



**Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología.**



“Estudio del receptor 2 de la dopamina en ovario humano y efecto de su modulación sobre el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica”

Tesis doctoral presentada por:
Francisco Manuel Delgado Rosas

Dirigida por:

Prof. Antonio Pellicer Martínez Dr. Raúl Gómez Gallego

Prof. Francisco Gaytán Luna

Tutor:

Prof. Carlos Simón Vallés

**290 F OBSTETRICIA I GINECOLOGIA II
Valencia 2012**



D. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

D. Raúl Gómez Gallego, Doctor en Ciencias Biológicas e Investigador contratado por la Fundación IVI. Valencia

D. Francisco Gaytán Luna, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Estudio del receptor 2 de la dopamina en ovario humano y efecto de su modulación sobre el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica” ha sido realizado íntegramente por D. **Francisco Manuel Delgado Rosas** bajo nuestra 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, firmamos la presente certificación en Valencia a 22 de Febrero de 2012.

Fdo. Prof. Antonio Pellicer Martínez

Fdo. Dr. Raúl Gómez Gallego

Fdo. Prof. Francisco Gaytán Luna

LISTA DE ABREVIATURAS

All: Angiotensina II
ACE: Enzima convertidora de angiotensina (del inglés Angiotensin Converting Enzyme)
AC: Adenilato ciclasa
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero
ASRM: Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (del inglés American Society for Reproductive Medicine)
A2M: Alfa-2-Macroglobulina
BUN: Nitrógeno Ureico Sanguíneo (del inglés Blood Urea Nitrogen)
Cb2: Cabergolina
DAB: Diaminobenzidina
DA: Dopamina
DAT: Transportador de dopamina (del inglés Dopamine Transporter)
DrD1/DrD2/DrD4/DrD5: Receptores de la dopamina
E2: Estradiol
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay)
FIV: Fecundación in vitro
FSH: hormona foliculoestimulante (del inglés Follicle-Stimulating Hormone)
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas (del inglés Gonadotropin-Releasing Hormone)
GPCR: receptores asociados a la proteína G (del inglés G protein-coupled receptors)
hCG: hormona coriónica humana (del inglés human Chorionic Gonadotropin)
HES: Hidroxietil Almidón (del inglés Hydroxyethyl Starch)
HIER: Desenmascaramiento antigénico mediante calor (del inglés Heat Induced Epitope Retrieval)
HMG: Gonadotropina menopáusica humana (del inglés Human Menopausal Gonadotropin)
HOC: Hiperestimulación ovárica controlada
HUVEC: Células endoteliales de vena umbilical humana (del inglés Human Umbilical Vein endothelial Cells)
IA, IB: Inhibina A y B
IL- 2, 6, 8: Interleucinas 2, 6 y 8
LH: Hormona luteinizante (del inglés Luteinizing Hormone)
LF: Líquido folicular
ON: Óxido nítrico
PBS: Tampón fosfato salino (del inglés Phosphate Buffered Saline)
PCO/PCOS: Síndrome de ovario poliquístico (del inglés Polycystic Ovary Syndrome)
PGs: Prostaglandinas
PIGF: factor de crecimiento derivado de placenta (del inglés Placenta Growth Factor)
PRL: Prolactina
PV: Permeabilidad vascular
P4: Progesterona
SDRA: Síndrome de distress respiratorio del adulto
SHO: Síndrome de hiperestimulación ovárica
SNC: Sistema nervioso central
SRAO: Sistema renina-angiotensina
sVEGFR1: receptor soluble de VEGF nº 1 (del inglés soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1)
TE: Transferencia embrionaria
TH: Tirosina hidroxilasa
TRA: Técnica de reproducción asistida
TSH: Hormona estimulante del tiroides (del inglés Thyroid-Stimulating Hormone)
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGFR 1 y 2: receptor 1 y 2 de VEGF (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and 2)
VLS: síndrome de pérdida vascular (del inglés Vascular Leak Syndrome)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.- INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.- Presentación histórica del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO).....	7
1.2.- Definición.....	8
1.3.- Sintomatología.....	9
1.3.1.- Cambios vasculares.....	9
1.3.2.- Síntomas clínicos.....	10
1.3.3.- Complicaciones clínicas.....	10
1.3.3.1.- Complicaciones obstétricas.....	10
1.3.3.2.- Complicaciones ginecológicas.....	11
1.3.3.3.- Ascitis a tensión.....	11
1.3.3.4.- Derrame pericárdico.....	11
1.3.3.5.- Fenómenos tromboembólicos.....	11
1.3.3.6.- Fracaso renal agudo.....	11
1.3.3.7.- Disfunción hepática.....	12
1.3.3.8.- Alteraciones pulmonares.....	12
1.4.- Grado de severidad. Clasificación.....	12
1.5.- Evolución de la enfermedad.....	14
1.6.- Factores de riesgo.....	15
1.7.- Prevalencia. Epidemiología.....	17
1.8.- Fisiopatología del SHO.....	18
1.8.1.- Gonadotropina Coriónica humana (hCG).....	18
1.8.2.- Ovario.....	19
1.8.3.- Factores vasoactivos relacionados con SHO.....	20
1.8.2.1.- Estradiol.....	20
1.8.2.2.- Sistema renina angiotensina.....	21
1.8.2.3.- Prostaglandinas.....	22
1.8.2.4.- Histamina.....	22
1.8.2.5.- Endotelina.....	22
1.8.2.6.- Óxido Nítrico.....	23
1.8.2.7.- Inhibinas.....	24
1.8.2.8.- IL-2.....	26
1.8.2.9.- IL-6.....	26
1.8.2.10.- IL-8.....	27
1.8.2.11.- VEGF.....	28
1.9.- Estrategias de tratamiento y prevención del SHO.....	30
1.9.1.- Estrategias de prevención primaria.....	31
1.9.1.1.- Protocolo con antagonistas de la GnRH.....	31
1.9.1.2.- Soporte de fase lútea con progesterona.....	32
1.9.1.3.- Maduración in vitro de ovocitos.....	33
1.9.1.4.- Agentes sensibilizadores de la insulina.....	34
1.9.2.- Estrategias de prevención secundaria.....	34
1.9.2.1.- Coasting.....	35
1.9.2.2.- Disminución de la dosis de hCG.....	36
1.9.2.3.- Criopreservación de embriones.....	36
1.9.2.4.- Cancelación de ciclo.....	37
1.9.2.5.- Inducción de la ovulación sin hCG.....	37
1.9.2.6.- Administración de macromoléculas.....	40

1.9.2.7.- Bloqueo del sistema renina-angiotensina.....	41
1.9.2.8.- Administración de anti-inflamatorios no esteroideos.....	41
1.9.2.9.- Administración de agonistas dopaminérgicos.....	41
1.9.3.- Estrategias no recomendadas.....	42
1.10.- Sistema VEGF/VEGFR2.....	43
1.10.1.- Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF).....	43
1.10.2.- Papel del VEGF y sus receptores en angiogénesis y permeabilidad vascular (PV).....	45
1.10.3.- Mecanismo de transducción de señales.....	49
1.10.4.- Inhibidores del sistema VEGF/VEGFR2.....	51
1.11.- Búsqueda de alternativas a los inhibidores comerciales para el bloqueo de la PV.....	53
1.12.- Modulación del Sistema VEGF/VEGFR2 a través de la dopamina.....	54
1.13.- Estudios de inhibición de SHO con agonistas dopaminérgicos.....	56
1.13.1.- Estudios en animales.....	56
1.13.2.- Estudios en humanos.....	57
1.14.- Sistema dopaminérgico en ovario.....	61
2.- HIPÓTESIS.....	65
3.- OBJETIVOS.....	69
3.1.- Objetivo general.....	71
3.2.- Objetivos específicos.....	71
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
4.1.- Diseño experimental.....	75
4.2.- Descripción pormenorizada del diseño experimental.....	75
4.2.1.- Estudio de la expresión del receptor DrD2 durante el ciclo ovárico.....	75
4.2.2.- Estudio in vitro del receptor DrD2 en células de la granulosa humana.....	76
4.2.2.1.- Experimento piloto. Establecimiento de condiciones de cultivo de las células de la granulosa.....	78
- Estudio de tiempo respuesta de hCG.....	79
- Estudio de dosis respuesta de hCG y PRL.....	79
- Ensayos de toxicidad celular.....	79
4.2.2.2.- Experimento nº 1. Modulación del sistema dopaminérgico de las células de la granulosa: efecto sobre la secreción de VEGF.....	81
- Ensayo de dosis respuesta para DrD2.....	81
- Ensayo de dosis respuesta para DrD1/DrD5 y DrD4.....	82
4.2.2.3.- Experimento nº 2. Papel del DrD2 en la regulación de la secreción del VEGF.....	83
4.3.- Métodos empleados para el desarrollo de la tesis doctoral.....	84
4.3.1.- Inmunohistoquímica.....	84
4.3.2.- Procesamiento y cultivo de células de la granulosa.....	88
4.3.2.1.- Obtención de las células de la granulosa.....	88
4.3.2.2.- Aislamiento y purificación de las células de la granulosa.....	88
4.3.2.3.- Citometría de flujo sobre CD45.....	90
4.3.2.4.- Cultivo de las células de la granulosa.....	92
4.3.3.- Determinación analíticas mediante ELISA.....	93
4.3.4.- Determinación de la viabilidad celular.....	94
4.3.4.1.- Método de exclusión del colorante vital Trypan Blue.....	94
4.3.4.2.- Método de Hoechst/ioduro de propidio.....	96
4.3.5.- Análisis estadísticos.....	96

4.4.- Lugar de realización de la Tesis Doctoral.....	97
5.- RESULTADOS.....	99
5.1.- Expresión inmunohistoquímica del receptor DrD2 durante el ciclo ovárico.....	101
5.1.1.- Expresión de DrD2 en folículos ováricos.....	102
5.1.2.- Expresión de DrD2 en el cuerpo lúteo menstrual.....	104
5.1.3.- Expresión de DrD2 en el cuerpo lúteo del embarazo.....	107
5.2.- Estudio in vitro del receptor DrD2 en células de la granulosa humanas.....	109
5.2.1.- Purificación de las células de la granulosa aisladas.....	109
5.2.2.- EXPERIMENTO PILOTO: Establecimiento de las condiciones de cultivo de células de la granulosa.....	110
5.2.2.1.- Estudio de tiempo respuesta.....	111
5.2.2.2.- Estudio de dosis respuesta.....	113
5.2.2.3.- Ensayos de toxicidad celular.....	115
5.2.3.- EXPERIMENTO N° 1: Modulación del sistema dopaminérgico de las células de la granulosa: efecto sobre la secreción de VEGF.....	117
5.2.3.1.- Ensayo de dosis respuesta para DrD2.....	117
5.2.3.2.- Ensayo de dosis respuesta para DrD1/DrD5 y DrD4.....	119
5.2.4.- EXPERIMENTO N° 2: Regulación de la secreción de VEGF a través de DrD2.....	120
6.- DISCUSIÓN.....	123
7.- CONCLUSIONES.....	135
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	139

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- PRESENTACIÓN HISTÓRICA DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA

El tratamiento de la esterilidad humana ha experimentado grandes avances dentro del campo de la medicina durante los últimos años. El desarrollo de técnicas avanzadas de reproducción asistida y de fármacos inductores de la ovulación ha incrementado las posibilidades de lograr el embarazo; sin embargo, el uso de gonadotropinas para la estimulación ovárica ha venido asociado desde sus inicios, a la aparición en algunos casos, de una respuesta supra fisiológica del ovario durante la fase lútea, caracterizada por desplazamiento del fluido intravascular desde los vasos al tercer espacio (Rydberg y Pedersen-Bjergaard, 1943; Davis y Hellebaum, 1944). Los síntomas de esta respuesta supra fisiológica del ovario, fueron definidos por entonces con el término (francés) de “syndrome d'hyperluteinisation massive des ovaires” y los primeros casos fatales descritos en 1951 por Gotsche nos llegaron posteriormente a través de Esteban Altirriba (Esteban Altirriba, 1961). En 1957, Le Dall describió este “syndrome” en su tesis (Le Dall, 1957), publicando posteriormente casos agudos en los que se requirió laparotomía, ovariectomía unilateral o bilateral e incluso sutura de quistes puncionados (Rouchy y Le Dall, 1959). Sin embargo, hasta 1968 (Mingeot, 1968) no encontramos el término síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) como tal en la bibliografía. El hecho de que con anterioridad surgiera la primera clasificación del síndrome basada en parámetros clínicos y de laboratorio (Rabau y cols, 1967) y posteriormente por otros (Schenker y Weinstein, 1978; Golan y cols 1989; Navot y cols, 1992; Whelan y Vlahos, 2000; Aboulghar y Mansour, 2003), demuestra que, a pesar de la diversa terminología (Southam y Janovskin, 1962; Sassi, 1964), la enfermedad estaba ya claramente definida.

En cualquier caso la verdadera eclosión del SHO surge con la utilización de la fecundación in vitro (FIV) para la concepción y gestación de seres humanos. En concreto apenas unos años después del nacimiento del primer “bebé probeta” (Steptoe y Edwards, 1978) se hacía público un estudio donde se mostraba la mejora de las tasas de embarazo cuando era más de uno el número de embriones “transferidos” en útero (Edwards y Steptoe, 1983). Siendo el número de óvulos el factor limitante para la obtención de embriones, se espoleaba más si cabe el uso de protocolos adecuados para provocar el desarrollo folicular múltiple. La extensión, generalización y posterior instauración del uso de gonadotropinas en los protocolos de hiperestimulación ovárica controlada (HOC) como rutina en mujeres sometidas a procesos de FIV lleva a finales de los 80 y principios de los 90 a la verdadera

explosión de casos de SHO (Golan y cols, 1988; Aisaka y cols, 1989; McClure y cols, 1992; Urman y cols, 1992; MacDougall y cols, 1993). Afortunadamente, el interés despertado por el auge del SHO incidirá en la proliferación de numerosos grupos que abordarán su estudio reflejándose sus resultados en un diagnóstico rápido de la sintomatología del síndrome, el desarrollo de medios para evitar mayores complicaciones del SHO como la cancelación del ciclo, una mejor monitorización y seguimiento de la paciente y avances significativos en el conocimiento de la fisiopatología del SHO con los que contamos hoy en día y que han conseguido que se reduzca notablemente el porcentaje de incidencia del síndrome, hasta el punto de que actualmente es la “pérdida de control” sobre los protocolos de la HOC lo que lo constituye.

A pesar de la gran cantidad de líneas de investigación que han permitido los avances en el conocimiento y la prevención del SHO, la fisiopatología del síndrome continúa siendo controvertida y no está totalmente esclarecida, quedando cuestiones por resolver como su origen molecular, el por qué se presenta de diferentes formas entre diferentes casos, o por qué no se produce en algunos pacientes que parecen presentar un elevado riesgo de desarrollarlo.

1.2.- DEFINICIÓN

El SHO se define como una complicación iatrogénica derivada del uso de gonadotropinas exógenas para inducción de la ovulación, principalmente hCG (human Chorionic Gonadotropin) y ocasionalmente con citrato de clomifeno, ocurriendo durante la fase lútea o al principio del embarazo (Kasum, 2010), pudiendo causar graves efectos en la salud o incluso la muerte (Gaona y cols, 2010). Se distingue por el aumento en el volumen ovárico, un desplazamiento agudo de fluido fuera del espacio intravascular y, en consecuencia, disminución del volumen intravascular, hemoconcentración, edema en el tercer espacio y, en los casos severos, acumulación de ascitis en la cavidad abdominal, en el espacio pleural o el pericárdico (Navot y cols, 1992; Cappa y cols, 1976; Balasch y cols, 1998; Whelan y Vlahos, 2000). La pérdida masiva de líquidos y la hemoconcentración llevan a alteraciones electrolíticas, insuficiencia renal y fenómenos tromboembólicos que pueden poner en riesgo la vida (Navot y cols, 1996). Los casos graves requieren atención especializada en la unidad de cuidados intensivos para evitar complicaciones, siendo los casos más frecuentes y graves los que se observan en las mujeres embarazadas (Humaidan y cols, 2010; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008).

1.3.- SINTOMATOLOGÍA

A lo largo de un ciclo de estimulación ovárica, los signos y síntomas predictivos del SHO ya se pueden observar de forma temprana durante la fase de estimulación, con el aumento de tamaño de los ovarios. Aunque la manifestación completa del síndrome se produce en la fase post ovulatoria (o tras la recuperación ovocitaria), donde se manifiesta un incremento de la permeabilidad vascular y la salida de fluido rico en proteínas desde el espacio intravascular. A continuación se describen detalladamente las diferentes manifestaciones sintomatológicas que caracterizan al síndrome de hiperestimulación ovárica.

1.3.1.- Cambios vasculares

Como hemos mencionado, el mecanismo responsable de las manifestaciones clínicas del SHO parece ser un aumento en la permeabilidad capilar de la superficie mesotelial con desplazamiento agudo de fluido fuera del espacio intravascular (Polishuk y Schenker, 1969), generando una acumulación masiva de fluido en el tercer espacio (Speroff y cols, 1999). La pérdida de fluido y proteínas hacia la cavidad abdominal genera hipovolemia y hemoconcentración, responsables de los problemas de circulación y excreción. Esto lleva a hipotensión arterial y disminución de la presión venosa central. Las complicaciones clínicas más relevantes son la coagulabilidad incrementada y la perfusión renal disminuida. Este cuadro sintomatológico podría sugerir la pérdida sanguínea causada por un proceso hemorrágico, sin embargo esta posibilidad queda descartada tras confirmarse hemoconcentración mediante la determinación del hematocrito.

La disminución en la perfusión renal origina una reabsorción aumentada de sal y agua en el túbulo proximal, produciendo oliguria y baja excreción urinaria de sodio. Al haber menos sodio presente en el túbulo distal, se genera una disminución en su intercambio por hidrógeno y potasio, resultando en una acidosis hiperkalémica. Por la perfusión reducida y la reabsorción incrementada de urea, se produce una elevación del nitrógeno ureico sanguíneo (*BUN*). Debido a que es sólo filtrada, la creatinina no aumenta tanto como el *BUN*. De este modo, la paciente está hipovolémica, azotémica e hiperkalémica. En respuesta a estos cambios, la aldosterona, la actividad de la renina plasmática y los niveles de hormona antidiurética están elevados (Speroff y cols, 1999). Balasch y cols, observaron que la patogénesis del SHO severo es más compleja y que una vasodilatación arteriolar periférica es fundamental en el desarrollo del SHO (Balasch y cols, 1998). Esta posibilidad fisiopatológica es importante al considerar la regulación del volumen del fluido corporal, homeostasis y función renal (Balasch y cols, 1990;

Balasch y cols, 1991; Balasch y cols, 1995). Las pacientes con un SHO severo presentan una actividad vasoconstrictora endógena compensatoria, un incremento del rendimiento cardiaco y del volumen sanguíneo como consecuencia de la retención de sodio y agua, que son insuficientes para mantener la homeostasis. Por el contrario, en pacientes con un estadio moderado, el grado de vasodilatación arteriolar no es intenso, por lo que la homeostasis se normaliza, la presión arterial es normal y no hay edema ni hemoconcentración (Balasch y cols, 1998).

