $FSH < 10$  mIU/ml) y sin enfermedades de carácter reproductivo y pocos intentos previos en ciclos de estimulación (2). Como hemos comentado anteriormente estas condiciones no se cumplen en gran parte de las pacientes; la gran mayoría de pacientes que acuden a clínicas especializadas de estimulación suave son pacientes de edad avanzada o que llevan muchos ciclos realizados y quieren nuevas estimulaciones de carácter más suave para conseguir el objetivo de un embarazo; esto hace que las tasas de éxito de este tipo de tratamiento sea muy distintas a lo que deberíamos esperar si siguiésemos estas pautas.

### **2.3. Farmacogenética.**

La personalización de los tratamientos médicos y los nuevos protocolos de estimulación suave van encaminados a hacer lo más efectivo posible el tratamiento de reproducción asistida; por esta razón, hay que buscar nuevos parámetros que nos permitan mejorar la eficacia de los medicamentos y procesos realizados por los médicos especialistas . La genética es uno de los parámetros más revolucionarios y novedosos que actualmente se están estudiando. Este hecho ha dado lugar a la aparición de la farmacogenética, que según el National Cancer Institute es “el estudio del modo en que los genes de una persona afectan la manera en que responde a los medicamentos. La farmacogenética se usa para saber de antemano cuál será el mejor medicamento o la mejor dosis para una persona.”

Actualmente la farmacogenética es una de las alternativas que da más esperanza en tratamientos de cáncer y otras enfermedades de base genética, que pueden verse resueltas gracias al estudio de los genes y su interacción, mediante las proteínas, con los fármacos utilizados. El objetivo principal de la farmacogenética es dirigir el tratamiento hacia la medicina personalizada, haciéndolo más seguro y eficiente. Hemos de tener en cuenta la

gran variabilidad genética que existe entre los humanos y cómo estas variaciones pueden afectar a los tratamientos.

Las variaciones del genoma son muy frecuentes, del orden de 1 cambio cada 500 o 1000 nucleótidos, lo que hace que existan diferencias sustanciales entre individuos a pesar de que estas variaciones representen un 0'01% de diferencia entre genomas.

Los SNPs, polimorfismos de un nucleótido, representan la forma de variación más simple que encontramos en el genoma; el cambio de una base nitrogenada por otra, cambiando el mensaje que contiene el DNA y creando un cambio en las proteínas. Como bien se conoce, los cambios generados por estos SNPs pueden no tener efecto, si el aminoácido es el mismo o pueden generar un efecto sobre la proteína si se cambia el aminoácido sintetizado o se genera un codón de stop truncando la proteína de manera prematura; en consecuencia, la estructura o actividad de la proteína se ve afectada, de manera tanto positiva como negativa y esto puede incurrir en un problema de salud.

A día de hoy, la medicina está en busca de marcadores de diversos tipos: genéticos, clínicos o bioquímicos para predecir enfermedades o mejorar los tratamientos aplicados; estos son los denominados biomarcadores, moléculas biológicas medibles que indican un estado biológico diferencial. Por tanto, podemos considerar los SNPs como biomarcadores de carácter genético, ya que son cambios en el genoma que podemos determinar y permiten diferenciar a los individuos en función de las variaciones genéticas que encontremos a lo largo de su genoma.

Uno de los aspectos más importantes de un tratamiento de reproducción asistida es la estimulación ovárica. Cuanto mayor sea el número de ovocitos obtenidos, mayores posibilidades habrá de obtener un RNV, objetivo final y más importante de este proceso. Por esta razón, la estimulación ovárica controlada tendría que ser un proceso altamente eficiente que consiga aumentar significativamente el número de ovocitos conseguidos. Esto no quiere decir que se consiga la máxima cantidad de ovocitos posible aumentando enormemente la cantidad de FSH administrada sino que, según los biomarcadores de nuestra paciente, personalizar su tratamiento, para maximizar los resultados, obteniendo una cantidad mayor de ovocitos respecto a los obtenidos con un tratamiento estándar.

El ejemplo más estudiado en cuanto a marcadores genéticos en relación con la EOC (estimulación ovárica controlada), es el gen del receptor de la FSH (FSHR); en este gen se han observado varios SNPs que afectan al funcionamiento del receptor y que hacen

que la estimulación sea diferente en función de los marcadores genéticos que encontremos (SNPs). Dentro de este gen se han identificado un gran número de SNPs, pero el T307A (rs6165) y el N680S (rs6166), son los más estudiados y de los que más literatura hay escrita y en los que principalmente nos centraremos en este trabajo. Pero como este ejemplo existen otros genes que pueden actuar como biomarcadores, como *lhcgr* (receptor LH), *fshb* (subunidad B de la FSH), *esr* (receptor de estrógenos), o *cyp19a1* (aromatasa). Estos genes pueden estar implicados en variaciones de la respuesta a la estimulación ovárica controlada, disminuyendo o aumentando el efecto de la medicación exógena recibida y alterando el resultado en el número de ovocitos obtenidos.

Por tanto, el gen FSHR se postula como un candidato a biomarcador asociado a la respuesta ovárica, ya que numerosos estudios han demostrado diferencias entre los distintos genotipos y esto supone una gran ventana de oportunidad para elaborar nuevos protocolos de estimulación, incluyendo el genotipo dentro de los marcadores a valorar; esto permite mejorar la eficiencia de la estimulación suave, ya que la inclusión del genotipo permitirá adaptar los protocolos a las necesidades individuales de las pacientes, obteniendo un mayor número de ovocitos, pero sometiéndose a una estimulación menos agresiva, algo que actualmente buscan muchas mujeres.

La hormona folículo-estimulante, FSH por sus siglas en inglés, es una de las hormonas sexuales más importantes, que, junto a la hormona luteinizante, LH, marcan en mujeres el curso del ciclo menstrual realizando diferentes acciones en las células del cúmulo de los folículos incipientes e interviene en la proliferación mitótica de las células de la granulosa, formación del antro folicular, el incremento de la actividad de la aromatasa, la inducción de síntesis de receptores a FSH y de la aparición de receptores a LH en la fase final de la foliculogénesis.

La función de la FSH es capaz de llevarse a cabo gracias a su receptor que se ubica en células de la granulosa en mujeres y células de Sertoli en hombres.

Pruebas realizadas en ratones KO para el gen *fshr* observaron una infertilidad total de las hembras, mientras que en los machos se observaba un pequeño descenso de la fertilidad, lo que determina que el gen *fshr* y su producto son esenciales para una correcta función reproductora en mujeres. (3)

Las mutaciones del gen *fshr* pueden provocar una pérdida o una ganancia de función; este hecho depende del tipo de mutación y cómo esta afecte a la cadena de aminoácidos y



conformación del receptor. La pérdida de función se relaciona con mujeres que cursan deficiencias como disgenesia ovárica, y amenorreas primarias y secundarias; mientras que las mutaciones que provocan una ganancia de función se han identificado en mujeres que sufren un síndrome de hiperestimulación ovárica. (3)

En este trabajo nos centraremos en los polimorfismos del gen *fshr* y como estos afectan a los resultados de la estimulación ovárica controlada y como los hallazgos pueden ser aplicados a las nuevas tendencias en los tratamientos de reproducción asistida.

### **3. Objetivos.**

#### **3.1. Objetivo principal:**

- Determinar si existe evidencia científica suficiente para implementar marcadores genéticos del Receptor de FSH como predictores del resultado de un tratamiento de reproducción asistida

#### **3.2. Objetivos secundarios:**

- Describir los conceptos: medicina personalizada, estimulación suave y farmacogenética.
- Determinar el rol de los polimorfismos del gen *fshr*
- Aplicar los hallazgos bibliográficos a la estimulación suave.
- Desarrollar perspectivas de futuro para la aplicación de los hallazgos.

## **4. Materiales y métodos.**

### **4.1. Pregunta de investigación**

La realización de la pregunta de investigación se llevó a cabo mediante el método PICO, acrónimo de Paciente, Intervención, Comparación y Outcome (resultado). Los pacientes hacen referencia al grupo de personas a las que se dirige la investigación, la intervención es aquello que se quiere evaluar, la comparación hace referencia a las diferencias a investigar en el grupo de las pacientes y el resultado, las variables en las que nos vamos a centrar.

### **4.2. Búsqueda de datos:**

Diseño:

Se realizó una revisión bibliográfica de publicaciones científicas actualizadas hasta junio de 2022.

