



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Medicina y Cirugía

**Impacto sobre la expresión génica del
endometrio de la maduración final
ovocitaria con un agonista de la GnRH y
diferentes protocolos de soporte de
fase lútea**

Tesis Doctoral presentada por:

Alfonso Bermejo de la Calzada

Directores:

Prof. Dr. Juan Antonio García Velasco

Dra. María Cerrillo Martínez

Madrid, 2013



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Medicina y Cirugía

Impacto sobre la expresión génica del
endometrio de la maduración final
ovocitaria con un agonista de la GnRH y
diferentes protocolos de soporte de
fase lútea

Tesis Doctoral presentada por:

Alfonso Bermejo de la Calzada

Directores:

Prof. Dr. Juan Antonio García Velasco

Dra. María Cerrillo Martínez

Madrid, 2013

Juan Antonio García Velasco, Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología de la
Universidad Rey Juan Carlos de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: 'Impacto sobre la expresión génica del endometrio de la maduración final ovocitaria con un agonista de la GnRH y diferentes protocolos de soporte de fase lútea' ha sido realizado íntegramente por Don Alfonso Bermejo de la Calzada bajo mi supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid, a 4 de Noviembre de 2013.

Fdo. Juan Antonio García Velasco

María Cerrillo Martínez, Doctora en Medicina por la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid

CERTIFICA:

Que Don Alfonso Bermejo de la Calzada ha realizado bajo mi codirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada 'Impacto sobre la expresión génica del endometrio de la maduración final ovocitaria con un agonista de la GnRH y diferentes protocolos de soporte de fase lútea'.

Dicho memoria está concluida y considerada apta para su lectura y defensa.

Madrid, a 4 de Noviembre de 2013.

Fdo. María Cerrillo Martínez

La presente tesis doctoral ha sido realizada en la clínica IVI Madrid y en los laboratorios de IVIOMICS gracias a la beca otorgada sin restricciones por Merck Sharp & Dohme (MSD).

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido partícipes y me han ayudado a lo largo de estos tres años que terminan en la presente tesis doctoral.

En primer lugar, al Profesor Juan Antonio García Velasco. Porque el primer día que le conocí la conversación terminó con la pregunta *‘¿Has hecho ya tu tesis doctoral? Pues ponte a ello desde hoy mismo...’*. Y desde entonces ha respondido a todas mis preguntas e innumerables correos con infinita paciencia y sabiduría.

A María Cerrillo, por demostrarme que con esfuerzo todo esto es posible a la vez que uno estudia, pasa consulta y cuida de dos niños en casa.

A Antonio Requena, por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con los mejores y aconsejarme *‘No lo dejes pasar’*.

A María Ruiz, por introducirme en el mundo de los *microarrays* y no abandonarme sólo ante el peligro a la hora de interpretar los resultados.

A Carlos Iglesias, por animarme en los momentos difíciles y decirme *‘Muchacho, esto lo conseguimos en una semana’*.

A todos los compañeros de IVI Madrid, por no torcer el gesto y ayudarme cada día del proyecto aunque haya supuesto multiplicar su esfuerzo... y sus retrasos en quirófano y consulta.

A mis hermanos, por enseñarme el camino correcto para que yo solo tuviera que imitarlos.

A mi abuelo Ramón: *'Doctor no es el que lo pone en su bata, sino el que tiene la tesis doctoral'*.

Y por supuesto, a Cristina, Lucía y Mario, porque lo sois todo.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA	3
1.1.1.Etiología y prevalencia	3
1.1.2.Fisiopatología y cambios hemodinámicos	4
1.1.3.Factores de riesgo	8
1.1.4.Manifestaciones clínicas y cambios hemodinámicos.....	9
1.1.5.Tratamiento.....	11
1.1.6.Prevenición.....	13
1.1.7.Conclusiones sobre el SHO.....	18
1.2. AGONISTAS DE LA GnRH PARA LA MADURACIÓN FINAL OVOCITARIA.....	19
1.2.1.Fisiología de la ovulación durante el ciclo natural	19
1.2.2.Inducción de la maduración final ovocitaria en tratamientos de reproducción asistida	22
A. Inducción de la ovulación con HCG.....	23
B. Inducción de la ovulación con LH	24
C. Inducción de la ovulación con agonistas de la GnRH	25
1.2.3.Conclusiones.....	27
1.3. SOPORTE DE FASE LÚTEA EN TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	27
1.3.1.Soporte de fase lútea cuando se utiliza HCG para la maduración ovocitaria	29
A. Protocolos propuestos.....	29
B. Resultados.....	31

1.3.2. Soporte de fase lútea cuando se utilizan agonistas de la GnRH para la maduración ovocitaria.....	32
A. Protocolos propuestos.....	32
B. Resultados.....	36
1.4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR <i>MICROARRAYS</i>	37
1.4.1. ¿Qué es un <i>microarray</i> ?	37
1.4.2. ¿Cómo se lleva a cabo un experimento con <i>microarrays</i> de expresión génica?	39
1.4.3. La tecnología de los <i>microarrays</i> aplicada al estudio de la receptividad endometrial	41
A. La ventana de implantación.....	43
B. Ciclo estimulado.....	46
C. Condiciones patológicas	49
1.4.4. Endometrial Receptivity Array (ERA®)	52
A. Selección de los genes	53
B. Diseño del <i>microarray</i>	54
C. Desarrollo y entrenamiento del predictor informático	56
D. Firma transcriptómica de receptividad endometrial.....	57
E. Precisión y reproducibilidad del ERA	58
F. Resultados clínicos	59
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
2.1. HIPÓTESIS	65
2.2. OBJETIVOS	65

3. MATERIAL Y MÉTODOS	69
3.1. DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	69
3.2. PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN	70
3.3. GRUPOS DE ESTUDIO	71
3.4. ANÁLISIS HORMONAL.....	73
3.5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	74
3.6. ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS E HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS	74
3.7. ENDOMETRIAL RECEPTIVITY ARRAYS (ERA®)	75
3.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	76
4. RESULTADOS	81
4.1. CARACTERÍSTICAS BASALES.....	81
4.2. NIVELES HORMONALES	81
4.3. EXPRESIÓN GENÉTICA DIFERENCIAL	83
4.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: PROCESOS BIOLÓGICOS....	91
5. DISCUSIÓN	95
5.1. SELECCIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE ESTUDIO Y GRUPO CONTROL	95
5.2. NIVELES HORMONALES	97
5.3. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL	98
5.4. APLICACIÓN CLÍNICA	100
6. CONCLUSIONES.....	105
7. BIBLIOGRAFÍA.....	109
8. ANEXOS.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferencias entre el pico de LH con aGnRH respecto del ciclo natural.....	26
Figura 1.2. Diseño de un <i>microarray</i> y estudios de expresión génica	56
Figura 1.3. Firma génica de receptividad endometrial. La intersección de los genes diferencialmente expresados entre las fases receptiva (R) vs pre-receptiva (PR) y receptiva (R) vs proliferativa (P) dio lugar a una selección de 134 genes. (102)	58
Figura 1.4. Principal Component Analysis de las 7 pacientes (A-G) en las que se repitió la biopsia para valorar su reproducibilidad (103).....	60
Figura 1.5. Protocolo de actuación para la aplicación clínica del ERA.....	61
Figura 4.1. Concentraciones de E2, P4 y LH en cada una de las tres extracciones realizadas en los grupos de estudio.	82
Figura 4.2. Concentraciones de LH, E2 y P4 en cada una de las tres extracciones realizadas en los grupos de estudio	83
Figura 4.3. A. Representación de las biopsias por <i>clusters</i> de genes una vez normalizados los datos. B. Datos normalizados para la representación del PCA de las 10 muestras de estudio	84
Figura 4.4. A. Diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados en cada grupo de estudio respecto del grupo 5 (control). B. Diagrama de Venn con los genes con expresión diferencial comunes entre los grupos 2, 3 y 4 respecto del grupo 1.....	91

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1.1. Características asociadas a las pacientes con riesgo elevado de SHO.....	8
Tabla 1.2. Clasificación del SHO según manifestaciones clínicas y analíticas	10
Tabla 1.3. Guía práctica para el <i>coasting</i> en casos de riesgo de SHO	15
Tabla 1.4. Medidas preventivas del SHO: ventajas e inconvenientes	19
Tabla 1.5. Tasas de RNV según la maduración utilizada (aGnRH vs HCG) y soporte de fase lútea estándar	34
Tabla 1.6. Tasas de RNV según la maduración utilizada (aGnRH vs HCG) y soporte de fase lútea modificada.....	36
Tabla 1.7. Análisis ontológico de los genes incluidos en el ERA mediante FatiGO	55
Tabla 4.1. Características basales y parámetro de estimulación en los grupos de estudio	81
Tabla 4.2. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G1 vs G5 (control)	85
Tabla 4.3. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G2 vs G5 (control)	87
Tabla 4.4. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G3 vs G5 (control)	88
Tabla 4.5. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G4 vs G5 (control)	89

GLOSARIO DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

Array: matriz.

aGnRH: agonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas.

antGnRH: antagonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas.

AMP-c: adenosín monofostato cíclico.

C

Coasting: suspensión temporal de la estimulación con gonadotrofinas.

Cluster: agrupación de genes.

D

DIU: dispositivo intrauterino.

Down-regulation: regulación a la baja de un eje hormonal.

Drilling: perforación múltiple del ovario para reducir el tejido activo.

E

E2: estradiol.

EAC: estudio aleatorizado y controlado.

ENA: estudio no aleatorizado.

ERA[®]: *endometrial receptivity array*.

F

Fold change: tasa de cambio en la expresión de un gen.

FC: *fold change*.

Feed-back: regulación de un eje hormonal por diversas sustancias.

FIV: fecundación in vitro.

Flare-up: efecto inicial de liberación hormonal.

FSH: hormona estimulante del folículo.

FSHr: hormona estimulante del folículo recombinante.

G

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.

H

HCG: coriogonadotrofina humana.

HCGr: coriogonadotrofina recombinante.

HCGu: coriogonadotrofina humana de origen urinario.

I

IGF: factor de crecimiento insulínico.

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

im: intramuscular.

IMC: índice de masa corporal.

L

LH: hormona luteinizante.

LHr: hormona luteinizante recombinante.

M

mcg: microgramo.

mEq: miliequivalente.

mg: miligramo.

mL: mililitro.

MHC: complejo mayor de la histocompatibilidad.

Microarrays: matriz que incorpora múltiples genes.

MMPs: metaloproteinasa de la matriz extracelular.

N

ng: nanogramo.

ns: no significativo

P

P4: progesterona.

PCA: análisis de componentes principales.

PC1: *principal component 1*.

PC2: *principal component 2*.

pg: picogramo.

R

RIN: RNA *integrity number*.

RNV: recién nacido vivo.

ROC: área bajo la curva (curvas ROC).

RR: riesgo relativo.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

S

Set: conjunto de muestras.

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica.

SOP: síndrome de ovarios poliquísticos.

Spot: pocillo.

T

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

Triggering: desencadenamiento de la maduración ovocitaria al final de la estimulación.

TRA: tratamientos de reproducción asistida.

TSH: hormona estimulante del tiroides.

U

UI: unidades internacionales.

V

VEFG: factor de crecimiento endotelial vascular.

VEFGR-1: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 1.

VEFGR-2: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2.

vo: vía oral.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

1.1.1. Etiología y prevalencia

El síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) es una complicación iatrogénica de los tratamientos de inducción de la ovulación que puede causar un impacto importante en la salud de la paciente. Se estima que entre el 0.1-2.0 % de las mujeres sometidas a un tratamiento de reproducción asistida (TRA) desarrollan algunas de las formas más severas del cuadro (1), aunque su incidencia se ha incrementado a medida que estas técnicas se han ido difundiéndose y aumentando en número cada año (2).

De forma general, el SHO es consecuencia de la administración exógena de medicamentos para la inducción de la ovulación (gonadotrofinas, citrato de clomifeno,...) en casos de anovulación -restaurando la ovulación mediante la inducción farmacológica de 2-3 folículos- y más frecuentemente, en estimulaciones ováricas controladas más agresivas aplicadas en los TRA, buscando el crecimiento sincronizado y la maduración de una cohorte mayor de folículos.

Sin embargo, puede aparecer un cuadro de SHO en situaciones en las que el estímulo del ovario es de origen endógeno (2), y aunque de una prevalencia mucho menor, se han descrito los siguientes casos:

- 1) Mujeres embarazadas con diagnóstico previo de síndrome de ovario poliquístico (SOP), con mayor sensibilidad al estímulo por gonadotrofinas endógenas (3).

- 2) Embarazos con niveles anormalmente altos de coriogonadotrofina (HCG), como ocurre en el embarazo molar (4).
- 3) Mujeres con hipotiroidismo primario, debido a la similitud de los receptores de la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Se ha propuesto un posible incremento de la sensibilidad en la respuesta a la FSH en caso de que su receptor haya sido previamente expuesto a altas concentraciones de TSH (5).
- 4) Diferentes mutaciones en el receptor de la FSH (6-9), asociadas a una hipersensibilidad de las mujeres portadoras al estímulo por la HCG, y que pueden presentar cuadros de SHO espontáneos (7, 8).
- 5) Adenomas hipofisarios productores de FSH y hormona luteinizante (LH), lo que incrementaría los niveles de estradiol (E2) y el aumento de tamaño de los ovarios (10).

Independientemente de su origen exógeno o endógeno, todas estas situaciones clínicas demuestran cómo el mecanismo esencial para el desencadenamiento del SHO está en la estimulación del ovario por las gonadotrofinas.

1.1.2. Fisiopatología y cambios hemodinámicos

Se han descrito muchas variables hormonales que podrían estar íntimamente ligadas con el desencadenamiento del SHO. De todas ellas, la HCG parece tener un papel clave en su fisiopatología, como demuestra el hecho de que en los TRA en los que no se utiliza el cuadro prácticamente es inexistente (11), reapareciendo cuando se aplica como soporte de la fase lútea.

Existen dos patrones claramente diferenciados de SHO:

- 1) *Temprano*, que generalmente se presenta entre 3 y 7 días tras la inducción de la ovulación con HCG en TRA, y que por tanto podría aparecer independientemente de que la paciente lograra o no el embarazo en ese ciclo.
- 2) *Tardío*, que se iniciaría a los 12-17 días de la administración de la HCG (2, 12) y que estaría desencadenado por la secreción endógena de esta hormona desde el trofoblasto en los casos en que la implantación embrionaria tuviera éxito y que desaparece rápidamente si se interrumpe la correcta evolución del embarazo.

Durante la estimulación ovárica se secretan desde el ovario diversas sustancias que estarían detrás de la cascada de acontecimientos que terminan por desencadenar el SHO. Los estudios se han centrado fundamentalmente en las sustancias vasoactivas, pues son evidentes las profundas alteraciones a nivel vascular y hemodinámico que se producen al inicio del síndrome y que se manifiestan de forma llamativa en el cuadro clínico completo. Por tanto, la HCG debe desencadenar la liberación de un mediador con un potente efecto sobre el sistema vascular, y que debería ser el responsable inicial de la fisiopatología y cuadro clínico del SHO (13).

En los últimos años han sido muchas las sustancias vasoactivas que se han implicado en el SHO. Algunas de ellas, como el estradiol (14), la histamina (15), o las interleuquinas (16) se siguen investigando como posibles desencadenantes del síndrome, pero la mayoría de estudios destacan la importancia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como principal sustancia angiogénica causante

INTRODUCCIÓN

del aumento de la permeabilidad vascular y pérdida de líquido al tercer espacio que caracterizan al cuadro clínico (17).

El VEGF es una proteína sintetizada y liberada en distintos compartimentos celulares, entre los que se encuentran las células de la granulosa en el ovario (18), y que posee un potente efecto sobre la permeabilidad vascular muy superior al de otras sustancias estudiadas, como la histamina (15). La salida de líquido a nivel capilar y venoso se produce como resultado de la apertura de las uniones intercelulares entre células endoteliales vecinas y a los cambios morfológicos que se producen en el endotelio vascular, que adquiere rápidamente un aspecto fenestrado (19) bajo el efecto del VEGF.

El gen del VEGF ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (20), y la combinación en la expresión de los 8 exones que lo componen (2) da lugar a distintas isoformas (21). De todas ellas, VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son las que principalmente se han asociado a los procesos de angiogénesis (22) y las únicas que pueden ser secretadas desde el ovario (23, 24). Los receptores del VEGF se encuentran en la superficie de las células endoteliales y pertenecen a la familia de los receptores tirosin-quinasa (25). Se han identificado dos receptores específicos a nivel endotelial, el VEGFR-1 y el VEGFR-2, siendo este último el implicado en los procesos de permeabilidad vascular, angiogénesis y vasculogénesis (26, 27) y lo que le ha convertido en una posible diana terapéutica en numerosos trabajos de investigación de ginecología oncológica. El VEGFR-1 es secretado en parte de forma soluble, actuando como modulador de la actividad del VEGF al ligarse a su fracción libre (28).

Son muchos los hallazgos que apoyan el papel del VEGF en el desarrollo del SHO, siendo clave el hecho de que los niveles de VEGF se elevan drásticamente tras la administración de HCG en las mujeres sometidas a un ciclo de estimulación ovárica y con factores de riesgo para desarrollar el síndrome (13). Además, en mujeres diagnosticadas de SHO se detectan niveles elevados de VEGF secretado desde las células de la granulosa luteinizadas (29-33), que se liberan en el líquido folicular (29, 34, 35) en respuesta a la HCG (36) y provocan el incremento de la permeabilidad capilar (29, 34, 35). También se ha confirmado la liberación de VEGF desde las células endoteliales humanas en respuesta a la HCG, aumentando así la permeabilidad vascular por esta vía autocrina (35).

De los estudios en animales puede concluirse que el sistema VEGF (VEGF/VEGFR-2) es regulado al alza en los ovarios estimulados, alcanzando su mayor nivel en el momento de máxima permeabilidad vascular y evidenciando un papel crucial del VEGF producido localmente en el ovario en el SHO.

Ya en humanos, los primeros trabajos en pacientes permitieron observar que, en casos de mujeres con un alto riesgo de SHO tras la estimulación, los niveles de VEGF libre y total eran superiores en aquellas que finalmente desarrollaban el síndrome, además de presentar concentraciones más bajas del VEGFR-1, que jugaría un papel protector frente al SHO al reducir la cantidad de VEGF libre disponible (37). Los trabajos realizados en los programas de donación de óvulos confirman que el inicio del fenómeno completo está restringido a los ovarios, como demuestra el hecho de que las receptoras que se embarazan no desarrollan el SHO aunque presenten altas concentraciones de VEGF y consigan la gestación en ese ciclo.

1.1.3. Factores de riesgo

Identificar a la población en riesgo de desarrollar un SHO es un paso clave en el objetivo por reducir su incidencia. Existen diversos criterios que permiten identificar a estas pacientes, que se recogen en la **Tabla 1.1**.

La mayoría de estudios coinciden en caracterizar a la mujer joven con fenotipo delgado como una candidata al SHO, en relación con la elevada concentración de estradiol procedente de las células de la granulosa del gran número de folículos que estas pacientes suelen producir en respuesta a una estimulación ovárica controlada (38). Aunque los niveles de estradiol son significativamente mayores en las pacientes que desarrollan SHO comparadas con los controles, la determinación de estradiol por sí sola no es suficiente para predecir su aparición, por lo que debe asociarse a los hallazgos ecográficos al haberse descrito casos graves en pacientes con concentraciones séricas de estradiol bajas (39). Las pacientes con SOP, sobre todo si presentan resistencia a la insulina (40), también presentan mayor riesgo de hiperestimulación.

Tabla 1.1. Características asociadas a las pacientes con riesgo elevado de SHO

<i>Antes del inicio del TRA</i>	<i>Durante el TRA</i>
Paciente joven Bajo peso Síndrome de ovario poliquístico Alergia	Alta respuesta folicular Niveles elevados de estradiol (> 4000 pg / mL) Ciclos en los que se consigue embarazo Suplemento de la fase lútea con HCG Niveles elevados en suero de VEGF

Otros estudios han encontrado una mayor incidencia de alergias en las mujeres que desarrollan un SHO (56 % vs 21 %), indicando que el factor inmunológico podría tener también un papel en su fisiopatología (38).

1.1.4. Manifestaciones clínicas y cambios hemodinámicos

El SHO es un cuadro marcado por la salida de líquido desde el nivel intravascular al tercer espacio, lo que desencadena el resto de manifestaciones clínicas y analíticas. La clasificación inicial (14) del síndrome ha ido sufriendo modificaciones con el paso del tiempo, aceptándose actualmente 4 niveles de SHO (2) (**Tabla 1.2**).

El SHO *leve* se caracteriza por los niveles elevados de E2 y progesterona (P4), así con un aumento ligero del tamaño de los ovarios por debajo de los 5 cm. En el siguiente escalón, además de los signos descritos, aparece distensión abdominal, náuseas, vómitos, diarrea y el tamaño de los ovarios puede alcanzar los 5-12 cm. En este momento puede comenzar la ascitis y menos frecuentemente, progresar a hidrotórax o derrame pericárdico.

Si el cuadro sigue avanzando, se llega al estadio de SHO *severo*, en el que la función renal se ve alterada (oliguria, elevación de las concentraciones de creatinina y descenso de su aclaramiento) y la paciente alcanza una hemoconcentración por encima del 45 %. Cuando el síndrome progresa, se puede alcanzar un nivel *crítico* caracterizado por el fallo renal (anuria), ascitis a tensión y distrés respiratorio.

Las alteraciones hemodinámicas y la hemoconcentración son causa de tromboembolismo, que se convierte así en la manifestación más peligrosa del SHO (14). Un 75 % se producen a nivel venoso (yugular interna, subclavia, vena cava

INTRODUCCIÓN

inferior) siendo menos frecuente las arteriales (cerebral media, cerebral anterior, carótida interna, arteria vertebral, humeral, mesentérica,...).

A nivel de resultados clínicos, el SHO que se produce en el contexto de un TRA se asocia una reducción en las tasas de implantación, por el efecto perjudicial de las altas concentraciones de hormonas esteroideas sobre la receptividad uterina (41), y a un empeoramiento en la calidad ovocitaria, con peores tasas de maduración y fertilización (42).

Tabla 1.2. Clasificación del SHO según manifestaciones clínicas y analíticas (2)

Categoría	Clínica	Laboratorio
<i>Leve</i>	Distensión abdominal Náuseas / vómitos Diarrea	Sin alteraciones importantes
<i>Moderada</i>	SHO leve + evidencia ecográfica de ascitis	Hematocrito > 41 % Leucocitosis Hipoproteinemia
<i>Severa</i>	SHO leve y moderado Evidencia clínica de ascitis Hidrotórax Disnea severa Oliguria / anuria Aumento rápido de peso (> 1 Kg / 24 h) Síncope Dolor abdominal severo Trombosis venosa	Hematocrito > 45 % Fallo renal Hiponatremia Hipopotasemia Hipertransaminasemia
<i>Crítica</i>	Anuria Trombosis arterial Arritmia Derrame pericárdico Hidrotórax masivo Distrés respiratorio Sepsis	Fracaso renal Fracaso hepático

1.1.5. Tratamiento

Hasta que no conozcamos la fisiopatología completa del cuadro el tratamiento del SHO continuará siendo empírico, con medidas de mantenimiento que permitirán la mejoría de la paciente hasta la resolución completa -generalmente espontánea en los casos leves y moderados- de su sintomatología.