1.3.2.- Síntomas clínicos

En cuanto a los síntomas clínicos del SHO en evolución, los más tempranos ya pueden ser aparentes a las 48 horas de la administración de la hCG. Estos síntomas, que incluyen náuseas, mareos, vómitos y dolor abdominal, usualmente se desarrollan de forma rápida en unos pocos días tras la aspiración folicular, pudiendo ser más severos entre los 7-10 días tras la hCG. En cambio, el desarrollo de síntomas clínicos relacionados con la ascitis (incomodidad abdominal debido a distensión) suele ser raro antes del día 7 tras la administración de la hCG (Murdoch y Evbuomwan, 1999). Los síntomas mejoran posteriormente de forma lenta con una rápida diuresis dentro de las 48 horas desde el inicio de la menstruación si no se produce embarazo. La mejoría inicial lenta también suele verse en las mujeres que gestan, pero sin embargo, coincidente con el aumento de hCG endógena, la ascitis continúa desarrollándose y el cuadro empeora.

1.3.3.- Complicaciones clínicas

En general, las complicaciones clínicas que pueden darse en un SHO son:

1.3.3.1.- Complicaciones obstétricas:

- Embarazo ectópico: Relativamente frecuente en los ciclos con concepción, quizás por la modificación de la estática tubárica secundaria al aumento de tamaño ovárico (Ballesteros y cols, 1999).

- Morbilidad obstétrica: En gestaciones complicadas con SHO severo se ha observado una mayor tasa de embarazos múltiples, aborto, prematuridad, bajo peso al nacimiento, preeclampsia, diabetes gestacional y desprendimiento de placenta, en relación a gestaciones

obtenidas mediante reproducción asistida pero no asociadas a este síndrome (Mathur y Jenkins, 2000a).

Muchas de estas complicaciones, pero no todas, pueden ser explicadas en gran parte por la mayor incidencia de fetos múltiples. El índice de aborto en gestaciones complicadas con SHO varía entre un 27 a 40%, superior a la tasa de aborto descrita en gestaciones tras reproducción asistida no complicadas con SHO (18-22%) (Chen y cols, 1997; Schenker y Weinstein, 1978).

1.3.3.2.- Complicaciones ginecológicas:

- Hemorragia intraperitoneal, originada por la ruptura de cuerpos lúteos.
- Torsión anexial: la combinación de agrandamiento ovárico, dolor abdominal, náuseas, leucocitosis progresiva y anemia puede deberse a este cuadro (Mashiach y cols, 1990).
- Persistencia de quistes ováricos grandes.

1.3.3.3.- Ascitis a tensión:

La acumulación de líquido en la cavidad abdominal puede producir una ascitis a tensión con aumento de la presión intrabdominal que generará por un lado una disminución del retorno venoso, con la consiguiente hipovolemia y oliguria, y por otro, una dificultad respiratoria con aparición de disnea.

1.3.3.4.- Derrame pericárdico:

Debido al aumento de permeabilidad capilar.

1.3.3.5.- Fenómenos tromboembólicos:

Son más frecuentes cuando existe hemoconcentración. También pueden aparecer en ausencia de ésta y con la presencia de niveles bajos de antitrombina III (Kaaja y cols, 1989). Estos hallazgos apoyan la hipótesis del posible papel de los niveles altos de estradiol y progesterona en la etiología de la trombosis venosa profunda asociada al SHO.

1.3.3.6.- Fracaso renal agudo:

Esta complicación suele deberse a la hipovolemia y al déficit de perfusión renal (Balasch y cols, 1990). Sus manifestaciones clínicas son la oliguria, la alteración del equilibrio

electrolítico, la azotemia y la hiponatremia por dilución, asociada a hipersecreción de hormona antidiurética.

1.3.3.7.- Disfunción hepática:

Las lesiones hepatocelulares o colestásicas se han asociado a niveles altos de E2 y al edema hepático debido al incremento de permeabilidad capilar (Younis y cols, 1988; Ryley y cols, 1990).

1.3.3.8.- Alteraciones pulmonares:

- Derrame pleural, por el aumento de permeabilidad capilar.
- Hidrotórax agudo, con compromiso pulmonar grave (Padilla y cols, 1990).
- Síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA): la hipoxemia intensa, asociada a este síndrome, puede llevar a la parada cardiorrespiratoria (Zosmer y cols, 1987).

1.4.- GRADO DE SEVERIDAD. CLASIFICACIÓN

A lo largo de la historia de la medicina que contempla el SHO, se ha intentado en varias ocasiones describir la severidad del síndrome no solo para comparar la incidencia entre los diferentes protocolos de estimulación con gonadotropinas, sino también para evaluar los diferentes métodos de prevención y las guías para su tratamiento. Uno de los primeros métodos de clasificación surge en 1967 (Rabau y cols, 1967), donde combinaba tanto los parámetros clínicos como los de laboratorio (niveles de estradiol y pregnandiol en orina a las 24 horas), con el fin de generar 6 grados de severidad. Posteriormente se reclasificó el síndrome en 3 categorías y 6 grados (Schenker y Weinstein, 1978). Con la llegada y extensión del uso de la ultrasonografía, Golan y cols incluyeron la evaluación ecográfica del tamaño ovárico y la presencia de ascitis como un criterio asociado al SHO, omitiendo y considerando como obsoletas las determinaciones de estradiol y pregnandiol en orina (Golan y cols, 1989). Este método de clasificación de Golan es el más aceptado, ya que incorpora signos y síntomas clínicos, hallazgos ecográficos y hallazgos analíticos para crear tres estadios (leve, moderado y grave) con 5 grados (1 y 2 en el leve, 3 en el moderado, 4 y 5 en el grave) de severidad (Tabla 1).

ESTADIOS DE SHO			
GRADO	LEVE	MODERADO	SEVERO
1	Distensión/ Incomodidad Abdominal		
2	Grado 1 + náuseas, vómitos y/o diarrea. Ovarios de 5-12 cm.		
3		SHO leve + evidencia ecográfica de ascitis	
4			SHO moderado + ascitis y/o hidrotórax y dificultad respiratoria
5			SHO grado 4 + Cambio en el volumen y aumento de la viscosidad sanguínea por hemoconcentración anomalías de coagulación y disminución de la función y perfusión renal

Tabla 1. Estadios de desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica atendiendo a la clasificación de Golan y cols, 1989. El grado 1 y 2 corresponde con una sintomatología leve, mientras que el grado 3 ya supone un estado moderado del síndrome. Las manifestaciones severas implican el grado 4 y 5.

Para los clínicos con cierta experiencia en ciclos de HOC, no es raro encontrar un alto porcentaje de pacientes bajo tratamiento para la estimulación ovárica que desarrollan síntomas del grado 1. De hecho, la incidencia del SHO en pacientes bajo HOC se ha descrito tan alta como un 33% usando esta clasificación (Golan y cols, 1989; Whelan y Vlahos, 2000). Este frecuente hallazgo demuestra que las manifestaciones del SHO ocurren dentro de un espectro y que las medidas preventivas instauradas en un estadio temprano son la mejor vía de evitar la morbilidad severa.

Hay dos variaciones fundamentales sobre el sistema de clasificación de Golan. La primera se basa en la simplificación de la misma en sólo tres estadios con sólo un grado por estadio (es decir, leve, moderado y severo) (Al-Ramahi, 1999). La distensión abdominal (por el aumento de tamaño ovárico), náuseas, vómitos y diarrea se incluyen en el grado moderado y no en el leve, aunque por lo común la mayoría de los autores los consideran marcadores de grado leve, pues son frecuentes en casi todas las mujeres que han sido sometidas a estimulaciones ováricas con éxito (Murdoch y Egbuomwan, 1999).

La segunda modificación se basa en una crítica al sistema de clasificación de Golan, ya que para algunos autores dentro del estadio "severo" no existe distinción del grupo de pacientes que pueden estar en una condición de inminente y potencial letalidad y por ello, redefinen el estadio severo en dos grados (severo y crítico) (Navot y cols, 1992). Otros autores,

en cambio, consideran que todos los casos de SHO severo determinados por la clasificación de Golan, deberían considerarse como potencialmente críticos y llevar a un ingreso hospitalario (Whelan y Vlahos, 2000).

En 2003, el comité de prácticas de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) propondría una clasificación simplificada del síndrome basada en su evolución sintomatológica, diferenciando de tal forma en, manifestación media, la cual puede persistir y dar lugar al empeoramiento sintomatológico, y por último se considera enfermedad seria cuando el dolor se acompaña por una o más manifestaciones graves como, incremento rápido de peso, inestabilidad hemodinámica, tensión ascítica, dificultad respiratoria, oliguria y otras anormalidades analíticas, las cuales se registran como un hematocrito superior a 45%, leucocitos superiores a 15000 por mm^3 , sodio menor de 135 meq/mL, potasio superior a 5.0 meq/mL, elevación de enzimas hepáticas, y creatinina sérica por encima de 1.2 mg/dL. Según estos criterios de la ASRM, la mayoría de los pacientes que desarrollan la forma seria del síndrome requieren hospitalización (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008).

1.5.- EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

El SHO suele ser autolimitado. La regresión se produce espontáneamente en 10-14 días (Whelan y Vlahos, 2000), con mayor antelación cuanto más precoz y apropiadamente se proveen los cuidados de soporte para evitar el deterioro de la condición de la paciente. Con la luteolisis y la menstruación, el síndrome desaparece con rapidez. La resolución clínica parece ser paralela al descenso de los niveles séricos residuales de hCG exógena, tras la dosis administrada para la maduración ovocitaria en la culminación del ciclo de HOC. Por ello, la implantación de una gestación (intrauterina o no) con el subsiguiente aumento de hCG endógena puede prolongar o empeorar el episodio actual de SHO o iniciar una forma “tardía” del mismo (Lyons y cols, 1994; Whelan y Vlahos, 2000), con una duración posible hasta el día 60 ó 70 de gestación (Ballesteros y cols, 1999). En el trabajo de Lyons se distinguen ya entre dos formas de SHO en función del momento de aparición. El SHO “temprano” se presenta 3-7 días tras la dosis ovulatoria de hCG y parece relacionarse con la magnitud de la respuesta ovárica precedente, mientras que el SHO “tardío” se identifica a los 12-17 días después de la administración de hCG en mujeres que gestan. La forma “tardía” no puede predecirse por los parámetros medidores de la respuesta ovárica en el ciclo de tratamiento precedente. La posible ocurrencia de un SHO “temprano” o “tardío” con diferentes factores de riesgo puede determinar, al menos en parte, la discrepancia observada cuando criterios idénticos son

utilizados para predecir la aparición del síndrome. Otro estudio de Mathur determina de nuevo la existencia de dos formas de SHO según el tiempo de inicio. Relaciona la forma “temprana” (aparición del cuadro en ≤ 9 días desde la recuperación ovocitaria) con la sensibilidad ovárica y la magnitud de la respuesta ovárica a la estimulación, mientras que la forma “tardía” (aparición del cuadro > 9 días desde la recuperación ovocitaria) se relaciona pobremente con la respuesta ovárica, pero sí parece hacerlo con la intensidad de la estimulación de la hCG endógena generada por la/s gestación/es implantada/s (Mathur y cols, 2000b). De este modo la forma “tardía” sería más difícil de predecir por criterios relacionados con la respuesta ovárica y tendería a ser más severa que la forma “temprana”. Otros autores, en cambio, creen que más que dos tipos de SHO, existen dos fases de una misma condición autolimitada, coincidiendo la primera fase con la hCG exógena inicial preovulatoria y la segunda con el aumento de hCG endógena debida a la gestación (Murdoch y Evbuomwan, 1999).

1.6.- FACTORES DE RIESGO

Las pacientes con antecedentes de síndrome de hiperestimulación ovárica presentan un alto riesgo de recurrir en ciclos subsiguientes de estimulación ovárica controlada. Navot y colaboradores, describieron algunas variables relacionadas con este riesgo (Navot y cols, 1988), que se han analizado por separado (Tabla 2).

- Edad: Con respecto a la edad, las mujeres jóvenes tienen un mayor número de folículos reclutados y una alta cantidad de receptores a gonadotropinas.

- Índice de Masa Corporal (IMC): Según se ha reportado, un índice de masa corporal bajo se asocia con una mayor incidencia de SHO (Navot y cols, 1988), aunque posteriormente otros autores han hallado resultados donde no han podido establecer esta misma asociación (Lewis y cols, 1990; Delvigne y cols, 1993; Enskog y cols, 1999).

- Nº de folículos recuperados: Cuando hay más de 35 folículos, el riesgo se eleva (Navot y cols, 1988), incluso más que si el número de folículos pequeños e intermedios fuera mayor, debido a la capacidad de éstos de producir estradiol (E2) y a la existencia de sustancias vasoactivas.

- Niveles de Estradiol: Asch y colaboradores demostraron que había un 80% de probabilidad de sufrir síndrome severo si se unían concentraciones de estradiol mayores de 6.000 pg/mL y hGC con más de 30 ovocitos reclutados (Asch y cols, 1991). De igual manera, las concentraciones de estradiol superiores a 4,000 pg/mL el día de la aplicación de hGC se relacionan con el síndrome, aunque esto no se ha confirmado todavía (Gaona y cols, 2010).

- Administración de hCG como inductor de la ovulación: Los protocolos de estimulación ovárica ocasionan una mayor incidencia del síndrome si se induce la maduración ovocitaria con hGC exógena antes de punción, o cuando se usa como soporte de la fase lútea (Asch y cols, 1991; Artini y cols, 1998a, b) en lugar de la progesterona. De hecho, la manifestación temprana del síndrome se atribuye a la administración exógena de hGC, y la forma tardía a su producción endógena, por lo que sólo se aprecia en pacientes embarazadas, especialmente si tienen más de un saco gestacional (Navot y cols, 1992).

- Síndrome de Ovario Poliquístico: Papanikolaou y colaboradores reportaron que de 113 pacientes con síndrome de hiperestimulación ovárica que analizaron, el 14.7% tenía síndrome de ovario poliquístico (PCOS), lo que constituye un factor de riesgo (Papanikolaou y cols, 2005).

- Hipersensibilidad y alergias: En otros estudios se ha observado que 50% de las mujeres con antecedentes de hipersensibilidad y alergias (Enskog y cols, 1999) padecían síndrome de hiperestimulación ovárica severo. Dado que sobre modelos animales se ha demostrado efectiva la inhibición del SHO mediante el uso de antihistamínicos (Knox, 1974), se sugiere de algún modo que el sistema inflamatorio y su bloqueo podrían estar relacionados con el síndrome y su tratamiento. Puesto que la ooforectomía cursa con la total desaparición del síndrome, sería factible pensar que en tal escenario el agente inflamatorio responsable del SHO quizás esté producido por el ovario.

MUJERES CON ALTO RIESGO	MUJERES CON BAJO RIESGO
<ul style="list-style-type: none"> - <35 años - Ovarios poliquísticos (PCO) - IMC bajo - Estradiol sérico >4000pg/ml - Signos morfológicos de PCO - Embarazo - Administración de hCG >35 folículos pequeños e intermedios - Más de 30 ovocitos recuperados - Aplicación de hCG a más de 25 folículos 	<ul style="list-style-type: none"> - >35 años - Hipogonadotropismo - IMC alto - Estradiol sérico <4000pg/ml - <20 folículos - Ovarios quiescentes - Ciclo fallido - Administración de Citrato de clomifeno - Administración de progesterona - Administración de FSH o menotropinas

Tabla 2. Principales características de las pacientes con alto y bajo riesgo de desarrollar el síndrome de hiperestimulación ovárica. IMC: índice de masa corporal; PCO: Ovario Poliquístico. Cuadro adaptado de Gaona y cols, 2010.

1.7.- PREVALENCIA. EPIDEMIOLOGÍA

Como hemos comentado anteriormente, a pesar de una aparente baja incidencia, la creciente demanda de protocolos de hiperestimulación controlada (HOC) en mujeres que se someten a técnicas de reproducción asistida (TRA), repercute en un mayor número de afectados cada año a nivel global.

Se estima una incidencia del 3-6% de SHO moderado, mientras que en sus formas más severas puede darse en el 0,1-3% de todos los ciclos (Delvigne y Rozenberg, 2002a; Vlahos y Gregoriou, 2006). La incidencia entre mujeres con alto riesgo de SHO puede alcanzar hasta el 20% (Gera y cols, 2009). La tasa de mortalidad relacionada con la estimulación ovárica es muy baja, y fue estimada por Brinsden con una ocurrencia de 1/400.000 a 1/500.000 ciclos de estimulación (Brinsden y cols, 1995). En otro trabajo, Serour y colaboradores, reportaron una mortalidad debida a fallo hepato-renal en 3.500 ciclos (Serour y cols, 1998). Adicionalmente se han documentado 11 complicaciones letales debidas a técnicas de reproducción asistida (Braat y cols, 2006).

Es posible que la incidencia real sea mucho mayor debido a casos no reportados en pacientes sometidos a un programa de HOC. Este efecto colateral asociado puede deberse a un enfoque agresivo de la inducción de la ovulación. No obstante, la incidencia relativamente baja de las formas moderada y grave puede atribuirse al avance en los métodos de monitorización de la inducción de la ovulación o bien a la mejor comprensión del síndrome y su prevención. La frecuencia del SHO se ve incrementada en los ciclos de concepción, de manera que se informa una incidencia del 50% en los ciclos donde el embarazo estaba presente y que el riesgo de SHO en los ciclos de concepción, era cuatro veces mayor que en los ciclos sin embarazo (Golan y cols, 1989). Hace algunos años se describió que la manifestación tardía del síndrome es concomitante con el embarazo en 96,7% de los casos, siendo más probable que se desarrolle una manifestación severa en estos casos que en el SHO temprano (Papanikolaou, 2005). Pero no está claro si el síndrome surge de la producción de hCG trofoblástica o si el SHO representa por sí mismo una condición de preconcepción favorable, con una producción de folículos y ovocitos más alta. Lo que parece claro es que las pacientes con SHO presentan una tasa de embarazo del 40-67% y que la tasa de embarazo múltiple se encuentra también más elevada, que en las pacientes que no desarrollan el síndrome (Golan y cols, 1989).

1.8.- FISIOPATOLOGÍA DEL SHO.

Comprender la fisiopatología que da lugar al SHO es un punto clave para evitar su aparición durante los tratamientos de reproducción asistida, sin embargo a pesar de que se ha ido recopilando gran cantidad de información a partir de numerosos trabajos que se han ido reportando en este campo, estos mecanismos fisiopatológicos permanecen todavía sin aclarar.