Estrategia de búsqueda:

Se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos PubMed (WEB) de publicaciones científicas en idioma inglés. Para la búsqueda se utilizaron diferentes descriptores: Follicle Stimulating Hormone; Polymorphism, Genetic; Pharmacogenetics; Receptors, FSH; Ovulation Induction; para su uso se escribía el termino en cuestión seguido de [Mesh]. Para encontrar los artículos más novedosos se ordenaron por fecha de antigüedad de publicación, apareciendo los más nuevos en primer lugar; también, para encontrar los metaanálisis se utilizó el filtro del buscador “Meta-analysis” solo incluyendo aquellos trabajos de revisión sistemática y metaanálisis.

Criterios de inclusión y exclusión.

Del total de estudios publicados, se incluyeron los trabajos que contaban con un cribado genético para detectar las variantes FSHR-Rs6166, FSHR-Rs6165 y FSHR-Rs1394205 y cuyos resultados aportasen datos sobre las siguientes variables: FSH basal, número de ovocitos obtenidos, calidad de los ovocitos obtenidos, cantidad de medicación usada, tasa de recién nacido vivo y efectos adversos (Hiper/hipo-respuesta).

Extracción de datos:

De total de los 58 trabajos encontrados en la base de datos, solo 11 cumplían dichos criterios. En total 4 metaanálisis y 7 artículos originales. Esta selección se realizó mediante la lectura del abstract para saber si el trabajo cumplía con las características expuestas previamente.

### **4.3. Visualización de proteína y cambios en modelo 3D.**

Los mutantes de cambio de aminoácidos se han ubicado en la proteína gracias a Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.), usando un modelo de predicción de la FSHR (Ref. UniProt P23945) elaborado por Alpha Fold, basado en la estructura cristalina de *Homo sapiens* (4).

## **5. Resultados**

La pregunta de investigación se formuló gracias al acrónimo PICO:

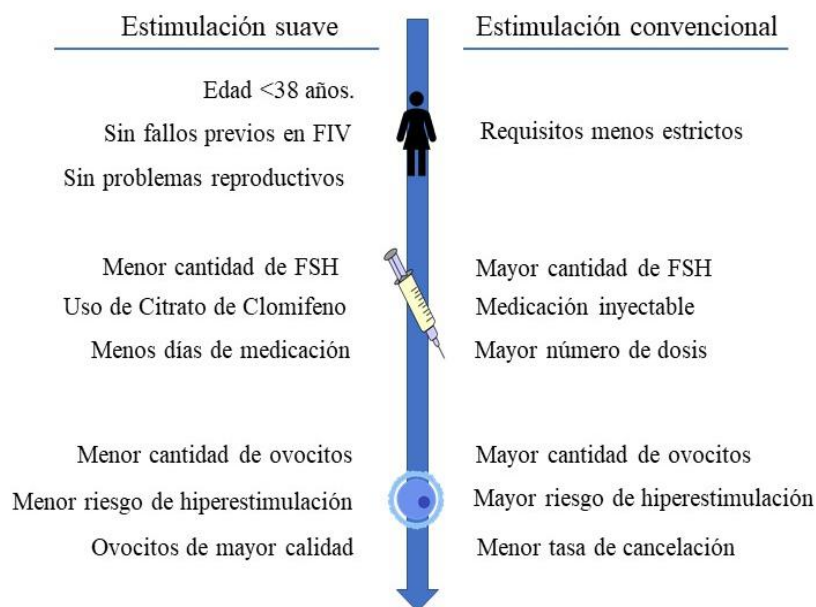
- Paciente: mujeres que se someten a un ciclo de estimulación suave
- Intervención: evaluar la capacidad de predecir el resultado de una estimulación.
- Comparación: diferentes variantes genéticas (SNPs) del receptor de la FSH.
- Resultados (Outcome): diferencias en FSH basal, número de ovocitos obtenidos, cantidad de medicación usada, tasa de recién nacido vivo y tipo de respuesta (Hiper/hipo-respuesta).

A partir de esta formulación se efectuó la búsqueda de material didáctico y científico para realizar la investigación.

### **5.1. Estimulación suave.**

Para poder llevar a cabo este estudio, lo primero que se ha de comprobar es, si realmente, la estimulación suave es un método de estimulación comparable a los protocolos tradicionales. Encontramos multitud de estudios que así lo demuestran e incluso dan gran valor a la estimulación suave por variables que son despreciadas en algunos casos como los costes o efectos secundarios. El último metaanálisis disponible que compara los

resultados de estimulación suave versus convencional fue publicado por Datta et al., 2021 (5) comparaba los dos tipos de estimulación en 31 ensayos clínicos aleatorizados, incluyendo 3 grupos en función de la respuesta a la estimulación (pobre, normal e hiperestimulación). Los resultados de este metaanálisis fueron similares a otros publicados anteriormente; no encuentran diferencias entre ambos tipos de estimulación en ninguno de los tres grupos en la tasa de recién nacido vivo ni en la tasa acumulada de recién nacido vivo. Donde sí encontramos diferencias significativas es en el riesgo de hiperestimulación; este es menor en el caso de las normo e hiper respondedoras sometidas a una estimulación suave. Así mismo, respecto a la tasa de cancelación de ciclo no encuentran diferencias entre pobre e hiperrespondedoras, pero sí hay diferencias en el caso de las normorrespondedoras, siendo superior la tasa de cancelación en pacientes sometidas a estimulación suave. Los resultados también revelan que en los protocolos de estimulación suave se obtienen un menor número de ovocitos y se generan un menor número de embriones, pero, la proporción de embriones de buena calidad es similar en ambos casos, aunque en términos absolutos sea inferior en la estimulación suave; además la estimulación suave disminuye el uso de gonadotropinas y, por tanto, disminuyen los riesgos asociados y el coste de la medicación.



**FIGURA 1: Esquema comparativo de la estimulación suave versus estimulación convencional.** Se tratan tres aspectos: características de la paciente, medicación utilizada y resultados de la estimulación. Elaboración propia.

## 5.2. Receptor de la FSH.

El gen del receptor de la FSH (FSHR) se ubica en el cromosoma 2p16.3, OMIM: 136435. Cuenta con 10 exones y una longitud de 54 kilobases. El producto es una proteína transmembrana de tipo proteína G, con 7 hélices transmembrana, un dominio extracelular y un dominio intracelular y un total de 695 residuos. El receptor es realmente un dímero, dos subunidades de FSHR, las cuales forman un tubo curvado cóncavo en el dominio extracelular que es el lugar de acople de la FSH; una vez se produce esta unión se provocan cambios conformacionales que derivan en la activación del receptor. La función principal del receptor es transducir la señal extracelular de la FSH a una señal intracelular y la activación del receptor provoca la activación de proteín-kinasas que activan diferentes vías en el interior celular. (6)

En este gen encontramos más de 2000 SNPs, pero solo unos pocos tienen una implicación funcional sobre la proteína (7). A continuación, se detallan aquellos con mayor relevancia:

**FSHR-Rs6166** (c.2039 A>G; p.N680S): localizado en el exón 10, se encuentra en el dominio intracelular de la proteína y se produce un cambio de una asparagina por una serina, añadiendo un posible sitio de fosforilación de la proteína (FIGURA 2 E). (6,7). Gracias a experimentos de cultivos celulares en células de granulosa humana se conoce el efecto que este polimorfismo ejerce sobre la dinámica celular; el estudio de Casarini et al., 2014 demostró que en el genotipo homocigótico S/S la producción de cAMP intracelular es más lenta comparada con el genotipo N/N. Este hecho hace que toda la cascada de activación, vía MAPK, desencadenada por el receptor de FSH sea cualitativa y cuantitativamente diferente entre ambos genotipos alterando la expresión de genes y la posterior producción de progesterona. (8)

**FSHR-Rs6165** (c.919 A>G; p.T307A): localizado en el exón 10, se encuentra en la región bisagra de la proteína que conecta el dominio de unión de la FSH al dominio transmembrana de la proteína. El cambio de una treonina por una alanina, que es un aminoácido no polar e hidrofóbico, provoca un cambio de interacción y retira un posible sitio de o-glicosilación (FIGURA 2 D). (6,7)

**FSHR-Rs1394205** (c. -29 G>A): se localiza en la región 5' UTR (región no traducida), y se relaciona con una menor actividad transcripcional de la proteína (FIGURA 2 B). (9)

Los resultados obtenidos del modelo en 3D de la proteína y los cambios producidos confirman lo observado por los datos bibliográficos. Como podemos observar en la figura 2 D, cuando se cambia la treonina por una alanina desaparece el átomo de oxígeno, coloreado en rosa y se pierde un sitio potencial de o-glicosilación que afectará a la actividad posterior de la proteína; también podemos observar que no hay ningún cambio en las uniones que el aminoácido crea con el resto de la proteína (línea discontinua amarilla), por tanto, este cambio no afecta a la conformación espacial ni estructura de la proteína. En el caso de la figura 2 E, ocurre el hecho contrario; el cambio de una asparagina por una serina da lugar a un grupo cetona que es un sitio potencial de fosforilación y O-glicosilación cambiando el procesamiento y actividad postranscripcional de la proteína.