La individualización de los protocolos de estimulación ovárica y la identificación de los factores de riesgo antes de iniciar el tratamiento permiten disminuir la incidencia y severidad de este síndrome (43).

Ante el SHO la primera decisión a tomar es si la paciente debe ser hospitalizada o bien puede recibir tratamiento ambulatorio. Un gran porcentaje de las pacientes que desarrollan el cuadro lo harán en su forma leve, con molestias abdominales y malestar general que no impide hacer una actividad diaria normal y que no requerirá hospitalización para su control y seguimiento.

Las pacientes con síntomas más floridos (náuseas y diarrea incontrolable, falta de apetito, deshidratación, oliguria) deben someterse a una estricta evaluación física, pélvica y abdominal. Son necesarios controles seriados para medir la concentración de electrolitos, el hematocrito y la creatinina y evaluar mediante ecografía la presencia y el volumen de la ascitis, así como cuantificar la ganancia o pérdida ponderal de la paciente. En caso de presentar clínica respiratoria se debe realizar una radiografía de tórax y control de la saturación de oxígeno mediante pulsioximetría.

La hospitalización es opcional y de acuerdo al criterio médico en los grados moderado y grave, y siempre debe valorarse la facilidad de acceso a los controles

INTRODUCCIÓN

ecográficos, analíticos y asistencia sanitaria de urgencia que la paciente pudiera necesitar en caso de empeoramiento.

Entre las medidas que se proponen para el tratamiento del SHO destacan:

1. *Reposo en cama*: el reposo en decúbito lateral derecho reduce la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y del sistema simpático, lo que favorecería el filtrado glomerular y la excreción del sodio y mejorando por tanto la diuresis. En caso de recomendar reposo absoluto, debe tenerse en cuenta el riesgo aumentado de tromboembolismo que se asocia al síndrome, por lo que habrá que reforzar las medidas profilácticas oportunas (anticoagulantes, antiagregantes, etc.).
2. *Aspiración del líquido ascítico guiado por ecografía vaginal*: en casos de ascitis a tensión, la aspiración del líquido libre permite un alivio rápido de la sintomatología (44). La aspiración del líquido intrabdominal mejora la diuresis, reduce la hemoconcentración, los niveles de creatinina, la disnea y las molestias abdominales, siendo un procedimiento seguro y de bajo riesgo (44, 14).
3. *Albúmina*: en caso de no poder corregir la inestabilidad hemodinámica con la sueroterapia intravenosa, los expansores del plasma como la albúmina pueden ayudar a recuperar el volumen intravascular y aumentar la volemia. La albúmina intravenosa es una medicación segura y con una vida media superior a la de otros expansores de volumen (1). La dosis habitual es de 50-100 g cada 6-12 horas.

4. *Diuréticos*: los diuréticos como la furosemida permiten aumentar la eliminación renal de sodio e incrementar el volumen de orina. Siempre se debe tener en cuenta que su uso está contraindicado en casos de hipovolemia o hemoconcentración severa, por lo que las dosis deben ajustarse de acuerdo a la diuresis y parámetros de laboratorio.
5. *Dieta baja en sodio*: aunque de eficacia controvertida, el balance negativo que se crearía con una baja ingesta de sodio (60 mEq / día) podría ayudar a movilizar el líquido libre intrabdominal hacia el espacio intravascular.
6. *Dopamina*: su administración puede estar indicada en casos de SHO severo. En dosis bajas y por vía intravenosa puede revertir rápidamente el cuadro sin efectos adversos para la paciente ni el embarazo (45).

1.1.6. Prevención

Se han propuesto diversas estrategias para la prevención del SHO, pero la identificación de la paciente con alto riesgo de desarrollarlo antes del inicio de la estimulación debe ser siempre la primera de las medidas a tomar.

1. *Cancelar la administración de la HCG*: existe la suficiente evidencia científica para señalar a la HCG como la principal desencadenante del cuadro, y por tanto posponer su administración puede ser una alternativa válida y segura para evitar el inicio del síndrome (44). La cancelación del ciclo supone para los pacientes importantes implicaciones económicas y emocionales, frustra tanto al paciente como al médico y podríamos estar cancelando el ciclo en muchas mujeres que no terminarían por desarrollar el SHO.

2. *Drilling* ovárico: se trata de una opción de segunda línea para las pacientes de riesgo, típicamente en la mujer diagnosticada de SOP (46). Generalmente se realiza por laparoscopia, y debe ser reservada para indicaciones reproductivas. La reducción de la corteza ovárica alteraría el ambiente endocrino del ovario, reduciendo la producción de andrógenos y el grosor de la corteza ovárica (14) característico de las pacientes con SOP.
3. *Coasting*: si durante la estimulación ovárica controlada se suspende la administración de gonadotrofinas y se mantienen los análogos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) –agonistas (aGnRH) o antagonistas (antGnRH)-, los altos niveles de estradiol alcanzados al final de la estimulación comienzan a decrecer rápidamente al frenarse el crecimiento folicular (14). Diferentes estudios (47) demuestran que los folículos en desarrollo soportan un periodo breve de privación gonadotrófica sin que los resultados clínicos se vean perjudicados, así como los niveles de expresión y secreción del VEGF se reducen (48), disminuyendo así las posibilidades de desarrollar el cuadro. Las recomendaciones sobre cuándo iniciar y cuando suspender el *coasting* durante una estimulación ovárica se recogen en la **Tabla 1.3** (49).
4. *Aspiración folicular*: la aspiración de los folículos antes de la administración de la HCG o previamente a la punción definitiva podría proteger frente al desencadenamiento del cuadro al reducir la producción de sustancias implicadas desde el ovario (50), además de alterar la función de los cuerpos lúteos generados a partir de los folículos aspirados (51, 52). Aunque el primer estudio retrospectivo sobre esta medida fue prometedor, estudios

randomizados posteriores no han permitido confirmar su eficacia en la prevención de las presentaciones más severas del SHO (51).

Tabla 1.3. Guía práctica para el *coasting* en casos de riesgo de SHO (49)

<i>Cuándo empezar</i>	<i>Cuándo terminar</i>
E2 > 4500 pg / mL E2 > 150 pg / mL por folículo > 16-18 mm > 15 y < 30 folículos maduros	E2 > 6500 pg / mL > 30 folículos maduros <i>Coasting</i> superior a 4 días
Realizar controles diarios de E2 <i>Triggering</i> con HCG (6500 UI) o aGnRH (0.2 mg) con E2 < 3500 pg / mL	

5. *Albúmina intravenosa*: la infusión intravenosa de albúmina inmediatamente después de la punción ovárica fue propuesta hace unos años como una medida de prevención del SHO eficaz, económica y segura. Tras varios estudios contradictorios, las últimas revisiones no han encontrado un papel profiláctico para la albúmina (53), que sí se mantiene como una alternativa terapéutica para la expansión del volumen intravascular en las mujeres que ya han iniciado el cuadro.
6. *Criopreservación de los embriones y transferencia diferida*: el SHO es más frecuente en aquellos ciclos en los que la implantación embrionaria se produce con éxito, debido a la liberación de HCG desde el trofoblasto. La cancelación de la transferencia para la criopreservación de los embriones y posterior realización en un ciclo natural o sustituido evitaría por completo la aparición del cuadro, al menos en su presentación tardía (54). Se trata de una medida de prevención muy segura, pero cada centro debe valorar los beneficios y riesgos

en base a sus resultados clínicos con embriones vitrificados y la opinión consensuada con los pacientes.

7. *Vitrificación de ovocitos*: la difusión del dispositivo (*Cryotop*[®]) (55) para la vitrificación ovocitaria ha proporcionado unos resultados de supervivencia tras la desvitrificación (por encima del 95 %), lo que abre las puertas a la posibilidad de vitrificar los ovocitos tras la punción sin fecundar para su posterior desvitrificación y microinyección en un ciclo natural o sustituido, evitando por completo el riesgo de hiperestimulación. Actualmente ya disponemos de datos sobre las tasas de implantación y recién nacido vivo tanto en ovocitos propios como donados, lo que convierte a esta técnica en una prometedora alternativa para las pacientes con alto riesgo de SHO.
8. *Agonistas dopaminérgicos*: estudios experimentales en ratas han demostrado un aumento en la expresión de los genes que regulan la síntesis de la enzima tirosina-hidroxilasa cuando a los animales se les induce un cuadro similar al SHO. Esta enzima es clave en la síntesis de la dopamina, y el uso de dosis no tóxicas de carbegolina (agonista dopaminérgico) reduce la permeabilidad vascular al alterar el eje VEGF-VEGFR-2 (56, 57). La aplicación clínica de estos hallazgos en donantes de ovocitos con riesgo de SHO demostró una reducción significativa de su incidencia en las pacientes que recibieron un tratamiento dopaminérgico comparado con el grupo que recibió placebo, así como una menor formación de ascitis y menor hemoconcentración. Estudios recientes en pacientes en las que se ha utilizado la quinagolida sólo han demostrado su eficacia para la reducción del cuadro precoz, pero no impide las formas más severas en aquellas mujeres que lograban gestación (58).

9. *Antagonistas de la GnRH (antGnRH) en fase lútea*: los antGnRH, además de su acción bloqueando la hipófisis, podrían tener una acción directa sobre el ovario, reduciendo su tamaño y las concentraciones de estradiol (14, 59).
10. *Letrozol*: el letrozol es un inhibidor de la enzima aromatasa, y por tanto actúa bloqueando la conversión de andrógenos en estrógenos a nivel ovárico y periférico. Al reducir los niveles de estrógenos, es un medicamento con el que se tiene una gran experiencia para el tratamiento del cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. En la prevención del SHO, el letrozol se ha utilizado durante la fase lútea en donantes de ovocitos (60) tras la punción folicular, reduciendo los niveles de E2, P4 y LH a partir del 4º día postpunción. Aunque no se ha confirmado en el último metanálisis publicado, estudios previos lo asociaron a un efecto teratogénico, lo que junto a la ausencia de esta indicación en la ficha técnica ha frenado su uso preventivo en el SHO salvo en la estimulación de donantes de ovocitos o en preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas.
11. *Maduración final de los ovocitos con agonistas de la GnRH*: la introducción de los antGnRH en los TRA ha abierto la posibilidad de usar los aGnRH como desencadenantes de la maduración de los ovocitos al final de la estimulación (14, 61). El pico de LH que acompaña al efecto *flare* tras la administración del aGnRH promueve los cambios periovulatorios que llevan a la maduración del óvulo y evita la administración de HCG para este fin (62), desapareciendo en la práctica el riesgo de desarrollar un SHO en estas pacientes por su breve vida media. Como se verá en el siguiente apartado, su efecto deletéreo sobre la fase lútea disminuye su aplicación generalizada en pacientes que deseen continuar

con la transferencia embrionaria en fresco, al reducirse las tasas de embarazo de forma considerable (63).

En la **Tabla 1.4** se recogen las ventajas e inconvenientes de cada una de estas propuestas de prevención.

1.1.7. Conclusiones sobre el SHO

El SHO es un cuadro clínico asociado al desarrollo multifolicular que acompaña a los tratamientos de reproducción asistida. Aunque generalmente se presenta en sus formas leves, en ocasiones el cuadro puede evolucionar a formas graves y con importantes consecuencias para la mujer, siendo las claves del proceso la salida de líquido al tercer espacio y la inestabilidad hemodinámica.

Ninguno de los tratamientos es eficaz al 100 %, por lo que la prevención primaria, identificando antes de iniciar cualquier tratamiento a la paciente con factores de riesgo de desarrollar el síndrome, es la clave para disminuir su incidencia.

De todas las medidas preventivas, sólo la inducción de la maduración ovocitaria con aGnRH permite abolir el síndrome y a la vez continuar con la transferencia embrionaria, pero sus efectos secundarios sobre la receptividad endometrial obligan a tomar medidas de soporte para la fase lútea si no se quieren ver comprometidos los resultados clínicos.

Tabla 1.4. Medidas preventivas del SHO: ventajas e inconvenientes

Categoría	Ventajas	Inconvenientes
<i>Cancelación del ciclo</i>	Desaparece por completo el riesgo de SHO	Coste económico y psicológico para los pacientes
<i>Drilling ovárico</i>	Mejora la inducción de la ovulación y los parámetros analíticos en el SOP	Agresivo, requiere quirófano y anestesia
<i>Coasting</i>	Buenos resultados clínicos	No desaparece por completo el riesgo de SHO
<i>Aspiración folicular</i>	Mejora la sintomatología	Eficacia controvertida
<i>Albúmina iv</i>	Mejora la clínica y el estado hemodinámico	Prevención secundaria
<i>Vitrificación de embriones</i>	Técnica segura y eficaz	No siempre disponible la vitrificación Aumento de los costes y tiempos
<i>Vitrificación de ovocitos</i>	Técnica segura y eficaz	No siempre disponible la vitrificación Aumento de los costes y tiempos
<i>Agonistas dopaminérgicos</i>	Tratamiento oral, bien tolerado	Prevención secundaria Eficacia controvertida en pacientes
<i>aGnRH triggering</i>	Desaparece el riesgo de SHO	Sólo en protocolo antagonista Defecto de fase lútea
<i>Letrozol</i>	Tratamiento oral, bien tolerado	Fuera de ficha técnica Posible teratogenicidad

1.2. AGONISTAS DE LA GnRH PARA LA MADURACIÓN FINAL OVOCITARIA

1.2.1. Fisiología de la ovulación durante el ciclo natural

Durante los últimos días de crecimiento del folículo dominante se aprecia un incremento en la frecuencia de pulsatilidad de la GnRH hipotalámica, lo que se traduce en un aumento de la frecuencia y de la intensidad de los picos de LH. En los 2 a 3 días

INTRODUCCIÓN

previos al pico de LH se produce un aumento espectacular del E2, acompañado de un incremento en los niveles de la 17-hidroxiprogesterona y la P4. Este aumento de los gestágenos antes de la ovulación se debe a la adquisición de receptores de LH por parte de las células de la granulosa. La LH, que se segrega ya en cantidades crecientes, estimula la actividad del citocromo P-450-scc y del P-450-c17 en las células de la granulosa, iniciándose así la síntesis de gestágenos (64).

Los niveles altos de E2 y la escasa P4 que comienza a sintetizarse actúan directamente sobre los receptores gonadotropos hipofisarios e indirectamente sobre las neuronas productoras de GnRH, iniciando así una descarga masiva de LH (y también, aunque de menor magnitud, de FSH). La duración media de este pico es de 48 horas, con una fase de ascenso muy rápido de unas 14 horas que coincide con una caída de E2 y un aumento progresivo de P4. La secreción de LH se mantiene en meseta unas 14 horas, tras lo cual ya se establece una firme secreción de P4 y una caída de los niveles de E2 e inhibina. La fase de descenso, de unas 20 horas de duración, completaría las 48 horas (64).

Se desconoce el momento preciso en que se produce la ovulación, pero se cree que tiene lugar 36 horas después del inicio del pico de LH, o lo que es lo mismo, casi al final de dicho pico.

El pico de LH ejerce numerosas acciones. Por una parte asegura la saturación de todos los receptores de las células de la granulosa y de la teca, con lo cual garantiza la vida y las funciones del cuerpo lúteo. Otra función importante de la LH es estimular la síntesis de prostaglandinas por el folículo maduro; éstas, a su vez, actúan sobre las miofibrillas de la pared folicular para lograr su contracción. Además, la LH estimula la

formación de diversas enzimas proteolíticas que provocan la lisis de la pared folicular en el punto de ruptura (65) favoreciendo así la ovulación.

El papel del pico de FSH es peor conocido, pero en los últimos años ha quedado clara su acción sobre la producción de activadores del plasminógeno por parte de las células de la granulosa (63). Este activador del plasminógeno está implicado en la rotura de las comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulo, lo que parece el factor desencadenante para que se reanude su meiosis al desaparecer las altas concentraciones de AMP cíclico (AMP-c) en el ambiente ovárico. Además, el pico final de FSH estimularía la formación de receptores de LH en las células luteinizadas de la granulosa, optimizando de esta forma la función del cuerpo lúteo (66).

Después de la ovulación se produce una caída breve en la síntesis de esteroides debido al colapso del folículo, pero ésta se recupera en las 48 horas siguientes, lo que se traduce en una importante producción de estrógenos y P4. No se conocen con precisión los factores que determinan que la vida del cuerpo lúteo se vea limitada a 12-14 días en ausencia de embarazo. Lo que sí se conoce es que la LH es imprescindible para su función: sin LH el cuerpo lúteo involuciona rápidamente, siendo los estrógenos y las prostaglandinas las sustancias fundamentales que determinan la limitación de su actividad.

A medida que progresa la producción de P4 se aprecia un espaciamiento progresivo en los picos de LH. Ello se debe a la disminución de la frecuencia de las descargas de GnRH desde el hipotálamo, que viene provocada por el aumento del tono opiáceo. La frecuencia de los pulsos va disminuyendo hasta tener un intervalo superior a dos horas, lo que determina que disminuya la secreción de LH (otro factor de

INTRODUCCIÓN

involución del cuerpo lúteo) y aumente la de FSH, reiniciándose así la selección de folículos para un nuevo ciclo (64).

En caso de producirse embarazo, el cuerpo lúteo continúa funcionando por unión de la nueva gonadotropina producida por el trofoblasto -la HCG- a los receptores de LH, que inmediatamente adquieren características específicas de selectividad.

1.2.2. Inducción de la maduración final ovocitaria en tratamientos de reproducción asistida

En los TRA estamos obligados a controlar e inducir la ovulación de forma que puedan planificarse los ciclos de coito programado, de inseminación artificial o la punción folicular en el caso de realizar un FIV/ICSI. Sin ello, los resultados relativos a las tasas de gestación serían muy bajos y la eficacia de los tratamientos escasa.

Se dispone de varias formas no farmacológicas de conocer el momento de la ovulación:

1. Empleo de la ecografía vaginal, apoyada por el *Doppler*.
2. Determinación en sangre de los valores de E2 (superiores a los 250 pg / mL por folículo superior a los 17 mm).
3. Identificación mediante análisis en sangre del pico de LH endógeno.
4. Kits de LH para la detección del pico de esta hormona en orina. Son capaces de detectar el pico de LH que se produce 24-36 horas antes de la ovulación. Se trata de un método preciso y sencillo, capaz de detectar la ovulación hasta 6 horas antes de que se haya producido. Por el contrario,

son caros y no informan si la ovulación ya ha tenido lugar, además de ser difíciles de aplicar en aquellas mujeres con ciclos menstruales irregulares.

En general se trata de métodos poco eficaces cuando se aplican a los TRA, lo que generalmente obliga a utilizar medicamentos que permitan la planificación de los ciclos y la correcta coordinación de la ovulación y el tratamiento final que se haya indicado (inseminación, punción ovárica para FIV-ICSI) para optimizar los resultados.

A. Inducción de la ovulación con HCG

La HCG ha sido durante décadas el fármaco más utilizado en los TRA como sustituto del pico de LH que se produce durante el ciclo natural. Debido a sus similitudes biológicas y estructurales, la LH y HCG se unen y activan el mismo receptor, el receptor LH/HCG (63). Sin embargo existen diferencias importantes, como es su vida media, mucho más corta en el caso de la LH (aproximadamente de 60') si se compara con la HCG (superior a las 24 horas y detectable hasta 7 días después) (63).

Debido a su prolongada vida media en la circulación, la HCG es capaz de sostener la función del cuerpo lúteo, pero se asocia al desencadenamiento del SHO. Además, diversos estudios han propuesto un posible efecto perjudicial de la HCG sobre la receptividad endometrial y la calidad ovocitaria.

La administración de HCG permite conocer con exactitud el momento de la ovulación, que acontece 36-40 horas más tarde. Actualmente se disponen exclusivamente en el mercado español de HCG recombinante (HCGr), de administración subcutánea en una sola dosis de 250 mcg que equivalen, según ficha técnica, a 6500 UI de la HCG de origen urinario (HCGu) que se utilizó durante años

INTRODUCCIÓN

hasta su retirada. La dosis de HCGr de 250 mcg es tan efectiva como la de 500 mcg en cuanto al número de ovocitos recuperados y las tasas de gestación, habiéndose observado que la dosis mayor se asocia a más efectos adversos y a una mayor incidencia de SHO (67).

Entre sus principales ventajas está su fácil administración y el fácil control del momento idóneo para su aplicación. Mediante control ecográfico podemos determinar el momento óptimo para administrarla antes de que se haya desencadenado el pico espontáneo de LH. Además sirve de soporte para la fase lútea debido a su larga vida media y a su efecto sobre el cuerpo lúteo.

El principal inconveniente de la HCG es su papel clave en el desencadenamiento del SHO. Por tanto, ante una paciente con alto riesgo de desarrollar el cuadro, debemos suspender su administración, cancelando el ciclo, o bien tomar alguna de las medidas de prevención secundaria que se detallaron en el apartado 1.1.5 (67).

B. Inducción de la ovulación con LH

La hormona luteinizante o LH es la desencadenante fisiológica del restablecimiento de la meiosis, de la maduración del cúmulo y finalmente de la ovulación. Su vida media es muy corta, de 4 a 6 horas, por lo que su uso se asocia a un riesgo bajo de desarrollar el SHO.

Actualmente en el mercado disponemos de una LH recombinante (LHr) de origen genético, con la que se ha informado una incidencia baja de hiperestimulación. Los inconvenientes para su uso habitual son que se trata de una medicación cara, necesitando entre 15.000 y 30.000 UI para desencadenar la ovulación (se comercializa

en envases de 10 ampollas de 75 UI) y que por su corto efecto, requiere de un soporte posterior para mantener la funcionalidad del cuerpo lúteo.

C. Inducción de la ovulación con agonistas de la GnRH

La introducción en los protocolos de estimulación de los antGnRH abrió las puertas a la posibilidad de inducir la maduración final de los ovocitos mediante un bolo único de aGnRH como alternativa al uso de la HCG. Los antGnRH ocupan los receptores de la GnRH a nivel hipofisario sin provocar la desensibilización de los mismos, lo que permite al aGnRH desplazar al antagonista y activar directamente el receptor, desencadenando su efecto *flare up* que se acompaña de la liberación de gonadotrofinas (63).

Aunque este efecto *flare up* es efectivo en la maduración de los ovocitos y en el desencadenamiento de la ovulación, existen diferencias respecto al perfil y duración de la liberación de hormonas inducido por el aGnRH al compararlo con el ciclo natural. Así, la oleada hormonal provocada por el aGnRH solo consta de 2 fases: una fase ascendente, rápida y corta (inferior a las 4 horas); y una segunda de descenso más prolongada, de unas 20 horas, para una duración total de 24-36 horas. Por tanto, la cantidad total de gonadotrofinas liberadas durante el pico provocado por el aGnRH se reduce drásticamente cuando se compara con las liberadas durante el ciclo natural (68).

Un de las posibles ventajas del *triggering* con aGnRH respecto del uso de HCG es que la onda de FSH que provoca el primero es comparable a la que se produce durante el ciclo espontáneo. Algunos estudios han observado un mayor número de ovocitos maduros recuperados cuando la maduración final se realiza con un aGnRH, y

una posible explicación sería que el cambio que produce es más fisiológico y natural al incluir la onda de FSH junto con el pico de LH (69).