En un ciclo ovulatorio natural, existen mecanismos de retroalimentación eficientes que aseguran el reclutamiento de un número limitado de folículos antrales tempranos dentro de una cohorte, y la maduración de un solo folículo dominante capaz de ovular tras el pico de LH a mitad del ciclo. Sin embargo en ciclos estimulados con gonadotropinas, este control endógeno no existe, permitiendo un reclutamiento multifolicular que a su vez incrementa el riesgo de desarrollar SHO. Como ya apuntamos en la definición, el SHO es prácticamente siempre una complicación iatrogénica que da lugar a una respuesta supra fisiológica del ovario, desencadenada casi siempre por la administración exógena de hormona gonadotropina coriónica (hCG) después de la estimulación de la ovulación. Para el desarrollo de esta respuesta supra fisiológica, entran en juego tres factores claves: el uso de hCG como inductor de la ovulación, el ovario y factores vasoactivos.

1.8.1.- GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA (hCG)

La hormona hCG se usa para estimular el receptor de la LH en los ciclos de reproducción asistida e iniciar la fase final de maduración folicular y ovocitaria, siendo la actividad biológica de la hCG aproximadamente 6-7 veces superior a la LH debido a su mayor vida media y afinidad por el receptor (Soares y cols, 2008). Esta relación parece confirmarse, tal y como se detallará más adelante, cuando se consigue impedir el desarrollo del síndrome al utilizar distintas estrategias sustitutivas de la hCG como inductor de la ovulación, o mediante la cancelación del ciclo evitando administrar hCG (Melo y cols, 2007; García-Velasco y cols, 2010; Herrero y cols, 2011).

La hiperestimulación ovárica ocurre después de una luteinización folicular masiva, por consiguiente en estos ciclos estimulados, el síndrome se manifiesta únicamente después de la administración exógena de hCG. Sin embargo, existen situaciones no iatrogénicas donde algunas formas de SHO se pueden desarrollar sin la presencia de la hCG exógena. En estos casos es la hCG endógena la que juega un papel determinante en el desarrollo del síndrome. Varias de estas situaciones relacionadas con el desarrollo del SHO mediado por hCG endógena se citan a continuación:

- Mujeres embarazadas con síndrome de ovario poliquístico, las cuales son más sensibles a las gonadotropinas (Zalel y cols, 1992).

- Embarazos que presentan de forma anormal altos niveles séricos de hCG, como embarazos molares o triploides (Ludwig y cols, 1998), o embarazos múltiples (Check y cols, 2000).

- Adenomas gonadotrópicos que inducen aumentos de FSH y LH (Kihara y cols, 2006), como puede ser el hipotiroidismo primario (Cardoso y cols, 1999) con exceso de TSH capaz de unirse al receptor de la FSH y el adenoma hipofisario con producción supra fisiológica de FSH y LH (Sommergruber y cols, 2000).

- Mutación del receptor de FSH, lo cual provoca una pérdida de la especificidad de la FSH por su receptor permitiendo que se una la hCG con la misma afinidad (Montanelli y cols, 2004, Vasseur y cols, 2003).

A pesar de que la hCG se considere como un factor esencial para el desarrollo del SHO, es improbable que esta hormona sea la responsable directa del desarrollo del síndrome debido a que por sí misma no tiene propiedades vasoactivas (Gómez y cols, 2002). Si fuese un factor vasoactivo de acción directa en el ovario, se esperaría que el SHO cursara en todas las mujeres con elevados niveles de hCG, por el contrario sabemos que, a pesar de su predisposición, no en todos los casos con altos niveles de hCG se desarrolla el síndrome. Ejemplo de ello se observa en una evaluación de 27 embarazos, donde la concentración de hCG fue mayor de 150.000 UI/L (con un máximo de 344.350 UI/L), y no hubo ninguna mujer que desarrollara el SHO (Michaelson-Cohen y cols, 2008). Esto sugiere pues, no solo que la hCG por sí misma no podría desarrollar el SHO, sino que deben existir otros mecanismos moleculares implicados en SHO que se desencadenan tras la administración de hCG.

1.8.2.- OVARIO

El otro elemento necesario para que se desarrolle SHO es el ovario, ya que no se cursa en animales sometidos a HOC los cuales previamente han sido ooforectomizados (Gómez y cols, 2002), en mujeres sometidas a donación de ovocitos desaparece con la luteolisis (Kols, 2004) y además se han reportado casos esporádicos donde el SHO se resuelve de forma radical al ooforectomizar a la paciente (Amarin, 2003). Todo esto reafirma el papel imprescindible o preponderante que desempeña el ovario en el desarrollo del síndrome.

1.8.3.- FACTORES VASOACTIVOS

Aunque el mecanismo fisiopatológico no se ha elucidado todavía, experimentos realizados en animales han demostrado una correlación directa entre el agrandamiento ovárico, incremento de la permeabilidad capilar, severidad de la ascitis y la dosis de gonadotropinas (Schenker y Weinstein, 1978; Gómez y cols, 2003a). Esto sugiere que el desarrollo de la ascitis es secundario al incremento de la permeabilidad capilar, que está relacionada con la dosis de la hCG y está mediado por una sustancia vasoactiva secretada a nivel sistémico y/u ovárico. Es por ello que, la mayoría de los estudios realizados sobre el SHO se han centrado en elucidar cuál o cuáles podrían ser las sustancias con capacidad vasoactiva que mediaran las acciones de la hCG en el incremento de la permeabilidad vascular que caracteriza el síndrome. Algunos de estos sistemas y mediadores vasoactivos son citados y descritos a continuación.

1.8.3.1.- ESTRADIOL

Inicialmente, el papel del estradiol en la fisiopatología del SHO levantó gran interés, ya que sus niveles se mostraban muy elevados en la mayoría de los pacientes con SHO (Haning y cols, 1983; Asch y cols, 1991). Esta asociación dirigió a los investigadores a pensar que el incremento en la concentración de estradiol podría ser el causante del SHO. Sin embargo, los ensayos que se publicaron demuestran que el estradiol no es un requisito necesario para desarrollar el síndrome, ya que no siempre se muestran estos altos niveles en todos los casos de SHO. Prueba de ello es, que en un caso de una paciente con una actividad 17,20-desmolasas deficiente, se desarrolló SHO durante un tratamiento de fecundación in vitro, a pesar de los bajos niveles de estradiol que presentaba (Pellicer y cols, 1991). También se han reportado casos de SHO en mujeres con bajos niveles de estradiol por hipogonadotropismo hipogonadotrófico (Levy y cols, 1996) e hiperplasia adrenal congénita (Meirow y cols, 1996). Adicionalmente, los altos niveles de estradiol por sí solos no dan lugar al SHO, ya que no parecen ser la causa de la disfunción circulatoria (Manau y cols, 1998) y el estradiol tampoco tiene propiedades vasoactivas por sí mismo (Delvigne y Rozenberg, 2002b), además de que el SHO solo se desarrolla cuando la hCG también está elevada (Aboulghar y Mansour, 2003; Simón y cols, 1996).

Por otro lado existen trabajos más recientes en los que mediante el uso de análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se observa una reducción de los niveles de estradiol, lo cual se relaciona directamente con la disminución de los niveles de VEGF, reduciendo a su vez la incidencia y severidad del SHO (Gustofson y cols, 2006; Tong y cols, 2008; Cerrillo y cols, 2009; Cerrillo y cols, 2010). Teniendo en cuenta estos resultados,

actualmente la asociación entre los altos niveles de estradiol y el SHO se considera básicamente como un marcador de la respuesta ovárica representada por la actividad de las células de la granulosa (Soares y cols, 2008). Estos niveles de estradiol son considerados como uno de los mejores predictores de la ocurrencia del SHO, como se demuestra en mujeres con alto riesgo de SHO donde se observan altos niveles (>2500 pg/mL) o un rápido incremento de estradiol en suero (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008).

1.8.3.2.- SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRAO)

Desde que se planteó por primera vez hace más de dos décadas, se viene considerando una relación directa entre la actividad de la renina plasmática y la severidad del SHO (Navot y cols, 1987). La prorenina y la renina activa se sintetizan en las células tecales del ovario humano (Paulson y cols, 1989). La HMG y la hCG inducen la actividad renina en el líquido folicular (LF) (Lightman y cols, 1987) y estimulan la producción ovárica de la prorenina (Sealey y cols, 1986; Glorioso y cols, 1986). Muchos autores han encontrado una relación directa entre la renina plasmática y el grado de hiperestimulación (Ong y cols, 1991; Navot y cols, 1996; Delbaere y cols, 1997b) hipotetizándose que a través de la secreción de la angiotensina II (AII) el SRAO desempeña un papel importante en la fisiopatología del síndrome (Delbaere y cols, 1997a). El LF de mujeres sometidas a HOC ha mostrado contener no sólo prorenina y renina sino también enzima convertidora de angiotensina (ACE), angiotensina I (AI), AII y angiotensinógeno (Sealey y cols, 1986; Derkx y cols, 1987). Se ha observado que la AII regula la permeabilidad de la pared vascular y que afecta a la esteroidogénesis ovárica en asociación con la actividad de la renina ovárica (Lightman y cols, 1987; Whelan y Vlahos, 2000). Además, el bloqueo de la ACE es capaz de disminuir las manifestaciones del SHO en conejo (Morris y cols, 1995) y se han encontrado niveles altos de AII en ascitis de mujeres que desarrollaron SHO grave (Delbaere y cols, 1994). Sin embargo, estos factores no son suficientes para ser responsables de la ascitis. Recientemente, se ha estimado que la dilatación arteriolar periférica es un hallazgo constante en el SHO, llevando dicha dilatación a la activación del SRAO–aldosterona y el sistema nervioso simpático y a la secreción de hormona antidiurética. Estos sistemas vasoactivos promoverían la retención de agua y sodio, contribuyendo a la formación de ascitis en pacientes con SHO severo (Balasch y cols, 1998). Sin embargo, la AII podría actuar como mediador de la formación de ascitis junto con otros agentes vasoactivos implicados en el desarrollo del síndrome como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (McClure y cols, 1994) o citoquinas (Revel y cols, 1996).

1.8.3.3.- PROSTAGLANDINAS (PGs)

Inicialmente se pensaba que las PGs tenían un papel clave en el desarrollo del SHO (Schenker y Polishuk, 1976). Las PGs pueden inducir el SHO directa o indirectamente a través de la producción elevada de All. Pero al emplear indometacina, un inhibidor de las PGs en conejos, se observó que el bloqueo de la síntesis de PGs no conseguía bloquear la formación de la ascitis y el agrandamiento de los ovarios (Pride y cols, 1984), por lo que su papel como posible inductor clave del síndrome ha ido perdiendo consistencia.

1.8.3.4.- HISTAMINA

Del mismo modo que las PGs, la histamina se consideró inicialmente como posible mediador, ya que utilizando bloqueadores del receptor de la histamina 1 en conejos, se inhibe la formación de ascitis (Gergly y cols, 1976). Pero más adelante, varios trabajos refutan esta posibilidad (Erlik y cols, 1979; Zaidise y cols, 1983), ya que no se encuentran diferencias en los niveles de histamina en los conejos con SHO comparado con los controles, existiendo mucha controversia en los trabajos realizados con bloqueadores de histamina. Por lo que actualmente, está descartada como mediador principal del SHO.

1.8.3.5.- ENDOTELINA

Además de una pérdida de líquido a nivel vascular causado por un incremento de la permeabilidad capilar, como se ha comentado anteriormente, el SHO severo se asocia a una marcada vasodilatación arteriolar (Balasch y cols, 1991). Hace años que se ha observado que además del sistema vasoconstrictor, el mantenimiento de la presión arterial, también está regulado por sustancias vasoactivas secretadas por el endotelio, como el óxido nítrico (ON) y la endotelina, un vasoconstrictor (Vane y cols, 1990; Battistini y cols, 1993). Las endotelinas actúan como una hormona paracrina sobre las células musculares, tienen un efecto homeostático sobre la circulación y el sistema endocrino, presentando también interacción con otras sustancias vasoactivas endógenas. La endotelina se encuentra en el líquido folicular y en el cuerpo lúteo siendo su producción estimulada por la hCG (Masaki, 1993; Abaé y cols, 1994), por lo que los ovarios hiperestimulados podrían ser el principal productor de hiperendotelinemia en los pacientes con SHO severo. Además la endotelina está relacionada con hiperestrogenemia. Finalmente los niveles de endotelina pueden representar un fenómeno secundario (homeostático) o primario para el mantenimiento de la presión sanguínea (Balasch y cols, 1995).

1.8.3.6.- ÓXIDO NÍTRICO (ON)

El ON es un vasodilatador de vida muy corta. Se descompone rápidamente en nitratos y nitritos (Bonello y cols, 1996; Tao y cols, 1997). El ON se sintetiza a partir de la oxidación de la arginina, mediante la ON sintasa (Griffith y Stuehr, 1995; Snyder, 1995). Interviene en la transmisión de señales fisiológicas y citotóxicas de las células, de una gran variedad de tejidos (Ben-Shlomo y cols, 1994). Se une a moléculas que presentan el grupo hemo en su estructura, como la oxihemoglobina, la ciclooxigenasa (síntesis de PGs), o la citocromo P450, implicada en la esteroidogénesis, o que presenten el grupo tiol (SH) en su estructura (Rosselli y cols, 1994). El ON actúa como protector de las células frente a los radicales libres (O_2^-). Al unirse a ellos protege a las células de la toxicidad de estos radicales (Cook y Tsao, 1993; Rosselli y cols, 1998). Pero en determinadas circunstancias, la reacción $ON + O_2^-$, puede dar lugar a $ONOO^-$, un potente agente oxidante y éste a su vez, puede dar lugar a una forma altamente reactiva, el radical hidroxinitrilo $HOONO$ (Beckman y cols, 1990). El $ONOO^-$ y sus metabolitos pueden inducir la toxicidad celular, por la peroxidación lipídica, o la nitrosilación del grupo tirosina (Rosselli y cols, 1998). Las acciones del ON dependerán de su concentración, estado de óxido-reducción de la célula, presencia de metales y proteínas con el grupo tiol (SH) (Davies y cols, 1995; Kelly y cols, 1996). Durante el desarrollo folicular, el incremento del ON se correlaciona con el aumento de estrógenos y también se ve aumentado con el tratamiento con GnRH, HMG y hCG (Rosselli y cols, 1994). En el proceso de la ovulación el ON actúa como mediador de las acciones de la Interleucina-1-Beta que induce el pico de LH necesario para la ovulación (Ben-Shlomo y cols, 1994; Bonello y cols, 1996). Por otro lado, la respuesta neovascular y muchos mecanismos celulares relacionados y necesarios para la angiogénesis, suceden a través del ON, o al menos participa en alguno de ellos, y desencadenado por agentes vasoactivos mediante mecanismos autoparacrinós (Ziche y cols, 1994). Como se comentará posteriormente el ON está muy relacionado con el VEGF, el cual es considerado como el principal agente vasoactivo desencadenante del síndrome.

1.8.3.7.- INHIBINAS

Las inhibinas se producen en el ovario y sus funciones principales son regular la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) desde la hipófisis por mecanismos endocrinos y la esteroidogénesis ovárica por mecanismos autocrinos/paracrinós (Baird y Smith, 1993). Las inhibinas son heterodímeros, consistentes en subunidades α y β unidas por un puente disulfuro. La Inhibina A (IA) se constituye por la subunidad α y el tipo A de la subunidad β , mientras que la Inhibina B (IB) por la subunidad α y el tipo B de la subunidad β . Las

subunidades componentes de las IA e IB han demostrado expresarse tanto en células de la teca como de la granulosa del folículo cuando se evalúan como proteína y como ARNm (Enskog y cols, 2000). Las mediciones de inhibina en sangre periférica de mujeres en edad reproductiva han revelado que las concentraciones de IB aumentan durante la fase folicular temprana hasta un valor máximo en el día después del pico interciclo de FSH, y un segundo ascenso más corto pero más pronunciado 2 días tras el pico de gonadotropinas de mitad de ciclo, seguido de concentraciones decrecientes durante toda la fase lútea (Groome y cols, 1996; Schipper y cols, 1998). El patrón de concentraciones circulantes de IA es diferente, con niveles bajos en la fase folicular temprana y un ascenso modesto en el día de pico de LH, seguido por un breve descenso y luego un aumento hasta concentraciones máximas durante la fase lútea media (Groome y cols, 1996; Schipper y cols, 1998). Así, la IB se considera más como una hormona de fase folicular con un papel de inhibición de la secreción de FSH, mientras que la IA es más una hormona de fase lútea. Durante la desensibilización hipofisaria con análogos de la GnRH existe una supresión marcada de las concentraciones de inhibina, siendo éstas elevadas con la estimulación con gonadotropinas (Enskog y cols, 2000). Además, las concentraciones de inhibina en condiciones basales y durante la estimulación ovárica pueden ser relacionadas con el resultado de FIV (Hall y cols, 1999). Todo ello hace pensar que las concentraciones de IA e IB parecen estar relacionadas con la selección folicular, pudiendo ser así marcadores útiles para predecir y monitorizar el SHO.

- INHIBINA A: En el primer estudio llevado a cabo para evaluar los patrones de las concentraciones de las inhibinas A y B en sangre periférica en el SHO severo, Enskog y cols (1999), hallan unos patrones distintos entre las pacientes que desarrollan o no el síndrome. En cuanto a la IA, si bien las concentraciones aumentan gradualmente sin diferencias significativas hasta el día de la transferencia embrionaria (TE), en las pacientes con SHO estas concentraciones permanecen elevadas tras la transferencia embrionaria, mientras que disminuyen en los controles. Durante el tratamiento del SHO, dichas concentraciones van disminuyendo hasta equipararse al alta hospitalaria a los valores presentes en el grupo control a partir del tercer día tras la TE. El hecho de que la IA aumente tras la TE hace pensar que la producción de esta glicoproteína está elevada en los ovarios grandes e hiperpermeables del SHO. Las subunidades de esta inhibina se expresan en las células humanas luteinizadas de la granulosa, secretadas de forma dimérica al ser estimulada por la prostaglandina E2 (Erämaa y Ritvos, 1996). Esta prostaglandina se produce en grandes cantidades en el cuerpo lúteo humano y puede tener un significado fisiopatológico en el SHO, ya que se han hallado

concentraciones elevadas en la cavidad peritoneal de pacientes con dicho síndrome (Schenker y Polishuk, 1976).