**TABLA 1: Resumen de los polimorfismos más importantes del gen FSHR.**

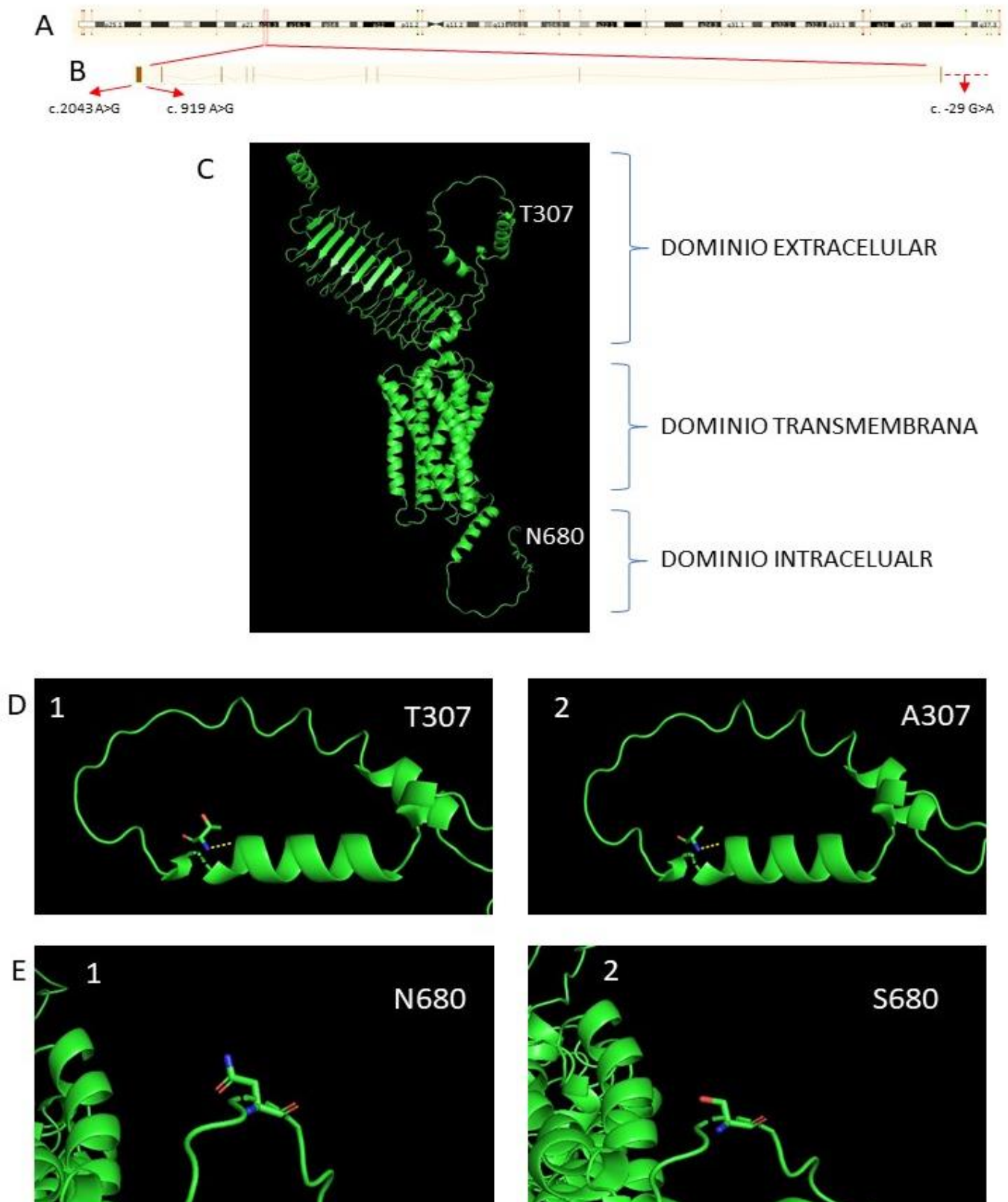
SNP	RefSeqGene	Cambio DNA	Cambio proteína	Efecto sobre la proteína
<b>FSHR-Rs6166</b>	NG_008146.1:g.196710 G>A	c.2039 A>G	p.N680S	Añade un potencial lugar de fosforilación y O-glicosilación. Producción post-transducional de cAMP más lenta.
<b>FSHR-Rs6165</b>	NG_008146.1:g.195590 G>A	c.919 A>G	p.T307A	Retirada de un lugar de posible O-glicosilación.
<b>FSHR-Rs1394205</b>	NG_008146.1:g.5046 G>A	c. -29 G>A	Cambio en región no codificante	Menor actividad transcripcional de la proteína.

Un hecho a destacar de los polimorfismos ubicados en el exón 10 (Rs6166 y rs6165) se encuentran en desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium). El LD es un fenómeno genético por el cual dos marcadores genéticos ubicados en el mismo cromosoma se segregan en proporciones distintas a las esperadas por el azar y es debido

a una cercanía física que impide que haya recombinación. En el caso de estos marcadores, encontramos dos haplotipos: Thr307/Asn680 (TN) y Ala307/Ser680 (AS), que son los más comunes; mientras que los haplotipos Thr307/Ser680 (TS) y Ala307/Asn680 (AN) solo representan un 10% del total de las variantes. En el trabajo de Simoni and Casarini, 2014, (7) se ha comprobado que existe un fenómeno de LD entre estos dos polimorfismos excepto en poblaciones africanas. También observan que la variante Ala307/Asn680 (AN) está muy conservada en las especies no humanas, al contrario de lo que ocurre en los humanos; es justamente en poblaciones africanas donde esta variante está más extendida y, por tanto, es el haplotipo ancestral del que han surgido las nuevas variantes en dos procesos de mutagénesis diferentes y dando lugar a los haplotipos dominantes a día de hoy (TN y AS) (7).

Gracias a estudios en primates no homínidos sabemos que estas dos variantes son recientes: el alelo ancestral del polimorfismo rs6166 es el A, en consonancia con lo expuesto anteriormente, en primates no homínidos y las poblaciones africanas la variante más común es Asn680. Ya en Neandertales encontramos los primeros alelos G en la posición 680 (7) y es una variante que se mantiene en los humanos actuales. En el caso del polimorfismo rs6165 el alelo ancestral es G, y solo en primates homínidos encontramos la variante alélica A. Por tanto, como hemos indicado anteriormente, el haplotipo primigenio en humanos era Ala307/Asn680 y ha evolucionado hasta la distribución de hoy en día.