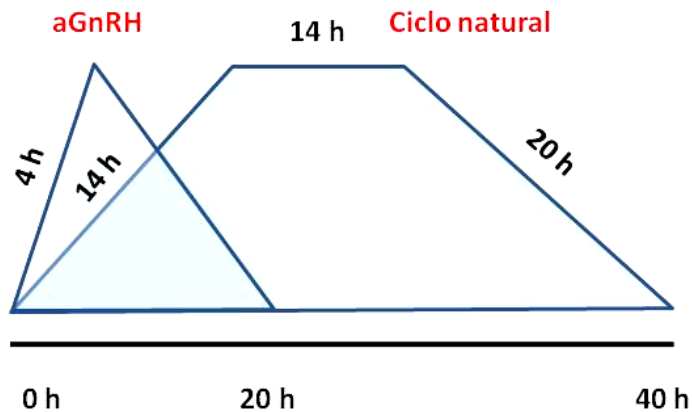


Figura 1.1. Diferencias entre el pico de LH con aGnRH respecto del ciclo natural.

Pero sin duda, la principal ventaja del *triggering* con aGnRH es que el SHO prácticamente desaparece, como han demostrado los estudios realizados tanto en pacientes como en donantes de óvulos (62). Esto lo convierte en la primera opción para la maduración ovocitaria en los programas de ovodonación, al abolir el SHO sin repercutir en la calidad ovocitaria ni en las tasas de embarazo de las pacientes receptoras.

Pese a esta gran ventaja, el punto más desfavorable cuando se utiliza un aGnRH para la maduración final son los resultados clínicos en los casos de pacientes que continúan con la transferencia embrionaria en fresco en el mismo ciclo (63). Los primeros estudios randomizados y controlados objetivaron unas tasas de implantación y embarazo bajas, junto con una tasa de aborto temprano extremadamente alta. Estos resultados fueron atribuidos a una insuficiencia de la fase lútea que el soporte habitual de esta fase con estradiol oral y progesterona vaginal no era capaz de equilibrar. Sin embargo, siguiendo a estos estudios, varios grupos han elaborado diferentes pautas

modificadas de soporte de fase lútea con las que han obtenido resultados similares a los conseguidos tras la maduración con HCG. Estas pautas serán analizadas en profundidad en el apartado 1.3.2.

1.2.3. Conclusiones

El *triggering* con aGnRH es más fisiológico, con una oleada de gonadotrofinas similar a la que se produce durante un ciclo natural y sin la larga vida media de la HCG. Sus principales ventajas son el mayor número de ovocitos maduros recuperados tras la punción ovárica y la drástica reducción de un cuadro potencialmente grave como el SHO.

El defecto de la fase lútea que se asocia a esta opción de maduración ovocitaria en pacientes sometidas a TRA debe ser contrarrestado con un soporte suficiente que optimice este momento clave para la implantación embrionaria y la consecución del embarazo.

1.3. SOPORTE DE FASE LÚTEA EN TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La fase lútea constituye el periodo comprendido entre la ovulación y el desarrollo de una gestación o el inicio de la menstruación a las dos semanas, siendo el resultado de una estimulación por pulsos (3-5 pulsos / 24 h) de la LH hipofisaria sobre el cuerpo lúteo. Una fase lútea normal es un requisito indispensable para la implantación embrionaria y la evolución del embarazo.

Desde el inicio de la aplicación de las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV), se observó que la estimulación multifolicular ocasionaba una alteración de la fase lútea. Estudios posteriores confirmaron que la deficiencia de esta fase en ciclos estimulados

INTRODUCCIÓN

se evidenciaba por una regresión prematura del cuerpo lúteo y por tener una menor duración, una elevación temprana de los niveles de P4 y una demora en la transformación secretora del endometrio. La consecuencia directa era la disminución de las tasas de gestación y de implantación, así como un incremento en la tasa de abortos tempranos.

La posterior aplicación de los aGnRH como tratamiento para prevenir la elevación prematura de la LH, que se acompaña de una recuperación lenta de la hipófisis (*down-regulation*) (70, 71), resultó en una evidente falta de soporte de los cuerpos lúteos por déficit de LH endógena. Más recientemente, con la introducción de los antGnRH, se pensó que no sería necesario apoyar la fase lútea por la rápida recuperación hipofisaria que se produce al cesar su administración. Sin embargo, se demostró que el acortamiento de la fase lútea persistía en los ciclos con antGnRH independientemente del fármaco empleado para inducir la ovulación (72).

Los diversos mecanismos que se postulan como causa de la alteración de la fase lútea son (73):

1. La aspiración de un gran número de células de la granulosa durante la punción ovárica, alterando su luteinización.
2. Retroalimentación negativa sobre la hipófisis ocasionada por los altos niveles de esteroides en fase lútea temprana, disminuyendo a niveles mínimos la concentración sérica de LH.
3. Recuperación hipofisaria tardía tras la aplicación de aGnRH en el protocolo largo.

4. Retroalimentación ovárica exagerada sobre la función hipotálamo-hipofisaria en respuesta a la estimulación.
5. Efecto directo sobre la hipófisis del bolo de HCG utilizado para inducir la maduración final ovocitaria.

Se han empleado múltiples fármacos y vías de administración con la finalidad de normalizar la fase lútea en ciclos de FIV, aunque hasta el momento no existe consenso acerca de la manera óptima de realizar este soporte.

1.3.1. Soporte de fase lútea cuando se utiliza HCG para la maduración ovocitaria

A. Protocolos propuestos

1. Soporte de fase lútea con HCG: la administración de HCG, por su acción similar a la LH, es capaz de rescatar el cuerpo lúteo y normalizar esta fase en ciclos de FIV (74). Esta estrategia se empleó como primera línea de soporte en los años 80 y 90. Posteriormente, diversos estudios mostraron que si bien la HCG incrementaba las tasas de embarazo en FIV, también se acompañaba de un aumento en la incidencia de SHO (75), razón por la que poco a poco se fue sustituyendo por otras alternativas. Un metaanálisis demostró que el 5 % de las pacientes suplementadas con HCG desarrollaban una hiperestimulación. Las dosis habitualmente usadas estaban entre 1500-2500 UI de HCG en días alternos.
2. Progesterona: la progesterona se ha convertido en la primera línea de tratamiento para el soporte de fase lútea. De las diferentes vías de administración, la vaginal es la más empleada por su facilidad de

empleo, además de evitar el paso metabólico hepático y carecer de efectos sistémicos (76). La vagina tiene un alto potencial de absorción y permite alcanzar altas concentraciones de P4 a nivel uterino. Se administra en forma micronizada en dosis de 300 a 600 mg al día, o bien en forma de gel en dosis de 90 mg diarios. La vía oral se emplea pocas veces debido a su pobre biodisponibilidad (< 10 %) y a una elevada producción de metabolitos que se asocian a efectos colaterales indeseables como la somnolencia. Por último, la progesterona también puede administrarse en dosis de 25 a 50 mg / día por vía intramuscular. Su principal ventaja es la alta concentración de progesterona alcanzada, pero con el inconveniente de que su administración es muy dolorosa. Revisiones recientes muestran resultados contradictorios al comparar la vía vaginal e intramuscular, aunque existe una tendencia a una mayor eficacia de esta última (73).

3. Estrógenos: el papel de los estrógenos durante la fase lútea aún está sin dilucidar. En los ciclos de FIV se ha demostrado que tanto el E2 como la P4 disminuyen significativamente durante esta fase si no se proporciona un soporte hormonal adecuado. Esto sería consecuencia del alto nivel de estrógenos existente en la fase lútea temprana, que ocasionaría un potente *feed-back* negativo sobre el eje hipotálamo-hipófisis, frenando la liberación de las cantidades adecuadas de LH. La disminución de las tasas de gestación se ha relacionado con la disminución de los niveles de estrógenos, si bien existe controversia sobre el beneficio o no de su suplementación durante la fase lútea. Un primer metaanálisis mostró

un beneficio en el caso de su aplicación en ciclos largos con aGnRH, pero en el caso de los protocolos con antGnRH los resultados no fueron concluyentes (77). El fármaco más frecuentemente utilizado es el valerianato de estradiol, en dosis orales de 4 a 6 mg al día. También se pueden administrar en forma de parches transdérmicos.

4. Agonistas de la GnRH: se ha demostrado la eficacia del empleo de pequeñas dosis de aGnRH (buserelina intranasal) para normalizar la fase lútea. La base es el efecto liberador de LH desde la hipófisis, de forma que si se administra con las dosis y el intervalo adecuado no se produciría la desensibilización hipofisaria y sí se mantendría su efecto *flare-up* (78).

B. Resultados

Son numerosos los estudios aleatorizados que han comparado diferentes fármacos como apoyo de la fase lútea. Revisiones y metaanálisis muestran resultados poco concluyentes y en ocasiones contradictorios (79). La disparidad en los protocolos y en las características de las pacientes incluidas hace difícil obtener una conclusión que permita la aplicación de uno de ellos de forma generalizada.

En la última revisión de la Cochrane publicada en 2011, la progesterona sintética por vía intramuscular mostró tasa superiores de embarazo al compararla con la progesterona micronizada por vía vaginal (80). En general, el agregado de estrógenos o HCG no pareció mejorar los resultados, además de asociar esta última opción un mayor riesgo de SHO. Por tanto, los autores concluyen que la mejor opción como apoyo de la fase lútea tras la inducción con HCG es la progesterona sintética,

aunque no debemos olvidar que su uso se asocia a otros efectos secundarios como dolor, infección y formación de abscesos en las zonas de administración y neuropatía.

1.3.2. Soporte de fase lútea cuando se utilizan agonistas de la GnRH para la maduración ovocitaria

A. Protocolos propuestos

1. Bolo único de HCG: tras dos pequeños trabajos en los que se había aplicado en ciclos de inseminación artificial, se llevaron a cabo varios estudios en ciclos de FIV/ICSI en protocolo con antGnRH en los cuales la maduración final se realizaba con un aGnRH. La mayoría de grupos aplicaban un bolo único de 1500 UI de HCG el día de la punción con la intención de reforzar el soporte de fase lútea habitual que se realizaba con progesterona vaginal y estrógenos orales. Esta pequeña dosis rescataba la fase lútea y se obtenían resultados clínicos similares a los del *triggering* con HCG (63). En el trabajo más amplio publicado hasta la fecha, que incluye más de 300 ciclos, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de recién nacido vivo (RNV) entre el grupo que recibió las 1500 UI de HCGu el día de la punción tras la maduración con aGnRH y el grupo control (*triggering* con 10000 UI de HCGu y soporte de fase lútea con progesterona vaginal). Además no se describieron casos de SHO en el grupo de estudio, frente a una incidencia del 2 % en el grupo en el que la maduración final ovocitaria se realizó con HCG. Un tercio de las pacientes incluidas presentaba más de 14 folículos mayores

de 11 mm al final de la estimulación, por lo que podrían considerarse como mujeres con alto riesgo de desarrollar el SHO (81).

2. Dosis repetidas de HCG durante la fase lútea: en un esfuerzo por encontrar la dosis mínima necesaria de HCG para mantener los resultados clínicos sin que reapareciera el SHO, un grupo español diseñó un estudio no aleatorizado en pacientes con alto riesgo (82). Tras la inducción de la maduración final con un aGnRH, el soporte de fase lútea se realizó con 3 dosis de HCGu separadas cada 72 h y comenzando al día siguiente de la punción. Las dosis de HCGu administradas fueron diferentes en los 3 grupos de pacientes que se incluyeron en el estudio: 1000, 500 y 250 UI. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las tasas de embarazo entre los 3 grupos. La incidencia total de SHO moderado fue del 4.2 %, además de un 3.6 % de casos severos. De nuevo no se encontraron diferencias entre los 3 grupos en cuanto al SHO. Seis de los 7 casos de SHO fueron de aparición tardía, y de estos 6, 4 tuvieron lugar en embarazos gemelares. Este estudio nos indica que las dosis bajas de HCG repetidas a lo largo de la fase lútea son suficientes para mantener las tasas de embarazo tras el *triggering* con aGnRH en pacientes con alto riesgo de desarrollar SHO. Aunque los casos de hiperestimulación son escasos, sí hay una fuerte asociación con el embarazo múltiple, lo que refuerza la idea de recomendar la transferencia selectiva de un único embrión en estas mujeres de alto riesgo. Respecto a las dosis, existe una tendencia a una reducción de los casos de SHO con las dosis más bajas, por lo que parece razonable

aconsejar las 500 UI como medida eficaz y segura para el soporte de fase lútea. Esta estrategia permite continuar en estos casos con la transferencia embrionaria en fresco, sin aumentar la incidencia de SHO ni perjudicar los resultados clínicos. Sin embargo, son necesarios estudios aleatorizados y controlados para poder generalizar estas conclusiones.

Tabla 1.5. Tasas de RNV según la maduración utilizada (aGnRH vs HCG) y soporte de fase lútea estándar

Estudio	Diseño	Pacientes	Apoyo de fase lútea	Maduración con aGnRH	Maduración con HCG
Fauser-2002	EAC	Normo-ovuladoras	P4 im	18.7 % (06/32)	13.3 % (02/15)
Humaidan-2005	EAC	Normo-ovuladoras	P4 vaginal E2 vo	3.9 % (03/55)	36 % (24/67)
Kolibianakis-2005	EAC	Normo-ovuladoras	P4 vaginal E2 vo	3.9 % (02/52)	27.7 % (15/54)
		RR	-0.18	7.9 % (11/139)	30.1 % (41/136)

EAC: estudio aleatorizado y controlado / RR: riesgo relativo / im: intramuscular / vo: vía oral

3. LH recombinante: otra alternativa para contrarrestar la insuficiencia de la fase lútea por las bajas concentraciones de LH asociadas al uso de aGnRH para la maduración final ovocitaria podría ser la administración de dosis repetidas de LH recombinante (LHr). La principal ventaja de la LHr frente a la HCG es su corta vida media, lo que reduciría la incidencia de SHO. En 2011 se llevó a cabo un estudio piloto en el que se administraron, junto a la progesterona vaginal, 300 UI diarias de LHr cada 48 horas, comenzando el día de la punción y con un total de 5

dosis (83). Las tasas de embarazo obtenidas se compararon con las del grupo control en el que el *triggering* se había realizado con HCG. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de RNV y no se describieron casos de SHO en ninguno de los dos grupos. El trabajo incluyó un total de 52 pacientes, por lo que son necesarios trabajos más amplios para obtener conclusiones sobre la eficacia y seguridad de las dosis repetidas de LHr como soporte de fase lútea.

4. Soporte intensivo con progesterona y estradiol: el *triggering* con aGnRH da como resultado niveles bajos de E2 y P4 en fase lútea que podrían estar indicando que el apoyo esteroideo estándar que se aplicó en los primeros estudios era insuficiente. Un primer trabajo aleatorizado y controlado en pacientes con SOP utilizó progesterona intramuscular (50 mg / día) y parches de estradiol (3 parches de 0.1 mg que se cambiaban cada 48 horas), comenzando al día siguiente de la captación ovocitaria (84). Las dosis de progesterona y estradiol se fueron incrementando a partir de la transferencia embrionaria con el objetivo de mantener sus niveles por encima de los 20 ng / mL y los 200 pg / mL, respectivamente. Con este protocolo se obtuvieron unas tasas de embarazo en curso del 53 %, además de no describirse ningún caso de SHO frente a la incidencia del 34 % del grupo control, en el que la maduración ovocitaria se había realizado con 10000 UI de HCG. Sin embargo, estos esperanzadores resultados en cuanto a tasas de embarazo y SHO en pacientes de alto riesgo no han sido confirmados en otros trabajos, que aplicando progesterona intramuscular (50 mg / día) y estradiol oral (4

mg / día) durante la fase lútea presentaron tasas decepcionantes de embarazo, por debajo del 10 %, y de aborto temprano, por encima del 80 %.

Tabla 1.6. Tasas de RNV según la maduración utilizada (aGnRH vs HCG) y soporte de fase lútea modificada

Estudio	Diseño	Pacientes	Apoyo de fase lútea	Maduración con aGnRH	Maduración con HCG
Humaidan-2006	EAC	Normo-ovuladoras	P4 vaginal 1500 UI HCG	38 % (05/13)	53 % (08/15)
Babayof-2006	EAC	SOP	P4 im E2 sc	6.6 % 6.7 (1/15)	15 % (2/13)
Pirard-2006	EAC	Normo-ovuladoras	aGnRH	16.6 % (02/12)	16.6 % (01/06)
Engmann-2006	EAC	SOP	P4 im E2 sc/vo	48.5 % (16/33)	43.7 % (14/32)
Humaidan-2010	EAC	Normo-ovuladoras	P4 vaginal 1500 UI HCG	23.7 % (36/152)	31.3 % (47/150)
Papanikolaou-2011	EAC	Normo-ovuladoras	P4 vaginal 300 UI LHr x 6	22.2 % (4/18)	23.5 % (04/17)
Castillo-2010	ENA	Normo-ovuladoras	P4 vaginal 500 UI HCG / 72 h x 4	42.6 % (49/115)	No controlado

EAC: estudio aleatorizado y controlado / ENA: estudio no aleatorizado

RR: riesgo relativo / im: intramuscular / vo: vía oral

B. Resultados

Si analizamos todos los trabajos publicados desde 2005, se observa que en todos los estudios se ha aplicado un soporte de fase lútea basado en el apoyo esteroideo intensivo o en el refuerzo de la actividad LH. El último metanálisis de 2010 que ha analizado los resultados de estos trabajos encuentra tasas

comparables de RNV a las obtenidas con la maduración con HCG. Sin embargo, todavía existe una diferencia de un 6 % a favor del segundo, aunque la incidencia de SHO desaparece frente al 7 % de las pacientes que reciben HCG (63).

Por tanto, el soporte de fase lútea tras la maduración final ovocitaria con un aGnRH tiene un efecto marcado en los resultados clínicos, reduciendo o incluso aboliendo la aparición del SHO. Pero a día de hoy todavía desconocemos cuál de estos protocolos es el candidato ideal para ser aplicado de forma generalizada a las pacientes con alto riesgo de SHO.

1.4. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR *MICROARRAYS*

En la era previa al desarrollo de la genómica, cuando la investigación estaba limitada por la incapacidad de estudiar más de una molécula al mismo tiempo, los estudios iban dirigidos a proteínas y otras moléculas que apareciesen diferencialmente expresadas, o genes específicos que pudiesen tener alguna relación con la enfermedad a estudiar. Hoy en día, en la era genómica, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) junto con la tecnología de *microarrays* nos proporcionan una gran cantidad de información sobre el endometrio, pudiendo de esta manera describir un perfil génico característico de las distintas fases del ciclo.

1.4.1. ¿Qué es un *microarray*?

Todas las células de un mismo organismo contienen la misma información genética, el mismo número de cromosomas con el mismo set de genes. Sin embargo, en función del tejido, del tipo celular y del proceso biológico que se lleve a cabo, expresan sólo una fracción selectiva del total de genes disponibles, de modo que hay

INTRODUCCIÓN

una expresión génica diferencial si comparamos una población celular respecto a otra. La tecnología de *microarrays* permite la determinación de qué genes se expresan en una célula en condiciones basales (85). Todavía de mayor interés es que esta técnica pueda medir los cambios en la expresión de genes en respuesta a una enfermedad, inflamación, agentes farmacéuticos, hormonas, factores de crecimiento, cambios en el desarrollo, u otras desviaciones de la homeostasis.

La tecnología de *microarrays* se aprovecha de la naturaleza del ADN y del ARN para unirse a hebras complementarias de ácidos nucleicos. El ARN es extraído de los tejidos o células de interés y se incuba con el *microarray*. La estructura de una secuencia de bases complementarias del ADN y ARN permite al ARN de la muestra unirse a la secuencia de ADN del *microarray* (85). De este modo, la secuencia de genes del *microarray* a la que se ha unido el ARN del tejido o célula, es identificada para desarrollar perfiles de expresión génica del tejido en estudio.

En lo que respecta a la receptividad endometrial, los *microarrays* de ADN son una técnica de gran alcance que permite la determinación de la expresión de genes en condiciones basales (durante el ciclo natural) y en presencia de enfermedad o situaciones no fisiológicas. Los avances médicos que pueden estar basados en el entendimiento de su expresión génica incluyen el desarrollo de mejores protocolos de transferencia embrionaria y nuevas pruebas diagnósticas, así como un mejor conocimiento de los acontecimientos que ocurren en la fase lútea.

Estudios recientes sugieren que hay anomalías en la regulación de genes específicos que están implicados en el fallo de implantación en los TRA. Anteriormente, las investigaciones sobre expresión génica estaban limitadas por la imposibilidad de estudiar más de un gen a la vez. La introducción de la tecnología de

los *microarrays* de ADN ha hecho posible examinar la expresión de miles de genes a la vez. Los estudios actuales utilizan los *microarrays* de ADN para buscar nuevos marcadores de expresión génica asociados a la receptividad endometrial mediante la identificación de genes expresados diferencialmente entre las distintas fases del ciclo natural y bajo condiciones no fisiológicas.

Los datos obtenidos demuestran que los *microarrays* de ADN son una herramienta efectiva para evidenciar las diferencias de expresión entre el endometrio receptivo y el refractario. Gracias a ellos se pueden dirigir los esfuerzos hacia aquellos genes alterados con el fin de esclarecer la fisiología de la implantación embrionaria y desarrollar nuevos tratamientos y protocolos que permitan mejorar las tasas de embarazo.

1.4.2. ¿Cómo se lleva a cabo un experimento con *microarrays* de expresión génica?

Los *microarrays* son matrices sólidas en las que están impresas miles de sondas que detectan genes con una secuencia conocida. Cada sonda contiene una secuencia específica de un solo gen, aunque para un mismo gen suele haber más de una sonda. De este modo, cada punto del *array* (*spot*) o sonda posee una sola secuencia, aunque en cada *spot* debe haber suficientes moléculas idénticas como para asegurarnos de que todo el conjunto de moléculas de un mismo gen transcrito de la muestra pueda hibridar y no dé lugar a saturación. De no ser así, no se podrían unir todos los transcritos para los que la sonda está diseñada y no se podría cuantificar la expresión del gen.

Existe un amplio rango de *microarrays* de expresión génica comercialmente disponibles y que se dividen principalmente en dos categorías: *microarrays* de ADN

INTRODUCCIÓN

complementario (ADNc) y los que más se emplean en la actualidad que son los oligonucleótidos sintéticos de alta densidad (86).

El número de *spots* de un *array* (cada uno de los puntos que contiene un conjunto de sondas iguales) varía desde unos muy pocos genes hasta el genoma completo. El número de *spots* necesarios depende del número de genes, del número de sondas por gen que queramos analizar, de las réplicas, así como del número de controles que incluyamos, etc.

Para la fabricación del *array* se sintetiza el material genético en forma de ADNc u oligonucleótidos que se inserta de forma automatizada en una capa de cristal, nailon o plástico, colocándose en unas casillas que actúan a modo de microtubo de ensayo. Los *microarrays* de nucleótidos son fabricados de manera automatizada e insertados por robots mediante fotolitografía o impresión piezoeléctrica. El resultado es un proceso automatizado y normalizado que permite miles de impresiones por cm² y minuto (87).

Estamos ante una tecnología en constante perfeccionamiento. Dentro de las compañías que han desarrollado esta técnica, cabe destacar la plataforma *Affimetrix*, que es una de las pioneras en este campo. Hoy en día se pueden diseñar *microarrays* a la carta en prácticamente todas las plataformas que incluyan los genes que nos interesan para estudiar un proceso determinado, ahorrando así tiempo, dinero y espacio de almacenamiento.