- INHIBINA B: En el estudio de Enskog y colaboradores, la IB muestra un patrón con concentraciones bajas al inicio de la estimulación, alcanzando niveles máximos 3 días antes de la aspiración ovocitaria, disminuyendo después a valores bajos el día de la transferencia embrionaria. Las concentraciones de IB tres días antes de la aspiración y el día de la aspiración son 2 veces mayores en el grupo de SHO severo (Enskog y cols, 1999). La IB se considera que se produce primariamente por los folículos antrales y en especial por el folículo dominante en un ciclo natural no estimulado (Groome y cols, 1996). Esto se basa en el hallazgo de concentraciones más altas de IB que de IA en el líquido folicular humano obtenido de ciclos naturales (Magoffin y Jakimuk, 1997). En el trabajo de Enskog anteriormente citado, encuentran que la mayor concentración de IB en el grupo de SHO severo no puede explicarse por la existencia de un mayor número de folículos maduros, pues no existieron diferencias significativas en este parámetro con respecto al grupo control (Enskog y cols, 1999). La explicación de la mayor producción de IB por el folículo en el SHO podría ser la mayor sensibilidad a las gonadotropinas de las células de la granulosa productoras de esta inhibina. Por otro lado, parece existir una gran variabilidad de sus concentraciones en el líquido folicular de folículos dominantes sanos, en contraste con las de IA que son más uniformes (Magoffin y Jakimuk, 1997). Al no existir diferencias significativas entre ambos grupos (SHO y control) en los niveles de IB al inicio del SHO, no parece que esta hormona sea responsable de los efectos agudos de la enfermedad, como la formación de ascitis. Puede ser, en cambio, que las altas concentraciones de la misma antes del inicio del SHO preparen al folículo, en la estimulación por hCG, para producir grandes cantidades de algunos factores que directamente causen una gran permeabilidad vascular en los ovarios y superficies peritoneales (Tollan y cols, 1990).

1.8.3.8.- INTERLEUCINA-2 (IL-2)

La IL-2 es importante para la generación y regulación de la respuesta inmune (Smith y cols, 1998). El efecto de la IL-2 en el sistema inmune humano presenta múltiples efectos tóxicos. El más importante es el llamado "*Síndrome de pérdida vascular*" (VLS) en el que la infusión de IL-2 recombinante encabeza la acumulación rápida de líquido extracelular, dando lugar a ascitis y edema pulmonar (Oppenheim y cols, 1991). La IL-2 causa este efecto estimulando la secreción de otras citoquinas con un efecto a nivel vascular como el incremento de la PV. Wang y Norman (1992a), estudiaron la concentración de IL-2 en líquido folicular preovulatorio, y encontraron una correlación positiva entre la concentración de IL-2

entre LF y plasma, pero no hallaron relación obvia entre IL-2 y esteroides en LF o plasma. Orvieto y cols (1995) demostraron que la concentración de IL-2 en el LF, obtenida en el día de la punción, era significativamente más elevada en pacientes que desarrollaban el SHO comparada con los controles y sugirieron que la IL-2, que producen los ovarios hiperestimulados, se transfiere del LF a la circulación provocando "VLS" (síndrome de pérdida vascular) a nivel sistémico. Por otro lado, Revel y colaboradores encontraron que los niveles de IL-2 en líquido peritoneal eran indetectables en las pacientes con SHO grave (Revel y cols, 1996). Y Por ello, parece que la acumulación de esta interleucina no es el mecanismo que media el efecto de la IL-2 en el SHO.

1.8.3.9.- INTERLEUCINA-6 (IL-6)

La IL-6 media la respuesta de la fase aguda de las heridas. Desencadena una reacción sistémica caracterizada por leucocitosis, incremento de la permeabilidad capilar y un incremento de proteínas sintetizadas por el hígado. La IL-6 (Damas y cols, 1992) se produce por monocitos y células endoteliales. Esta interleucina se ha encontrado en el LF de mujeres estimuladas (Buyalos y cols, 1992). El hallazgo de la IL-6 a nivel de ARNm durante el proceso de neovascularización y/o angiogénesis que ocurre durante el desarrollo del folículo ovárico, sugiere que la IL-6 presenta un papel de importancia en la función ovárica normal y en concreto en la ovulación, aumentando la permeabilidad capilar (Motro y cols, 1990). Friedlander y su grupo de trabajo, realizaron un estudio en el que analizaron el papel de la IL-6 en el desarrollo del SHO en cuatro pacientes afectadas, observando que tanto el suero como el líquido ascítico presentaban gran cantidad de esta citoquina (Fiedlander y cols, 1993). El mecanismo por el cual la IL-6 podría ser un mediador de la patogénesis del síndrome no está aclarado. No obstante, en el mismo estudio anterior, se encontró que en dos de las pacientes, la albúmina, la cual se relaciona con la regulación de la presión osmótica de la sangre (Aboulghar y cols, 2002), se encontraba más baja de lo esperado (Friedlander y cols, 1993). Esta observación refuerza la hipótesis de que la IL-6 pueda desempeñar un papel importante en la fisiopatología del síndrome ya que esta interleucina es un potente inhibidor de la producción de albúmina hepática (Kishimoto, 1989). La expresión e inmunolocalización de IL-6, en pacientes con SHO ha sido estudiado en profundidad por el grupo de Loret de Mola, los cuales observaron una inmunotinción de esta citoquina en el cuerpo lúteo y las células de la granulosa luteinizadas en aspirados foliculares y que es dependiente de LH o hCG (Loret de Mola y cols, 1996a, b). Este mismo grupo, encontró un incremento de esta citoquina en el SHO e investigaron si la concentración preovulatoria podría predecir el SHO, encontrando que los valores del estado preovulatorio y durante la estimulación ovárica eran similares (Loret de

Mola y cols, 1996a), lo que indica que la determinación de esta citoquina antes de la administración de la hCG no parece ser útil para predecir el síndrome. Sin embargo, en un trabajo del grupo de Geva y colaboradores, se observó que las altas concentraciones de IL-6 en LF en el momento de la aspiración ovocitaria, podrían predecir el desarrollo de la forma temprana de SHO en las altas respondedoras (concentración de E2 > 3000 pg/ml y/o 20 ovocitos recuperados) (Geva y cols, 1997). Posteriormente, de acuerdo con los resultados anteriores, un estudio de Chen confirmó que la concentración aumentada de IL-6 en LF en el momento de la recuperación ovocitaria puede ser un marcador precoz del SHO en pacientes sometidas a FIV. Del mismo modo su valor sérico el día de la administración de hCG puede distinguir las pacientes con riesgo de SHO, que bien lo desarrollarán o no (Chen y cols, 2000a).

Estos resultados discordantes entre diferentes autores, no ha permitido establecer una relación consistente de esta interleucina con el SHO, que sirva como marcador de su aparición en mujeres sometidas a un ciclo controlado de estimulación ovárica.

1.8.3.10.-INTERLEUCINA-8 (IL-8)

Se trata de una citoquina con actividad quimiotáctica neutrófila y un factor angiogénico importante que se muestra como un posible marcador de SHO, sin embargo, dado que se correlaciona fuertemente con las concentraciones séricas de E2, podría ser un epifenómeno y no un factor clave con responsabilidad directa sobre el desarrollo del síndrome (Chen y cols, 2000a). También se sabe que las concentraciones de IL-8 en fluido peritoneal en pacientes con SHO son significativamente superiores a los controles, no habiendo diferencias en sus niveles séricos (Revel y cols, 1996). Su valor potencial en la predicción del SHO no ha sido estudiado en profundidad, aunque un trabajo reciente se pone de manifiesto de nuevo una posible relación con el desarrollo del SHO, al determinarse un efecto de esta interleucina IL-8 presente en el líquido folicular, sobre la permeabilidad de células endoteliales en cultivo (Chen y cols, 2010).

1.8.3.11.- FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

Las numerosas evidencias y hallazgos publicados a día de hoy, han situado al VEGF como uno de los factores más relevantes directamente implicados en la fisiopatología del SHO (Geva y cols, 2000; Chen y cols, 2010). Como citoquina angiogénica es un potente estimulador del endotelio vascular, suponiendo un papel crucial en el crecimiento folicular, la función del cuerpo lúteo y la angiogénesis ovárica.

Es bien sabido desde hace más de una década, que los niveles de VEGF correlacionan directamente con la severidad del SHO (Levin y cols, 1998). El VEGF ha sido cuantificado en líquido peritoneal, líquido folicular y en suero de diferentes mujeres, observando que en los casos que desarrollaron posteriormente el SHO en su estadio severo, estos niveles fueron significativamente mayores que al ser comparados con los controles (Krasnow y cols, 1996). La presencia del VEGF a nivel de ARNm también se ha confirmado en células de la granulosa luteinizadas (Yan y cols, 1993a), cuyos niveles se observan incrementados tras la administración de hCG de forma dosis-tiempo dependiente (Neulen y cols, 1995a, b), apareciendo también un incremento del VEGF a nivel sérico (Pellicer y cols, 1999). Esta asociación cobra sentido a través de trabajos que establecen la existencia de una estrecha relación entre el VEGF y la hCG (Neulen y cols, 1998; Wang y cols, 2002b), lo que es tremendamente importante para el desarrollo del SHO ya que, como se ha comentado anteriormente, el principal factor desencadenante del SHO es la administración de la hCG. De hecho, no sólo sabemos que la hCG estimula la secreción del VEGF por las células de la granulosa (Neulen y cols, 1998) sino que existen estudios que muestran claramente cómo las células de la granulosa aisladas de pacientes que posteriormente desarrollaron el SHO, secretan mayor cantidad de VEGF en respuesta a la hCG que las células de la granulosa de aquellas pacientes que posteriormente no lo desarrollaron (Wang y cols, 2002a).

McClure y colaboradores estudiaron el papel del VEGF en el SHO, y concluyeron por primera vez que este factor de crecimiento es el principal responsable de la actividad permeabilizante del líquido ascítico del SHO en un modelo in vitro (McClure y cols, 1994). Años después serían Gómez y colaboradores quienes demostraran la relación del VEGF con el incremento de la permeabilidad vascular en el desarrollo del síndrome sobre un modelo animal de SHO en roedores, donde se observó un pico de expresión tanto del VEGF como de su receptor VEGFR2 y de permeabilidad vascular a nivel ovárico, aproximadamente 48 horas después de la administración de hCG, coincidiendo con la completa formación y máxima actividad del cuerpo lúteo (Gómez y cols, 2002; Gómez y cols, 2003a). En humanos también se ha confirmado esta relación, demostrando que la PV y los niveles de VEGF y VEGFR2 aparecen elevados ya durante la fase de estimulación con gonadotropinas, previamente a la inyección de hCG, sin embargo estos parámetros se incrementan de forma incipiente tras la administración de hCG como inductor de la ovulación (Wang y cols, 2002a).

El incremento de la PV producido por el VEGF se produce mediante el reordenamiento de las proteínas de unión de las células endoteliales, incluidas caderina y claudina 5, las cuales son importantes para establecer las uniones entre las células del endotelio vascular, generando una barrera entre el compartimento luminal y los tejidos (Rodewald y cols, 2009).

En modelos *in vitro* de SHO basados en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), se describió cómo la hCG y el VEGF, al contrario que cuando se añade estradiol, son capaces de producir cambios en las fibras de actina y un incremento de la concentración de caderina, lo cual indica un incremento de esta PV (Villasante y cols, 2007). Un estudio más reciente *in vitro* demostró que la hCG es capaz de incrementar la concentración del VEGF y la PV sobre células de la granulosa y HUVEC, donde se asoció una reducción de claudina 5 en las células endoteliales (Rodewald y cols, 2009).

Aunque algunos autores no han hallado aumento de las concentraciones séricas de VEGF tras la administración de hCG (Licht y cols, 1997; Pellicer y cols, 1999; Ludwig y cols, 1999) otros sí lo han hecho tanto *in vivo* como *in vitro* (Neulen y cols, 1995a, b; Agrawal y cols, 1998; Agrawal y cols, 1999). En cualquier caso, los primeros estudios sobre los niveles de VEGF en sangre, distan mucho de tener vigencia en nuestros días y están más que cuestionados debido a las inexactitudes de los métodos empleados (Jelkmann, 2001). Destacaremos dos de las más importantes. La primera es que, durante la coagulación del suero, las plaquetas liberan VEGF en cantidades más que significativas que interfieren en la medida real del VEGF circulante. La segunda es que el VEGF, en un porcentaje del 90%, se halla unido a proteínas secuestradoras como la Alfa-2-macroglobulina (A2M) (McElhinney y cols, 2002) o a su inhibidor natural el receptor soluble de VEGF nº 1 (sVEGFR1) (Neulen y cols, 2001), también llamado sFlt-1. Teniendo en cuenta que en la mayoría de estudios realizados hasta la fecha, el VEGF se midió en suero y que en ninguno de ellos se realizaron medidas de VEGF libre, que es el que realmente ostenta carácter angiogénico, no es de extrañar la gran variabilidad de resultados que se ha obtenido con respecto al papel del VEGF en el SHO.

A pesar de las inexactitudes en la evaluación del VEGF sérico, en plasma se ha observado un claro patrón de incremento del VEGF relacionado con el SHO, que se produce varios días después de la administración de hCG (Pau y cols, 2006). Por todo ello, este factor se considera como el candidato más aceptado cuyo papel es crucial en el desarrollo del síndrome (Vloeberghs y cols, 2009).

1.9.- ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DEL SHO

El conocimiento de los posibles mecanismos y factores etiopatogénicos del síndrome de hiperestimulación ovárica permite diseñar esquemas específicos para la prevención y el tratamiento de este padecimiento iatrogénico y en ocasiones letal. Una vez disparados los mecanismos que originan el síndrome, no existe un tratamiento 100% efectivo, estando el mismo enfocado en medidas meramente paliativas sobre la sintomatología que lo caracteriza.

Hasta ahora, la conducta terapéutica se ha enfocado en los siguientes aspectos: 1) identificar factores de riesgo; 2) clasificar adecuadamente el grado de severidad del síndrome; 3) idear estrategias para limitarlo; 4) iniciar medidas generales; 5) determinar si es necesaria la hospitalización en cuidados intensivos (Gaona y cols, 2010).

La medida inicial es el reposo absoluto, independientemente de la gravedad. Se vigila de forma rutinaria el peso y el perímetro abdominal de la paciente; se realiza seguimiento ultrasonográfico de los ovarios dos veces por semana y se cuantifica la fracción beta de hGC para diagnosticar el embarazo. En los casos leves es necesario incrementar la ingestión de líquidos e indicar analgésicos. Los casos moderados se manejan en forma ambulatoria, en tanto que los graves requieren vigilancia hemodinámica en la unidad de cuidados intensivos, con colocación de vía central para medir la presión venosa central y valorar la volemia y el gasto urinario. En los casos moderados a severos se aplican subcutáneamente 20 a 40 mg cada 24 horas de heparina de bajo peso molecular. Se restablece la osmolaridad fisiológica del sistema vascular mediante soluciones coloides como albúmina, polimerizado de gelatina o plasma fresco para mejorar la presión oncótica intravascular y, en caso necesario, se sustituyen factores de coagulación. El gasto urinario debe mantenerse por arriba de 0.5 mL/kg/h; para mejorar la perfusión renal, se administran 2 a 4 mg/kg/día de dopamina. En algunos casos puede prescribirse diurético a dosis bajas (Balasch y cols, 1996), aunque una vez que se corrige la hipovolemia con soluciones coloides el gasto urinario mejora.

En una revisión Cochrane de cinco estudios controlados y aleatorizados, en los que se incluyeron 378 mujeres, 193 de ellas en el grupo tratado con albúmina humana y 185 en el grupo de control, se concluyó que la administración intravenosa de albúmina disminuye la incidencia del síndrome severo de hiperestimulación ovárica en los casos de alto riesgo (Aboulghar, 2002). La aspiración o drenaje de ascitis y la punción folicular guiada por ultrasonografía a través del fondo de saco posterior (Raziel y cols, 1999), son procedimientos efectivos y necesarios, siempre y cuando se realicen bajo medidas adecuadas de asepsia y antisepsia para evitar infecciones. Se recomienda la toracocentesis en derrames pleurales de más de 40%, o bilaterales que afecten la mecánica ventilatoria. Existen casos aislados de autotransfusión de ascitis (Aboulghar, 1992; Barron y cols, 1994).

A pesar de la importancia de estos tratamientos enfocados a la estabilización y reversión de la sintomatología del síndrome una vez que se cursa, es más importante si cabe, el conocimiento de estrategias específicas orientadas a la prevención del SHO donde, de forma genérica, los aspectos más importantes de su prevención son, el conocimiento de los factores de riesgo y un juicio clínico con una inducción ovulatoria adecuada (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008). Cuando se afronta una situación de

elevado riesgo de SHO, se conocen diversas estrategias para reducir este riesgo las cuales se describen a continuación:

1.9.1.- ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN PRIMARIA

Las diversas estrategias conocidas para reducir el riesgo de SHO, se pueden dividir en dos tipos principalmente, estrategias de prevención primaria y estrategias de prevención secundaria. En la prevención primaria, el protocolo de estimulación es personalizado en base a una primera evaluación del riesgo de desarrollo del SHO, considerando los diferentes casos como bajas, normales o altas respondedoras. Por ello, las bajas respondedoras son sometidas a regímenes diferentes de estimulación con el fin de reclutar una cohorte ovocitaria mayor, mientras que para altas respondedoras, el protocolo de estimulación pretende producir una respuesta ovárica menor.

1.9.1.1.- Protocolo con antagonistas de la GnRH

Los antagonistas de la GnRH producen la supresión inmediata de la secreción de gonadotropinas. Son usados para suprimir el pico endógeno de LH después de que se haya comenzado la estimulación exógena con gonadotrofinas (Dittkoff y cols, 1991), lo que supone un menor reclutamiento folicular, una menor exposición a gonadotrofinas exógenas y la disminución de la duración total del tratamiento (European Orgalutran Study Group, 2000; European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001; North American Ganirelix Study Group, 2001). En este sentido, existen claras ventajas de uso de antagonistas de GnRH frente a los agonistas, ya que se evita el efecto “flare up”, no aparecen efectos secundarios menopaúsicos, se reduce el riesgo de formación de quistes, y se consigue reducir la duración del tratamiento por lo que se necesita menor cantidad de FSH (Humaidan y cols, 2010). A su vez, los antagonistas de GnRH producen una disminución inmediata de los niveles de estradiol tras su administración, lo cual se relaciona con un descenso de la secreción de VEGF y por ende de la permeabilidad vascular (Gustofson y cols, 2006; Tong y cols, 2008; Vrtacnik-Bokal y cols, 2009; Giles y cols, 2009).

Todos estos datos apuntan a un claro efecto beneficioso de los antagonistas de GnRH sobre la incidencia de SHO en comparación con el uso de agonistas de GnRH. En diversos meta-análisis y estudios prospectivos randomizados se ha observado una menor incidencia de SHO cuando se usaron antagonistas de GnRH (The ganirelix dose finding study group, 1998; Albano y cols, 2000; Olivennes y cols, 2000; Borm y Mannaerts, 2000; European and Middle East Orgalutran Study Group, 2001; Ludwig y cols, 2001; Ragni y cols, 2005; Al-Inany y cols, 2007).