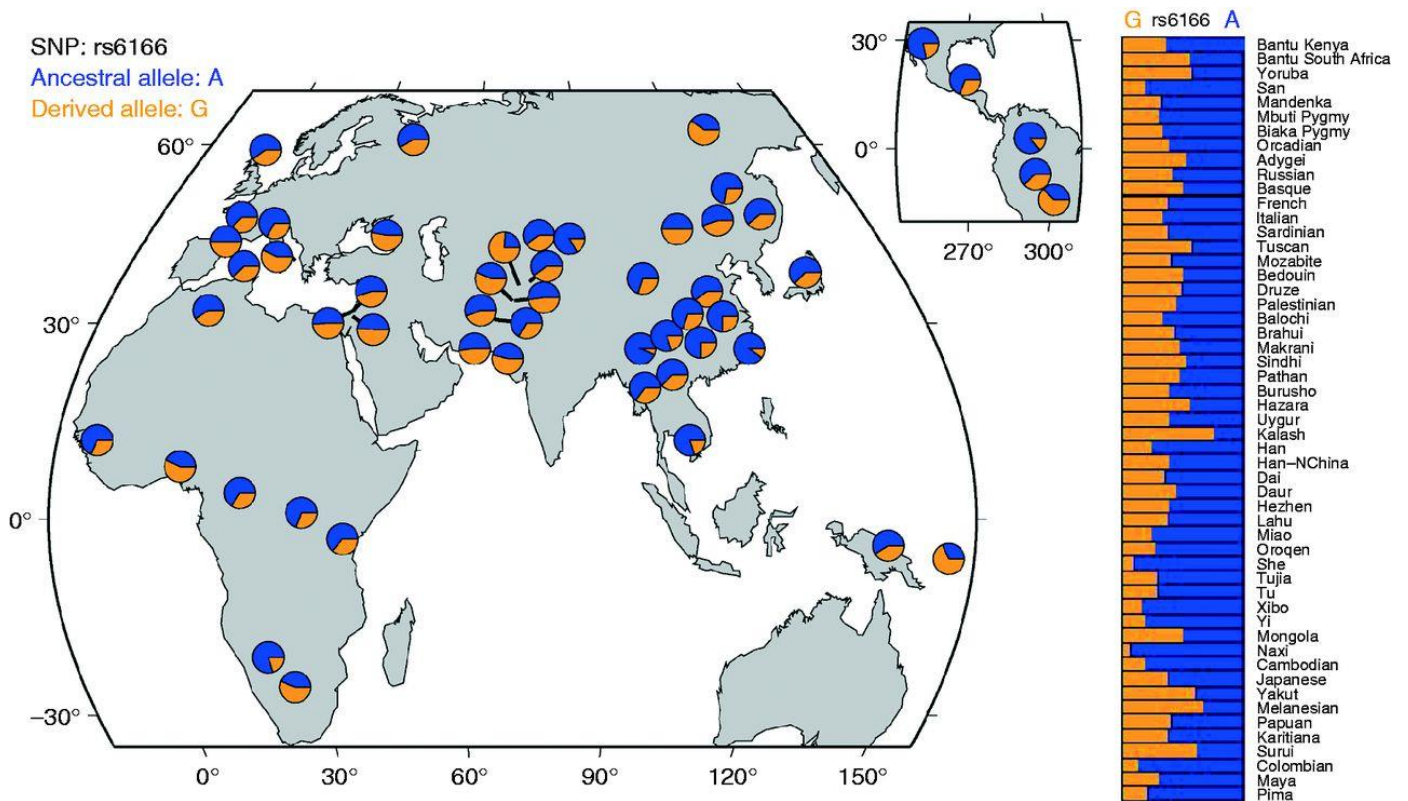
El hecho de que las variantes se hayan extendido de forma diferente en cada población hace que la distribución geográfica de las variantes sea muy poco uniforme; la distribución ha sido más estudiada en el caso del polimorfismo rs6166 y la podemos ver reflejada en el mapa de frecuencias (figura 3). Podemos observar que el alelo A ancestral es predominante en el África subsahariana y sudeste asiático, en cambio, el alelo G es predominante en poblaciones aisladas geográficamente como kalash (Pakistán), Surui (Brasil) o yakutis (Siberia); en regiones europeas, del oriente medio y Oceanía encontramos el alelo G con presencia superior al 50% en la población, sin llegar a ser muy predominante.



**FIGURA 2: Caracterización de los mutantes.** A) DNA del gen GLDC (obtenido de Ensembl) B) Ubicación de las mutaciones en el cDNA. C) Imagen en 3D del receptor de FSH y ubicación de las mutaciones en los dominios. D.1) Ubicación del residuo p.T307 y los puentes de hidrogeno que forma (líneas amarillas discontinuas) D.2) Ubicación del residuo p.A307 y los puentes de hidrogeno que forma (líneas amarillas discontinuas) E.1) Ubicación del residuo p.N680 E.2) Ubicación del residuo p.S680. Imágenes obtenidas con Pymol; elaboración propia.



En el caso del rs6165 la distribución ha sido menos estudiada; el alelo G es más abundante en el África subsahariana, mientras que, en el resto de las poblaciones, la distribución geográfica es similar al rs6166 debido al desequilibrio de ligamiento.



**FIGURA 3: Distribución alélica del polimorfismo FSHR-Rs6166.** Porcentaje de cada alelo en cada una de las poblaciones; Alelo ancestral A en azul, alelo G en naranja. Mapa extraído de Simoni and Casarini, 2014, (7).

### 5.3. Revisión bibliográfica.

En el proceso de revisión bibliográfica se han obtenido un total de 7 artículos científicos y 4 metaanálisis. A continuación, se comentarán los datos más relevantes que se han extraído del conjunto de trabajos seleccionados.

El primer trabajo publicado sobre estos polimorfismos y su importancia en ciclos de estimulación fue el realizado por Mayorga et al., 2000 (10); este estudio cuenta con 163 pacientes sometidas a ciclos de reproducción asistida cuyos principales resultados muestran que existen diferencias significativas en el nivel basal de FSH y en la cantidad de FSH exógena necesaria para alcanzar el mismo efecto, en ambos casos los niveles son superiores en las pacientes homocigóticas para Ser/Ser; concluyen el estudio proponiendo

que este polimorfismo tiene un rol importante en la fisiología del FSH. A raíz de este estudio se ha abierto la puerta a nuevos trabajos con estos polimorfismos.

En 2005, Greb et al, (11) realizaron un estudio con 21 mujeres, 12 homocigóticas ASN680 y 9 homocigóticas SER680. A estas se les practicaban diariamente análisis hormonales en sangre desde 9 días antes de la menstruación, hasta el inicio del siguiente periodo menstrual. Los datos se ordenaron en dos escalas diferentes: una en función del día del comienzo de la menstruación y una segunda en función del pico de LH. Los resultados observados determinaron que los niveles de FSH fueron más altos para el genotipo homocigótico SER680 respecto a ASN680 durante la mayoría de los 18 días previos al pico de LH. Otro resultado observado fue que los niveles de progesterona, estradiol e inhibina A disminuyen más rápidamente en el grupo SER680 y por tanto existe en este grupo una menor retroalimentación negativa hacia el sistema nervioso central, lo que puede explicar el aumento del nivel de la FSH. En último lugar, determinaron que la longitud del ciclo era superior para el grupo SER680. Las principales conclusiones a las que llega este estudio, es que, como en el caso anterior, el umbral de respuesta al FSH es superior en el genotipo SER680, lo que denominan una variante “resistente” al FSH, ya que, para conseguir completar el ciclo de manera normal, el genotipo SER680 precisa de un mayor nivel de FSH.

Posteriormente, estos trabajos se realizaron en pacientes de hiperestimulación ovárica controlada. En este sentido, encontramos el trabajo de Xianliang et al., 2014 (12); este es un estudio retrospectivo con 1250 mujeres sometidas a un tratamiento de reproducción asistida. Los resultados de este estudio concluyeron diferencias estadísticamente significativas para este polimorfismo N680S en el nivel basal de la FSH, en la FSH exógena que necesitaron las pacientes, el nivel de estrógenos en el día de la inyección de hCG y en el número de ovocitos obtenidos. En segundo lugar, se formaron dos grupos en función de la cantidad de ovocitos obtenidos: las pobres respondedoras, aquellas que obtienen menos de 5 ovocitos y las buenas respondedoras, con más de 5 ovocitos. Los análisis determinaron que las posibilidades de ser pobre respondedora eran más de dos veces mayor en pacientes homocigóticas SS respecto a homocigóticas NN (OR=2'25). Este grupo de pobres respondedoras necesitaba mayores dosis de gonadotropinas exógenas para alcanzar un mayor número de ovocitos. Como conclusión confirman que el polimorfismo N680S se relaciona con el resultado de la estimulación ovárica, basado

en la necesidad de mayor consumo de FSH exógeno de estas pacientes para alcanzar el mismo resultado.

En 2019, Köing et al, (13) realizaron otro estudio retrospectivo que incluía 1185 pacientes sometidas a TRA. En estos tratamientos se administraba FSH recombinante en igual cantidad a todas las pacientes con un pequeño ajuste a la edad de las mismas. En este estudio se incluyen también pacientes heterocigóticas NS. Los resultados del estudio constatan diferencias significativas entre la FSH basal, el número de ovocitos obtenidos, número de embriones obtenidos y tasa de recién nacido vivo por embrión transferido. Un hecho a destacar es que la tasa de recién nacido vivo en el primer ciclo es significativamente superior en el genotipo heterocigótico (NS) y en el homocigótico (SS); los investigadores proponen que este hecho puede deberse a una desregulación de la receptividad endometrial y niveles hormonales generados por la hiperestimulación a la que están sometidas las pacientes. Por el contrario, cuando generan un modelo de regresión logística ajustado a diferentes variables, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de recién nacido vivo acumulado. Además, como en el trabajo anterior, encuentran un mayor porcentaje de pobres respondedoras en el grupo SS respecto al NS y SS. Las conclusiones del trabajo son similares a las vistas en el caso anterior; esta variante es más “resistente” al FSH exógeno administrado y esto afecta a la cantidad de ovocitos que obtenemos, sin embargo, en el estudio no detectan una peor tasa de RNV acumulativo, hecho que atribuyen a la mejor calidad de los ovocitos del grupo SS.