La primera parte del experimento consiste en tener un buen diseño experimental que nos permita tener un número de muestras apropiado, en nuestro caso de endometrio, en distintas condiciones. Una vez que las muestras son tomadas,

se procede a la extracción del ARN total, donde está incluido el ARN mensajero (ARNm). Este paso es muy importante, ya que gran parte del éxito del análisis va a depender de la calidad del ARNm obtenido.

Una vez purificado, el ARNm es transcrito a ADNc al mismo tiempo que es marcado con nucleótidos que portan fluorescencia o biotinilados, según el sistema elegido. El ADNc marcado es hibridado sobre el *microarray* durante horas y posteriormente el *microarray* es lavado para eliminar los ADNc no unidos de forma específica (sólo las moléculas que hibriden permanecerán unidas a su sonda específica en el *microarray*). El revelado se realiza mediante un escáner óptico de alta resolución que permite leer imágenes de hasta de 5 μm (87).

El estudio de la expresión génica se puede realizar con un marcaje de dos colores o de un solo color. El de dos colores consiste en marcar una población de ARNm con un fluoróforo de color verde y la otra con un fluoróforo de color rojo. Ambas poblaciones se hibridan al mismo tiempo en el *microarray* y compiten por los sitios de unión, de modo que la intensidad de fluorescencia de cada *spot* dependerá de la cantidad de expresión relativa de ese gen en una muestra con respecto de la otra. En el caso de marcajes con un solo color se utilizan dos *microarrays* distintos, uno para cada muestra de modo que en la unión no hay competencia. Con este sistema se puede comparar la expresión génica diferencial de más de dos muestras (88).

1.4.3. La tecnología de los *microarrays* aplicada al estudio de la receptividad endometrial

El nivel de estudio que proporciona la genómica funcional del endometrio constituye un enfoque a nivel molecular de la función endometrial, tanto en

INTRODUCCIÓN

condiciones fisiológicas como patológicas. En el ámbito de la medicina reproductiva, es de gran interés conocer el perfil de expresión génica del endometrio humano. Para ello se han desarrollado modelos humanos *in vitro* e *in vivo* y se ha estudiado la expresión génica de las células estromales durante el proceso de decidualización (89), así como los cambios de expresión que tienen estas mismas células en respuesta a la progesterona. También ha sido estudiado el patrón de expresión génica diferencial entre el compartimento epitelial y estromal durante la fase proliferativa del ciclo menstrual en humanos, mediante la sección por *laser capture*.

Se han encontrado evidencias moleculares convincentes sobre la identificación de perfiles de expresión génica del endometrio humano no sólo en fase de receptividad, sino a través de las diferentes fases del ciclo menstrual (90). El grupo australiano de Peter Rogers fue el primero en proponer la caracterización del endometrio humano a lo largo del ciclo al utilizar la tecnología de los *microarrays* (91). Este grupo concluyó que es posible clasificar con exactitud el endometrio mediante su perfil molecular sin tener en cuenta su apariencia morfológica. Incluso demostraron que en algunas muestras el patrón de expresión génica corrige al criterio histopatológico de Noyes y sugirieron su utilización como marcador biológico del endometrio. Es más, fueron capaces de establecer la existencia de *clusters* de genes característicos de las diferentes fases del ciclo, y destacaron el potencial del perfil de expresión génica para el desarrollo de herramientas moleculares en la evaluación del estado endometrial.

Estos resultados subrayan el potencial de los perfiles de expresión génica para poder desarrollar diagnósticos moleculares y poder distinguir entre endometrios funcionalmente normales y anormales con idéntica morfología.

A. *La ventana de implantación*

Mediante esta tecnología se ha conseguido establecer qué moléculas son las esenciales en el desarrollo del estatus receptivo del endometrio (92, 93). Son muchos los trabajos independientes basados en los *microarrays* sobre el análisis genómico funcional durante la ventana de implantación en la especie humana y que identifican variaciones en el genoma completo.

El grupo de trabajo dirigido por Kao comparó la fase folicular con distintos días de la fase receptiva entre LH+8 y LH+10 (considerándose LH+0 como el día en el que se produce el pico fisiológico de LH que desencadenará la ovulación a las 36-40 horas). Este grupo describió más de 150 genes regulados positivamente y 350 regulados negativamente (94). Entre los genes regulados al alza se encontraron proteínas de transporte de lípidos (apolipoproteína E), proteínas sintetizadoras de prostaglandinas (PLA2), síntesis de proteoglicanos (gluroniltransferasa), proteínas secretadas como la glicodelina (PP14), proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico (IGF), proteínas relacionadas con la TGF-beta, proteínas de transducción de señales, componentes de matriz extracelular (osteopontina, laminina), numerosos moduladores de la inmunidad, genes detoxificadores (metalotioninas) y muchos otros. Entre los genes que disminuían su expresión en el endometrio receptivo se encontraban, entre otros, factores de transcripción relacionados con la familia TGF-

INTRODUCCIÓN

beta, moduladores de la inmunidad (subunidades del MHC-II) y miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (FrpHE).

El grupo de Carson (92) comparó endometrios obtenidos en la fase lútea inicial (pre-receptiva) versus fase lútea media (receptiva). Describieron la existencia de 370 genes regulados negativamente, mientras que aproximadamente 320 genes aumentaban su expresión. Entre los genes más destacables se encontraban algunos ya descritos previamente por Kao, pero a estos se añadían algunos nuevos como receptores de superficie celular, proteínas de adhesión a matriz extracelular y factores de crecimiento. Así mismo, el grupo de Borthwick, mediante la utilización de un *microarray* que incluía más de 60.000 oligonucleótidos, describió 149 transcritos diferencialmente expresados entre endometrios en fase prolifera y secretora de distintas pacientes.

En el trabajo llevado a cabo por Riesewijk (93) con el objetivo de comprender de forma global la base molecular de la receptividad endometrial en humanos, se compararon los perfiles de expresión génica del endometrio pre-receptivo (día LH+2) frente al receptivo (LH+7) de la misma mujer fértil y en el mismo ciclo menstrual. Las biopsias fueron analizadas mediante un chip de ADN de *Affymetrix* que contenía unos 12.000 genes. Al utilizar el criterio predefinido de un aumento o disminución de tres veces (*fold change* -FC- $> \pm 3$), en 4 de las cinco mujeres se identificaron 211 genes diferencialmente expresados. De estos, 153 estaban aumentados en LH+7 frente a LH+2, mientras que 58 estaban disminuidos. Entre estos 211 genes identificamos algunos que ya se sabía que desempeñaban un papel en el desarrollo de la receptividad endometrial, y genes para los que no se había descrito previamente

dicho papel. La validación de estos resultados fue llevada a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR) de cuatro genes implicados en la receptividad endometrial: tres aumentados (*glutathione peroxidase* -GPX-3- *claudin 4* y *solute carrier family member 1* -SLC1A1-) y uno disminuido (α -*catenin* -ACAT-) en muestras independientes de endometrio en LH+2 frente a LH+7 de mujeres fértiles. Experimentos de hibridación *in situ* mostraron que la expresión de GPX-3 y SLC1A1 estaba restringida a las células del epitelio glandular y luminal durante la fase lútea media y tardía.

Este trabajo introduce nuevos e importantes datos en este campo, y destaca la complejidad del estudio de la receptividad endometrial incluso al utilizar el análisis de expresión génica global. En definitiva, el análisis bioinformático mediante el análisis de componentes principales (PCA) basado en el perfil de expresión molecular de 2.000 genes al azar nos permite diferenciar las muestras de endometrio de la misma paciente sin recurrir a la morfología.

Aunque sólo uno de los genes, la osteopontina, se encuentra inducido al alza en los cinco trabajos comentados, hay varias moléculas importantes que han sido destacadas en 4 de los 5 estudios. Algunas de ellas son moléculas y proteínas previamente identificadas en el endometrio con o sin una función concreta. Genes implicados en el metabolismo lipídico (apolipoproteína D), respuesta inmune (*decay accelerating factor for complement*), serín o cisteín-proteasas, interleucina -IL-15-, regulación del ciclo celular (*growth arrest and DNA-damage-inducible-alfa*), unión a iones (anexina IV) o enzimas con diferentes funciones en distintos tejidos (monoamino-oxidasa A) (95).

INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos por todos estos laboratorios han demostrado que la receptividad endometrial es un proceso equilibrado, complejo y activo, que implica cientos de genes inducidos y reprimidos. Estos resultados también llevan a pensar que no existe una molécula clave con la capacidad de regular la receptividad endometrial por sí misma.

Una de las principales carencias de los resultados descritos es su incapacidad para diferenciar los tipos celulares presentes en el endometrio. Por tanto, las conclusiones descritas obtenidas mediante tecnología de *microarrays* han de ser completadas con el estudio separado de ambos compartimentos endometriales (epitelio y estroma).

B. Ciclo estimulado

El objetivo de los protocolos de estimulación ovárica es desencadenar la maduración de un número importante de folículos para obtener el mayor número de ovocitos viables y, con ello, conseguir incrementar la probabilidad de embarazo. Sin embargo, este procedimiento da lugar a una dinámica hormonal anormal que podría ser responsable de una menor tasa de implantación por embrión transferido comparado con el ciclo natural. Esto se compensa mediante el aumento del número de embriones transferidos, lo cual produce a su vez un incremento de embarazos múltiples. Las tasas de implantación obtenidas en los programas de donación de ovocitos son mayores que en las mujeres con estimulación ovárica controlada, lo que sugiere que las diferencias observadas están relacionadas con el efecto hormonal negativo sobre el endometrio. Estudios prospectivos han demostrado que los niveles suprafisiológicos de E2 en el día de la administración de HCG son deletéreos para la

implantación embrionaria (96). También se ha comprobado histológicamente que la fase lútea temprana se encuentra en un estado avanzado en casos de estimulación.

Se ha analizado el impacto de algunas moléculas específicas en el desarrollo de la receptividad endometrial. Sin embargo, la estrategia más interesante para estudiar el perfil genómico del endometrio y el impacto de los protocolos de estimulación en la receptividad del mismo ha sido el uso de la tecnología de los *microarrays*, que permite el estudio global de los patrones de expresión génica de un tejido en un único experimento.

El grupo de Horcajadas (97) fue el primero en estudiar el impacto genómico de la estimulación ovárica sobre el endometrio. Para ello, compararon el perfil de expresión génica endometrial en el día HCG+7 de mujeres sometidas a un protocolo largo con aGnRH frente al patrón genético en el día LH+7 de esas mismas mujeres en su ciclo natural previo. El chip utilizado incluía más de 22.000 genes y los resultados fueron testados por PCR cuantitativa y semicuantitativa. En su estudio encontraron más de 558 genes con una expresión diferencial de más de dos veces ($FC > \pm 2$) cuando se comparaban ciclos estimulados y naturales de la misma mujer. Tras analizar la lista de genes, encontraron que había un número sorprendentemente elevado de genes implicados en la receptividad endometrial que se expresaban de forma aberrante durante la ventana de implantación en caso de los ciclos estimulados asemejándose así al endometrio no receptivo. Esto claramente indicaba que el desarrollo endometrial estaba retrasado bajo estas condiciones, como ya se había sugerido en estudios previos.

INTRODUCCIÓN

En 2004, Mirkin comparó el perfil de expresión génica del endometrio cercano a la implantación en un ciclo natural versus estimulado con gonadotrofinas usando FSH recombinante (FSHr), en protocolo agonista o antagonista de la GnRH y con o sin aporte de progesterona en la fase lútea (98). Las biopsias de endometrio fueron tomadas en el ciclo natural previo, 8 días después del pico de LH (LH+8) y 9 días después de la administración de HCG (HCG+9) en el siguiente ciclo de estimulación. El análisis fue llevado a cabo con *microarrays* de oligonucleótidos de alta densidad, con más de 12.000 genes diana. Otras características estructurales y funcionales del endometrio fueron también investigadas, confirmando los cambios morfológicos previamente descritos por otros autores. Además, encontraron diferencias, aunque escasas, en los patrones de expresión genética de los ciclos bajo protocolo agonista versus antagonista de la GnRH (13 genes significativamente diferentes).

Un segundo estudio del grupo de Horcajadas (99) evaluó el impacto de las dosis estándar y altas de un antGnRH (*ganirelix*) en ciclos estimulados comparadas con un aGnRH (*buserelina*) en protocolo largo. Todos los grupos fueron iniciados con una dosis fija de FSHr y las biopsias endometriales fueron tomadas en HCG+2 y HCG+7. Estas muestras se compararon con las tomadas en LH+2 y LH+7 de un ciclo natural previo. En la datación endometrial del día HCG+2, la aparición de los receptores de estrógenos y progesterona y la expresión de pinópodos analizada por microscopía fueron comparables en todos los grupos, inclusive el ciclo natural. Sin embargo, tanto la datación como la expresión de pinópodos sugirieron un desarrollo endometrial enlentecido en el caso del uso del agonista cuando se comparaba con el antGnRH en HCG+7. Los perfiles de expresión génica en los ciclos estimulados fueron comparables con los del ciclo natural en LH+2. En lo que respecta a la ventana de implantación, los

patrones de expresión génica fueron más semejantes a los del ciclo natural cuando se utilizaron antGnRH con la dosis estándar (50 genes con expresión alterada) o en alta dosis de *ganirelix* (23 genes) comparado con la administración de agonistas (85 genes diferencialmente expresados). Esto sugiere que la expresión génica endometrial bajo la estimulación ovárica está afectada de una manera global y, como resultado, surge un perfil endometrial diferente. El perfil genómico endometrial después de un tratamiento con dosis estándar o altas de antGnRH en mujeres bajo estimulación se asemeja más al del ciclo natural.

C. Condiciones patológicas

Se han diseñado diferentes estrategias encaminadas a estudiar los patrones de expresión génica en condiciones en las que la mujer tiene mermada su receptividad endometrial para poder ser comparadas con el endometrio en ciclos naturales. El modelo más interesante para comprobar la funcionalidad de determinados genes o proteínas es contrastarlos en el endometrio refractario. Es decir, el estudio molecular de aquellos endometrios de pacientes fértiles que se encuentran en el periodo receptivo pero en el que hemos inducido cambios endometriales mediante tratamientos hormonales, como el RU486, o con la colocación de un dispositivo intrauterino (DIU). Esta aproximación en el estudio de los perfiles génicos aporta evidencias directas de la relevancia de los genes implicados en la ventana de implantación endometrial.

El RU486 o *mifepristona* es un derivado sintético similar en estructura a la progesterona pero con elevada afinidad por el sitio de unión a su receptor endometrial. Compite por la progesterona por su receptor y afecta a su unión con el

INTRODUCCIÓN

ADN, teniendo ya efecto a las 6 horas sobre la expresión génica del endometrio y transformando a éste en refractario. El grupo dirigido por Catalano estudió el endometrio en 7 mujeres fértiles en fase secretora media (entre los días 19 y 23 de ciclo) a las que se les había realizado una histerectomía por problemas ginecológicos benignos (100). Las muestras endometriales se dividieron en dos: con una parte se hicieron cultivos de explantes con concentraciones fisiológicas de estradiol y progesterona, y con la otra se realizó un cultivo en las mismas condiciones pero añadiendo niveles farmacológicos de RU486. Extrajeron el ARN en ambas condiciones para su análisis por medio de los *microarrays* de expresión génica. Estos *microarrays* fueron diseñados por ellos e incluían genes específicos de angiogénesis, apoptosis, control del ciclo celular, remodelado de matriz extracelular, señalización celular, marcadores de estroma, epitelio y linfocitos. De todos estos genes incluidos apenas se produjo un cambio de 1.2 % de ellos (12 genes de los 1000 incluidos en el *array*).

Con este estudio pretendían observar el efecto a corto plazo (a las 12 horas) inducido en el endometrio por la administración del fármaco. Este cambio se produjo sólo en algunas de las muestras y, en conjunto, cambios significativos solo se dieron en 12 genes. Estos genes representarían, por lo tanto, la primera respuesta al fármaco ya que el análisis se llevó a cabo a las 12 horas de su aplicación. Entre esos genes responsables de la transformación de un endometrio normal en un endometrio refractario se encontraron genes implicados en apoptosis, transcripción, respuesta al estrés,... pero sobretodo genes implicados en rutas de señalización. Es razonable encontrar genes implicados en estas rutas puesto que son los primeros cambios que se están produciendo en el endometrio hasta conseguir el efecto deseado (endometrio refractario). Las principales rutas de señalización que se encontraron alteradas

(disminuidas) fueron las del JAK/STAT y la JNH (factores de transcripción tirosinquinasa). Estas rutas, a su vez, son modificadas por varios receptores, a través de los cuales podría actuar el RU486.

Los DIUs, independientemente del tipo, provocan cambios cuyo resultado final es un endometrio refractario que no va a permitir la implantación embrionaria. El grupo de Horcajadas ha analizado también el perfil de expresión del endometrio con DIU por medio de *microarrays* (101). Para realizar este estudio, se comparó el perfil génico del endometrio de la misma mujer fértil en día LH+7 en 4 ciclos menstruales distintos: antes de la inserción del DIU (biopsia 1), en el momento de la retirada del DIU (biopsia 2), 2 meses después (biopsia 3) y 1 año después de su retirada (biopsia 4). Para evitar factores de confusión se utilizó un DIU inorgánico de plástico.

El estudio demostró la existencia de 147 genes alterados en el endometrio refractario con respecto al endometrio receptivo (biopsias 2 versus 1). De ellos, 52 (35 %) eran genes que estaban implicados en la regulación de la ventana de implantación según el trabajo previo de Riesewijk (93). Así mismo, se observó que la mayoría de los genes que se modificaban en presencia del DIU (96.6 %) permanecían alterados 2 meses después de su retirada. El 80 % de ellos (118 de los 147 genes) volvían a su estado de expresión normal después de 1 año de la retirada del DIU, lo que demuestra que a nivel molecular existe un efecto a largo plazo del DIU sobre el perfil de expresión génica endometrial que se corresponde con los datos epidemiológicos existentes.

Los resultados obtenidos a nivel genómico demuestran que la reducción de la fertilidad tras la inserción o retirada del DIU podría deberse a la modificación génica transitoria sufrida por el endometrio, algo que sólo se recupera completamente

después de un año de su retirada. Por lo tanto, los genes funcionalmente más interesantes serán aquellos que vuelvan a la normalidad cuando clínicamente se recupera la fertilidad. Al comparar el perfil genómico entre el endometrio receptivo y el refractario, se han identificado cuatro grupos únicos de genes con posible implicación funcional. Todos ellos vuelven a la normalidad después de 1 año, y algunos no habían sido previamente relacionados con el proceso de receptividad endometrial en humanos.

Los mecanismos moleculares implicados en el estatus refractario del endometrio humano producido por el DIU están relacionados con procesos biológicos como la apoptosis, transportadores de iones, inmunomoduladores, proteínas secretadas, proteínas implicadas en transducción de señales, proteínas de membrana y factores de transcripción. Además, como ya se ha mencionado, muchos de los genes que cambiaban entre ambas situaciones pertenecían a genes típicos o identificados previamente durante la ventana de implantación.

1.4.4. Endometrial Receptivity Array (ERA®)

El *Endometrial Receptivity Array* (ERA®) es una herramienta diagnóstica que analiza la expresión de 238 genes íntimamente relacionados con la receptividad endometrial. Ha sido introducida en la práctica clínica y patentada en 2009 por la empresa IVIOMICS, rama genómica del grupo IVI (102).

Usando una muestra de RNA procesada a partir de una biopsia endometrial bajo diferentes condiciones, el predictor informático que analiza el resultado del *microarray* es capaz de clasificar esa muestra como '*receptiva*', y por tanto con alta probabilidad de implantación, o '*no receptiva*', en cuyo caso las posibilidades de

embarazo estarían disminuidas si la transferencia embrionaria se llevara a cabo en un ciclo bajo esas mismas condiciones.

El desarrollo del *array* ha sido publicado por Díaz-Gimeno en 2011 (102), y su eficacia y consistencia se ha demostrado en el trabajo del mismo autor publicado un año después (103). Finalmente, su aplicabilidad clínica en pacientes con fallo de implantación se ha constatado en la publicación de Ruiz-Alonso en 2013 (104). Actualmente se encuentra en proceso un estudio randomizado para evaluar su aplicabilidad en pacientes sin tratamientos previos de reproducción asistida.

A. Selección de los genes

Para buscar los genes involucrados en la receptividad endometrial y seleccionar los candidatos para ser incluidos en el ERA, los autores analizaron las diferencias de expresión genética de todo el genoma humano de un *set* de muestras de endometrio receptivas (fase secretora media) y pre-receptivas (fase proliferativa y secretora temprana) utilizadas en un estudio previo (99).

Las muestras para seleccionar los genes fueron tomadas en fase pre-receptiva (LH+1, LH+3 y LH+5) y receptiva (LH+7), 5 en cada grupo para un total de 20 biopsias. Basado en los criterios de un $FC > \pm 3$ y un $p\text{-valor} < 0.05$, 238 genes fueron finalmente incluidos al demostrarse una expresión significativamente diferente de los mismos entre ambas fases. La validación del *microarray* se realizó mediante técnica de PCR de 4 genes seleccionados previamente.

Para caracterizar la naturaleza de los genes incluidos en el ERA, se analizaron los procesos biológicos que se veían afectados mediante la herramienta *FatiGO*. Entre

INTRODUCCIÓN

ellos se incluyen procesos biológicos (sistema inmune, respuesta inmune, respuesta al estrés, respuesta de la inmunidad humoral, respuesta inmune innata, respuesta al dolor...), funciones moleculares (actividad oxido-reductasa, unión a carbohidratos, unión a receptor...) y componentes celulares (formación de microtúbulos, ...).

El análisis de estos genes por *clusters* se llevó a cabo para detectar genes con un comportamiento similar desde la fase proliferativa a la fase secretora media, generándose 7 *clusters* bien diferenciados. El *cluster* 1 estaba representado por 50 genes cuya expresión genética desde la fase proliferativa a la fase pre-receptiva se mantenía baja, pero mostraba un incremento marcado al alcanzar la fase receptiva. En el *cluster* 7, con 37 genes, estos mostraban también un incremento en la fase receptiva tras una expresión insignificante en las fases previas. En el otro extremo, el *cluster* 5, estaba formado por 72 genes con una regulación a la baja en la fase receptiva. El resto de *clusters* mostró cambios en su expresión génica menos marcados durante las distintas fases del ciclo menstrual.

B. Diseño del microarray

Una vez seleccionados los genes, se fabricó el *microarray* llamado ERA a partir del catálogo de genes de la empresa *Agilent*, evitando así el fenómeno de cruzamiento. La validación del *microarray* se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para 4 genes seleccionados: GPX3, FXD2, SPP1 y MT1G.

El análisis ontológico de los genes incluidos en el ERA definió 19 procesos biológicos que se recogen en la **Tabla 1.7** con el número de genes incluidos y el porcentaje que suponen sobre el total de genes del *array*.