Sin embargo, a pesar de estas ventajas, también existen resultados de estudios comparativos donde parece que se cuestiona la eficacia del uso de antagonistas de GnRH con respecto a los resultados obtenidos en el tratamiento de reproducción asistida. En una revisión Cochrane se ha concluido que, a pesar de que se reduzca significativamente la incidencia de SHO, también se produce un discreto perjuicio en la tasa de embarazo y nacido vivo, cuando se comparan regímenes con antagonistas frente a los protocolos largos estándar (Al-Inany y cols, 2007). De forma contradictoria, también existen otros trabajos cuyos datos no se encuentran en concordancia con los anteriores, en los cuales no se encuentran diferencias significativas entre ambos protocolos cuando se comparan las tasas de nacidos vivos (Kolibianakis y cols, 2006). De todas formas, es posible que las diferencias encontradas entre ambos estudios se puedan atribuir a diferentes metodologías empleadas para realizar los meta-análisis.

1.9.1.2.- Soporte de fase lútea con progesterona

El soporte de la fase lútea es necesario para el mantenimiento del embarazo temprano en ciclos donde se ha suprimido terapéuticamente la producción de gonadotropinas por parte de la pituitaria. Sin embargo, el soporte de la fase lútea con hCG se asocia con un mayor riesgo de SHO y debe evitarse cuando los niveles de estradiol superan los 2700 pg/ml y existen más de 10 folículos (Fatemi y cols, 2007). La progesterona (P4) es igualmente efectiva que la hCG para el soporte de la fase lútea pero con un reducido riesgo de desarrollar SHO (Prakash y cols, 2009; Daya y Gunbi, 2004). La eficacia y seguridad de la progesterona en el mantenimiento de la fase lútea ha sido fuertemente demostrado con un gran trabajo prospectivo, multicéntrico y aleatorizado de 1211 pacientes sometidas a un tratamiento de FIV, donde las que recibieron P4 experimentaron altas tasas de nacimientos (35-38%) y baja incidencia de SHO (6-7%) (Doody y cols, 2008).

Una alternativa a la P4 ha sido sugerida mediante repetidas administraciones intranasales de GnRH, sin embargo se necesitan estudios más amplios que den soporte a esta práctica. Por tanto en función de las evidencias actuales, se recomienda que en los ciclos donde se usen análogos de la GnRH se realice el mantenimiento de la fase lútea usando P4, con o sin suplemento de E2, mejor que con hCG (Humaidan y cols, 2010).

1.9.1.3.- Maduración in vitro de los ovocitos

La forma más segura de prevenir el SHO sería minimizar todo lo posible la estimulación ovárica. En estos ciclos de maduración in vitro de los ovocitos, los ovocitos inmaduros se recuperarían de unos ovarios apenas estimulados o no estimulados en absoluto. Los ovocitos madurarían en un medio de cultivo definido durante 24-48 horas y posteriormente serían

fecundados in vitro o microinyectados. La transferencia embrionaria se llevaría a cabo de forma normal, con dos o tres embriones transferidos el día 2 o 3 tras la fecundación. El no estimular los ovarios proporciona muchos beneficios como son la reducción del coste en los tratamientos, la desaparición del riesgo de SHO, y la reducción del número total de visitas de pacientes para evaluaciones clínicas y de laboratorio (Lanzendorf, 2006).

Los ensayos clínicos realizados sobre mujeres con PCO usando esta técnica de maduración ovocitaria, demostraron una tasa de embarazo adecuada por cada embrión transferido (20-54%) y unas tasas de implantación aceptables (5.5-34.5%) (Suikkari, 2008). Estas tasas se presentan relativamente inferiores cuando se evaluaron mujeres ovulatorias normales, obteniendo una tasa de embarazo por embrión transferido de entre 15 y 33.3% y una tasa de implantación entre 8.8 y 22,6%. En la literatura han sido reportados aproximadamente 400 nacimientos usando esta técnica, donde el seguimiento post-natal realizado ha concluido en resultados aceptables (Suikkari, 2008).

El empleo de hCG previo a la recuperación ovocitaria, proporcionó una mayor tasa de maduración ovocitaria, una preparación endometrial más adecuada, y una mayor tasa de implantación, lo cual a su vez, dio como resultado un incremento de la tasa de embarazo por cada embrión transferido hasta aproximadamente un 40% (Son y cols, 2008a, b).

Aunque se han reportado resultados remarcables en algunas clínicas, esta técnica de maduración in vitro no ha llegado a ser considerada como alternativa de rutina en los tratamientos de fertilidad. Los motivos más relevantes para esto son las dificultades técnicas que supone recuperar los ovocitos inmaduros en ovarios no estimulados y cultivarlos, por otro lado los resultados de nacimientos vivos están por debajo de los tratamientos convencionales, y por último sobre los ovocitos humanos inmaduros, se han reportado mayores incidencias de anomalías meióticas y cromosómicas (Lanzendorf, 2006).

1.9.1.4.- Agentes sensibilizadores de la insulina

La resistencia a la insulina con hiperinsulinemia compensatoria se cree que puede jugar un papel fisiológico muy importante en la disfunción ovárica (Adashi y cols, 1985; Barbieri y cols, 1986) y el hiperandrogenismo (Dunaif y cols, 1989; y cols, 1991) asociado a mujeres PCO. Es conocido que la insulina estimula la expresión proteica del VEGF y su secreción (Prakash y cols, 2009), siendo esta estimulación significativamente mayor en mujeres con ovario poliquístico (Stanek y cols, 2007). El mecanismo de acción de los agentes sensibilizadores de la insulina para reducir la incidencia de SHO, podría ser debido a la mejora de la sensibilidad a la insulina y a la reducción de la hiperinsulinemia que producen estos agentes. De esta forma, mejora o se reduce la sintomatología de ovario poliquístico y se

reduce a su vez el riesgo de padecer SHO. Esto quizá pudiese explicarse debido al hecho de que las células de la granulosa de mujeres PCO son más sensibles a la insulina en términos de mayor secreción de VEGF en ensayos in vitro (Stanek y cols, 2007), y por ello una normalización de la hiperinsulinemia en estos casos, podría inducir una disminución de la secreción de VEGF en sus células de la granulosa.

Existen diferentes agentes empleados con este fin como puede ser la tiazolidinediona, la cual es un tipo de agente sensibilizador de la insulina pero asociado con una mayor morbilidad cardíaca que puede contraindicar su uso en mujeres sanas con PCO (Dunaif, 2008). Sin embargo, la metformina es poco costosa y efectiva en la sensibilización de la insulina, con un perfil seguro de uso, la cual en mujeres PCO ha sido reportada como un agente reductor del riesgo de SHO (Costello y cols, 2006).

1.9.2.- ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN SECUNDARIA

Los métodos de prevención secundaria del SHO se llevan a cabo ante la presencia de factores de riesgo derivados de una excesiva respuesta ovárica tras el tratamiento de reproducción asistida, implicando la retirada, disminución, retraso o modificación de elementos del protocolo de estimulación con el fin de evitar el SHO en estos pacientes.

1.9.2.1.- Coasting

El “coasting” es una estrategia preventiva de SHO donde se pospone la administración de hCG en mujeres que responden a la estimulación ovárica con altos niveles de estradiol en plasma, hasta que estos niveles bajan hasta valores considerados seguros (Nardo y cols, 2006). En un estudio retrospectivo (Ho Yuen y cols, 2008) se vio que la retirada de la administración de gonadotropinas durante al menos 3 días en mujeres con alto riesgo de SHO, se asociaba con un 63% de reducción de estradiol plasmático (de 18043 a 6656 pmol/L), mientras que tan solo se reducía un 29% (de 14205 a 10132 pmol/L) en mujeres con alto riesgo a las cuales se le continuaba la administración de gonadotropinas. Teniendo en cuenta la duración del coasting, la no adición de gonadotropinas durante 3 días como máximo, podría disminuir el riesgo de SHO sin alterar la tasa de embarazo. Por otro lado, si esta retención en la administración de gonadotropinas es de 4 o más días, se podría ver reflejado en una menor tasa de implantación, probablemente debido a un efecto sobre la receptividad endometrial (Nardo y cols, 2006).

Recurrir al coasting normalmente se considera en base al nivel de estradiol obtenido el día de la administración de gonadotropinas. Sin embargo, no existe un consenso respecto a un valor mínimo que indique que esta administración se debe detener. En la mayoría de los

artículos publicados, el corte de estradiol se encuentra entre 2500 y 4000 pg/ml (Gera y cols, 2010; Moon y cols, 2008; Yilmaz y cols, 2009).

El por qué se manifiesta una prevención del SHO mediante el coasting sigue siendo incierto. Una posible explicación podría ser el incremento de la tasa de apoptosis en los folículos ováricos, principalmente en aquellos por debajo de 14 mm. Todos estos folículos son los principales responsables del incremento de estradiol sérico y de compuestos vasoactivos, existiendo una consecuente reducción tanto en el estradiol sérico como en la producción folicular y expresión génica del VEGF, siendo probablemente la disminución de este factor vasoactivo tan determinante, el mecanismo responsable del efecto preventivo que proporciona el coasting sobre el SHO (García-Velasco y cols, 2004).

Las evidencias actuales siguen siendo insuficientes para poder determinar si esta estrategia es efectiva para prevenir el SHO (D'Angelo y Amsó, 2002a). A pesar de que el coasting es una de las estrategias más usadas para prevenir el SHO, siendo considerada muy beneficiosa debido a la evidente caída de estradiol que produce, aún existe una carencia de estudios aleatorizados donde se pueda comparar el efecto del coasting frente al no coasting.

A pesar de los buenos resultados comentados anteriormente, es preciso señalar que la incidencia de SHO alcanza el 9,4% de los casos aunque se llegue a realizar el coasting (Huddleston y cols, 2008).

1.9.2.2.- Disminución de la dosis de hCG

La administración de 10000 UI de hCG para la inducción de la ovulación en los tratamientos de reproducción asistida, es la dosis históricamente más aceptada. Como anteriormente se ha citado, la dosis de hCG está directamente relacionada con el incremento de la incidencia de SHO de forma dosis dependiente, por lo que con el fin de reducir la incidencia de SHO se ha propuesto reducir o ajustar esta dosis de hCG a un rango de 5000 a 2500 UI (revisado en Nastri y cols, 2010).

En un estudio retrospectivo de 250 ciclos, se comparó la dosis habitual de 5,000 UI frente a una dosis reducida a 3300 UI. No se encontraron diferencias en la proporción de ovocitos maduros, tasas de fertilización y embarazo entre ambos grupos, permitiendo considerar que la reducción de hCG no perjudica los resultados del tratamiento de FIV (Schmidt y cols, 2004). Más recientemente, un estudio piloto ha evaluado la seguridad y eficacia del uso de dosis de 2500 UI de hCG en 21 mujeres con alto riesgo de SHO. En este estudio no se observó ningún caso de SHO moderado o severo, y la tasa de embarazo fue bastante alta (61,9%), permitiendo a los autores llegar a la conclusión de que esta estrategia no altera los resultados del tratamiento de fertilidad y además podría reducir la incidencia de

SHO (Nargund y cols, 2007). De todas formas, es importante destacar que la mayoría de los resultados publicados sobre la efectividad de esta estrategia sobre la reducción de la incidencia del SHO, proceden de estudios no controlados, con pocos casos y/o retrospectivos. Para poder confirmar la disminución de la incidencia de SHO tras la inducción de la ovulación con dosis reducidas de hCG, es necesario todavía el desarrollo de trabajos prospectivos aleatorizados y controlados con una mayor casuística.

1.9.2.3.- Criopreservación de embriones

Otra alternativa para prevenir el SHO consiste en realizar el ciclo de estimulación normal pero sin llegar a transferir los embriones, siendo criopreservados para ser reimplantados más tarde cuando los niveles hormonales del paciente no estén elevados. A pesar de todo, la fase temprana del SHO puede darse (Aboulghar y cols, 2003; Wada y cols, 1992; Queenan y cols, 1997; D'Angelo y Amso, 2002b), pero con esta estrategia se evita la fase tardía del SHO ya que se descarta la posibilidad del incremento de hCG asociada con el embarazo (Wada y cols, 1992; Amso y cols, 1990; Salat-Baroux y cols, 1990). La mayor desventaja de esta técnica es que la tasa de éxito de embarazo usando embriones congelados es generalmente menor que con embriones en fresco (Wright y cols, 2008). Aunque con la aparición de la vitrificación se consigue reducir considerablemente el daño infringido a los embriones por la congelación, lo cual podría mejorar las posibilidades éxito, sin embargo todavía se necesitan estudios a mayor escala. A día de hoy, la evidencia de la eficacia de esta técnica sigue siendo conflictiva (Delvigne y Rozenbergr, 2002a). Esto se justifica al menos por las diferencias existentes en los diseños experimentales, los grupos de población y las técnicas de criopreservación. Uno de los pocos estudios prospectivos randomizados que comparan la transferencia de embriones en fresco con los criopreservados en 125 mujeres con alto riesgo de SHO, ha reportado que 4 de 67 mujeres desarrollaron SHO severo necesitando hospitalización después de la transferencia de embriones en fresco, comparado con ninguno de los 58 casos donde se transfirieron embriones congelados, aunque estos datos no fueron estadísticamente significativos (Ferraretti y cols, 1999). Un factor que podría haber alterado los resultados obtenidos fue que en ambos tratamientos los pacientes recibieron 20 g de albúmina humana intravenosa el día de la recuperación ovocitaria, lo cual pudo tener alguna influencia en los resultados. Además los criterios para considerar a las mujeres con alto riesgo de SHO fueron más conservadores que en los usados por otros investigadores (Sills y cols, 2008).

Por ahora se necesitan más estudios randomizados controlados sobre esta estrategia preventiva de SHO.

1.9.2.4.- Cancelación de ciclo

La cancelación del ciclo y la no adición de hCG es la única estrategia que garantiza la prevención del SHO (Schenker y Weinstein, 1978). Es importante tener en cuenta que en ciclos de estimulación ovárica donde no se usan análogos de GnRH, se produce un pico natural de LH que podría dar lugar a la ovulación y al embarazo natural en algunos casos, existiendo por tanto la posibilidad de desarrollar SHO tardío. Por ello se deben tomar las suficientes precauciones anticonceptivas en estos casos de alto riesgo de SHO que cancelan el ciclo.

A pesar de que la cancelación de ciclo sea el mejor preventivo para el SHO, existen causas emocionales y económicas que lo conviertan en la estrategia menos usada. Los pacientes son reacios a perder un ciclo de estimulación y a pesar de ser informados de los riesgos, deciden seguir adelante con el tratamiento de FIV (Humaidan y cols, 2010).

1.9.2.5.- Inducción de ovulación sin hCG

Las complicaciones del SHO podrían ser teóricamente prevenidas si se evita a usar la hCG como inductor de la ovulación, ya que no se han observado casos de SHO moderado o severo cuando no se administra esta hormona (revisado en Nastri y cols, 2010). La LH recombinante podría ser un sustituto de la hCG más seguro (Manau y cols, 2002), pero debido a que la dosis equivalente a 5000 UI de hCG en LH recombinante estaría entre 15000 y 30000 UI y a su elevado coste económico, su uso no es tenido en cuenta como una alternativa factible (European Recombinant LH Study Group, 2001).

Los agonistas de GnRH también pueden ser sustitutos de la hCG en un protocolo de estimulación con antagonistas de la GnRH o con gonadotrofinas únicamente. Sustituir la hCG por estos agonistas sí que sería aceptable en cuanto a costes, con unas buenas tasas de embarazo y una disminución drástica en la incidencia de SHO moderado y severo (Diedrich y cols, 2001; Engmann y cols, 2008; Bodri y cols, 2009; Galindo y cols, 2009). La administración de un bolo de agonistas de GnRH, genera en la pituitaria un pico (flare up) de liberación de gonadotrofinas (LH y FSH), simulando el pico que se produce a mitad de ciclo de forma natural, y dando lugar a la maduración y ovulación final de los ovocitos estimulados (Gonen y cols, 1990; Itskovitz y cols, 1991). El conocimiento de que estos agonistas podían ser usados como inductores de la ovulación para evitar el desarrollo de SHO en pacientes de alto riesgo de padecerlo, fue introducido por Itskovitz hace más de 20 años (Itskovitz y cols, 1988), existiendo a partir de entonces diferentes estudios que confirman estos efectos beneficiosos sobre la incidencia del SHO. En un trabajo con 16 mujeres, las cuales previamente habían desarrollado SHO tras un protocolo largo de estimulación con agonistas de la GnRH y con inducción de

ovulación con hCG, no desarrollaron en ningún caso el SHO, cuando tras ser estimuladas en otro ciclo, la maduración ovocitaria fue inducida con agonistas de GnRH (Lewit y cols, 1996). A través de ensayos a pequeña escala sobre mujeres con alto riesgo de desarrollar SHO, también se confirmó que el uso de estos agonistas reducía o incluso eliminaba la incidencia del síndrome. En uno de estos estudios donde se incluyeron 28 pacientes, 4 de 13 (30,8%) tratadas con hCG desarrollaron SHO moderado o severo, mientras que de las 15 pacientes tratadas con agonistas de GnRH para inducir la ovulación, ninguna desarrollo SHO ($P < 0,05$) (Babayof y cols, 2006). Un estudio más amplio, con 66 mujeres con alto riesgo de SHO proporcionó resultados similares a los anteriores. De 32 pacientes que recibieron hCG, 10 de ellas desarrollaron SHO (31,3%), mientras que en el grupo que recibió el bolo de agonistas de GnRH no se registró tampoco ningún caso (Engamnn y cols, 2008). Muy recientemente se ha publicado otro trabajo en el que tampoco se desarrolla el síndrome en mujeres PCO a pesar de los altos niveles de estradiol, cuando se dispara la ovulación mediante agonistas de GnRH (Manzanares y cols, 2010).

La posible explicación de por qué se reduce la incidencia de SHO cuando se induce la ovulación con agonistas de GnRH, podría estar relacionada con el acortamiento del pico de LH endógena que se produce mediante esta inducción, cuando se compara con la estimulación del receptor LH/hCG de forma continua durante 7-9 días tras un bolo de 10000 UI de hCG, así como el efecto negativo que producen los niveles supra fisiológicos de esteroides sobre la secreción de LH en la pituitaria (Humaidan y cols, 2011). Con el fin de comprender el origen de estos efectos beneficiosos sobre el SHO, diversos trabajos se han centrado en explorar la modulación diferencial de mediadores vasoactivos como el VEGF, Ang-2 y sVE-cadherina, sobre voluntarios que se han sometido a estimulación ovárica, seguida de una maduración e inducción ovulatoria con hCG o con agonistas de GnRH. De esta forma se ha podido determinar que estos agonistas de GnRH disminuyen significativamente el VEGF tanto a nivel de RNAm como de su proteína, en comparación con la hCG (Cerrillo y cols, 2009; Cerrillo y cols, 2010). Estos resultados sugieren que el pico endógeno de LH inducido por la GnRH no solo es de corta duración, sino que el receptor de LH/hCG es activado de forma débil.