Overbeek et al., 2009 (14) realizó un estudio retrospectivo que relacionaba la resistencia al CC con el genotipo del rs6166 del FSHR. Para llevar a cabo este estudio utilizó datos de 193 pacientes afectadas de SOP, sometidas a un tratamiento ovulatorio con CC, a las que se les realizó un análisis genético para conocer el marcador N680S; los resultados no detectaron diferencias en las características basales de las pacientes pero si revelaron una predisposición a la resistencia al CC de las pacientes con genotipo S/S comparadas con los grupos N/N y N/S, siendo el doble de probable que se encontrase dicha resistencia en ese grupo ( $OR > 2$ ). Concluyen el estudio postulando que el genotipo S/S es más resistente al CC guardando relación con el umbral de FSH alterado en estas pacientes.

Por el contrario, tenemos ejemplos de otros trabajos cuyos resultados son contrarios a los comentados anteriormente. El trabajo de Pirtea et al., 2022 (15), es un estudio

retrospectivo con 1183 pacientes TRA desde 2006 hasta 2017, en el que no se observa relación entre el polimorfismo rs6166 (N680S) y las variables estudiadas (tasa de ovocitos obtenidos, blastocito útil, tasa de implantación y tasa de RNV) y por tanto no está asociado al resultado reproductivo, descartándose como biomarcadores.

El trabajo de La Marca et al., 2013 (16) con 193 pacientes analizó los efectos del polimorfismo rs6166 y un segundo polimorfismo del gen la subunidad B de la FSH. En ambos casos individualizados no encontró diferencias significativas respecto a características basales (FSH, AMH o estradiol); en cambio, si encontró diferencias en el estradiol basal en día 3 cuando se combinaban ambos polimorfismos.

Los resultados obtenidos de muchas investigaciones han sido contradictorios, por esta razón varios autores han optado por analizar los datos conjuntos de todos los trabajos para ver los efectos conjuntos y poder sacar conclusiones. En este sentido se han realizado diversas revisiones sistemáticas y metaanálisis de los trabajos de investigación publicados.

El primer metaanálisis realizado sobre la influencia de los polimorfismos de FSHR fue realizado por Yao et al., 2011 (17); en este se incluyeron 8 trabajos para un total de 1092 casos evaluados. Los resultados observados determinaron que la variante Ser680 está asociada a un incremento basal de la FSH y una tendencia de aumento de la dosis exógena necesaria, aunque esta diferencia no era significativa; además, el genotipo SS es más común entre las pobres respondedoras. En cambio, no se observan diferencias entre los ovocitos obtenidos o tasas de embarazo. El estudio destaca un alto grado de heterogeneidad, que podría ser explicada por la inclusión de diferentes etnias y el tipo de estudio que se está valorando.

En segundo lugar, encontramos el metaanálisis realizado por el grupo de Tang et al., 2015 (18). En este se incluyeron un total de 16 estudios y 4287 pacientes. Sus resultados indican que el único parámetro en el que hay diferencias significativas entre los genotipos SS y NS/NN es en el número de ovocitos obtenidos; en el caso de la dosis de FSH exógena administrada, el tipo de respuesta (baja respuesta/buena respuesta) y las tasas de embarazo clínico no hay diferencias significativas entre los datos estudiados de los distintos genotipos. El trabajo concluye que este puede ser un buen biomarcador para predecir el

número de ovocitos, pero falla en el resto de las variables, atribuyendo este resultado a un tamaño de muestra insuficiente.

El metaanálisis realizado por Alviggi et al., 2017 (19) analiza varios polimorfismos del gen FSHR (rs6166, rs6165, rs1394205) y de otros genes como son el gen *lhb* y *lhcg*. Los resultados del metaanálisis reflejan diferencias significativas en el número de ovocitos obtenidos para los polimorfismos rs6165 y rs6166; en el caso del rs6166 la variante S680 se asocia a menor número de ovocitos, mientras que en el caso del rs6165 T307 se asocia a un número mayor de ovocitos obtenidos durante la estimulación ovárica; en el consumo de FSH exógeno hay diferencias significativas en el polimorfismo rs1394205, la variante G consume menor cantidad de FSH exógena. En el resto de las variables, duración de la estimulación, número de ovocitos MII y tasa de embarazo en curso, no hay diferencias significativas. En el estudio también se determina diferencias significativas en la FSH basal, siendo sus niveles mayores para la variante S680 (rs6166) demostrando la “resistencia” de esta variante del receptor a la FSH. Otro análisis realizado por este estudio demuestra que el número de ovocitos obtenidos de pacientes SS (rs6166) son menores cuando se usa FSH recombinante respecto a las pacientes NN; mientras que si la estimulación se realizaba con Gonadotropina urinaria no había diferencias entre el número de ovocitos obtenidos.

El último metaanálisis publicado hasta la fecha es el de Prodromidou et al., 2022 (20); en este se incluyeron 11 estudios y 4343 pacientes y solo analiza los polimorfismos del rs6166. Los principales resultados que observaron se relacionaban con los niveles de estradiol el día de la administración de hCG y en el número de embriones transferidos; en ambos casos estos valores eran mayores para el genotipo homocigótico Asn/Asn respecto al homocigótico Ser/Ser. En cambio, cuando hablan del número de embriones transferibles, son superiores para el genotipo Ser/Ser. Las principales conclusiones que obtienen de este metaanálisis apuntan a que la combinación del estradiol en día de administración de hCG en combinación con estos marcadores genéticos pueden ser buenos marcadores de cara al éxito de la estimulación ovárica.

**TABLA 2: resumen de los resultados de la revisión bibliográfica.**

AUTOR	TAMAÑO MUESTRAL	TIPO DE ESTUDIO	POLIMORFISMOS ANALIZADOS	CONCLUSIONES	REFERENCIA
Mayorga et al., 2000	163	Observacional prospectivo	FSHR-Rs6166 FSHR-Rs6165	Diferencias en la FSH basal y cantidad de FSH exógena consumida.	(10)
Greb et al., 2005	21	Observacional prospectivo	FSHR-Rs6166	Niveles de FSH más altos durante el ciclo y umbral de respuesta al FSH es superior en el genotipo SER680.	(11)
Xianliang et al., 2014	1250	Estudio de cohortes prospectivo	FSHR-Rs6166	Diferencias en nivel basal de la FSH, FSH exógena consumida, nivel de estrógenos en el día de hCG y en el número de ovocitos obtenidos. Doble de posibilidades de ser pobre respondedora (genotipo SS).	(12)
Köing et al., 2019	1185	Observacional retrospectivo	FSHR-Rs6166	Diferencias en FSH basal, el número de ovocitos obtenidos, número de embriones obtenidos y tasa de recién nacido vivo por embrión transferido. La variante (SS) es resistente a la FSH.	(13)
Overbeeck et al., 2009	193	Observacional retrospectivo	FSHR-Rs6166	Resistencia de la variante SS al Citrato de Clomifeno es el doble comprada con las variantes NN y NS.	(14)
Pirtea et al., 2022	1183	Estudio de cohortes retrospectivo	FSHR-Rs6166	No detecta diferencias entre tasa de ovocitos obtenidos, blastocito útil, tasa de implantación y tasa de RNV de ambos grupos NN y SS.	(15)
La Marca et al., 2013	193	Observacional prospectivo	FSHR-Rs6166	No encuentra diferencias en FSH basal cuando analiza FSHR-Rs6166, pero si las detecta en combinación con polimorfismos de la subunidad B de la FSH.	(16)
Yao et al., 2011	1092	Metaanálisis	FSHR-Rs6166	Diferencias en FSH basal y tendencia al mayor consumo de FSH exógena.	(17)
Tang et al., 2015	4287	Metaanálisis	FSHR-Rs6166	Diferencias en el número de ovocitos obtenidos. Proponen el polimorfismo como un predictor de ovocitos obtenidos.	(18)
Alviggi et al., 2017	5532	Metaanálisis	FSHR-Rs6166 FSHR-Rs6165 FSHR-Rs1394205	FSHR-Rs6166 y Rs6165 se asocia a un menor número de ovocitos y FSHR-Rs1394205 se asocia a menor consumo de FSH exógena. El uso de gonadotropinas urinarias hace desaparecer este efecto.	(19)
Prodromidou et al., 2022	4343	Metaanálisis	FSHR-Rs6166	Diferencias en el estradiol y número de embriones transferidos (mayores para NN). Combinación estradiol y marcador genético como predictor.	(20)

## **6. Argumentación crítica de los resultados.**

Para integrar toda la información obtenida se procederá a comentar los principales resultados en función de las variables determinadas inicialmente en la pregunta de investigación.