Tabla 1.7. Análisis ontológico de los genes incluidos en el ERA mediante FatiGO

Término	<i>Nivel Go</i>	<i>% genes</i>	<i>Nº genes</i>
<i>Respuesta inmune</i>	BP3	14.94	26
<i>Respuesta al estrés</i>	BP3	15.52	27
<i>Respuesta defensiva</i>	BP3	10.34	18
<i>Circulación</i>	BP3	4.60	8
<i>Respuesta a estímulos externos</i>	BP3	10.34	18
<i>Comportamiento</i>	BP3	6.32	11
<i>Ciclo celular</i>	BP3	12.07	21
<i>Adhesión celular</i>	BP3	10.34	18
<i>Desarrollo de estructuras anatómicas</i>	BP3	2.41	39
<i>Respuesta inmune humoral</i>	BP4	6.02	10
<i>Señalización célula-célula</i>	BP4	13.25	22
<i>Respuesta innata inmune</i>	BP4	4.22	7
<i>Ciclo mitótico celular</i>	BP4	6.63	11
<i>Respuesta a la agresión</i>	BP4	8.43	14
<i>Actividad oxido-reductasa</i>	MF3	18.10	21
<i>Unión a carbohidratos</i>	MF3	9.48	11
<i>Unión a receptor</i>	MF4	16.91	23
<i>Huso meiótico</i>	CC10	30.43	7
<i>Microtúbulos – huso meiótico</i>	CC11	30.77	4

C. Desarrollo y entrenamiento del predictor informático

La fiabilidad del test ERA fue probada con una cohorte de biopsias endometriales diferentes de las utilizadas para la selección de los genes a incluir en el *array*. Los valores de expresión génica obtenidos en estos ERA fueron utilizados entonces para el entrenamiento del predictor tanto en la datación del endometrio como para la definición de la firma transcriptómica de receptividad endometrial.

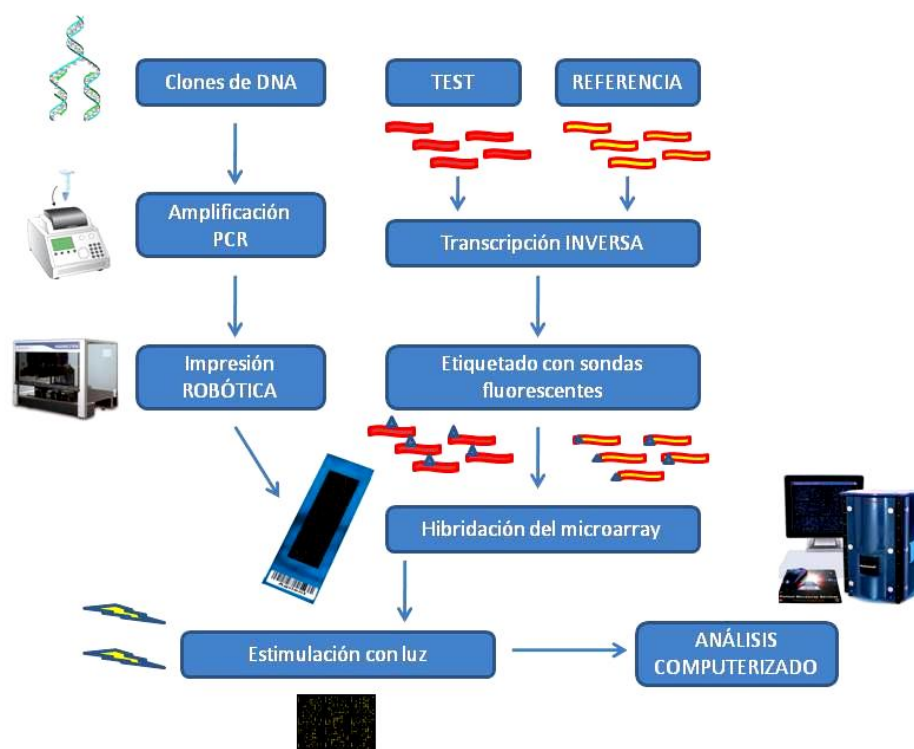


Figura 1.2. Diseño de un *microarray* y estudios de expresión génica

Para el entrenamiento del predictor en la datación endometrial se obtuvieron 68 biopsias de endometrio de mujeres fértiles durante el ciclo menstrual, y fueron clasificadas como receptivas, pre-receptivas o proliferativas (102). El grupo receptivo estaba representado por las biopsias tomadas en el día LH+7 (día 20-21 del ciclo menstrual), para un total de 40 muestras; en el grupo pre-receptivo, la biopsias se

realizaron entre los días LH+1 y LH+5 (13 muestras); finalmente, en el grupo proliferativo, se tomaron 15 biopsias entre el día 8-12 del ciclo menstrual.

Para el entrenamiento en condiciones no fisiológicas, se tomaron varias muestras de endometrio en el día LH+7: 5 en paciente diagnosticadas de fallo de implantación y 2 de mujeres en las que se objetivó la presencia de un hidrosálpinx. Siete de las biopsias endometriales, que pertenecían a los diferentes grupos, fueron excluidas por razones técnicas.

Al analizar los resultados del predictor, se encontró que la precisión para la datación endometrial era del 95 %, con un área bajo la curva (curva ROC) de 0.94. La especificidad y sensibilidad del predictor fue de 0.8857 y 0.99758 respectivamente. Para la clasificación de las muestras patológicas, los resultados revelaron una precisión del 87 %, con una especificidad del 0.1571 y una sensibilidad de 0.995.

D. Firma transcriptómica de receptividad endometrial

Para la obtención de la firma transcriptómica de receptividad se llevaron a cabo 2 tipos de comparaciones. La primera fue la expresión diferencial en el ERA entre las muestras receptivas y pre-receptivas y la segunda fue entre las muestras receptivas y las proliferativas. En la primera comparación, 200 genes (110 regulados al alza y 90 a la baja) presentaban una expresión significativamente diferente; mientras que en la segunda comparación lo hacían 179 genes (93 al alza y 86 a la baja).

La intersección de las dos comparaciones dio lugar a una lista de 134 genes (74 regulados al alza y 60 a la baja) que se expresaban de una forma significativamente

diferente en las muestras receptivas y las no receptivas (pre-receptivas y proliferativas) y que constituyen la firma genética de receptividad endometrial.

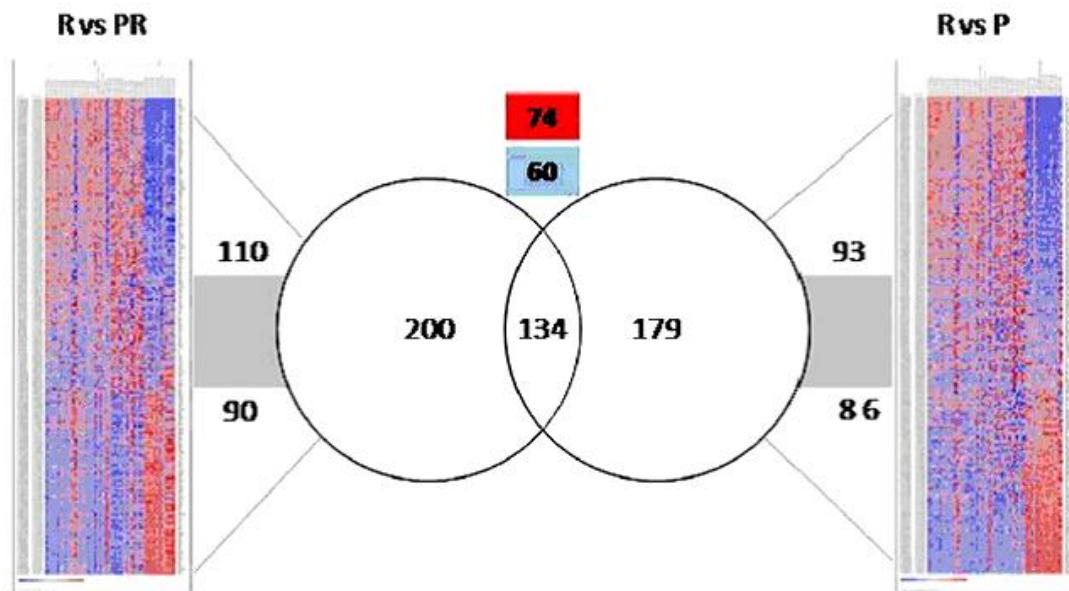


Figura 1.3. Firma genética de receptividad endometrial. La intersección de los genes diferencialmente expresados entre las fases receptiva (R) vs pre-receptiva (PR) y receptiva (R) vs proliferativa (P) dio lugar a una selección de 134 genes. (102)

E. Precisión y reproducibilidad del ERA

Los mismos autores que desarrollaron el test ERA diseñaron un estudio con el fin de comparar la capacidad del ERA para datar el endometrio respecto de los criterios histológicos clásicos y confirmar su reproducibilidad (103). Para ello tomaron 49 biopsias de endometrio en donantes de ovocitos en diferentes fases del ciclo menstrual, clasificándolas como receptivas (LH+7), pre-receptivas (entre LH+1 y LH+4), proliferativas (entre los días 8 y 12 del ciclo menstrual) y secretoras (entre LH+11 y LH+13). 49 de estas biopsias se utilizaron para comparar el resultado del ERA a partir de las mismas frente a la valoración histológicas de dos patólogos. Para determinar su

reproducibilidad, se analizaron 4 muestras clasificadas como 'receptivas' y 3 como fuera de la ventana de implantación y bajo estas mismas condiciones y en las mismas pacientes se repitió la biopsia entre 29 y 40 meses después.

Teniendo como referencia el pico de LH en orina, 16 de las 49 muestras fueron datadas correctamente por los patólogos y el ERA. En 13 de las biopsias el predictor ERA se mostró superior, fallando sólo en 3 casos, dos de los cuales también fueron erróneamente diagnosticados por los patólogos. Respecto al pico de LH, los patólogos 1 y 2 mostraron un índice de concordancia kappa de 0.618 y 0.685 respectivamente, frente al 0.922 observado al aplicar el test ERA. Por tanto, el predictor ERA demostró mayor precisión que el análisis histológico para la datación endometrial.

Al analizar la concordancia en los resultados obtenidos en las 7 muestras repetidas, el test ERA demostró una consistencia y reproducibilidad del 100 %. El análisis PCA mostraba como las muestras procedentes de la misma paciente y tomadas en la misma fase del ciclo tendían a agruparse, sugiriendo, pese al escaso número de muestras incluidas, que las variaciones en la firma transcriptómica de receptividad endometrial son raras, incluso más de 3 años después.

F. Resultados clínicos

El test ERA ha sido propuesto por sus autores como una herramienta terapéutica que, aplicado en pacientes con fallo de implantación, permita personalizar la transferencia al analizar de forma individual la ventana de implantación de cada paciente. Para demostrarlo, diseñaron un estudio prospectivo multicéntrico en el que se tomaron muestras de endometrio en pacientes diagnosticadas de fallo de implantación (104). Las biopsias se realizaron en ciclo natural, a los 7 días del pico de

LH (LH+7); o en ciclo sustituido, tras 5 días de impregnación con progesterona. En las pacientes en las que el predictor ERA arrojó un resultado *'receptivo'* se aconsejó llevar a cabo la siguiente transferencia bajo las mismas condiciones. En los casos en los que el primer resultado fue *'no receptivo'*, se tomó una segunda biopsia según la información arrojada por el primer análisis hasta obtener un resultado *'receptivo'*, realizando entonces bajo esa misma preparación la transferencia embrionaria.

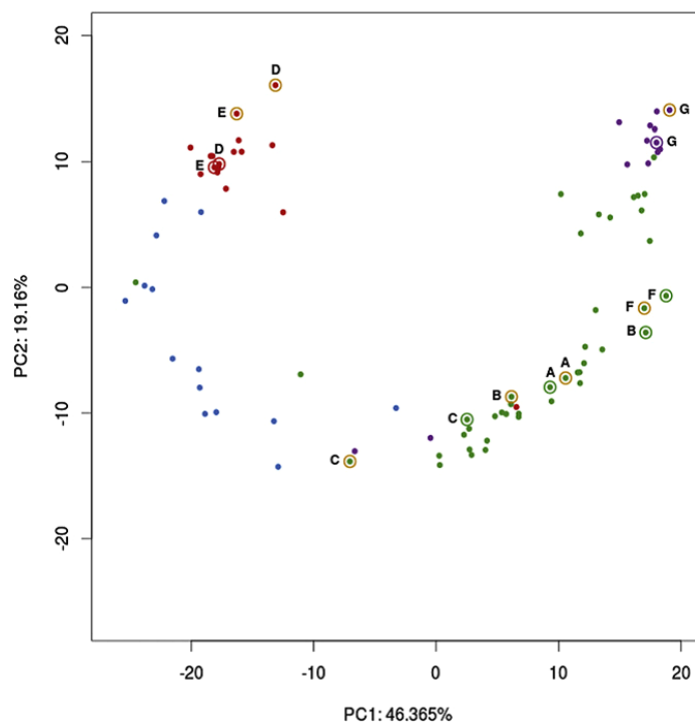


Figura 1.4. Principal Component Analysis de las 7 pacientes (A-G) en las que se repitió la biopsia para valorar su reproducibilidad (103).

Se obtuvieron 85 muestras de pacientes con fallo de implantación (con una media de 4.8 ± 2 transferencias previas fallidas), y sus resultados se compararon con los de 25 controles con una media de 0.4 ± 0.5 de intentos previos.

En 25 de las primeras biopsias realizadas en ambos grupos el resultado del ERA fue *'no receptivo'*. De estas 25 pacientes, 18 repitieron el test ERA retrasando el día de la biopsia a LH+9 (en los ciclos naturales) o P+6/P+7 (en los ciclos sustituidos) en aquellos casos en los que el patrón de expresión genética era pre-receptivo. En caso de haber obtenido un patrón post-receptivo, la segunda biopsia se adelantó al día P+3/P+4. 15 de las 18 biopsias repetidas fueron clasificadas entonces como *'receptivas'*, de las que se han obtenido resultados clínicos hasta la fecha de 8 pacientes: tasa de embarazo del 50 % y una tasa de implantación de 38.5 %. Estos resultados, pese a ser esperanzadores, deben tomarse con cautela debido al escaso número de pacientes analizados hasta la fecha. En la **figura 1.5** se muestra el protocolo de actuación propuesto por los autores del ERA.

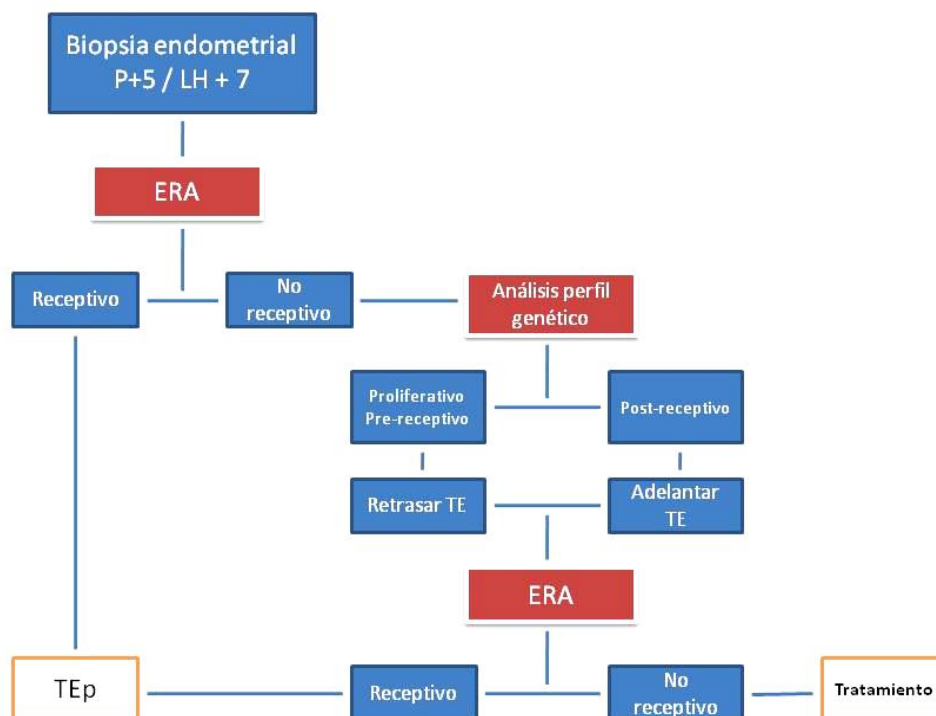


Figura 1.5. Protocolo de actuación para la aplicación clínica del ERA.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La expresión de los genes relacionados con la receptividad uterina puede ser eficazmente analizada en una biopsia de endometrio aplicando la tecnología de los *microarrays*.

Bajo las condiciones de una estimulación ovárica y la inducción final de la maduración ovocitaria con un bolo de aGnRH, la expresión de estos genes a nivel endometrial será diferente según el protocolo de soporte de fase lútea que se administre durante este momento clave para la implantación.

Comparando la expresión diferencial de estos genes podremos valorar con cuál de estos protocolos de suplementación se obtiene el patrón genético más próximo al que se produce tras la inducción de la ovulación con HCG, que es el protocolo más utilizado y con el que a día de hoy se obtienen las mejores tasas de embarazo.

2.2. OBJETIVOS

1. Estudiar la expresión génica a nivel endometrial durante la ventana de implantación con diferentes protocolos de soporte de fase lútea tras la inducción de la maduración ovocitaria con un bolo de aGnRH.
2. Comparar la expresión génica de cada uno de estos protocolos con la obtenida tras la inducción de la ovulación con HCG y soporte habitual de fase lútea con progesterona vaginal.
3. Comparar los perfiles hormonales durante la fase lútea (E2, LH y P4) de cada uno de los cinco protocolos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio se diseñó como ensayo clínico aleatorizado y controlado, con 4 grupos de estudio (inducción de la maduración ovocitaria con un bolo de aGnRH) y un grupo control (inducción de la ovulación con HCG y soporte estándar de fase lútea con progesterona vaginal).

Se incluyeron un total de 25 pacientes voluntarias del programa de donación de ovocitos de la Clínica IVI Madrid. El periodo de reclutamiento ha sido entre Enero de 2012 y Febrero de 2013.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron los mismos que se requieren para poder entrar en dicho programa de donación:

- Edad comprendida entre los 18 y los 35 años.
- Ciclos menstruales regulares, entre 25 y 35 días.
- Perfil hormonal basal normal: FSH < 10 mUI / mL y E2 < 60 pg / mL.
- Cariotipo en sangre periférica 46 XX normal.
- Índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 25 Kg / m².
- Serologías de enfermedades transmisibles negativas: antígeno de superficie de la hepatitis B (Ag HBs), anticuerpos anti-hepatitis C (Ac VHC), sífilis (RPR) y VIH.
- Citología cervical normal en el último año.
- Ecografía ginecológica normal.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Endometriosis.

- Síndrome de ovario poliquístico.
- Haber sido portadora de un DIU en los últimos 3 meses.

El estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación de la Clínica IVI Madrid y por el Comité de Ética de la Fundación IVI. Fue registrado como ensayo clínico aleatorizado y controlado con el número de la *European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials* (EudraCT) 2011-003250-34 y aceptado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid el 9 de Septiembre de 2011.

Todas las donantes participantes firmaron el Consentimiento Informado por el cual aceptaban participar en el estudio (ver **Anexo 1**) previa información oral y por escrito del médico encargado de iniciar la estimulación.

3.2. PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN

El inicio de la estimulación ovárica en las 25 participantes se programó mediante la utilización de un anticonceptivo oral (*Microgynon30*, etinilestradiol 0.03 mg y levonorgestrel 0.15 mg, Bayer), 1 comprimido al día, comenzando en los 3 primeros días del ciclo y manteniéndolo entre 12 y 16 días. Tras un periodo de lavado del anticonceptivo de 5 días, las pacientes comenzaron la estimulación con una dosis fija de 150 UI de FSH recombinante (FSHr) (*Puregon*, MSD) durante 4 días, y a partir de ahí la dosis diaria se ajustó en base a la respuesta folicular objetivada en los controles ecográficos. Para evitar la elevación prematura de LH las pacientes recibieron una inyección diaria de antGnRH (*Orgalutran* 0.25 mg, MSD) una vez que el folículo mayor

alcanzó un tamaño > 13-14 mm. El antGnRH se mantuvo hasta el mismo día de la inducción de la ovulación.

La maduración final de los ovocitos se llevó a cabo una vez que se detectaron al menos 3 folículos mayores de 17 mm por ecografía. En este momento las pacientes fueron aleatorizadas a cada uno de los 5 grupos por una enfermera asignada al estudio, para lo cual utilizó una lista de números únicos generados por ordenador introducidos en sobres sellados y sin etiquetar. Tanto el ginecólogo encargado de realizar la punción folicular como el técnico de laboratorio que procesó y analizó las muestras desconocían los resultados de esta aleatorización en el momento de llevar a cabo su labor.

Los pacientes asignados a los grupos 1, 2, 3 y 4 recibieron un bolo de 0.2 mg de aGnRH (*Decapeptyl* 0.1 mg, Ipsen Pharma) para inducir la ovulación, mientras que las pacientes del grupo 5 (grupo control) recibieron 250 mcg de HCG recombinante (HCGr) (*Ovitrelle*, Serono). Ambos fármacos se administran por vía subcutánea.

La aspiración de los ovocitos se programó a las 36 horas de la inducción en todas las pacientes.

3.3. GRUPOS DE ESTUDIO

En el grupo 1, el soporte de fase lútea se realizó con una dosis oral de 2 mg de valerianato de estradiol cada 8 horas (*Progynova*, Bayer) junto a 400 mg de progesterona micronizada (*Progeffik*, Effik) por vía vaginal cada 12 horas, comenzando la mañana siguiente a la aspiración folicular. Las vías oral y vaginal para la administración de ambos medicamentos difieren de las aplicadas por Engmann

MATERIAL y MÉTODOS

(estradiol por vía transdérmica y progesterona intramuscular) en su trabajo previo (105) debido a la ausencia de una progesterona natural de uso intramuscular en el mercado español.

En el grupo 2, las pacientes recibieron 150 UI de LHr (*Luveris*, Serono), administradas a diario por vía subcutánea desde el día siguiente de la punción para un total de 4 dosis. Además, la fase lútea en este grupo se apoyó con 2 mg cada 8 horas de valerianato de estradiol oral y 200 mg de progesterona micronizada cada 12 horas por vía vaginal.

En el grupo 3, se administró a las pacientes un bolo subcutáneo de 1500 UI de HCGr a las dos horas de la punción. El apoyo de fase lútea continuó con 2 mg cada 8 horas de estradiol oral y 200 mg cada 12 horas de progesterona vaginal hasta el día de la biopsia endometrial.

En el último grupo de estudio, grupo 4, las pacientes recibieron 3 dosis subcutáneas de 500 UI de HCGr separadas 48 horas, comenzando el mismo día de la punción (LH+2, LH+4 y LH+6). Junto a la HCG, este grupo utilizó 2 mg cada 8 horas de estradiol oral y 200 mg cada 12 horas de progesterona vaginal.

La única HCG de origen urinario que estaba disponible en España (*HCG lepori*) fue finalmente retirada del mercado en 2010. Basado en los estudios previos de bioequivalencia (106), se consideró que la dosis de 250 mcg bajo la que se comercializa la HCGr equivalía a 10000 UI de HCGu cuando se utiliza para la inducción de la ovulación. Actualmente, *The European Pharmacopoeia* ha establecido en 6500 UI la dosis equivalente más exacta. Por tanto, los grupos 3 (bolo único de 60 mcg de HCGr) y

4 (3 dosis de 20 mcg) recibieron las dosis de HCG correspondientes con la única HCGr disponible en el mercado español (*Ovitrelle*).