Parece evidente que la sustitución de la hCG por agonistas de GnRH para disparar la maduración ovocitaria y su ovulación, presenta una efectividad confirmada sobre la incidencia del SHO, pero a pesar estos buenos resultados, existen publicaciones con datos contradictorios sobre los resultados reproductivos en los tratamientos que no utilizan la hCG como inductor de la ovulación. Por un lado se han reportado resultados reproductivos totalmente normales (Babayof y cols, 2006), mientras que otros autores publican una tasa de embarazo considerablemente baja (6%) con una alta tasa de pérdida del embarazo (80%) (Engmann y

cols, 2008) cuando se induce la ovulación con agonistas de GnRH en lugar de hCG. En ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados, de nuevo se observa que el uso de estos agonistas presenta desventajas frente la hCG en cuanto a un incremento extremadamente alto de la tasa de pérdida temprana del embarazo, a pesar de la suplementación con progesterona vaginal y estradiol oral como soporte de la fase lútea (Kolibianakis y cols 2005; Humaidan y cols, 2005). Estos datos negativos parecen estar relacionados a una insuficiencia de fase lútea, debido a unos niveles de LH circulante demasiado bajos (Humaidan y cols, 2005; Humaidan y cols, 2006; Humaidan y cols, 2009). Esta hipótesis toma peso cuando se observan los buenos resultados sobre la tasa de recién nacido vivo en los casos en los que se induce la ovulación con agonistas de GnRH, se criopreservan los embriones y se pospone la transferencia embrionaria (Griesinger y cols, 2007; Manzanares y cols, 2010). En una revisión muy reciente, se observa que actualmente se están logrando alcanzar resultados muy similares a los obtenidos mediante la inducción ovulatoria con hCG, trabajando en los protocolos de soporte de fase lútea. De esta forma se concluye que la incidencia de SHO es 0% tanto en los casos de FIV en fresco con transferencia embrionaria, como en donaciones de ovocitos, cuando se induce la ovulación con agonistas de GnRH. Mientras que con un soporte de fase lútea modificado se mejora significativamente la tasa de parto tras la inducción ovulatoria con agonistas de GnRH, hasta niveles muy similares a los casos inducidos con hCG, aunque todavía sigue presente una diferencia no significativa en favor de la hCG (Humaidan y cols, 2011).

1.9.2.6.- Administración de macromoléculas

La albúmina es un componente del plasma de bajo peso molecular con un importante papel en la presión osmótica. La albúmina humana se ha usado administrándose de forma intravenosa el mismo día de la inyección de hCG para prevenir el SHO en mujeres con alto riesgo. Sin embargo, su eficacia continua siendo objeto de debate. En 2002 se publicó una revisión (Aboulghar y cols, 2002) que incluía 5 ensayos controlados aleatorizados, donde evaluaba el uso de albúmina en 193 mujeres y 185 controles. El odd-ratio para SHO en los grupos tratados con albúmina fue 0.28 (95% IC 0.11-0.73). En función de este estudio, se necesitan tratar 18 mujeres con alto riesgo de desarrollar SHO para conseguir prevenir uno.

Sin embargo, otros estudios no han encontrado ningún beneficio en esta estrategia (Isikoglu y cols, 2007; Bellver y cols, 2003). Uno de estos estudios controlados aleatorizados incluía 998 mujeres con alto riesgo de SHO, con una administración de 40 g de albúmina humana justo después de la recuperación ovocitaria y comparado con los controles sin tratamiento, observando que después de 7 días de seguimiento no existían diferencias significativas en la tasa de hemoconcentración, disfunción renal o hepática, o la incidencia de

SHO moderado o severo entre ambos grupos (Bellver y cols, 2003). Estos autores concluyeron que la infusión de albúmina el día de la punción folicular no es una estrategia útil para prevenir el SHO. Además debido a su origen humano, la albumina presenta el inconveniente de que no se puede excluir totalmente la transmisión de virus (Vloeberghs y cols, 2009).

Una alternativa al uso de albúmina es el expansor de plasma sintético llamado hidroxietil almidón (HES). Este expansor se ha mostrado prometedor como medida preventiva para el SHO en ciclos de alto riesgo (Prakash y cols, 2009), además es más seguro que la albúmina debido a su origen sintético por lo que no contempla la transferencia viral (Graf y cols, 1997). Su mecanismo de acción es similar a la albúmina, y aunque se ha publicado en varias ocasiones su efecto reductor sobre la incidencia del SHO moderado/severo (Graf y cols, 1997; König y cols, 1998; Gokmen y cols, 2001), todavía son necesarios estudios donde se incremente el número de casos para poder considerar el uso de HES como recomendación para prevenir el SHO (Vloeberghs y cols, 2009).

1.9.2.7.- Bloqueo del sistema renina-angiotensina

Se han reportado 2 series de casos (Ando y cols, 2003; Ata y cols, 2008) donde se ha realizado un bloqueo doble combinando el uso de un bloqueante del receptor de la angiotensina y un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. Considerando estos dos estudios, se estudiaron 14 mujeres con alto riesgo de SHO (estradiol >8000 pg/ml), de entre las cuales se dieron 2 casos de SHO moderado/severo (14,4%). En ambos estudios, los embriones fueron criopreservados y la transferencia se produjo posteriormente. Sin embargo, la activación del sistema renina-angiotensina es probablemente un efecto y no la causa del SHO, y se deben tener precauciones cuando se considera esta estrategia preventiva, ya que pueden existir efectos nocivos sobre el feto y también la posibilidad de empeorar el fallo renal asociado al SHO (Manno y Tomei, 2008).

1.9.2.8.- Administración de anti-inflamatorios no esteroideos

La administración de aspirina a bajas dosis (100 mg diarios, desde el primer día de la estimulación ovárica) se ha visto efectiva en la prevención del SHO entre mujeres con alto riesgo de desarrollarlo tras ser evaluado en un ensayo controlado y randomizado (Varnagy y cols, 2009). Este estudio recopiló 2425 ciclos donde se usaron agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas. De entre 1192 mujeres con alto riesgo, 780 al azar recibieron aspirina, observándose que la incidencia de SHO fue del 0,25% comparado con el 8,4% en las 412 mujeres que no fueron tratadas. Las tasas de embarazo fueron similares.

Otro anti-inflamatorio usado con este fin es el Meloxicam, el cual se ha estudiado en modelos animales (Quintana y cols, 2008), donde se ha observado la reducción de incidencia del SHO asociado con el incremento del tamaño ovárico y con la expresión del VEGF.

1.9.2.9.- Administración de agonistas dopaminérgicos

Los primeros indicios que relacionaron el SHO con la administración de dopamina surgieron de ensayos clínicos no aleatorizados, en los que se indicaba el uso de la dopamina como método paliativo para mejorar la perfusión del parénquima renal y evitar el fallo renal agudo en pacientes que desarrollaron el síndrome. El uso de 0,18 mg/kg/h de dopamina intravenosa en pacientes con SHO severo que presentaban oliguria, demostró una dilatación de los vasos renales y el incremento del flujo sanguíneo renal sin llegar a afectar a la presión sanguínea ni la frecuencia cardíaca (Ferraretti y cols, 1992), concluyendo en resultados satisfactorios de mejoría sobre la diuresis y la recuperación de la sintomatología clínica del síndrome. Estos resultados volverían a reproducirse años después en otros estudios, donde la administración de docarpamina (un precursor de dopamina) en 27 pacientes hospitalizadas por SHO, mejoró gradualmente la diuresis y la ascitis (Tsunoda y cols, 2003).

Estos compuestos presentan baja toxicidad, siendo usados de forma efectiva para el control de la secreción de leche materna y para el tratamiento de la hiperprolactinemia producida tanto por micro como por macroprolactinomas (Gillam y cols, 2006; Colao y cols, 2007; Buhendwa y cols, 2008). Usados durante el embarazo, los agonistas dopaminérgicos, no suponen un incremento del riesgo de aborto espontáneo, partos prematuros, embarazos múltiples o anomalías congénitas (Mornex y cols, 1978; Robert y cols, 1996; Ciccarelli y cols, 1997; Liu y Tyrrell, 2001; Ricci y cols, 2002; Martin y cols, 2009). Concretamente, la prolactina, es una hormona hipofisaria que también se sintetiza en otros tejidos como el útero y las glándulas mamarias, la cual se ve contrapuesta con el uso de la dopamina y sus análogos, de tal modo que sobre mujeres hiperprolactinélicas tratadas con agonistas dopaminérgicos que a su vez desarrollaban SHO, no solo se observó la remisión del prolactinoma, para lo cual estaba indicado el tratamiento, sino que también mostraron una sensibilidad ovárica menor, resultando en un menor número de folículos estimulados, niveles de estradiol sérico más bajos, y algo más relevante si cabe, la reducción de la incidencia del SHO (Papaleo y cols, 2001 y Murata y cols, 2003).

A pesar de esta acción beneficiosa observada sobre la incidencia de SHO, en ese momento no se planteaba la existencia de un mecanismo molecular específico que fuese responsable de esos resultados y que permitiese usar los agonistas dopaminérgicos como un

tratamiento para el SHO. Los primeros esbozos para determinar ese mecanismo no tendrían lugar hasta 2001, tal y como se describe en el apartado 1.14 de esta tesis doctoral.

1.9.3.- ESTRATEGIAS NO RECOMENDADAS

Existen algunas estrategias a las que se ha podido recurrir como medidas preventivas, las cuales podrían considerarse no recomendadas por diversos motivos. Por ejemplo la aspiración folicular donde se produce la aspiración de las células de la granulosa de uno de los ovarios, dando lugar a sangrado intraovárico y limitando la producción de mediadores de SHO, permitiendo además el desarrollo contralateral del otro ovario (Gronen y cols, 1991).

A pesar del éxito de esta técnica en manos de algunos investigadores, la retirada del aspirado folicular no es algo sencillo e incluye costes, malestar al paciente y una necesidad de procedimientos invasivos bajo anestesia. Por estos motivos, y ya que existen otras alternativas con mayor peso de evidencia que las soporta, esta estrategia no es recomendada.

Otra estrategia controvertida es el uso de inhibidores de la aromatasa. La aromatasa interviene en la producción de estrógenos (Santen, 2003). Los inhibidores de esta enzima podrían ayudar a reducir el exceso de estradiol que se sintetiza durante la estimulación ovárica y como consecuencia reducir el riesgo de desarrollar SHO. Sobre este tema no se han realizado suficientes trabajos que evalúen el impacto de los inhibidores de la aromatasa sobre el SHO en mujeres con infertilidad anovulatoria asociada con PCO. Los ensayos clínicos sobre los inhibidores de la aromatasa se han centrado en estudiar su habilidad para incrementar la respuesta a la FSH en bajas respondedoras (Erstad y cols, 1991). Es por ello por lo que aunque los efectos antiestrogénicos de estos agentes parecen ser prometedores en la prevención o reducción del riesgo de SHO, aún no pueden ser recomendados para un uso clínico (Humaidan y cols, 2010).

1.10.- EL SISTEMA VEGF/VEGFR2

Por su papel preponderante en el desarrollo del SHO, el sistema VEGF/VEGFR2 merece un apartado específico, donde poder ampliar con suficiente detalle la información referida a los componentes que establecen el sistema y cómo interaccionan entre sí para dar lugar a las diferentes respuestas fisiológicas sobre los fenómenos vasculares.

1.10.1.- Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

En 1983, Senger describió una proteína capaz de aumentar la permeabilidad vascular en la piel de cobayas (Senger y cols, 1983). Esta proteína, es una citoquina multifuncional (Senger y cols, 1993) aislada a partir de las proteínas secretadas en las pequeñas venas hiperpermeables que rodean los tumores (Senger y cols, 1983). Posteriormente, Ferrara y Henzel, paralelamente a Ploüet y colaboradores (1989), describieron de forma independiente la purificación y secuenciación de un factor mitógeno específico de la célula endotelial, que en estudios posteriores se demostró ser la misma proteína, al que llamaron de forma diferente: factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Ferrara y Henzel, 1989) y vasculotropina (Ploüet y cols, 1989).

La familia del VEGF está formada por el VEGF-A y sus homólogos VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y el factor de crecimiento derivado de placenta (PlGF). El VEGF, a veces conocido como VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (VPF) (Ferrara y Henzel, 1989; Senger y cols, 1983), realmente es una glicoproteína básica dimérica de 34 a 45 kDa, capaz de ligar heparina y formada por polipéptidos con extremo N-terminal idénticos unidos por puentes disulfuro. Los mayores niveles de ARNm del VEGF-A en tejidos normales se encuentran en pulmón, riñón, corazón y glándula adrenal, encontrándose por el contrario los más bajos pero aún detectables, en hígado, bazo y mucosa gástrica. El VEGF-A es el principal miembro implicado en los procesos angiogénicos, mientras que el VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D se relacionan principalmente con la linfangiogénesis.

El gen del VEGF humano se localiza en el cromosoma 6 (6p12) (Wei y cols, 1996) estando formado por 8 exones (Figura 1). Mientras los exones 1 a 5 y 8, siempre están presentes en el ARNm del VEGF, la expresión de los exones 6 y 7 se regula por división alternativa. Es por ello que el VEGF-A presenta seis isoformas que varían entre 121 y 206 aminoácidos: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 y VEGF206 (Tischer y cols, 1991; Houck y cols, 1991).

Gen del factor de crecimiento del endotelio vascular

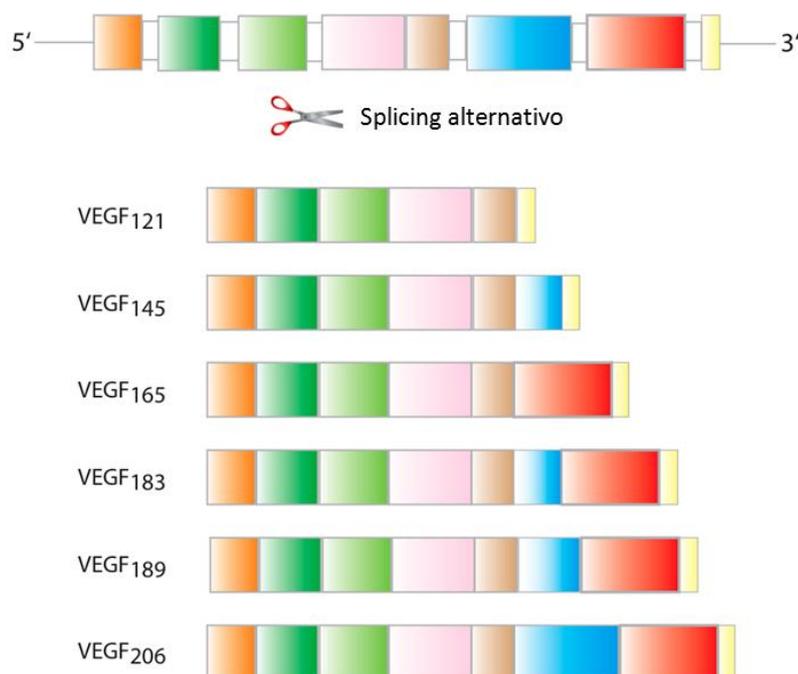


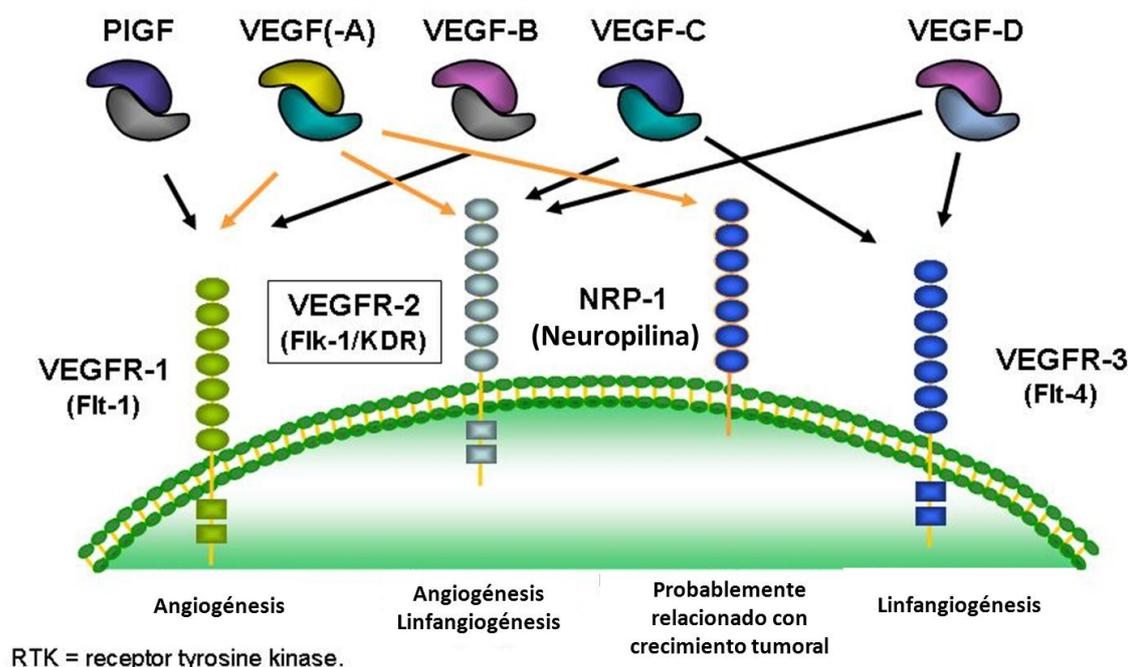
Figura 1. Modelo de corte alternativo para el ARNm de VEGF y que genera 6 isoformas de VEGF. Los exones se representan por cuadros de colores, mientras que los intrones son los pequeños cuadrados blancos que separan los exones. Todas las isoformas tienen unos exones comunes y se distinguen por las diferentes combinaciones de corte y empalme entre el resto de exones que no son comunes. Imagen obtenida de Wikipedia.org.

Una gran diferencia entre estas isoformas radica en la afinidad que presentan por la heparina, lo que afecta a su unión celular y a la matriz extracelular (Ferrara y Alitalo, 1999). El dominio de unión a la heparina está codificado por el exón 6 y es determinante para la unión a la matriz extracelular, por lo que las isoformas que contienen este dominio (VEGF-A145, VEGF-A189 y VEGF-A206) se encuentran fuertemente unidas a esta matriz (Houck y cols, 1992; Park y cols, 1993), siendo detectadas en la mayoría de los tejidos que expresan VEGF, salvo la isoforma 206 que solamente se ha detectado en hígado fetal humano (Houck y cols, 1991). Sin embargo esta afinidad por la heparina es variable, y el VEGF-A165, que es la forma molecular predominante, posee solamente un dominio de unión a heparina, codificado por el exón 7, quedando su afinidad reducida, de forma que una proporción significativa se mantiene unida mientras que la otra parte es soluble (Houck y cols, 1992). El VEGF-A121, que no posee los dominios codificados por los exones 6 y 7, no tiene la capacidad de unión a la heparina y por lo tanto es una proteína que se encuentra de forma libre y soluble. Las diferencias en el punto

isoelectrónico y de afinidad a la heparina, son determinantes para la biodistribución del VEGF en los tejidos (Houck y cols, 1992). El VEGF-A145, VEGF-A189 y VEGF-A206, pueden ser liberados de la matriz extracelular por la acción de una proteasa, la plasmina (Houck y cols, 1992), por lo que el VEGF-A disponible para las células se obtiene bien por secreción de isoformas solubles o por escisión proteolítica de isoformas unidas.