En primer lugar, se necesitaba plantear si los tratamientos de estimulación suave son tan efectivos como los de estimulación convencional; aunque esto puede ocupar un trabajo entero, lo publicado hasta día de hoy refleja que ambos tipos de tratamientos tienen resultados similares; los cuantiosos trabajos publicados sobre los pros y contras de un tipo de estimulación u otro tienen que verse respaldados por datos que nos ofrezcan una visión objetiva de la discusión. En este sentido, multitud de metaanálisis publicados en la actualidad llegan a conclusiones similares; en este trabajo se ha reflejado uno de los metaanálisis más completos y actualizados hasta la fecha que cuenta con 31 ensayos clínicos aleatorizados y una estratificación de pacientes en función de su respuesta. Las conclusiones de trabajo no muestran ninguna diferencia en la tasa de recién nacido vivo en ninguno de los tres grupos, pero sí que muestra diferencias en el riesgo de hiperestimulación y en la cancelación de ciclo. En definitiva, a pesar de un aumento de riesgo de cancelación en normorrespondedoras, la tasa de RNV y el menor riesgo de sufrir un síndrome de hiperestimulación hace que sean equiparables ambos tipos de estimulación; esto asociado al menor uso de gonadotropinas, lo que disminuye los efectos secundarios y gastos hacen que sea una opción muy a tener en cuenta en mujeres que cumplen las pautas mencionadas anteriormente en el trabajo.

La realidad actualmente es que las pacientes sometidas a este tipo de tratamientos no cumplen estas características recomendables; muchas de estas mujeres son mayores de 38 años y con fallos en ciclos previos, lo que obviamente va a hacer que la efectividad de este tipo de estimulación en la práctica clínica sea muy inferior a lo que se refleja en los estudios realizados al respecto como el mencionado anteriormente. Esta situación hace que tengamos que proponer nuevos métodos para incrementar la eficacia de este tipo de estimulación si realmente los beneficios son mayores.

En este trabajo hemos propuesto a la farmacogenética como medio para incrementar esta eficiencia. Se ha elegido el receptor de FSH ya que hay mucha literatura científica alrededor de los polimorfismos que afectan a este gen.

Los polimorfismos con mayor relevancia hasta el día de hoy son FSHR-Rs6166, FSHR-Rs6165 y FSHR-Rs1394205 y aunque el FSHR-Rs6166 es del que más resultados tenemos, todos pueden ser candidatos a ser buenos marcadores y, aunque no encontramos resultados completamente homogéneos, parece que todos indican en la misma dirección. A continuación, procederemos a comentar los resultados clínicos extraídos de los estudios en función de las variables: FSH basal, cantidad de medicación usada, número de ovocitos obtenidos, tasa de recién nacido vivo y tipo de respuesta:

### **FSH basal:**

Solo uno de los estudios, Greb et al., analiza los ciclos completos en términos de niveles hormonales y en este se refleja una diferencia entre los genotipos SS y NN del FSHR-Rs6166, lo que observamos son mayores niveles de FSH y menores de estradiol para el genotipo SS. Este hecho concuerda con 4 estudios más donde el nivel basal de FSH es superior en este genotipo y un metaanálisis también llega a esta conclusión. Todos los autores de estos trabajos proponen al polimorfismo FSHR-Rs6166 como “resistente” a la FSH; lo que ocurre es que la menor respuesta que origina este polimorfismo en el interior celular tienen que ser compensada con una mayor cantidad de FSH para obtener el mismo efecto, por tanto, es lógico que aparente ser una variante resistente a la luz de lo visto en estos estudios. Así mismo, hay otros trabajos en los que no se observa esta elevación de la FSH basal, aun así, los datos clínicos y fisiológicos parecen indicar que esta resistencia ocurre realmente.

### **FSH consumida:**

En cuanto a la FSH consumida, solo podemos valorar aquellos trabajos que han sido realizado con datos de ciclos de reproducción asistida. En este sentido, Mayorga et al. y Xianliang et al., detectan diferencias en la cantidad de FSH consumida, siendo superior para el genotipo SS. Este hecho guarda relación con el resultados anterior de la FSH basal, ya que corroboran que es necesaria una mayor cantidad de FSH para llegar al nivel de activación de las otras variantes. Un hecho también destacables es que en el trabajo de



Köing et al. no hay diferencia de cantidad usada de FSH debido al diseño de su investigación, pero esto se refleja en el resto de las variables, ya que los ovocitos obtenidos son menores, por tanto, vemos que si existe esa concordancia de la que se hablaba anteriormente de que hace indicar que el polimorfismo FSHR-Rs6166 es resistente al FSH.

Alviggi et al. en su metaanálisis llega a esta conclusión para el polimorfismo FSHR-Rs1394205, del que observa que necesita mayor cantidad de FSH para llegar al mismo efecto. A pesar de estos resultados, hay que tomar con cautela esta variable ya que es muy dependiente de la configuración del estudio o del tipo de tratamiento que reciban las pacientes.

### **Número de ovocitos obtenidos:**

Este es el parámetro clínico más importante de cara a la efectividad del tratamiento y donde los resultados son más homogéneos. Xianliang et al. y Köing et al. en sus trabajos demuestran que existen diferencias entre el número de ovocitos obtenidos, siendo menor en el genotipo SS. Como ya hemos comentado anteriormente, este dato es especialmente relevante en el estudio de Köing et al. ya que no hay diferencias en la FSH consumida. Estos datos se conforman en los metaanálisis de Alviggi et al. y Tang et al. donde detectan diferencias en el número de ovocitos obtenidos, siendo siempre menor en el genotipo SS. Este hecho es muy relevante, ya que el objetivo final de una estimulación es maximizar el número de ovocitos obtenidos y en este caso vemos que disminuye el número. Como se propone en Tang et al. este marcador si puede ser útil para predecir el número de ovocitos obtenidos y en función de este modificar los ciclos para que se maximice.

### **Tasa de recién nacido vivo:**

El único estudio que analiza la tasa de recién nacido vivo Köing et al., sí que detecta diferencias significativas entre los genotipos SS y NN, siendo menor la tasa del primero, pero este efecto se mitiga cuando se observa la tasa acumulada de recién nacido vivo aplicando una regresión logística. El resto de los estudios no encuentran diferencias en este parámetro, que es el objetivo principal de las pacientes que acuden a una clínica de reproducción, por tanto, estos marcadores pueden perder relevancia si no se observan diferencias en parámetros de RNV.

### **Tipo de respuesta:**

Xianliang et al. y Köing et al. observaron que el riesgo de ser baja respondedora, si era portadora del genotipo SS, era el doble comparado con el resto de los genotipos; en ambos casos, las Odds Ratio eran superiores a 2, por tanto, hay una evidencia estadística de que este genotipo causa más casos de baja respuesta. Este hecho tiene relación con lo demostrado en el apartado de número de ovocitos obtenidos ya que, si con este genotipo (FSHR-Rs6166 SS) obtenemos un menor número de ovocitos respecto a otros genotipos (FSHR-Rs6166 NN/NS), hay más posibilidades de ser pobre respondedora al no llegar a 5 ovocitos, límite estipulado entre baja respondedora y normo respondedora.

Para continuar con este apartado, comentaremos otros resultados obtenidos durante la revisión que se consideran de gran interés para el trabajo.

Como se ha comentado en la introducción, la estimulación suave se basa en el menor uso de gonadotropinas para la estimulación ovárica, el citrato de Clomifeno, es uno de los fármacos usados en este tipo de estimulación. El CC bloquea los receptores de estrógenos del sistema nervioso central, generando el bloqueo hipofisario del feedback negativo, que provoca un aumento de la GnRH, incrementando la síntesis de FSH y LH, hecho que favorece la ovulación. Lo que observó Overbeeck et al. en su estudio es que, las mujeres que portan el genotipo FSHR-Rs6166 SS son más resistentes al tratamiento con este fármaco; el riesgo de no ovular con dicho fármaco era más del doble cuando se comparaban los genotipos FSHR-Rs6166 SS vs NN/NS. Lo que observamos una vez más, es que el umbral de la FSH está alterado. Como se ha comentado anteriormente, las cantidades de FSH necesarias para la correcta maduración ovocitaria de las portadoras del FSHR-Rs6166 SS son superiores a las del genotipo NN. Se concluye que estos hechos guardan relación ya que, si aplicamos un fármaco como el citrato de Clomifeno para incrementar los niveles de FSH necesitamos superar el umbral necesario para la evolución de los folículos, si dicho umbral está alterado y las cantidades no son suficientes para que se produzca la maduración, nos encontraremos en una situación similar a no aplicar n ningún tipo de fármaco y resultará en una mayor tasa de cancelación, especialmente si hablamos de estimulación suave.