Finalmente, en el grupo control (grupo 5), la maduración ovocitaria se indujo con 250 mcg de HCGr y el soporte de fase lútea se llevó a cabo exclusivamente con progesterona vaginal, 200 mg cada 12 horas, comenzando al día siguiente de la aspiración folicular. Este es el protocolo estándar que se utiliza en nuestro centro en aquellas pacientes que continúan con la transferencia embrionaria en fresco en el mismo ciclo.

3.4. ANÁLISIS HORMONAL

Se obtuvieron muestras de sangre periférica para la determinación de las concentraciones de P4, E2 y LH en el día de la punción (LH+2), a las 48 horas (LH+4) y en el día de la biopsia de endometrio (LH+7).

Las medias de las concentraciones de estas hormonas se compararon mediante un test de ANOVA o de Kruskal-Wallis según la normalidad o no de su distribución. La significación estadística se estableció en 0.05. El test de la U de Mann-Whitney se aplicó para las muestras pareadas en caso de valores sin distribución normal, ya que ofrece resultados similares al test de Kruskal-Wallis para dos muestras independientes.

En los casos de comparaciones múltiples, se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples para poder analizar las diferencias en las concentraciones hormonales alcanzadas entre los diferentes protocolos.

Todos los análisis estadísticos se obtuvieron utilizando el programa informático para análisis predictivos SPSS, versión 18.0 (SPSS, Inc.).

3.5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se realizaron un total de 25 biopsias endometriales (5 en cada grupo) del fondo uterino. Estas se llevaron a cabo bajo condiciones de esterilidad a los 7 días de la maduración ovocitaria (LH+7) mediante un catéter de biopsia Pipelle (Pipelle de Cornier, Prodimed, Neuilly-en-Thelle, Francia).

Las biopsias fueron inmediatamente depositadas en criotubos, homogenizadas con 1.5 mL de solución *RNA-later* (QIAGEN, Barcelona, España), agitadas vigorosamente para su mezcla y mantenidas a temperatura ambiente hasta su procesamiento para el análisis ERA.

3.6. ETIQUETADO DE LAS MUESTRAS E HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS

El ARN total fue extraído de las muestras usando el mini kit comercializado *QIAGEN RNeasy* (QIAGEN, Chatsworth, CA). Aproximadamente se obtuvo entre 1-2 mcg de ARN total por cada miligramo de tejido endometrial. La calidad del ARN fue valorada cargando 300 ng del mismo en un *RNA Labchip*, que es analizado de forma computerizada por el *A2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies, Inc.*, Santa Clara, CA, EEUU). La calidad óptima de las muestras de ARN, determinada por un RIN (*RNA Integrity Numbers*) igual o superior a 7, fue un requisito previo para poder realizar el análisis ERA. Las 25 biopsias de endometrio alcanzaron este criterio y por tanto pudieron ser procesadas.

Se realizaron un total de 25 hibridaciones, todas por separado. La preparación de las muestras y su hibridación en un solo color fue adaptada del manual técnico de la empresa *Agilent*. De forma resumida, la primera cadena de ADN complementario fue

transcrita a partir de 200 ng de ARN total usando como promotor-cebador un T7-Oligo (dT) *Promoter Primers*. Estas regiones promotoras permiten el inicio de la transcripción del gen.

Las muestras de ADN complementario fueron transcritas *in vitro* y marcadas con el fluoróforo Cy-3 mediante el kit comercializado *Low Input Quick Amp Labeling* de *Agilent Technologies*. La reacción de marcado generalmente se produce entre 4-5 mcg de ARN complementario (ARNc) con una actividad específica mayor de 6. Los fragmentos de ARNc se hibridaron sobre el *microarray* ERA y fueron incubados a 65 °C durante 17 horas y con una constante rotación. Tras este periodo, se sometió al *microarray* a dos procesos de lavado de 1 minuto de duración.

Finalmente, los *microarrays* ya hibridados se escanearon mediante el escáner *Axon 4100A* (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA, EEUU), y los resultados se analizaron utilizando el programa informático *GenePix Pro 6.0* de la misma casa comercial.

3.7. ENDOMETRIAL RECEPTIVITY ARRAYS (ERA®)

Los valores de expresión de los genes incluidos en el ERA fueron pre-procesados y normalizados, y la receptividad endometrial se analizó mediante su predictor informático (102). El test ERA clasifica las muestras de endometrio como 'receptivas' o 'no receptivas' junto a una probabilidad diagnóstica asociada. Este test ha sido validado a día de hoy en biopsias de endometrio obtenidas en ciclo natural o bajo terapia hormonal sustitutiva. Aplicado en nuestro estudio, fuera de estas condiciones estudiadas, nos permite centrar el análisis en la expresión de 238 genes íntimamente ligados a la receptividad endometrial. La fiabilidad y consistencia del ERA como herramienta diagnóstica ha demostrado ser superior al diagnóstico histológico, y

sus resultados son completamente reproducibles hasta 40 meses después del primer test.

3.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando los recursos disponibles *on line* en la web de *Babilomics* (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) (107). La intensidad de la señal fue estandarizada mediante un algoritmo de normalización por percentiles.

Para cada gen, el resultado se expresa en cuanto a su tasa de cambio o *fold change* y su correspondiente p-valor. Este p-valor debe ser corregido debido a las comparaciones múltiples para minimizar el número de falsos positivos en el estudio. En nuestro análisis, y con este fin, se utilizó el procedimiento de corrección del p-valor propuesto por Benjamini-Hochberg, obteniendo así el p-valor ajustado (108).

Para el análisis de los grupos de genes con posible repercusión sobre diferentes procesos biológicos se utilizaron modelos de regresión logística descritos previamente (108, 109), identificando así bloques de genes con un patrón de expresión común bajo las diferentes condiciones del estudio. El procedimiento propuesto por Benjamini-Yekutieli se aplicó para corregir de forma estandarizada el efecto de las comparaciones múltiples y obtener en p-valor ajustado de cada uno de los procesos. El análisis funcional por bloques se basó en la información contenida en la base de datos *GO Biological Process* (110).

El *Principal Component Analysis* (PCA) es un procedimiento matemático que utiliza la transformación ortogonal para convertir una muestra de observaciones de

posibles variables correlacionadas (en nuestro caso, la expresión de los 238 genes contenidos en el ERA) en un conjunto de valores formados por variables no lineales ni correlacionadas llamadas *principal components* (PC) o componentes principales. Esta transformación es definida de tal forma que el primer componente principal (PC1) representa la máxima variabilidad de los datos posibles (40 % en nuestro conjunto de datos) y el resto de componentes (PC2 en nuestro estudio) justificaría la posible variabilidad restante (29 % en nuestro caso). Para nuestro conjunto de datos, PC1 y PC2 agrupan el 69 % de la variabilidad que separa las muestras en el espacio.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS BASALES

Las características basales y los parámetros de la estimulación ovárica de cada uno de los cinco grupos de estudio se resumen en la **Tabla 4.1**. No se encontraron diferencias significativas en la edad media, el IMC o el número de donaciones previas.

Con respecto a la estimulación ovárica, las diferencias encontradas en las dosis recibidas de gonadotrofinas, número de ovocitos maduros recuperados, niveles de estradiol al final de la estimulación o la duración de la misma no alcanzaron la significación estadística.

Tabla 4.1. Características basales y parámetro de estimulación en los grupos de estudio

	G1	G2	G3	G4	G5	p-valor
<i>Edad (años)</i>	24.0±1.5	24.8±1.9	22.6±1.7	22.6±1.6	25.6±0.7	ns
<i>IMC (kg/m²)</i>	21.9±1.2	21.7±1.5	21.4±0.7	20.7±1.5	23.3±0.7	ns
<i>Dosis total FSH (UI)</i>	1565±354	1710±278	1740±198	1310±113	2145±287	ns
<i>Folículos >15 mm en LH+0</i>	13.2±2.8	15.4±3.1	15.4±2.4	14.4±1.9	9±0.5	ns
<i>Nº de ovocitos recuperados</i>	21.8±4.5	18±2.4	19±3.8	16.8±5.8	12.2±1.8	ns
<i>Días de estimulación</i>	9.4±0.9	9.4±0.6	9.4±0.7	9.0±0.4	11.6±0.8	ns
<i>E2 en LH+0 (pg/mL)</i>	2162±450	1881±365	1904±527	1948±330	1761±502	ns

ns: no significativo

4.2. NIVELES HORMONALES

Las concentraciones en sangre periférica de estradiol, progesterona y LH se representan gráficamente en las **Figuras 4.1 y 4.2** para cada una de las tres

RESULTADOS

extracciones realizadas: día de la punción (LH+2), a las 48 horas de la misma (LH+4) y el mismo día de la biopsia endometrial (LH+7).

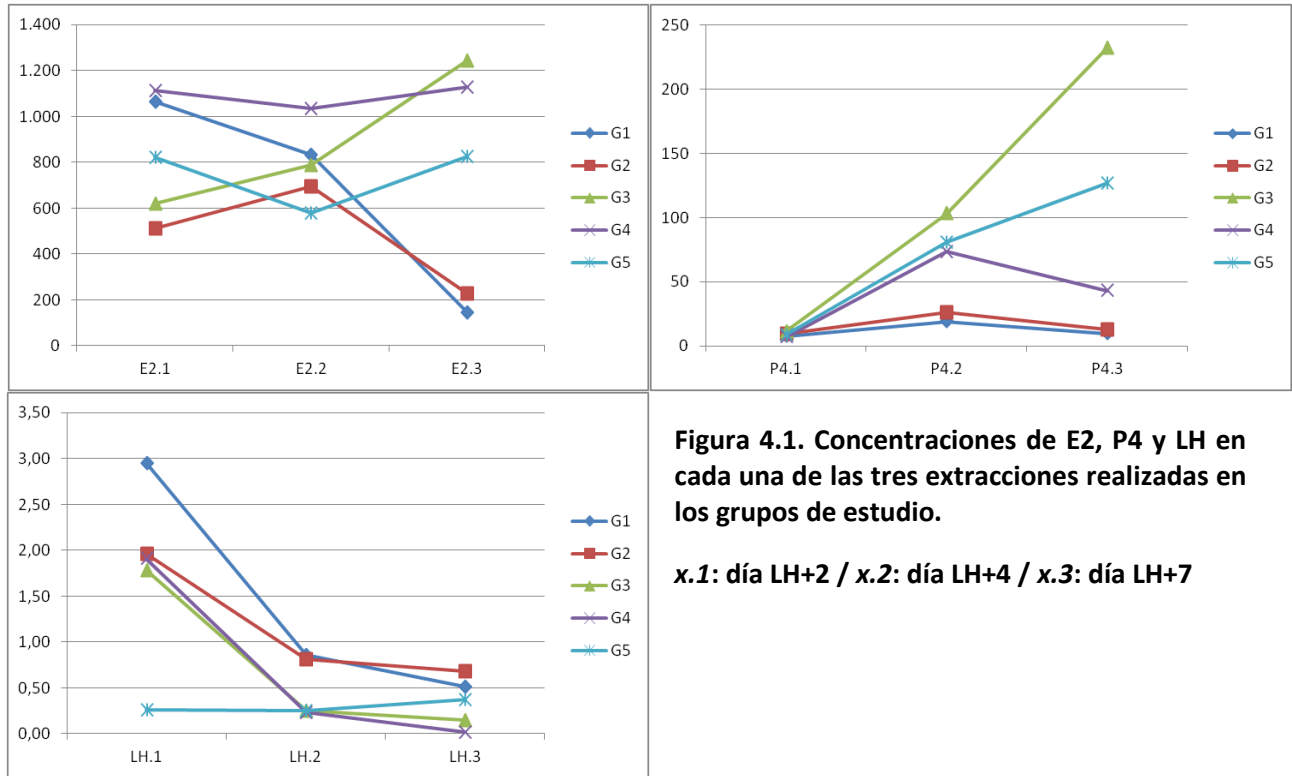


Figura 4.1. Concentraciones de E2, P4 y LH en cada una de las tres extracciones realizadas en los grupos de estudio.

x.1: día LH+2 / x.2: día LH+4 / x.3: día LH+7

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de LH en el día de la punción, con niveles inferiores en el grupo 5 (control) con respecto al resto de grupos. Los niveles de P4 plasmática a las 48 horas de la punción fueron significativamente inferiores en los grupo 1 y 2 al compararlos con los grupos 3 y 4, que recibieron HCGr en un único bolo o en 3 pequeñas dosis en días alternos. En cuanto al día de la biopsia endometrial, las concentraciones plasmáticas de P4 y E2 analizadas fueron superiores en los grupos 3 y 5 a las encontradas en el resto de grupos.

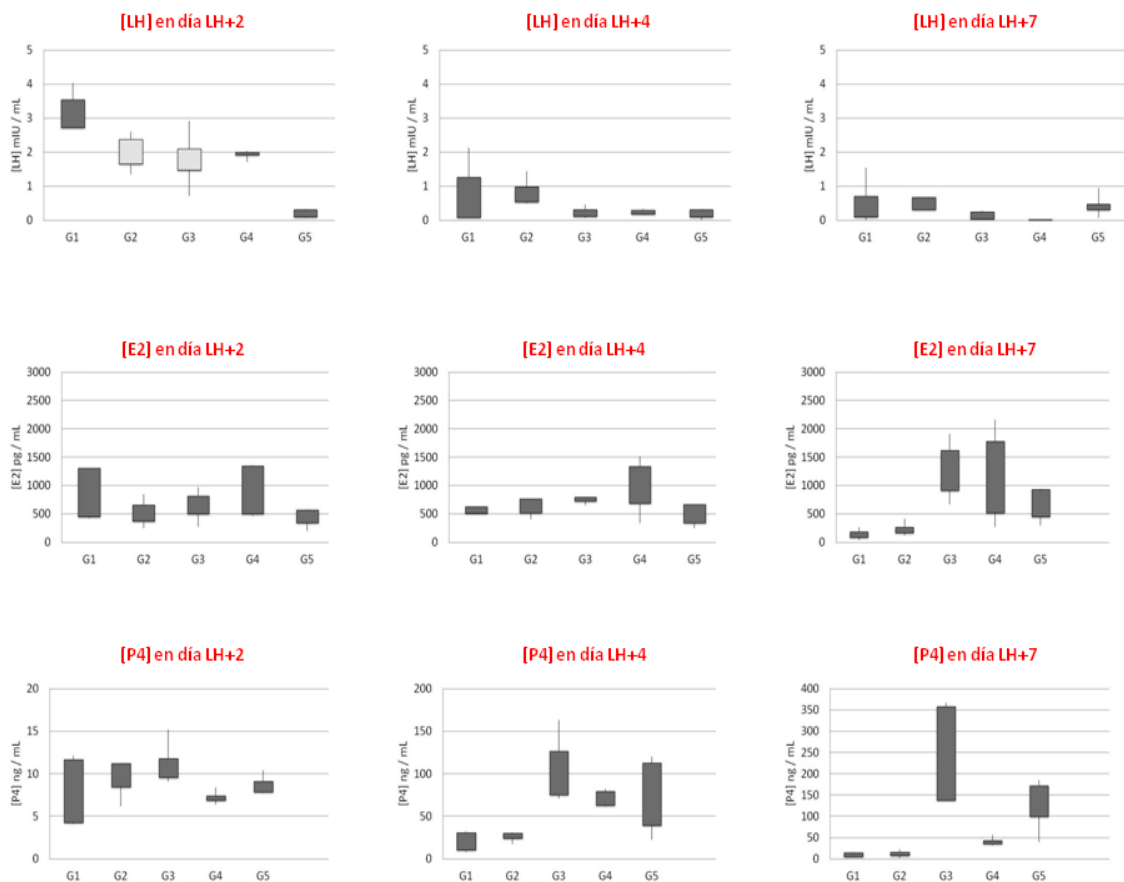


Figura 4.2. Concentraciones de LH, E2 y P4 en cada una de las tres extracciones realizadas en los grupos de estudio

4.3. EXPRESIÓN GENÉTICA DIFERENCIAL

Todas las muestras tomadas pudieron ser leídas y pre-analizadas apropiadamente. La normalización de los datos permitió reducir los artefactos técnicos y la potenciación de la señal biológica. El total de genes de cada grupo con una cambio en su expresión (*fold change*) superior o igual a 2 con respecto al grupo 5 se muestran en las **Tablas 4.2, 4.3, 4.4 y 4.5** con su correspondiente p-valor y p-valor ajustado.

El grupo 1 (estradiol oral más progesterona vaginal) presentó el mayor número de genes diferencialmente expresados al comparar su expresión genética con el grupo

RESULTADOS

5 ó control. Este primer grupo muestra un total de 56 genes con expresión alterada (25 genes al alza y 31 a la baja) frente a los 36 del grupo 2 (13 al alza y 23 genes a la baja), 44 en el grupo 3 (28 expresados al alza y 16 a la baja) y los 30 (20 al alza y 10 a la baja) del grupo 4. El PCA y los *clusters* de expresión genética de las 25 muestras analizadas se muestran en la **Figura 4.3**.

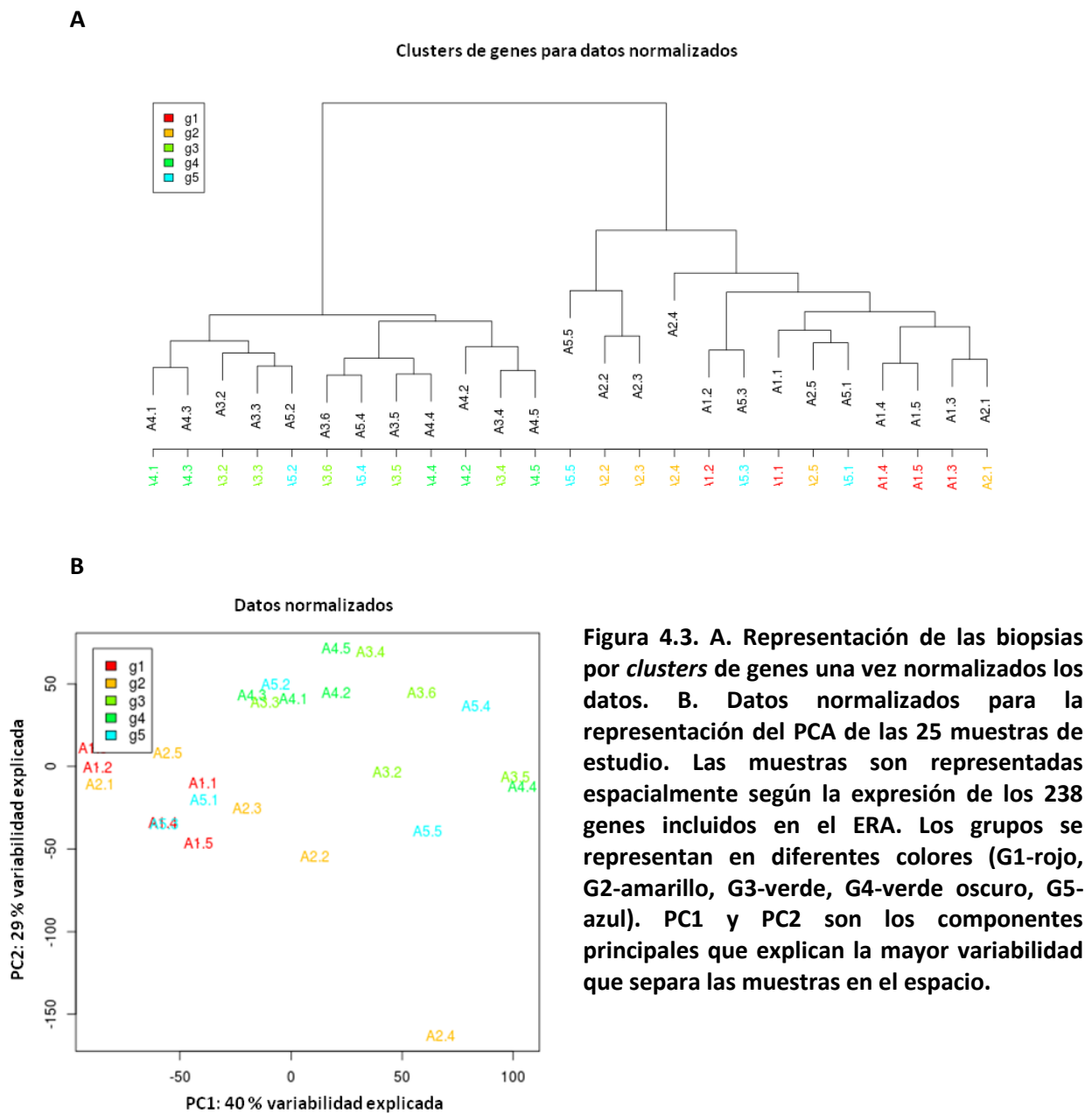


Tabla 4.2. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G1 vs G5 (control)

G1 vs G5	Gen	Fold change	P-valor	P-valor ajustado	
<i>Al alza</i>	LAMB3	3.75	0.00	0.43	
	ABCC3	3.62	0.00	0.43	
	ARID5B	3.49	0.00	0.43	
	DHRS3	3.43	0.00	0.43	
	ANG	3.32	0.00	0.44	
	CLDN10	3.18	0.00	0.48	
	TMEPAI	3.16	0.00	0.48	
	FAM59A	3.07	0.00	0.57	
	HABP2	2.86	0.00	0.70	
	IMPA2	2.81	0.00	0.70	
	RNASE4	2.81	0.00	0.70	
	PROM1	2.77	0.00	0.70	
	AQP3	2.73	0.00	0.72	
	C4BPA	2.72	0.00	0.72	
	SLC15A1	2.67	0.01	0.76	
	SCYE1	2.49	0.01	0.94	
	EFNA1	2.47	0.01	0.94	
	RARRES1	2.46	0.01	0.94	
	PAEP	2.46	0.01	0.94	
	SYNE2	2.43	0.01	0.96	
	GPX3	2.33	0.02	1	
	EVC	2.27	0.02	1	
	PROS1	2.16	0.03	1	
	EFEMP1	2.06	0.04	1	
	INDO	2.05	0.04	1	
	<i>A la baja</i>	PBK	-2.03	0.04	1
		BARD1	-2.05	0.04	1

(Continúa)

RESULTADOS

KHDRBS3	-2.05	0.04	1
HEY1	-2.11	0.04	1
MMP26	-2.26	0.02	1
C10orf3	-2.29	0.02	1
MGC11242	-2.32	0.02	1
HSD11B2	-2.34	0.02	1
NR4A2	-2.35	0.02	1
CREB3L1	-2.38	0.02	1
RPRM	-2.38	0.02	1
ATP6V0E2	-2.39	0.02	1
RAD54B	-2.47	0.01	0.94
GDF15	-2.49	0.01	0.94
ATP1B1	-2.50	0.01	0.94
CTNNA2	-2.57	0.01	0.89
PRC1	-2.62	0.01	0.81
MAP2K6	-2.66	0.01	0.76
KIF20A	-2.69	0.01	0.75
SORD	-2.785	0.00	0.70
STEAP4	-2.78	0.00	0.70
SLC15A2	-2.87	0.00	0.70
CXCL13	-2.88	0.00	0.70
SERPINA5	-2.97	0.00	0.62
BIRC3	-3.00	0.00	0.61
DFNB31	-3.02	0.00	0.60
DUOX1	-3.17	0.00	0.48
HLA-DOB	-3.29	0.00	0.44
CYP2J2	-3.34	0.00	0.44
CAPN6	-3.63	0.00	0.43
ADAMTS8	-5.41	0.00	0.00