1.10.2.- Papel del VEGF y sus receptores sobre los fenómenos de angiogénesis y permeabilidad vascular (PV)

De las 6 isoformas del VEGF, el VEGF121 y VEGF165 parecen ser las más implicadas en el proceso de angiogénesis (Watkins y cols, 1999). El sistema de ligandos tiene sus receptores específicos presentes en las membranas de las células endoteliales y que pertenecen a la familia de la Tirosin-quinasa (de Vries y cols, 1992). Estos receptores (Figura 2), son el VEGFR-1 (también llamado flt-1), el VEGFR-2 (también Flk-2/KDR) y el VEGFR-3 (o flt-4) (Waltenberger y cols, 1994; Shalaby y cols, 1995). Tal y como posteriormente se detalla el VEGFR-2 parece ser el más implicado en el proceso de angiogénesis, vasculogénesis y permeabilidad vascular (Shalaby y cols, 1995; Verheul y cols, 2000).



Dvorak. *J Clin Oncol*. 2002;20:4368; Ferrara et al. *Nat Med*. 2003;9:669.

Figura 2. Receptores del VEGF. Las diferentes moléculas de VEGF pueden ser reconocidas por diferentes receptores de VEGF desempeñando funciones concretas relacionadas con la vascularización. Otros factores diferentes al VEGF pueden ser reconocidos por el receptor del VEGF y desempeñar funciones similares de angiogénesis, como es el caso del factor de crecimiento placentario (PIGF) que puede activar el VEGFR-1. Por otro lado, el VEGF-A además de poder unirse a los 3 receptores del VEGF, puede ser reconocido por otro receptor diferente como es la neuropilina-1. Los efectos de esta unión no están muy claros, aunque se relaciona con el crecimiento tumoral. Adaptado de Dvorak, 2002 y Ferrara y cols, 2003.

El VEGF, cuando actúa sobre células endoteliales en cultivo, es capaz de inducir cambios en la expresión génica (Pepper y cols, 1992, Unemori y cols, 1992), la acumulación de calcio citoplasmático (Brock y cols, 1991), cambios en la morfología (Senger y cols, 1993), división, proliferación (Connolly y cols, 1989; Whelan y Vlahos, 2000), migración celular (Ferrara y cols, 1992), incrementar la PV con un valor 1000 veces superior al de la histamina (Feng y cols 1996), agente vasoactivo por excelencia, e inducir angiogénesis *in vivo* (Leung y cols, 1989; Ferrara y Davis-Smith, 1997; Whelan y Vlahos, 2000).

Ferrara y Henzel (1989), describieron el VEGF como un potente agente mitógeno cuya acción estaba referida a las células endoteliales de la micro y macrovasculatura de arterias, venas y vasos linfáticos, careciendo de actividad mitógena en otros tipos celulares, por lo que se pudo considerar como un factor mitógeno específico de células endoteliales.

También es conocido que el VEGF aumenta de forma considerable la permeabilidad vascular (Dvorak y cols, 1995), la cual es una vía indirecta de estimulación de la angiogénesis que precede o se produce de forma simultánea a su acción sobre las células endoteliales y que se ha demostrado ser un paso clave en el proceso de angiogénesis.

La forma activa del VEGF es un homodímero y las diferentes isoformas aparentemente presentan la misma actividad biológica a la hora de inducir la proliferación celular (Houck y cols, 1992). La isoforma de 121 aminoácidos es más soluble, mientras que las más grandes tienen, debido a los dominios presentes en los exones 6 y 7, una gran afinidad por los proteoglicanos de la superficie celular (Park y cols, 1993). Por esta razón se ha sugerido que las isoformas más cortas serían las encargadas de desplazarse hacia los focos de lesión tisular, donde es necesaria la neoformación de vasos para la reparación del tejido (Watkins y cols, 1999). En la mayoría de las situaciones, la isoforma de 165 aminoácidos es la más abundante (Li y cols, 1995; Soker y cols, 1996; Ferrara y Davis-Smith, 1997).

El fenómeno de angiogénesis es considerado como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente (Folkman y Klagsbrun, 1987). Es necesaria tanto para el desarrollo y diferenciación del endotelio, como para la reparación de los órganos dañados (Schwartz y cols, 1990; Klagsbrun y D'Amore, 1991). El VEGF facilita la angiogénesis en modelos *in vitro*, estimulando la formación de estructuras similares a capilares y la invasión en geles de colágeno de las células endoteliales (Pepper y cols, 1992). En modelos *in vivo* ejerce una fuerte respuesta angiogénica (Folkman y Klagsbrun, 1987; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Folkman y Davis-Smith, 1992) y es un potente mediador para la permeabilidad capilar (Keck y cols, 1989).

EL VEGF está implicado en el inicio y mantenimiento de la angiogénesis durante el desarrollo embrionario (Millauer y cols, 1993), en los tejidos adultos que precisan angiogénesis cíclica como el endometrio (Charnock-Jones y cols, 1993; Torry y cols, 1996) y el cuerpo lúteo en formación (Ravindranath y cols, 1992) en mujeres en edad reproductiva. Este factor de crecimiento también está implicado en procesos patológicos que cursan con angiogénesis como el desarrollo de la vascularización de tumores (Kim y cols, 1993) y se encuentra elevado en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis (McLaren y cols, 1996). La regulación de la expresión del VEGF se debe a diferentes factores: hipoxia, citoquinas, óxido nítrico y regulación hormonal. La hipoxia es un estado en el que los tejidos reciben cantidades reducidas de oxígeno. La situación de hipoxia supone un estímulo adecuado para los factores angiogénicos como el VEGF (Sandner y cols, 1997), y éste se correlaciona con el estímulo de la angiogénesis *in vivo* (Shweiki y cols, 1992). Algunas citoquinas o factores de crecimiento como: TGF-Beta 1 (Frank y cols, 1995), IL-1 Beta (Li y cols, 1995), IL-1 y PGE2 (Ben-Av y cols, 1995), e IL-6 (Cohen y cols, 1996) inducen el aumento del VEGF en diferentes líneas celulares. Por otro lado, la respuesta neovascular y muchos mecanismos celulares relacionados y necesarios para la angiogénesis, suceden a través del ON, o al menos participa en algunos de ellos. El ON puede ser desencadenado por agentes vasoactivos mediante mecanismos autocrinos y paracrinos (Davies y cols, 1995). Como se ha mencionado anteriormente, el VEGF es el factor angiogénico por excelencia y éste incrementa el ON de manera dosis-tiempo dependiente en el endotelio vascular (Kelly y cols, 1996). Un hecho claro de que el ON podría ser un mediador del VEGF, es que los inhibidores de la ON sintasa bloquean el efecto del VEGF en los capilares (Morbideilli y cols, 1996; Whelan y Vlahos, 2000).

Las células de la granulosa luteinizadas en el momento de la recuperación ovocitaria expresan el VEGF a nivel de ARNm y se correlaciona positivamente con el E2 y la P4 (Doldi y cols, 1997). La respuesta angiogénica, que ocurre en el folículo en el momento de la ovulación, implica un incremento de la permeabilidad capilar (Cavender y Murdoch, 1988). Los vasos de la granulosa y el cuerpo lúteo dependen exclusivamente de la formación de nuevos capilares, y por ello, la angiogénesis desencadenada por el VEGF es de gran importancia para el crecimiento y mantenimiento del folículo ovárico y el cuerpo lúteo (Gordon y cols, 1996). En este sentido los estudios funcionales realizados por Zimmermann demuestran que el bloqueo de VEGF mediante inhibidores específicos cursa con inhibición del proceso ovulatorio (Zimmermann y cols, 2001a).

Utilizando un marcador de permeabilidad, se estudió, *in vitro*, el efecto que tenía el líquido folicular y peritoneal de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida sobre

la función de barrera del endotelio (Goldsmán y cols, 1995), observándose un incremento en la tasa de permeabilidad con muestras procedentes de mujeres con estimulación ovárica.

Las acciones de aumento de permeabilidad promovidas por VEGF sobre las células endoteliales son directas y (Hippenstiel y cols, 1998) vienen reguladas por la presencia de dos receptores específicos expresados fundamentalmente en el endotelio vascular: el receptor de VEGF nº 1 (VEGFR1), también llamado *Flt-1*, y el receptor de VEGF nº2 (VEGFR2), también llamado *Flk-1* o *KDR*, (siendo *KDR* el nombre que recibe el receptor en humanos y *Flk-1* el nombre que recibe en roedores).

La expresión de VEGFR1 es especialmente preponderante en el endotelio arterial (Peters y cols, 1993) mientras que el VEGFR2 está aumentado en densidad en capilares, venas y vénulas (Millauer y cols, 1993). VEGFR1, el cual tiene una mayor afinidad por el VEGF que VEGFR2, desempeña principalmente funciones de morfogénesis y estructuración de las células endoteliales (Fong y cols, 1995) mientras que VEGFR2 está implicado principalmente en la mitogénesis (Shalaby y cols, 1995; Gille y cols, 2001).

Se ha podido comprobar que fragmentos de VEGF que carecen de su dominio de unión al receptor VEGFR2 no son capaces de aumentar la permeabilidad de monocapas endoteliales de origen bovino (Joukov y cols, 1998). De igual modo, mediante ensayos de permeabilidad se probaron en cobayas distintos ligandos específicos de VEGFR1 como el factor de activación de las plaquetas sin que se observara aumentos de permeabilidad (Murohara y cols, 1998). Dos de los estudios funcionales que apoyan en mayor grado el papel de VEGFR2 en la PV en detrimento de VEGFR1 fueron realizados por Waltenberger y Gille. En el estudio de Waltenberger se transfectaron por separado ambos receptores sobre líneas celulares que carecían de ellos de forma natural, observando que únicamente aquellas células transfectadas con VEGFR2 eran capaces de mostrar los cambios moleculares asociados a angiogénesis y PV (Waltenberger y cols, 1994).

El estudio de Gille fue más preciso si cabe, ya que se utilizaron fragmentos específicos de activación exclusiva de uno u otro receptor demostrando que sólo aquellos que activaban VEGFR2 eran capaces de aumentar la PV de las células endoteliales. Con todo ello se postula que los efectos de aumento de permeabilidad vienen mediados por la unión del VEGF a su receptor VEGFR2 y no a VEGFR1 (Gille y cols, 2001).

1.10.3.- Mecanismo de transducción de señales

Aunque se conocen las uniones del VEGF a sus receptores, todavía no se entienden la totalidad de los mecanismos moleculares que se ponen en marcha tras la unión del ligando a su receptor, es decir, de la transducción de la señal que genera las respuestas fisiológicas que se observan. La secuencia ordinal de la mayoría de los mecanismos que tienen lugar durante la transducción de la señal no era más que un complejo rompecabezas hasta 1998. De este complejo sistema sólo se conocían datos aislados del mismo, como la entrada masiva de calcio al interior celular o los incrementos de inositol trifosfato (IP3) (Brock y cols, 1991) como segundo mensajero producidos por la fosfolipasa C (PLC) (Berridge e Irvine, 1989). La ordenación de todos estos hallazgos puntuales unido a los propios, permitió a Esser y cols (1998) determinar secuencialmente la cascada enzimática que se originaba durante la transducción de señal de VEGFR2 (*Flk-1/KDR*) tal y como se recoge en la Figura 3. Criscuolo y Balledux hipotetizaron que de algún modo la entrada de calcio, promovida por la transducción de la señal de VEGFR2, induciría cambios en la morfología de la célula por modificación de su citoesqueleto de fibras de actina (Criscuolo y Balledux, 1996). Pudieron comprobar mediante microscopía fluorescente, cómo tras la adición de VEGF a la monocapa endotelial, ésta sufría reorganización de las fibras de actina y con ello una modificación en la morfología celular que desembocaba en la formación de espacios en las uniones intercelulares. No mucho tiempo después se determinó que no sólo las fibras de actina del citoesqueleto, sino que también proteínas de unión intercelular como Occludin y Zona Occludens-1 (ZO-1), que ayudan a mantener la cohesión del tejido y con ello la estabilidad endotelial, veían afectada su distribución “normal” tras la adición de VEGF sobre las monocapas (Kevil y cols, 1998). Estas discontinuidades indicaban que de algún modo se estaban perdiendo las uniones o anclajes entre estas proteínas encargadas de mantener las células compactadas, por lo que iba a ser mucho más sencillo que se formaran poros entre ellas por las que el líquido pudiera extravasarse.

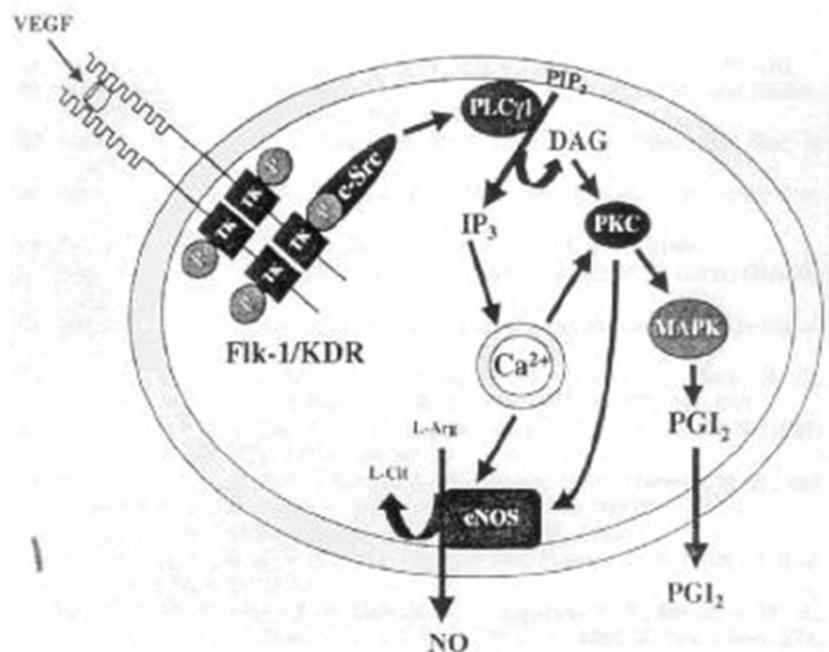


Figura 3. La unión del VEGF a sus dianas en el endotelio implica la autofosforilación del receptor y por lo tanto su activación. El estado activado se transfiere por fosforilación a la proteína Src y de ésta a la fosfolipasa C (PLC) que actuaría liberando al Diacilglicerol (DAG) y al Inositol trifosfato (IP3) como segundos mensajeros. Dichos intermediarios activarían el funcionamiento de la NO sintasa dependiente de Calcio que desembocaría, mediante mecanismos todavía no comprendidos en su totalidad, en la fosforilación de las proteínas intercelulares, cambio en su conformación, formación de poros y finalmente aumento de la permeabilidad vascular.

La relación entre el VEGF y el desensamblaje intercelular que provocaba sobre las monocapas, vendría justificada por los trabajos de Antonetti y colaboradores, donde observaron que la formación de discontinuidades en la distribución de ZO-1 estaba asociada a la fosforilación de ésta tras la adición de VEGF (Antonetti y cols, 1999). Con ello postulaban que la estabilidad de las uniones intercelulares era dependiente de las reacciones fosforilación-desfosforilación, promovidas por VEGF, dentro de las proteínas que formaban esta red. Sabemos que la PV ha sido inhibida significativamente in-vivo mediante el bloqueo de los canales transportadores de calcio al interior celular (Bates y Curry, 1997). Sin embargo el nexo entre la entrada de calcio y la fosforilación de las proteínas intercelulares todavía no está claro. En algunos foros de discusión se barajan varias hipótesis: Una de ellas implica que las reacciones de fosforilación de las proteínas intercelulares son dependientes de calcio también, con lo que su déficit exterior por entrada al interior como cofactor para la ON sintasa provocaría la fosforilación de las proteínas. Se entiende que la hiperpermeabilidad cesa a medida que el estado deficitario en calcio revierte y las uniones intercelulares se regeneran. Otra es que el mismo ON, sería el encargado de promover la fosforilación de estas proteínas en respuesta al VEGF. Ambas hipótesis explicarían la inhibición de la permeabilidad de acuerdo con lo observado por Bates y Curry (1997), en el primer caso porque el bloqueo de la entrada

de calcio al interior evitaría su déficit en el exterior y en el segundo caso porque la no entrada de calcio al interior disminuiría la actividad de la óxido nítrico sintasa y con ello la producción de ON. A este respecto ya hemos comentado que los inhibidores de la ON sintasa bloquean el efecto del VEGF en los capilares (Morbidelli y cols, 1996; Whelan y Vlahos, 2000). En ambos casos el papel del calcio se justificaría como cofactor de la ON sintasa en la transducción de la señal, pero de ahí a establecer un nexo entre el calcio o el ON y la fosforilación de las uniones intercelulares media un largo viaje que nadie ha recorrido. En cualquier caso, debido al número de componentes conocidos de la ruta de transducción de VEGFR2 y al claro papel del VEGF sobre la permeabilidad vascular y la angiogénesis, es comprensible el gran esfuerzo que ha realizado la comunidad científica por desarrollar y establecer diversas estrategias para la inhibición del VEGF, tal y como mostramos en el siguiente apartado.

1.10.4.- Inhibidores del Sistema VEGF/VEGFR2

Son diversas las motivaciones que impulsaron la búsqueda de inhibidores de las distintas acciones del VEGF sobre el VEGFR2 en cuanto a mitogenicidad, quimiotaxis y permeabilidad. La implicación del VEGF en sus uniones al VEGFR2 como motor en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que abastecieran las células tumorales, motivó la búsqueda del bloqueo de esta unión con el fin de abordar un mismo problema desde distintos puntos de vista. En este sentido se generaron, ya en 1995, **anticuerpos neutralizantes** anti-VEGFR2 frente a roedores, siendo el más destacado el DC101 (Rockwell y cols, 1995). La modificación (*humanización de anticuerpos*) tanto del mencionado DC101 como del anticuerpo c-p1c11 (Zhu y cols, 1999) para su uso en clínica, supusieron el arranque de este tipo de acercamientos para el tratamiento del cáncer.

Otras estrategias utilizadas fueron la generación de **pequeños péptidos inhibidores** que impidieran la unión del VEGF a sus receptores VEGFR1 y VEGFR2, y que pudieran llevar al desarrollo de antagonistas de VEGF útiles farmacológicamente (Wayne y cols, 1998) como podía ser la **suramina** cuyas propiedades inhibitorias se basan de igual modo en impedir la unión del VEGF a VEGFR1 y VEGFR2 (Waltenberger y cols, 1996).