Otro resultado con relevancia extraído del metaanálisis de Alviggi et al. nos indica que el uso de gonadotropinas urinarias frente a la FSH recombinante hace desaparecer las diferencias en cuanto al número de ovocitos obtenidos. La posible causa puede encontrarse en las distintas isoformas que encontramos en cada uno de los fármacos; las gonadotropinas urinarias contienen gran variedad de isoformas, mientras que de la rFSH las isoformas son mucho más limitadas. Las isoformas de las hormonas tienen un claro impacto sobre su función y la capacidad de estas de mitigar efectos producidos por el genotipo FSHR-Rs6166 SS ha de ser tomada en cuenta para la aplicación de los protocolos de estimulación.

Un último hecho a comentar guarda relación con la elevada heterogeneidad de los metaanálisis utilizados. En los 4 metaanálisis incluidos en el estudio este factor hace que los resultados tengan que ser tomados con mucho cuidado. La explicación que dan los autores a este hecho se relaciona con la distribución étnica; como se ha comentado, la distribución de los polimorfismos, en especial FSHR-Rs6166 es muy variada en función de las regiones, esto hace que muchos de los resultados puedan variar en función de la población de referencia que se utilice. Los principales resultados de la división por etnias dan una visión más precisa con resultados que pueden ser aplicados a dichas etnias; esto hace que nuestro marcador seleccionado pierda valor, ya que se necesita un marcador global que funcione en todas las etnias por igual, para poder ser aplicado en cualquier caso.

Para concluir este apartado hay que hacer referencia al modelo 3D de la proteína y la visualización de los distintos cambios realizados. Haciendo una recapitulación de los resultados, se han determinado unas claras tendencias relacionadas con los polimorfismos estudiados: se observa una resistencia a la FSH que provoca un umbral más alto para alcanzar el correcto desarrollo de los ovocitos, esto provoca la obtención de un menor número de ovocitos tras EOC y mayor porcentaje de pacientes pobres respondedoras. Los datos obtenidos del modelo 3D de la proteína coinciden con lo propuesto en la literatura, tanto en ubicación como en función. No se observa ningún cambio de interacción con otros aminoácidos, es decir, que no hay cambios conformacionales, ya que los polimorfismos FSHR-Rs6166 y FSHR-Rs6165 no se encuentran en regiones estructurales importantes. Lo que si observamos es un cambio funcional del receptor que causa la

resistencia a la FSH. A nivel molecular solo se conoce el efecto del polimorfismo FSHR-Rs6166 y lo que hay descrito en la literatura concuerda de nuevo con el modelo; observamos que esta mutación se ubica en el dominio intracelular de la proteína, donde se une el sistema de activación de la cascada de señalización. La adición de un posible lugar de fosforilación hace que toda esta dinámica celular cambie y se retrase la activación de la vía ERK produciéndose un ascenso más lento del cAMP más lento y generando la resistencia a nivel fisiológico como consecuencia de una respuesta al FSH más pobre, tanto cualitativa como cuantitativamente.

En el caso del polimorfismo FSHR-Rs6165 la mutación se ubica en una región enlace entre los dominios extracelular y transmembrana. La posible retirada de un lugar de O-glicosilación provoca un cambio en la vida media de la proteína, ya que se conoce que los residuos azucarados determinan características postraduccionales de las proteínas que los portan. Respecto al polimorfismo FSHR-Rs1394205 no podemos ver estos cambios reflejados en el modelo ya que se trata de una región no traducida (5'-UTR) pero el efecto sí que se observa a nivel fisiológico debido a una menor traducción del RNA mensajero debido al cambio de uno de los nucleótidos, lo que supone un impedimento en la unión de los factores y maquinaria de traducción, generando por tanto, menor cantidad de proteína FSHR y dando lugar a una respuesta menor.

## 7. Conclusiones.

Actualmente los tratamientos médicos se orientan hacia la medicina personalizada. El reciente aumento de su popularidad y sus elevados costes hacen que quede muy lejos su aplicación en la práctica clínica habitual, por lo que hay que seguir investigando en esta dirección para conseguir con el tiempo un sistema de prevención, detección y tratamientos que aumente la efectividad de los mismos y que mejore la calidad asistencial a los pacientes.

Una de las aproximaciones a esta medicina personalizada es la farmacogenética, como hemos visto a lo largo del trabajo, las variaciones de los genes tienen influencia en los resultados de los tratamientos convencionales. Lo que se ha intentado demostrar en este trabajo es que la farmacogenética es una opción a día de hoy y hay varios ejemplos donde la aplicación de la misma nos puede aportar una nueva visión, en este caso, de los protocolos de estimulación. Observamos que el pronóstico, en número de ovocitos, que nos ofrecen las características clínicas y bioquímicas analizadas de manera habitual, en ocasiones no se corresponden con los resultados reales obtenidos, dando lugar a bajas respuestas. Esta es la razón por la que se propone la farmacogenética como herramienta para entender esta variabilidad y que permita explicar los casos en los que los resultados no sean acordes a lo esperado.

Uno de los genes más estudiados en el ámbito de los ciclos de reproducción asistida es el *fshr*. El receptor de la FSH es una proteína indispensable en el proceso evolutivo y madurativo de los folículos y, las variaciones que encontramos en el genoma pueden alterar la acción de la FSH administrada de forma exógena en los tratamientos de estimulación ovárica controlada. No solo este gen tiene efectos sobre la EOC, otros como la subunidad B de la FSH (*fshb*) también se han mostrado como posibles marcadores; incluso se han demostrado interacciones entre polimorfismos de ambos genes que provocan diferencias significativas en el nivel basal de la FSH, dando lugar a una posible resistencia debido a cambios en la proteína y el receptor (16). Además de este, otros genes como *lhb* (subunidad B de la LH), *hcgb* (subunidad B de la hCG) y el *lhcr* (receptor de LH y hCG) son candidatos a incluirse dentro de estos marcadores genéticos.

El objetivo principal de este tipo de investigaciones y aproximaciones es mejorar la eficacia de los protocolos de estimulación, especialmente en aquellos casos donde las

previsiones son peores. Por esta razón, el trabajo, se ha ideado de cara a la estimulación suave, un tipo de estimulación con menor cantidad de medicación y por tanto menor riesgo de hiperestimulación, menores efectos derivados de la medicación convencional y un menor gasto económico. Este tipo de estimulaciones sigue la corriente “Menos es más”, donde el método de estimulación más natural sería menos agresivo y se obtendrían ovocitos de mejor calidad y mejorando la calidad del endometrio para la implantación a costa de obtener un número menor de ovocitos. Esta idea está muy extendida y es uno de los argumentos que abalan a la estimulación suave como un método alternativo, fiable y más seguro que las estimulaciones convencionales, pero no ha sido completamente demostrada ya que existen argumentos en contra y a favor de la misma.

Actualmente, los resultados de la estimulación suave no son los esperados; el aumento de popularidad de este tipo de tratamientos y la aparición de clínicas especializadas como MiniFiv Madrid han generado un mayor uso de estas técnicas pero sus resultados no son óptimos. Hemos comentado ya que el mayor problema de este tipo de estimulación es la población a la que va dirigida: mujeres jóvenes, sin problemas reproductivos graves y sin fallos en ciclos anteriores. La realidad es bien distinta, encontramos un gran número de pacientes de edad más avanzada y mujeres que llevan muchos intentos en estimulaciones y transferencias y no han conseguido aún ser madres. A pesar de esta realidad de la estimulación suave los avances en medicina personalizada deberían centrarse en incrementar las posibilidades de todos los tipos de pacientes, no sólo de aquellas cuyas características son ideales para este tipo de tratamientos.

El problema de este tipo de estimulación, como se ha comentado en el trabajo, es que se obtiene un menor número de ovocitos para conseguir el objetivo del recién nacido vivo. Como alternativa existe la acumulación ovocitaria en varios ciclos de estimulación o aumentar la eficacia de este tipo de tratamientos para conseguir el máximo número de ovocitos posibles, con la menor cantidad de medicación posible. El descubrimiento e investigación de nuevos biomarcadores es esencial para maximizar la eficiencia de estas estimulaciones. En este trabajo, el marcador estudiado ha sido el gen del *fshr* y se han observado resultados esperanzadores de cara a uso futuro uso.