Tabla 4.3. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G2 vs G5 (control)

G2 vs G5	Gen	Fold change	P-valor	P-valor ajustado
<i>Al alza</i>	TMEPAI	3.11	0.00	1
	ABCC3	2.69	0.01	1
	ARID5B	2.62	0.01	1
	LAMB3	2.57	0.01	1
	EFNA1	2.46	0.01	1
	SYNE2	2.45	0.01	1
	ID4	2.45	0.01	1
	FOSL2	2.39	0.02	1
	HABP2	2.36	0.02	1
	MUC16	2.25	0.03	1
	SLC15A1	2.19	0.03	1
	PROM1	2.04	0.04	1
	BCL6	2.04	0.04	1
	<i>A la baja</i>	PRC1	-2.02	0.04
CSRP2		-2.03	0.04	1
IDH1		-2.07	0.04	1
KIF20A		-2.08	0.04	1
SORD		-2.09	0.04	1
MAP2K6		-2.11	0.04	1
CTNNA2		-2.12	0.04	1
CAPN6		-2.13	0.03	1
ATP6V0E2		-2.15	0.03	1
SLC7A1		-2.16	0.03	1
ATP1B1		-2.22	0.03	1
CKB		-2.23	0.03	1
MGC11242		-2.33	0.02	1
DFNB31		-2.35	0.02	1

(Continúa)

RESULTADOS

BARD1	-2.39	0.02	1
HLA-DOB	-2.49	0.01	1
SLC15A2	-2.58	0.01	1
CYP2J2	-2.75	0.00	1
STEAP4	-2.82	0.00	1
CXCL13	-2.87	0.00	1
SERPINA5	-3.00	0.00	1
BIRC3	-3.13	0.00	1
ADAMTS8	-6.19	0.00	0.00

Tabla 4.4. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G3 vs G5 (control)

G3 vs G5	Gen	Fold change	P-valor	P-valor ajustado
<i>Al alza</i>	CYP2J2	3.10	0.00	1
	SORD	3.00	0.00	1
	RANBP17	2.73	0.00	1
	MSX1	2.60	0.01	1
	NR4A2	2.49	0.01	1
	OPRK1	2.49	0.01	1
	C11orf8	2.46	0.01	1
	COBL	2.43	0.01	1
	GALNT4	2.43	0.01	1
	CSRP2	2.43	0.01	1
	NDRG2	2.41	0.02	1
	SLC16A6	2.40	0.02	1
	KCNJ2	2.38	0.02	1
	DFNB31	2.35	0.02	1
	MAP2K6	2.32	0.02	1

<i>A la baja</i>	HSD11B2	2.31	0.02	1
	RAD54B	2.28	0.02	1
	CBR3	2.18	0.03	1
	SLC15A2	2.18	0.03	1
	COMP	-2.10	0.04	1
	LAMB3	-2.13	0.03	1
	RARRES3	-2.15	0.03	1
	SOD2	-2.16	0.03	1
	NNMT	-2.20	0.03	1
	CLDN10	-2.20	0.03	1
	DDX52	-2.24	0.03	1
	MRPS2	-2.26	0.02	1
	TSPAN8	-2.32	0.02	1
	GPX3	-2.50	0.01	1
	C4BPA	-2.52	0.01	1
	C3	-2.58	0.01	1
	C14orf161	-2.63	0.01	1
	CXCL14	-2.96	0.00	1
	CDA	-3.35	0.00	1
	PAEP	-3.80	0.00	1

Tabla 4.5. Genes con expresión diferencial significativa al comparar G4 vs G5 (control)

G4 vs G5	Gen	<i>Fold change</i>	P-valor	P-valor ajustado
<i>Al alza</i>	CSRP2	3.64	0.00	1
	KCNG1	3.27	0.00	1
	C11orf8	2.58	0.01	1

(Continúa)

RESULTADOS

	SERPINA5	2.49	0.01	1
	CTNNA2	2.40	0.02	1
	RASSF2	2.38	0.02	1
	OFD1	2.33	0.02	1
	ALPL	2.31	0.02	1
	HSD11B2	2.29	0.02	1
	TMEPAI	2.28	0.02	1
	SORD	2.27	0.02	1
	NDRG2	2.22	0.03	1
	RANBP17	2.07	0.04	1
	COBL	2.06	0.04	1
	MGC11242	2.05	0.04	1
	DUOX1	2.05	0.04	1
	OPRK1	2.05	0.04	1
	DFNB31	2.03	0.04	1
	ATP6V0E2	2.03	0.04	1
	ANK3	2.02	0.04	1
<i>A la baja</i>	GPX3	-2.03	0.04	1
	GADD45A	-2.07	0.04	1
	CDA	-2.19	0.03	1
	C14orf161	-2.29	0.02	1
	ABCC3	-2.35	0.02	1
	C4BPA	-2.38	0.02	1
	RARRES3	-2.79	0.00	1
	SLC1A1	-2.96	0.00	1
	PAEP	-3.42	0.00	1
	CXCL14	-3.52	0.00	1

Al analizar la expresión génica de los diferentes grupos de estudio respecto del grupo 5, llama la atención que los genes con expresión alterada tienden a hacerlo en sentido diferente. Así, al comparar estos genes comunes del grupo 2 respecto del grupo 1, 28 ellos se modificaban en el mismo sentido. Sin embargo, los 18 genes comunes entre los grupos 1 y 3 se expresaban de forma diferente, 13 regulados al alza (CREB3 L1, CYP2J2, MAP2K6, SORD, DFNB31, DUOX1, MCG11242, HLA-DOB, HSD11B2, NR4A2, RAD54B, SERPIN5, and SCL15A2) y 5 a la baja (C4BP2, CLDN10, GPX3, LAMB3, and PAEP). Al comparar los grupos 1 y 4, sólo 1 de los 13 genes alterados en ambos grupos lo hace en la misma dirección, el TMPA1.

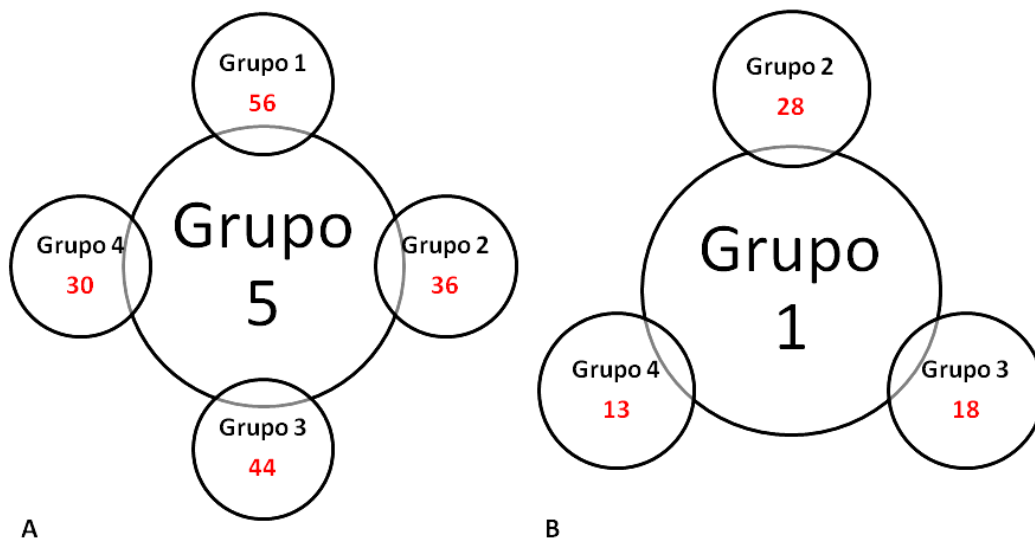


Figura 4.4. A. Diagrama de Venn con el número de genes diferencialmente expresados en cada grupo de estudio respecto del grupo 5 (control). B. Diagrama de Venn con los genes con expresión diferencial comunes entre los grupos 2, 3 y 4 respecto del grupo 1.

4.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: PROCESOS BIOLÓGICOS

Para el análisis de los procesos biológicos afectados se utilizó la base de datos de la *GO Biological Process database* (110). Esta base de datos es diferente en aquellas funciones o bloques de genes que se organizan en una estructura DAG (Directed Acyclic Graph). Esto hace que muchos de los procesos biológicos que se muestran

RESULTADOS

como significativamente alterados sean redundantes. Por ello, solo se muestran los procesos significativos y los términos no redundantes, de forma que el análisis de los datos se centra en los términos o funciones más específicos.

En el grupo 1 se encontraron 2 procesos biológicos afectados de forma significativa al comparar su expresión genética con el grupo 5. Uno de ellos, expresado a la baja, es el proceso de “organización del huso” (*spindle organization*), que está involucrado en la síntesis y organización de los microtúbulos que constituyen el citoesqueleto y es un paso clave para el correcto funcionamiento del huso meiótico durante la segregación del ADN celular. El otro proceso alterado, “*organic hydroxy compound transport*”, regula el transporte de sustancias orgánicas con grupo hidroxilo entre células a través de moléculas de transporte o canales de membrana.

Cuando se comparan los resultados del grupo 2 respecto del control, grupo 5, se encuentra un proceso biológico afectado: “*positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation*”. Este grupo de genes participa en la regulación de las tasas, frecuencia y duración de la fosforilación de los péptidos de tirosina, que es un paso clave para la síntesis proteica y los procesos de remodelación celular.

Con respecto a la expresión genética diferencial del grupo 3, se encontró un único proceso alterado: “*immunoglobulin-mediated immune response*”. Este proceso biológico está involucrado en la regulación de la inmunidad mediada por los linfocitos

B.

4. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. SELECCIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE ESTUDIO Y GRUPO CONTROL

Este estudio revela importantes diferencias en los patrones de expresión génica relacionados con la receptividad endometrial según la medicación aplicada para la maduración ovocitaria o el soporte de fase lútea utilizado.

La estimulación ovárica asociada a los TRA provoca niveles suprafisiológicos de esteroides durante la fase lútea. Estos esteroides inhiben la secreción de LH desde la glándula hipofisaria por un mecanismo de *feed back*. Cuando se utiliza un bolo de aGnRH para inducir la maduración final de los ovocitos, los niveles de LH circulante también decaen drásticamente durante la fase lútea (68), debido a la luteolisis precoz y a un soporte insuficiente para la implantación embrionaria (111, 112). Esta concentración menor de LH es aún más llamativa si la comparamos con el pico de LH que se produce en un ciclo natural (113) o tras la administración de un bolo de HCG con el mismo fin (114).

El bolo de HCG (6500-10000 UI) que se utiliza para la maduración ovocitaria en los TRA mantiene el cuerpo lúteo más allá de los 7-10 primeros días, gracias a su larga vida media (113). La actividad del cuerpo lúteo dependerá a partir de entonces de la secreción endógena de LH desde la hipófisis y del incremento gradual de la concentración de HCG producido tras la implantación exitosa del embrión. Esta última ya puede ser detectada en sangre materna a partir del octavo día desde la ovulación. Sin embargo, los niveles endógenos de LH caen bruscamente si se utiliza un aGnRH para el *triggering*, y junto con la estimulación ovárica, conducen a un empeoramiento de los resultados clínicos en los TRA pese al soporte estándar de la fase lútea (115).

DISCUSIÓN

Esto ha llevado a numerosos grupos de investigadores a desarrollar diferentes estrategias de soporte de fase lútea que obtengan el beneficio de la maduración final de los ovocitos con un aGnRH pero sin perjudicar los resultados en los pacientes que decidan continuar con la transferencia embrionaria en fresco en el mismo ciclo.

En este estudio, en el grupo 5 utilizado como control se aplicó el protocolo habitual para inducir la maduración ovocitaria con HCG y apoyar la fase lútea con progesterona vaginal, con el que se han descrito tasas de implantación embrionaria cercanas al 30 %. Respecto a los protocolos utilizados en los grupos de estudio, la elección se basó en la revisión de la literatura previa (63). En el grupo 1, las pacientes recibieron exclusivamente estradiol por vía oral y progesterona vaginal, de forma similar al protocolo usado por Humaidan y Engmann en sus primeros estudios del año 2005 (69, 105) pero usando diferentes dosis y vías de administración. El grupo 2 recibió una dosis diaria de LHr junto al estradiol oral y la progesterona vaginal, en un intento por contrarrestar los bajos niveles de LH asociados a la inducción con aGnRH. Se escogió una dosis diaria de 150 UI de LHr frente a la pauta de 300 UI cada 48 horas utilizada por Papanikolaou (83). En el grupo 3, el soporte de fase lútea se llevó a cabo con un bolo único de 1500 UI de HCGr el día de la punción, protocolo con el que el grupo de Humaidan ha presentado recientemente buenos resultados tras la inducción con aGnRH (81). Finalmente, en el grupo 4 las pacientes recibieron 3 dosis de 500 UI de HCGr en días alternos, pauta que ha demostrado su eficacia en el estudio observacional publicado por el grupo español de Castillo (82).

5.2. NIVELES HORMONALES

Al analizar los niveles séricos de LH, E2 y P4 se objetivaron niveles superiores de esteroides antes de la biopsia de endometrio en los grupos de pacientes que recibieron suplementación de la actividad LH durante la fase lútea, en forma de HCGr o LHr. El nivel de E2 es el inductor clave del decaimiento de la fase lútea tras la estimulación ovárica controlada, y las dosis de HCGr o LHr utilizadas en estos grupos podrían tener un impacto en la función del cuerpo lúteo. Estos resultados son consistentes con lo publicado por estudios previos que analizaron el perfil hormonal en protocolos similares a los aplicados en nuestro estudio en los grupos 3 (81) y 4 (116).

También encontramos concentraciones mayores de LH en el día de la punción (LH+2) en todos los grupos de estudio con inducción con aGnRH respecto del grupo 5 control (HCG). Estos datos coinciden de nuevo con los de estudios previos que compararon los patrones hormonales durante la fase lútea tras la inducción con aGnRH (117), con un pico mayor de LH tras el efecto *flare up* inicial y una rápida vuelta a los niveles basales en los siguientes días.

Humaidan, utilizando una dosis baja de 1500 UI de HCG en pacientes bajo estimulación ovárica para FIV, no encontró diferencias significativas en cuanto a las tasas de embarazo en curso (26 % vs 33 %), RNV (24 vs 31 %) o aborto temprano (21 vs 17 %) al comparar el *triggering* con aGnRH frente a las 10000 UI de HCGu utilizadas habitualmente en su centro (81). En su población de estudio no describieron ningún caso de SHO frente a los 3 casos (2 %) del grupo control. En nuestro estudio, 2 de las pacientes que recibieron 1500 UI de HCGr en el día de la punción folicular requirieron ingreso hospitalario por SHO moderado. Ambas se manejaron de forma conservadora

DISCUSIÓN

y fueron dadas de alta antes de los 10 días. Al comparar ambos estudios, observamos que la media de ovocitos recuperados en el trabajo de Humaidan era de 8.9 ± 5.4 , comparada con los 14 ± 3.8 ovocitos de media en nuestro grupo 3. Con el resto de protocolos no se diagnosticó ningún caso de hiperestimulación. Recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo que incluyó a 23 pacientes que recibieron 1500 UI de HCG como soporte de fase lútea tras la maduración ovocitaria con un aGnRH y que continuaron con la transferencia embrionaria en fresco en ese mismo ciclo (118). Los autores informan de una tasa elevada de SHO (6 casos de 23 pacientes, 26 %). Por tanto, cuando se considere este protocolo como una alternativa para apoyar la fase lútea deben tenerse en cuenta y descartar otros marcadores de riesgo de SHO, como el IMC o la respuesta ovárica a la estimulación.

5.3. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

La aplicación de la tecnología de los *microarrays* nos permite estudiar, en un corto periodo de tiempo, el comportamiento de cientos de genes en un tejido determinado y bajo diferentes condiciones. Esta misma tecnología ha sido ya aplicada con éxito al estudio de la expresión genética del endometrio asociada a la presencia de pólipos (119), miomas (120), elevación prematura de la progesterona en tratamientos de FIV (121) o al impacto de la estimulación ovárica sobre la receptividad endometrial (99). En este estudio el grupo 1, con un soporte de fase lútea exclusivamente con estradiol oral y progesterona vaginal, mostró el patrón de expresión genética más alejado del grupo control, con un total de 56 genes diferencialmente expresados. Además, estos genes alterados en el grupo afectan a 2 procesos biológicos relacionados

con la división celular ("*spindle organization*") y el transporte intra- e intercelular de moléculas orgánicas ("*organic hydroxy compound transport*").

Treinta y seis genes en el grupo 2, 44 en el grupo 3 y 30 en el 4 se expresaron de forma significativamente diferente respecto del grupo control. Es especialmente interesante el hecho de que los genes comunes entre los grupos de estudio se comporten de manera diferente: en el caso de los grupos 3 y 4, estos genes se expresan en sentido contrario a los del grupo 1, mientras que los 28 genes comunes entre los grupos 1 y 2 lo hacen en el mismo sentido (al alza o a la baja).

El gen denominado ADAMTS8 está profundamente regulado a la baja en los grupos 1 y 2. ADAMTS8 es el gen que expresa una desintegrina y metaloproteinasa asociada a trombospondina que forma parte de una familia de proteinasas recientemente descrita y que es capaz de degradar la matriz extracelular formada por los proteoglicanos que componen los vasos sanguíneos (122). La expresión del gen ADAMTS8 se induce durante la diferenciación del monocito en macrófago, y este último aumenta la expresión del gen ante el estímulo con interferón-gamma o TNF-alfa. Además, el gen ADAMTS8 tiene propiedades antiangiogénicas e inhibe específicamente la proliferación de las células endoteliales en estudios in vitro, suprime la vascularización inducida por el FGF-2 e inhibe la angiogénesis inducida por el VEGF en diferentes tejidos (122, 123). Las metaloproteinasas juegan un papel clave en la fase de invasión del endometrio por el embrión, permitiendo la entrada en contacto del trofoblasto y el estroma uterino para la formación de las vellosidades coriónicas. La secreción de algunas de estas metaloproteinasas, como la MMPs2 y la MMPs9, ha sido descrita como específica de esta fase fundamental para la implantación embrionaria (124, 125).

El grupo de Humaidan diseñó recientemente un estudio aleatorizado en donantes de óvulos que llevaron a cabo 4 protocolos consecutivos de estimulación ovárica con diferentes maneras de inducir la maduración ovocitaria y diferentes soportes de fase lútea (126). Los

DISCUSIÓN

investigadores analizaron la expresión génica del tejido endometrial obtenido por biopsia a los 5 días de la punción y encontraron importantes diferencias en los patrones de expresión génica en base al tipo de *triggering* y soporte de fase lútea. Sin embargo, el patrón génico tras maduración con aGnRH y el soporte de fase lútea modificado con la administración de 1500 UI de HCG el día de la punción fue similar al obtenido tras la inducción con HCG, de forma similar a los perfiles obtenidos en nuestro estudio al comparar los grupos 3 y 5.

5.4. APLICACIÓN CLÍNICA

Ninguna de las pacientes incluidas en nuestro estudio recibió dos protocolos diferentes, por lo que podrían plantearse dudas sobre la reproducibilidad de los resultados y la variabilidad ciclo a ciclo del patrón génico asociado a la receptividad endometrial. Los mismos autores que desarrollaron el test ERA han demostrado la seguridad y reproducibilidad de este *microarray* de endometrio respecto a los criterios histológicos repitiendo y analizando una segunda biopsia endometrial en 7 pacientes tras 29-40 meses de la primera, concluyendo que la reproducibilidad del ERA es del 100 % entre ambas muestras y validando su utilidad clínica (103).

La comparación de los análisis por *microarrays* obtenidos en los diferentes grupos de estudio respecto del control no demostró un número impactante de genes con expresión diferencial. Además, a excepción del gen ADAMTS8 en los grupos 1 y 2, el resto de genes alterados no alcanzó la significación estadística al utilizar el p-valor ajustado (p-valor ajustado > 0.05). Sin embargo, el número de genes afectados muestra una tendencia a la baja en los grupos que recibieron durante la fase lútea un apoyo de la actividad LH en forma de LHr o HCGr, y quizá se pudiera alcanzar la significación estadística si se incluyera en un futuro un mayor número de pacientes en cada grupo. Estos datos, junto con el número pequeño de procesos biológicos afectados, refuerza el conocimiento actual sobre la modificación de la

expresión génica a nivel endometrial en función de la modalidad de maduración ovocitaria y el soporte de fase lútea aplicado.

Por tanto, la inducción con un aGnRH es suficiente para asegurar la maduración final ovocitaria (81), pero causa una deficiencia en la fase lútea que el soporte habitual con progesterona vaginal y estradiol por vía oral no es capaz de contrarrestar, perjudicando a los resultados clínicos (127). Sin embargo, la combinación del *triggering* con aGnRH y un apoyo de la fase lútea modificado que añade actividad LH o HCG acerca el patrón de expresión génica de estos endometrios al que se produce tras la inducción convencional con HCG. Todavía se requiere una mayor evidencia científica e incluir un mayor número de pacientes antes de poder afirmar que la receptividad endometrial y los resultados clínicos mejorarían implementando estas medidas.

Debido a sus efectos secundarios y al posible mayor riesgo asociado de SHO cuando se utiliza un bolo único de 1500 UI de HCG, el uso de LHr o pequeñas dosis de HCGr a lo largo de la fase lútea podría ser la mejor opción para aquellos pacientes en los que se decida continuar con la transferencia en fresco de los embriones tras la maduración ovocitaria con un aGnRH.

La inmensa información ofrecida por la tecnología de los *microarrays* debe animar a la comunidad científica a su aplicación para la investigación de la receptividad endometrial. Los datos de nuestro estudio, basados en un modelo de donación de ovocitos, podrían ayudarnos a seleccionar el protocolo de soporte de fase lútea más adecuado para la paciente con alta respuesta y riesgo de SHO, en la que se decide continuar con la transferencia embrionaria tras la inducción con un aGnRH. Aunque los resultados clínicos parecen similares al protocolo habitual, todavía deben modificarse algunos detalles hasta conseguir los mismos resultados que se obtienen tras la inducción con HCG.

Se necesita un mayor conocimiento y estudio del por qué de estas diferencias en los patrones de expresión génica a nivel endometrial, así como determinar si éstas pueden ser

DISCUSIÓN

debidas a las diferencias en los niveles de LH, P4 o ambas. Nuestros resultados tras la maduración final ovocitaria con un aGnRH nos han permitido un mejor conocimiento de la fisiología de la fase lútea y sus cambios en el ciclo estimulado, y la aplicación de la tecnología de los *microarrays* puede permitirnos en un futuro desarrollar el mejor protocolo para su aplicación en la práctica clínica diaria.

5. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El Síndrome de Hiperestimulación Ovárica es un cuadro patológico frecuente y potencialmente grave, íntimamente ligado a los tratamientos de reproducción asistida en los que se estimula a la paciente con gonadotropinas exógenas para alcanzar un desarrollo folicular múltiple.
2. La primera medida para reducir su incidencia debe ser la prevención primaria basada en la identificación precoz de factores de riesgo. Si el inicio del cuadro ya se ha desencadenado, existen múltiples opciones para minimizar su gravedad y duración.
3. De todas ellas, la inducción final de la maduración ovocitaria con un agonista de la GnRH en los ciclos de estimulación bajo protocolo antagonista de la GnRH ha demostrado ser una medida eficaz y segura, con una reducción notable de los casos graves de hiperestimulación ovárica precoz aún en las pacientes en las que se decide continuar con la transferencia embrionaria en fresco.
4. Pese a estas ventajas, la maduración final ovocitaria con un agonista de la GnRH se asocia a una fase lútea insuficiente que reduce las posibilidades de embarazo respecto a los ciclos en los que se utiliza HCG para la maduración folicular.
5. Se han propuesto diversos protocolos de soporte de fase lútea para reforzar este periodo clave para la implantación embrionaria, con diferentes resultados. La disparidad en los pacientes y protocolos aplicados, así como el escaso número de casos incluidos en los estudios, dificulta la aplicación generalizada de las distintas opciones.
6. La tecnología de los *microarrays* permite analizar la expresión génica de un tejido bajo diferentes condiciones. Aplicada al estudio del endometrio ha dado lugar a un patrón de expresión génica íntimamente ligado a cada una de las fases del ciclo menstrual natural.

CONCLUSIONES

7. El Endometrial Receptivity Array (ERA®) permite centrar el estudio de expresión génica en 238 genes íntimamente ligados a la receptividad endometrial durante la ventana de implantación, facilitando el análisis y la interpretación de los resultados.
8. El estudio de la expresión génica del tejido endometrial obtenido en pacientes sometidas a una estimulación ovárica bajo diferentes protocolos de fase lútea tras la maduración final ovocitaria con un agonista de la GnRH nos permite comparar los diferentes patrones obtenidos con el expresado tras la inducción convencional con HCG.
9. De nuestros 4 grupos de estudio, los protocolos en los que se reforzó la fase lútea con actividad LH en forma de LHr o HCGr mostraron el perfil génico más próximo al expresado por el grupo control.
10. De esta forma, podemos concluir que el análisis del perfil génico endometrial durante la fase lútea cuando se refuerza con actividad LH o HCG indica que estas opciones podrían permitir aprovechar el principal beneficio de la inducción final con agonista de la GnRH, reduciendo la incidencia de SHO, sin que los resultados clínicos se vean comprometidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992;58:249-61.
2. Rizk B. Epidemiology of ovarian hyperstimulation syndrome: iatrogenic and spontaneous. In Rizk B., *Ovarian hyperstimulation syndrome*. Cambridge University Press 2006, Chapter 2, pp. 10-42.
3. Balasch J, Fabregues F, Arroyo V. Peripheral arterial vasodilatation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1998;13:2718-30.
4. Cappa F, Pasqua C, Tobia M, Ventura T. Ascites and hydrothorax due to endogenous hyperstimulation of HCG in a case of hydatidiform mole destruens with secondary irreversible kidney insufficiency due to disseminated intravascular coagulation. *Riv Ital Ginecol* 1976;56:363-8.
5. Guvenal F, Guvenal T, Timuroglu Y, Timuroglu T, Cetin M. Spontaneous ovarian hyperstimulation-like reaction caused by primary hypothyroidism. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:124-5.
6. Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, Pierson R, Vassart G, Costagliola S. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Engl J Med* 2003;21:760-6.
7. Vasseur C, Rodien P, Beau I, Desroches A, Gérard C, de Poncheville L. A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *N Engl J Med* 2003;349:753-9.

8. Montanelli L, Delbaere A, Di Carlo C, Nappi C, Smits G, Vassart G, Costagliola S. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1255-8.
9. Montanelli L, Van Durme JJ, Smits G, Bonomi M, Rodien P, Devor EJ. Modulation of ligand selectivity associated with activation of the transmembrane region of the human follitropin receptor. *Mol Endocrinol* 2004;18:2061-73.
10. Kihara M, Sugita T, Nagai Y, Saeki N, Tatsuno I, Seki K. Ovarian hyperstimulation caused by gonadotroph cell adenoma: a case report and review of the literature. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:110-3.
11. McClure N, Leya J, Radwanska E, Rawlins R, Haning RV Jr. Luteal phase support and severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1992;7:758-64.
12. Lyons CA, Wheeler CA, Frishman GN, Hackett RJ, Seifer DB, Haning RV Jr. Early and late presentation of the ovarian hyperstimulation syndrome: two distinct entities with different risk factors. *Hum Reprod* 1994;9:792-9.
13. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 1999;71:482-9.
14. Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril* 1978;30:255-68.
15. Knox GE. Antihistamine blockade of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1974;118:992-4.

16. Loret de Mola JR, Baumgardner GP, Goldfarb JM, Friedlander MA. Ovarian hyperstimulation syndrome: pre-ovulatory serum concentrations of interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and tumour necrosis factor-alpha cannot predict its occurrence. *Hum Reprod* 1996;11:1377-80.
17. Rizk B, Aboulghar M, Smitz J, Ron-El R. The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update* 1997;3:255-66.
18. Yan Z, Weich HA, Bernart W, Breckwoldt M, Neulen J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1723-5.
19. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-79.
20. Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ, Zimonjic DB. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet* 1996;97:794-7.
21. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
22. Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM, Patel A, Maniscalco WM. Differential expression of VEGF mRNA splice variants in newborn and adult hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999;276:858-67.

23. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994;54:276-80.
24. Gómez R, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology* 2002;143:4339-48.
25. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-91.
26. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-6.
27. Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM. Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 2000;1:45-50.
28. Hornig C, Behn T, Bartsch W, Yayon A, Weich HA. Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Methods* 1999;226:169-77.
29. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, Marmé D, Breckwoldt M. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1967-71.

30. Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:353-9.
31. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3845-51.
32. Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, Matsushita K, Hamid AA, Yura Y, Mori T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol* 1997;11:371-81.
33. Goldsman MP, Pedram A, Dominguez CE, Ciuffardi I, Levin E, Asch RH. Increased capillary permeability induced by human follicular fluid: a hypothesis for an ovarian origin of the hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1995;63:268-72.
34. McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV Jr, Connolly DT, Robertson DM. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* 1994;344:235-6.
35. Albert C, Garrido N, Mercader A, Rao CV, Remohí J, Simón C, Pellicer A. The role of endothelial cells in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Hum Reprod* 2002;8:409-18.
36. Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, Shabsigh A, de la Taille A, Buttyan R, Shabsigh R. Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for

- vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans. *Biol Reprod* 1999;60:398-404.
37. Pau E, Alonso-Muriel I, Gómez R, Novella E, Ruiz A, García-Velasco JA, Simón C, Pellicer A. Plasma levels of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 may determine the onset of early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2006;21:1453-60.
38. Enskog A, Henriksson M, Unander M, Nilsson L, Brännström M. Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999;71:808-14.
39. Delvigne A, Vandromme J, Demeestere I, Leroy F. Unpredictable cases of complicated ovarian hyperstimulation in IVF. *Int J Fertil Womens Med* 1997;42:268-70.
40. Fulghesu AM, Villa P, Pavone V, Guido M, Apa R, Caruso A, Lanzone A, Rossodivita A, Mancuso S. The impact of insulin secretion on the ovarian response to exogenous gonadotropins in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:644-8.
41. Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohí J, Simón C. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril* 1996;65:1190-5.
42. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1997;68:1017-21.

43. Bellver J, Escudero E, Pellicer A. Bilateral partial oophorectomy in the management of severe ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): ovarian mutilating surgery is not an option in the management of severe OHSS. *Hum Reprod* 2003;18:1363-7.
44. Rizk B, Aboulghar M. Modern management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1991;6:1082-7.
45. Ferraretti AP, Gianaroli L, Diotallevi L, Festi C, Trounson A. Dopamine treatment for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1992;7:180-3.
46. Rimington MR, Walker SM, Shaw RW. The use of laparoscopic ovarian electrocautery in preventing cancellation of in-vitro fertilization treatment cycles due to risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1997;12:1443-7.
47. Fluker MR, Hooper WM, Yuzpe AA. Withholding gonadotropins ("coasting") to minimize the risk of ovarian hyperstimulation during superovulation and in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1999;71:294-301.
48. García-Velasco JA, Zúñiga A, Pacheco A, Gómez R, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Coasting acts through downregulation of VEGF gene expression and protein secretion. *Hum Reprod* 2004;19:1530-8.
49. García-Velasco JA, Isaza V, Quea G, Pellicer A. Coasting for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: much ado about nothing? *Fertil Steril* 2006;85:547-54.
50. Kingsland CR, Collins JV, Rizk B, Mason BA. Ovarian hyperstimulation presenting as acute hydrothorax after in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:381-2.

51. Egbase PE, Makhseed M, Al Sharhan M, Grudzinskas JG. Timed unilateral ovarian follicular aspiration prior to administration of human chorionic gonadotrophin for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome in in-vitro fertilization: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 1997;12:2603-6.
52. Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Early timed follicular aspiration prevents severe ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:282-6.
53. Orvieto R, Ben-Rafael Z. Role of intravenous albumin in the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1998;13:3306-9.
54. Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011;95:1137-40.
55. Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by Cryotop method. *Fertil Steril* 2007;89:1657-64.
56. Gómez R, González M, Simón C, Pellicer A. Tyrosine hydroxylase (TH) down regulation in hyperstimulated ovaries reveals the dopamine agonist bromocriptine (Br2) as an effective and specific method to block increased vascular permeability (VP) in OHSS. *Fertil Steril* 2003;80:43-44.
57. Gómez R, González-Izquierdo M, Zimmermann RC, Novella-Maestre E, Alonso-Muriel I, Sánchez-Criado J, Remohí J, Simón C., Pellicer A. Low dose dopamine agonist administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)

- mediated vascular permeability without altering VEGF receptor-2 dependent luteal angiogenesis in rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology* 2006;11:5400-11.
58. Busso C, Fernández-Sánchez M, García-Velasco JA, Landeras J, Ballesteros A, Muñoz E, González S, Simón C, Arce JC, Pellicer A. The non-ergot derived dopamine agonist quinagolide in prevention of early ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 2010;25:995-1004.
59. de Jong D, Macklon NS, Mannaerts BM, Coelingh Bennink HJ, Fauser BC. High dose gonadotrophin-releasing hormone antagonist (ganirelix) may prevent ovarian hyperstimulation syndrome caused by ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:573-5.
60. García-Velasco, Quea G, Piró M, Mayoral M, Ruiz M, Toribio M, Requena M. Letrozol during luteal phase after ovarian stimulation impacts corpus luteum function: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* 2009;92:222-5.
61. Shalev E, Geslevich Y, Ben-Ami M. Induction of pre-ovulatory luteinizing hormone surge by gonadotrophin-releasing hormone agonist for women at risk for developing the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1994;9:417-9.
62. Bodri D, Guillén JJ, Trullenque M, Schwenn K, Esteve C, Coll O. Early ovarian hyperstimulation syndrome is completely prevented by gonadotropin releasing-hormone agonist triggering in high-risk oocyte donor cycles: a prospective, luteal-phase follow-up study. *Fertil Steril* 2010;93:2418-20.

63. Humaidan P, Kol S, Papanikolaou EG; Copenhagen GnRH Agonist Triggering Workshop Group. GnRH agonist for triggering of final oocyte maturation: time for a change of practice? *Hum Reprod Update* 2011;17:510-24.
64. Knobil E. The neuroendocrine control of ovulation. *Hum Reprod* 1988;3:469-72.
65. Ryan KJ, Petro Z. Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1966;26:46-52.
66. Zelinski-Wooten MB, Hutchison JS, Hess DL, Wolf DP, Stouffer RL. Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Hum Reprod* 1995;10:1658-66.
67. Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update* 2002;8:559-77.
68. Itskovitz J, Boldes R, Levron J, Erlik Y, Kahana L, Brandes JM. Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 1991;56:213-20.
69. Humaidan P, Bredkjaer HE, Bungum L, Bungum M, Grondahl ML, Westergaard L, Andersen CY. GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2005;20:1213-20.
70. Smitz J, Van Den Abbeel E, Bollen N, Camus M, Devroey P, Tournaye H. The effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist in the follicular

- phase on in-vitro fertilization outcome in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 1992;7:1098-102.
71. Donderwinkel PF, Schoot DC, Pache TD, de Jong FH, Hop WC, Fauser BC. Luteal function following ovulation induction in polycystic ovary syndrome patients using exogenous gonadotrophins in combination with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Hum Reprod* 1993;8:2027-32.
72. Fluker MR, Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Variable ovarian response to gonadotropin-releasing hormone antagonist-induced gonadotropin deprivation during different phases of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:912-9.
73. Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev* 2006;27:170-207.
74. Herman A, Ron-El R, Golan A, Raziel A, Soffer Y, Caspi E. Pregnancy rate and ovarian hyperstimulation after luteal human chorionic gonadotropin in in vitro fertilization stimulated with gonadotropin-releasing hormone analog and menotropins. *Fertil Steril* 1990;53:92-6.
75. Soliman S, Daya S, Collins J, Hughes EG. The role of luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of randomized trials. *Fertil Steril* 1994;61:1068-76.
76. Levy T, Yairi Y, Bar-Hava I, Shalev J, Orvieto R, Ben-Rafael Z. Pharmacokinetics of the progesterone-containing vaginal tablet and its use in assisted reproduction. *Steroids* 2000;65:645-9.
77. Fatemi HM, Kolibianakis EM, Camus M, Tournaye H, Donoso P, Papanikolaou E. Addition of estradiol to progesterone for luteal supplementation in patients

- stimulated with GnRH antagonist/rFSH for IVF: a randomized controlled trial. Hum Reprod 2006;21:2628-32.
78. Pirard C, Donnez J, Loumaye E. GnRH agonist as novel luteal support: results of a randomized, parallel group, feasibility study using intranasal administration of buserelin. Hum Reprod 2005;20:1798-804.
79. Pritts EA, Atwood AK. Luteal phase support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 2002;17:2287-99.
80. van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, Kremer JA, Metwally M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. Cochrane Database Syst Rev 2011;(10):CD009154.
81. Humaidan P, Ejdrup Bredkjaer H, Westergaard LG, Yding Andersen C. 1,500 IU human chorionic gonadotropin administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase when gonadotropin-releasing hormone agonist is used for ovulation induction: a prospective, randomized, controlled study. Fertil Steril 2010;93:847-54.
82. Castillo JC, Dolz M, Bienvenido E, Abad L, Casan EM, Bonilla-Musoles F. Cycles triggered with GnRH agonist: exploring low-dose HCG for luteal support. Reprod Biomed Online 2010;20:175-81.
83. Papanikolaou EG, Verpoest W, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P, Tournaye H. A novel method of luteal supplementation with recombinant LH, when a GnRH-Agonist is used instead of HCG for ovulation triggering. A randomized prospective proof of concept study. Fertil Steril 2011;3:1174-7.
84. Engmann L, DiLuigi A, Schmidt D, Nulsen J, Maier D, Benadiva C. The use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce oocyte maturation

- after cotreatment with GnRH antagonist in high-risk patients undergoing in vitro fertilization prevents the risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomized controlled study. *Fertil Steril* 2008;89:84–91.
85. Hansen KA, Eyster KM. Genetics and genomics of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 2010;53:403-12.
86. Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, Berchuck A, Barrett JC. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003;63:6-11.
87. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
88. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006;354:2463-72.
89. Popovici RM, Kao LC, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000;141:3510-3.
90. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;147:1097-121.

91. Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004;10:879-93.
92. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002;8:871-9.
93. Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003;9:253-64.
94. Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002;143:2119-38.
95. Horcajadas JA, Riesewijk A, Martín J, Cervero A, Mosselman S, Pellicer A, Simón C. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol* 2004;63:41-9.
96. Simón C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995;10:2432-7.
97. Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, Simón C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005;11:195-205.

98. Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005;20:2104-17.
99. Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4500-10.
100. Catalano RD, Yanaihara A, Evans AL, Rocha D, Prentice A, Saidi S, Print CG, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK. The effect of RU486 on the gene expression profile in an endometrial explant model. *Mol Hum Reprod* 2003;9:465-73.
101. Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JR, Domínguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, Simón C. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3199-207.
102. Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011;95:50-60.
103. Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alama P, et al. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histological dating as diagnostic method for the endometrial factor. *Fertil Steril* 2013;99:508–17.
104. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity

- array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013;100:818-24.
105. Engmann L, DiLuigi A, Schmidt D, Benadiva C, Maier D, Nulsen J. The effect of luteal phase vaginal estradiol supplementation on the success of in vitro fertilization treatment: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2008;89:554-61.
106. Chang P, Kenley S, Burns T, Denton G, Currie K, DeVane G. Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (Ovidrel) to urinary hCG (Profasi) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2001;76:67-74.
107. Medina I, Carbonell J, Pulido L, Madeira SC, Goetz S, Conesa A. Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Nucleic Acids Res* 2010;38:W210-3.
108. Sartor MA, Mahavisno V, Keshamouni VG, Cavalcoli J, Wright Z, Karnovsky A. ConceptGen: a gene set enrichment and gene set relation mapping tool. *Bioinformatics* 2010;26:456-63.
109. Montaner D, Dopazo J. Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS One* 2010;5:e10348.
110. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4:P3.

111. Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril* 2001;76:962–8.
112. Forman R, Fries N, Testart J, Belaisch-Allart J, Hazout A, Frydman R. Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation. *Fertil Steril* 1988;49:118–22.
113. Hoff JD, Quigley ME, Yen SS. Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:792–6.
114. Damewood MD, Shen W, Zacur HA, Schlaff WD, Rock JA, Wallach EE. Disappearance of exogenously administered human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1989;52:398–400.
115. Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Papanikolaou E, Donoso O, Devroey P. An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Update* 2007;13:581-90.
116. Garcia-Velasco JA, Motta L, López A, Mayoral M, Cerrillo M, Pacheco A. Low-dose human chorionic gonadotropin versus estradiol/progesterone luteal phase support in gonadotropin-releasing hormone agonist-triggered assisted reproductive technique cycles: understanding a new approach. *Fertil Steril* 2010;94:2820-3.
117. Fauser BC, de Jong D, Olivennes F, Wramsby H, Tay C, Itskovitz-Eldor J. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:709-15.

118. Seyhan A, Ata B, Polat M, Son WY, Yarali H, Dahan MH. Severe early ovarian hyperstimulation syndrome following GnRH agonist trigger with the addition of 1500 IU hCG. *Hum Reprod* 2013;28:2522-8.
119. Liu Y, Zhang Y, Fu J, Tan W. Inflammation-related gene expression profiles of endocervical polyps. *J Interferon Cytokine Res* 2012;32:191-7.
120. Horcajadas JA, Goyri E, Higón MA, Martínez-Conejero JA, Gambadauro P, García G, Simón C. Endometrial receptivity and implantation are not affected by the presence of uterine intramural leiomyomas: a clinical and functional genomics analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3490-8.
121. Labarta E, Martínez-Conejero JA, Alamá P, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Endometrial receptivity is affected in women with high circulating progesterone levels at the end of the follicular phase: a functional genomics analysis. *Hum Reprod* 2011;26:1813-25.
122. Dunn JR, Reed JE, du Plessis DG, Shaw EJ, Reeves P, Gee AL. Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. *Br J Cancer* 2006;94:1186-93.
123. Zhao C, Zha Y, Wu X, Chen L, Shi J, Cui L. The quantification of ADAMTS4 and 8 expression and selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in myocardial infarction. *Biomed Pharmacother* 2011;65:555-9.
124. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999;274:23349-57.

125. Bischof P, Martelli M, Campana A, Itoh Y, Ogata Y, Nagase H. Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. *Early Pregnancy* 1995;1:263-9.
126. Humaidan P, Van Vaerenbergh I, Bourgain C, Alsbjerg B, Blockeel C, Schuit F. Endometrial gene expression in the early luteal phase is impacted by mode of triggering final oocyte maturation in recFSH stimulated and GnRH antagonist co-treated IVF cycles. *Hum Reprod* 2012;27:3259-72.
127. Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A, van Steirteghem A, Devroey P, Diedrich K. A lower ongoing pregnancy rate can be expected when GnRH agonist is used for triggering final oocyte maturation instead of HCG in patients undergoing IVF with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2005;20:2887–92.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO 1. Información para los pacientes y consentimiento informado

¿Cuál es el objetivo principal del estudio?

Nuestro objetivo es comparar la receptividad endometrial en la ventana de implantación del ciclo (entorno al día 21) con diferentes pautas de tratamiento en pacientes en las que se induce la maduración final ovocitaria con aGnRH, como es el caso de las donantes de óvulos.

La aplicación de estas pautas en pacientes puede ayudar en un futuro a reducir al máximo la incidencia de hiperestimulación ovárica en las mujeres que realizan tratamientos de reproducción asistida.

¿En qué consiste mi participación?

Las participantes del estudio serán divididas en 5 grupos, que recibirán pautas de medicación diferentes.

Como máximo, serán 5 días de medicación posteriores a la punción ovárica, terminando en la realización de una biopsia endometrial para obtener el tejido sobre el que se analizarán los resultados.

¿Influye esta medicación en los resultados de la donación?

No. Tenga en cuenta que recibirá la nueva medicación sólo tras la donación, por lo que no influirá en los resultados ni en la posibilidad de volver a donar en el futuro.

¿En qué consiste la biopsia endometrial?

ANEXOS

La biopsia endometrial es una prueba muy sencilla, usada de forma habitual en la Consulta de Ginecología para el diagnóstico de la patología endometrial (sangrado postmenopáusico, metrorragias, etc.).

Para su realización no hace falta anestesia y no lleva más de 1 minuto. Las pacientes no suelen referir molestias superiores a las de una revisión ginecológica.

¿Puedo abandonar el estudio una vez que acepto participar?

Sí. En cualquier momento del seguimiento puede revocar su consentimiento a participaren el mismo.

¿Recibiré algún tipo de compensación económica aceptando participar en el estudio?

La participación en el estudio es voluntaria. Si lo completa, recibirá una compensación por los gastos de desplazamiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO ESTUDIO 'ERA-aGnRH'

Dº _____ , con DNI nº _____ , informada de los objetivos e implicaciones del estudio por _____ , **ACEPTO** participar en el estudio "ERA-aGnRH".

Madrid, a ____ de _____ de 201_.

REVOCAMIENTO ESTUDIO 'ERA-aGnRH'

Dº _____ , con DNI nº _____ , informada de los objetivos e implicaciones del estudio por _____ , **REVOCO MI CONSENTIMIENTO** participar en el estudio "ERA-aGnRH".

Madrid, a ____ de _____ de 201_.

ANEXO 2. Certificado del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid



D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID

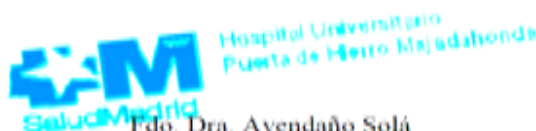
CERTIFICA

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

“RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL CON DIFERENTES PROTOCOLOS DE SOPORTE DE FASE LÚTEA EN CICLOS DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA EN LOS QUE LA MADURACIÓN FINAL OVOCITARIA SE REALIZA CON ANÁLOGOS DE LA GNRIL. ANÁLISIS MEDIANTE MICROARRAYS DE ENDOMETRIO”

Del que son investigadores principales el Dr. Alfonso Bermejo Calzada y el Dr. Juan Antonio García Velasco, considerando que su planteamiento global es aceptable desde el punto de vista metodológico y ético. Acta nº 198 de fecha 09/09/2011.

En Majadahonda, a 09 de Septiembre de 2011.



Fdo. Dra. Avendaño Solá

Secretaria del CEIC

ZONA NOROESTE
C/ Joaquín Rodrigo, 2
28222 Majadahonda / Madrid