Los resultados de la búsqueda bibliográfica demuestran que los polimorfismos (SNPs) presentes en el FSHR tienen repercusión sobre los resultados de la estimulación. Del que más resultados significativos se han obtenido es el FSHR-Rs6166, los estudios

observaciones y metaanálisis han demostrado diferencias significativas de manera conjunta en la FSH basal y el número de ovocitos obtenidos. La principal conclusión obtenida durante el estudio es que este polimorfismo genera una resistencia al FSH, lo que hace que se necesita una mayor cantidad de FSH para obtener los mismos resultados; esto se refleja en un umbral FSH alterado y la evolución de un menor número de folículos, que dan un menor número de ovocitos recuperados tras la punción.

Los resultados obtenidos, en cambio, no muestran diferencias en las tasas de embarazo ni en las tasas de recién nacido vivo. Estas estadísticas son las más importantes, ya que el objetivo de un ciclo de reproducción asistida es conseguir un embarazo evolutivo que llegue a término. Que estas tasas no se vean modificadas cuando se comparan diferentes polimorfismos puede hacer que el marcador pierda valor, ya que el objetivo final se cumple de igual manera. Es por ello que algunos autores proponen estos polimorfismos como factores protectores del embarazo, en donde, la existencia de estos polimorfismos hace que la calidad de los ovocitos mejore y no se vea afectada la tasa de embarazo. Aun así, tener más marcadores que nos ayuden a la hora de evaluar la efectividad de la estimulación y poder predecir más exactamente el número de ovocitos que vamos a obtener son esenciales para aconsejar a las pacientes que tipo de estimulación es más recomendable.

Estos resultados contradictorios tienen que ser estudiados de cara al futuro, realizando ensayos clínicos aleatorizados y posteriores metaanálisis de sus resultados para eliminar la elevada heterogeneidad que muestran actualmente los estudios. Con estos nuevos datos, se podrían establecer nuevos marcadores genéticos y procedimientos que nos ayudasen a la elección de un correcto tratamiento. Actualmente se comienza a ver que detrás de los marcadores genéticos se esconde parte de la aleatoriedad de los resultados y controlar este componente nos dirigiría hacia una medicina personalizada centrada en cada paciente.

Por tanto, uniendo todos los datos recabados, hemos determinado que la estimulación suave es un método efectivo y más seguro que la estimulación convencional pero que sus resultados actuales no son los esperados. Para conseguir que estos resultados mejoren, necesitamos nuevas aproximaciones clínicas para reducir la variabilidad de los resultados. En el trabajo se propone la farmacogenética, más concretamente se estudia el receptor de la FSH como marcador genético que puede generar variabilidad en los resultados. La

estimulación suave necesita de estos marcadores para mejorar su eficiencia y conseguir un mayor número de óvulos ya que estos están comprometidos a causa de utilizar menos dosis de fármacos. La existencia de polimorfismos en el *fshr* da lugar a diferencias en los resultados clínicos, principalmente la obtención de un menor número de ovocitos. Por tanto, la existencia de estos polimorfismos reduce más aún el número de ovocitos obtenidos, llevándonos a una situación de baja respuesta e incluso a una cancelación del ciclo. Por esta razón, la búsqueda de estos marcadores es esencial, especialmente en este tipo de tratamientos, donde la cantidad de ovocitos que se manejan es menor. Por otro lado, estos polimorfismos también influyen en la actuación del Citrato de Clomifeno, muy utilizado en estimulación suave. Se ha demostrado una resistencia a este fármaco de aquellas mujeres con el polimorfismo FSHR-rs6166 SS y esto tienen un impacto claro en el tratamiento ya que, su efectividad será menor y se conseguirán un menor número de ovocitos. El análisis de este marcador podría ser muy útil para modificar los protocolos en función de la genética de cada paciente y mejorar la eficacia del tratamiento.

La investigación y uso de este tipo de marcadores pueden ser muy útiles para controlar las más variables y poder maximizar la obtención de ovocitos en cada estimulación. Además, el estudio conjunto de otros genes puede ser de gran ayuda; en estimulaciones convencionales la FSH es exógena, pero, en estimulaciones suaves donde se usa el citrato de Clomifeno, la FSH es endógena; esto hace que sea interesante estudiar nuevos polimorfismos en el gen de la *fshb* y como la combinación de estos polimorfismos afecta al resultado final.

Para concluir, un solo marcador genético no va a ser suficiente para comprender toda la variabilidad observada en un tratamiento de estimulación ovárica controlada, por eso el trabajo en un pool de marcadores tiene que ser el camino a seguir en el futuro, generando paneles de marcadores genéticos, clínicos y bioquímicos que permitan una mejor gestión de las pacientes.



## 8. Bibliografía.

- (1) Redekop WK, Mladi D. The faces of personalized medicine: a framework for understanding its meaning and scope. *Value Health* 2013 Sep-Oct;16(6 Suppl):4.
- (2) Gianaroli L, Vitagliano A, Ferraretti AP, Azzena S, Terzuoli G, Perruzza D, et al. IVF Lite: a smart IVF programme based on mild ovarian stimulation for good prognosis patients. *Reprod Biomed Online* 2022 -08;45(2):256-263.
- (3) Desai SS, Roy BS, Mahale SD. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction. *Reproduction* 2013 -12;146(6):235.
- (4) Received: 11 May 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 -08;596:583-589.
- (5) Datta AK, Maheshwari A, Felix N, Campbell S, Nargund G. Mild versus conventional ovarian stimulation for IVF in poor, normal and hyper-responders: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2020 -11-04;27(2):229-253.
- (6) Wunsch A, Sonntag B, Simoni M. Polymorphism of the FSH receptor and ovarian response to FSH. *Ann Endocrinol (Paris)* 2007 -06;68(2-3):160-166.
- (7) Simoni M, Casarini L. Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *Eur J Endocrinol* 2014 -03;170(3):91.
- (8) Casarini L, Moriondo V, Marino M, Adversi F, Capodanno F, Grisolia C, et al. FSHR polymorphism p.N680S mediates different responses to FSH in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2014 -08-05;393(1-2):83-91.
- (9) Casarini L, Santi D, Marino M. Impact of gene polymorphisms of gonadotropins and their receptors on human reproductive success. *Reproduction* 2015 -12;150(6):175.
- (10) Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 -09;85(9):3365-3369.
- (11) Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L, et al. A Common Single Nucleotide Polymorphism in Exon 10 of the Human Follicle Stimulating Hormone Receptor Is a Major Determinant of Length and Hormonal Dynamics of the Menstrual Cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005 August 1,;90(8):4866-4872.
- (12) Huang X, Li L, Hong L, Zhou W, Shi H, Zhang H, et al. The Ser680Asn polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is associated with the ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015 -04;82(4):577-583.
- (13) König TE, van der Lee J, Schats R, Lambalk CB. The relationship between FSH receptor polymorphism status and IVF cycle outcome: a retrospective observational study. *Reproductive BioMedicine Online* 2019;39(2):231-240.

- (14) Overbeek A, Kuijper EAM, Hendriks ML, Blankenstein MA, Ketel IJG, Twisk JWR, et al. Clomiphene citrate resistance in relation to follicle-stimulating hormone receptor Ser680Ser-polymorphism in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 2009 August 1,;24(8):2007-2013.
- (15) Pirtea P, de Ziegler D, Marin D, Sun L, Tao X, Ayoubi JM, et al. Gonadotropin receptor polymorphisms (FSHR N680S and LHCGR N312S) are not predictive of clinical outcome and live birth in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2022 - 07-13.
- (16) La Marca A, Papaleo E, Alviggi C, Ruvolo G, De Placido G, Candiani M, et al. The combination of genetic variants of the FSHB and FSHR genes affects serum FSH in women of reproductive age. *Hum Reprod* 2013 -05;28(5):1369-1374.
- (17) Yao Y, Ma C, Tang H, Hu Y. Influence of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn polymorphism on ovarian function and in-vitro fertilization outcome: A meta-analysis. *Mol Genet Metab* 2011;103(4):388-393.
- (18) Tang H, Yan Y, Wang T, Zhang T, Shi W, Fan R, et al. Effect of follicle-stimulating hormone receptor Asn680Ser polymorphism on the outcomes of controlled ovarian hyperstimulation: an updated meta-analysis of 16 cohort studies. *J Assist Reprod Genet* 2015 -12;32(12):1801-1810.
- (19) Alviggi C, Conforti A, Santi D, Esteves SC, Andersen CY, Humaidan P, et al. Clinical relevance of genetic variants of gonadotrophins and their receptors in controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2018 September 1,;24(5):599-614.
- (20) Prodromidou A, Dimitroulia E, Mavrogianni D, Kathopoulos N, Pappa KI, Loutradis D. The Effect of the Allelics of Ser680Asn Polymorphisms of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in IVF/ICSI Cycles: A Systematic Review and Meta-analysis. *Reprod Sci* 2022 -06-09.