ZD4190 supuso un avance en el desarrollo de inhibidores, no por el incremento de sus acciones de bloqueo sino porque permitía la administración oral del compuesto. Se trataba de una proteína recombinante generada a partir de dominios de receptores situados en membrana plasmática transfectados en células de insectos que fueron infectadas con baculovirus (Wedge y cols, 2000).

Partiendo de una molécula central como es la indolin-2-uno en presencia de piperidina y variando la presencia de varios radicales en distintas posiciones, se consiguió desarrollar una

amplia gama de inhibidores específicos de VEGFR2 (Strawn y cols, 1996). Entre todos ellos cabe destacar al **SU5416**, que mediante su unión al receptor, y aunque no impide la de VEGF, bloquea la fosforilación del mismo impidiendo la transducción de la señal y por lo tanto la posterior cascada enzimática que desembocaría en incrementos de permeabilidad notables (Fong y cols, 1999).

Los **anticuerpos** fueron diseñados específicamente para la inhibición del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que pudieran abastecer de nutrientes a las células tumorales y su eficacia como bloqueantes específicos de permeabilidad no había sido evaluada. **La suramina** fue en principio utilizada como droga antitripanosomal en 1916 y se han ido descubriendo nuevas propiedades en ella en los últimos años. El principal inconveniente de su uso es que actúa a nivel mitocondrial alterando la información genética de la misma, estos efectos secundarios eran demasiado peligrosos como para no tenerlos en cuenta y poder establecer en el futuro una terapia para mujeres embarazadas con el SHO. Además, sus efectos de bloqueo de permeabilidad tampoco son específicos, sino que tienden en cualquier caso a la disminución de la mitogenicidad endotelial. **ZD4190** al igual que en los anteriores no es un bloqueante específico de la permeabilidad endotelial, aunque su amplio espectro podría hacer aconsejable su uso en el futuro si se modifica adecuadamente para que sea más específico en sus acciones. **SU5416** fue diseñado en principio como un antitumoral, sin embargo sus acciones más relevantes vinieron por sus inhibiciones del enrojecimiento y permeabilidad endotelial de roedores en los cuales se había introducido previamente una línea tumoral. El hecho de que ya hubiera sido ensayado satisfactoriamente con descensos de la permeabilidad endotelial en roedores, sin efectos tóxicos aparentes, que su especificidad por el receptor *Flk-1* fuera casi total sin mostrar reacciones cruzadas con receptores de la misma familia como *Flt-1* y que tuviera valores de afinidad por el receptor mayor que las de los anticuerpos monoclonales (Fong y cols, 1999), convertían a SU5416 en el mejor candidato actual si lo que se pretendía era bloquear o inhibir in vivo la permeabilidad que caracteriza el SHO. Gómez y su grupo de trabajo (2002), utilizaron el SU5416 con resultados satisfactorios en un modelo animal. En este modelo animal hiperestimulado que desarrolla el SHO tras la administración de hCG, se demuestra que el aumento de PV producido por esta hCG es coincidente con la expresión y producción de VEGF y VEGFR-2 en los ovarios (Gómez y cols, 2002, 2003a) y que empleando bloqueantes del VEGFR2, el cuadro se reversibiliza (Gómez y cols, 2002). Estos experimentos permitieron establecer el primer tratamiento específico del SHO en contraposición con los acercamientos meramente empíricos y paliativos que hasta el momento se habían desarrollado. Pero a pesar de este prometedor descubrimiento, se presentan dos obstáculos que no permiten aplicar estos bloqueantes del Sistema

VEGF/VEGFR2 a los seres humanos. En primer lugar, la alta toxicidad de los bloqueantes comerciales del VEGFR-2. Por ejemplo el SU5416, es un inhibidor específico que presenta efectos tóxicos importantes como la hipertensión pulmonar y efectos tromboembólicos (Taraseviciene-Stewart y cols, 2001; Kuenen y cols, 2003; Glade-Bender, 2003), y de otros similares que estaban en fase de ensayos clínicos (Taraseviciene-Stewart y cols, 2001; Glade-Bender, 2003). En segundo lugar, la absoluta dependencia del ovario (Wulff y cols, 2001; Pauli y cols, 2005; Zimmermann cols, 2001 a, b, 2003) y el útero (Rockwell y cols, 2002; Heryanto y cols, 2003), con respecto al componente angiogénico del sistema VEGF/VEGFR2 para mantener su función, ya que la finalidad en última instancia de un tratamiento de reproducción asistida es el embarazo y esta situación parece verse comprometida con un bloqueo del VEGF. A pesar de todo, algo crucial que mostraba el trabajo de Gómez y cols (2002) era que el bloqueo de VEGFR2 era una diana adecuada sobre la que actuar en el incremento de permeabilidad vascular mediada por el SHO, por lo que en base a este conocimiento, se planteó la necesidad de encontrar nuevas estrategias orientadas al bloqueo de la permeabilidad vascular bien por modulación del componente específica de VEGFR2 o de alguno de sus intermedarios en la transduccion de la señal que permitiese desarrollar un tratamiento terapéutico eficaz y tolerable en humanos.

1.11.- BÚSQUEDA DE ALTERNATIVAS A LOS INHIBIDORES COMERCIALES PARA EL BLOQUEO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

Ante la necesidad de plantear otras alternativas menos tóxicas frente al incremento de permeabilidad característico del SHO, se buscaron posibles dianas que pudieran estar relacionadas en este proceso fisiológico. Mediante el uso de la genómica se analizaron los genes regulados al alza y a la baja en condiciones de SHO en un modelo animal (Gómez y cols, 2003b) con la intención última de actuar sobre las proteínas codificadas por genes que pudieran estar implicados en la regulación de la PV, sin que por ello supusieran una acción crítica sobre la angiogénesis. Se estudiaron ovarios de animales hiperestimulados y controles, identificando 72 genes (incluyendo el VEGF y las prostaglandinas) en el grupo SHO como posibles mediadores del síndrome. De estos 72, se seleccionaron 4 en función de un estudio bibliográfico en base al cumplimiento de los criterios de implicación en la PV suponiendo baja toxicidad: escualeno epoxidasa (SQE), fosfatasa ácida resistente a tartrato (PATR), proteína de respuesta al crecimiento (CL-6) y la Tirosina Hidroxilasa (TH).

En este sentido, teniendo en cuenta que la TH es una enzima presente en las células dopaminérgicas, la cual está implicada en la síntesis de la dopamina (Fujisawa y cols, 1987;

Zigmond y cols, 1989), se planteaba en qué medida podría estar la dopamina relacionada con el desarrollo del SHO. Esta relación pudo intuirse gracias en un estudio donde se describió la dopamina como un modulador del VEGFR2 (Basu y cols, 2001), abriendo una nueva vía de investigación donde la dopamina se presentaba como un posible candidato de baja toxicidad que podría ser usado para modular la actividad del sistema VEGF/VEFR2 y ser planteado como tratamiento del SHO.

1.12.- MODULACIÓN DEL SISTEMA VEGF/VEGFR2 A TRAVÉS DE LA DOPAMINA

Se sabe por trabajos de hace más de 30 años que la dopamina disminuye el crecimiento de varios tipos de tumores malignos en ratones (Wick 1978, 1981). Se atribuía dicho efecto a la inhibición de la proliferación de células tumorales o estimulación de la inmunidad. Pero posteriormente se demostró la presencia de receptores dopaminérgicos en las células endoteliales (Bacic y cols, 1991), dando lugar a los estudios de Sujit Basu y su grupo de investigación, los cuales centran dicha información en la observación de ciertos tipos de tumores que son más activos cuando las células endoteliales de los vasos sanguíneos que las nutren, pierden la actividad dopaminérgica (Basu y cols, 1995). Así, en un magnífico trabajo publicado en 2001 sobre ratones singénicos con cáncer de ovario, el cual fue inducido al inyectar intraperitonealmente células tumorales ováricas secretoras de VEGF, se objetiva un descenso de la ascitis y de la angiogénesis al inyectar dopamina (Basu y cols, 2001). Del mismo modo, mediante estudios de agonistas y antagonistas, se pudo observar que el efecto antiangiogénico de la dopamina lo ejerce a través de la activación de su receptor 2 (DrD2) y no a través de la modulación de otros receptores de la misma familia como DrD1. También en este estudio se incluye un vector adenoviral que provoca la expresión de VEGF en la oreja de ratones atímicos, provocando la misma respuesta angiogénica que se da en los tumores, de tal forma que al inyectar dopamina en ellos, desarrollan síntomas como edema, permeabilidad, etc, en mucho menor grado que en aquellos ratones a los que no se les administra la dopamina. Los estudios inmunohistoquímicos demuestran que estos neovasos inducidos al inyectar este vector adenoviral, son fuertemente positivos a los receptores DrD2 (Basu y cols, 2001), demostrando así que estos receptores de dopamina están presentes en las células endoteliales, donde la dopamina podría ejercer un efecto antitumoral por inhibición de la angiogenesis (Chakroborty y cols, 2009). En el estudio de Basu sobre los cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC), se afirma que el VEGF unido a su receptor 2 produce la fosforilación del receptor y que la dopamina disminuye esta fosforilación debido a la reducción de la expresión de VEGFR2 en la superficie de estas células, pero cuando se

rompen o permeabilizan estas mismas células, la expresión del VEGFR2 total es la misma en tratadas con dopamina como en las no tratadas, concluyendo de esta forma que la dopamina estimula la internalización del receptor por endocitosis (Basu y cols, 2001). Aunque este estudio propone la internalización del VEGFR2 como mecanismo de acción, esta hipótesis no está demostrada completamente.

Las evidencias sobre las acciones de la dopamina sobre VEGFR2 continuaron surgiendo de la mano de este mismo grupo de investigación, dirigido por Basu, donde en 2004 publicó un nuevo artículo donde demuestra los efectos de la dopamina sobre la fosforilación del VEGFR2 directamente in vivo (Sarkar y cols, 2004). Extrajeron células endoteliales de mesenterio de ratones tratados o no con dopamina, sobre estas células endoteliales (células extraídas directamente de animales tras tratamiento y no líneas celulares) estos investigadores estudiaban directamente la fosforilación de VEGFR2, observándose el mismo fenómeno, una disminución en el grado de fosforilación de VEGFR2 como ya hemos mencionado.

En uno de los trabajos más recientes que manifiestan el efecto de la dopamina sobre el VEGFR2 y su implicación sobre el desarrollo del SHO (Chen y cols, 2010), observaron cómo la permeabilidad sobre cultivos de células HUVEC se vería incrementada tras aplicar líquido folicular de mujeres con riesgo de padecer SHO, mediada principalmente por el VEGF y la IL-8. Ambas moléculas actuaban sobre la fosforilación del VEGFR2, consiguiendo reducir la permeabilidad hasta aproximadamente un 50% cuando incorporaba dopamina al medio de cultivo (considerando 100% al tratamiento control), mediante la inhibición de la fosforilación del VEGFR2, de VE-caderina y de occludin presente en estas células endoteliales. Del mismo modo, cuando estudiaron los efectos de la dopamina sobre otros fenómenos angiogénicos, encontraron que a bajas dosis (0.5, 2 mM), la dopamina no impedía la migración y la formación de tubos capilares de las células endoteliales, pero sí que la inhibía significativamente cuando usaron una dosis más alta (10 mM). En base a estos resultados se confirma un efecto dual que ejerce la dopamina cuando se encuentra a diferentes dosis (Chen y cols, 2010).

El efecto de la dopamina sobre el VEGFR2 parece que no solo se produce directamente inhibiendo su fosforilación, sino que también se ha visto que se podría disminuir la activación del VEGFR2 por inhibición de la producción de su ligando, el VEGF. Esta posibilidad se confirma en ratones knockout para el receptor 2 de la dopamina (DrD2), sobre los cuales se observa que la ausencia de este receptor está directamente relacionada con un incremento del VEGF en las células de la pituitaria, sugiriendo por ello que si el DrD2 estuviese presente, estaría ejerciendo un papel opuesto, es decir, inhibiendo o regulando la producción y secreción del VEGF, dando como resultado una menor disponibilidad del mismo y por tanto una menor activación del VEGFR2 (Cristina y cols, 2005).

1.13.- ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE SHO CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS.

Como se ha comentado anteriormente, los primeros indicios que relacionaban el uso de agonistas dopaminérgicos con un efecto terapéutico sobre el SHO (Ferraretti y cols, 1992), no prestaban atención a la posibilidad de que los beneficios proporcionados fuesen producidos por algún mecanismo molecular específico sobre la fisiopatología del síndrome. El motivo de la poca repercusión de este trabajo, habría que buscarlo principalmente en el hecho de que la administración de dopamina se justificaba para tratar la sintomatología renal producida por el síndrome, pero en ningún momento existía una hipótesis de acción fisiológica molecular de la dopamina sobre el SHO, como podría ser el bloqueo de la permeabilidad vascular a través del sistema del VEGF. Evidentemente, si se hubiera tenido la información actual respecto al papel modulador del sistema VEGF/VEGFR2 que proporcionan los agonistas dopaminérgicos, la línea de investigación abierta por Ferraretti, se hubiera seguido avanzando en ese mismo momento. Teniendo en cuenta los hallazgos comentados anteriormente, Gómez y colaboradores, plantearon un trabajo en animales que pretendía determinar si la dopamina fuese efectiva en el tratamiento del SHO.

1.13.1.- ESTUDIOS SOBRE ANIMALES

Los ensayos iniciales para determinar la efectividad de la dopamina como tratamiento del SHO fueron llevados a cabo previamente sobre animales, para de este modo, obtener información suficiente que permitiese trasladar el tratamiento a humanos. Con este fin se llevó a cabo un estudio sobre un modelo animal bien establecido de SHO suplementado con prolactina (para descartar los efectos luteolíticos debidos a la privación de PRL a través de los agonistas dopaminérgicos), donde se pretendía ver si la permeabilidad vascular y la angiogénesis podrían estar inhibidas en función de la dosis aplicada del agonista dopaminérgico cabergolina (Cb2), y si esta inhibición suponía algún efecto deletéreo sobre el cuerpo lúteo. A altas dosis (500 µg/kg) de Cb2 se observó tanto la disminución de la PV como la disminución de la angiogénesis del ovario, del mismo modo que se describía en el trabajo de Basu (Basu y cols, 2001). Sin embargo, la administración de 100 µg/kg de Cb2, consiguió revertir la permeabilidad dependiente del VEGFR2 sin afectar la angiogénesis del cuerpo lúteo a través de una inhibición parcial de la fosforilación del VEGFR-2 ovárico, y por ello sin producir efectos luteolíticos (no hubo diferencias en los niveles de progesterona sérica ni tampoco en la apoptosis del cuerpo lúteo), a diferencia de las dosis altas (Gómez y cols, 2006). Ante estos resultados se podría pensar que la prolactina (PRL) podría ser la responsable de estos efectos

sobre la PV y la angiogénesis, sin embargo tras la suplementación no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de prolactina en ninguno de los grupos experimentales al comparar con los controles no tratados con agonista dopaminérgico, por lo que los efectos luteolíticos observados a altas dosis de Cb2, no se deberían a la privación de prolactina sino al efecto de Cb2 sobre el componente angiogénico mediado por el VEGFR2 (Gómez y cols, 2006). En cualquier caso, es reseñable el hecho de que previamente ningún grupo había podido asociar el efecto de los agonistas dopaminérgicos con el SHO a través del VEGF/VEGFR2, hasta que Gómez y colaboradores observaron la desregulación de la enzima TH y pudieron asociarla con los trabajos de Basu que habían sido publicados varios años antes.

1.13.2.- ESTUDIOS EN HUMANOS

En base a los resultados tan prometedores obtenidos en el trabajo de Gómez y colaboradores sobre animales, se dio pie un año después al diseño del primer estudio de toda una sucesión de trabajos posteriores sobre humanos, para evaluar la efectividad de los dopaminérgicos para el tratamiento del SHO. Además, como se ha comentado previamente, el uso de agonistas dopaminérgicos como tratamiento farmacológico en humanos ya estaba establecido previamente en patologías como la hiperprolactinemia, dada su buena tolerancia y baja toxicidad, siendo además un tratamiento que no presenta alteraciones durante el embarazo.

El primero de estos trabajos fue un estudio prospectivo, doble ciego y aleatorizado sobre humanos, llevado a cabo por nuestro grupo a través de Álvarez y colaboradores. En este trabajo se empleó por primera vez la técnica de IRM (imagen por resonancia magnética) para cuantificar la permeabilidad vascular. En el estudio se reclutaron 54 mujeres incluidas en un programa de donación de ovocitos, las cuales durante la estimulación desarrollaron 20-30 folículos mayores de 12 mm y durante la punción se recuperaron más de 20 ovocitos. Inmediatamente después de la administración de hCG, las pacientes se segmentaron en 2 grupos de forma aleatoria mediante una herramienta informática. El grupo de estudio constaba de 29 pacientes, las cuales recibieron 0,5 mg de Cb2 al día de forma oral, durante 8 días. El grupo control reclutó a 25 mujeres, las cuales recibieron el placebo durante otros 8 días. Estas mujeres fueron controladas cada 48 horas desde la administración de la hCG y durante los 8 días del estudio. La permeabilidad vascular fue medida mediante resonancia magnética, pudiendo observar una reducción significativa en la presencia de líquido extravascular en las pacientes tratadas con Cb2. Los resultados evidenciaron que la hemoconcentración y la presencia y volumen de líquido ascítico se redujeron significativamente en el grupo experimental. La incidencia de SHO se redujo de un 43,8% en

los controles a un 20% en el tratamiento (Álvarez y cols, 2007a). Quizá estos resultados no sean extrapolables a otros tipos de ensayos, pero podría ser interesante mencionar que el porcentaje de disminución de permeabilidad observada en el trabajo de Álvarez, se manifiesta de forma coincidente en un estudio in vitro sobre células endoteliales HUVEC, tras ser cultivadas con líquido folicular de mujeres con riesgo de SHO y tratadas con dopamina (Chen y cols, 2010).

Estos resultados, evidentemente fueron muy prometedores, pero tan solo confirmaban en humanos una sola parte del efecto dual que se observó con la administración de agonistas dopaminérgicos para el tratamiento del SHO reproducido en el modelo animal de Gómez (Gómez y cols, 2006), siendo imposible determinar el efecto sobre la angiogénesis debido a que los objetivos del estudio no permitieron realizar un diseño compatible con tales valoraciones. Es por ello, por lo que el mismo grupo puso en marcha un nuevo estudio retrospectivo para dar a conocer si la Cabergolina a las dosis administradas, afectaba la angiogénesis del endometrio humano, suponiendo un impedimento fisiológico para la implantación embrionaria y una limitación evidente para el tratamiento del SHO en mujeres sometidas a un tratamiento de reproducción asistida. En este estudio se compararon 2 grupos de pacientes, uno de ellos compuesto por mujeres con riesgo elevado de desarrollar SHO las cuales recibieron Cb2, mientras que el otro grupo lo componían mujeres sin riesgo de desarrollar el síndrome. Los resultados mostraron que las tasas de fertilización, implantación o embarazo no presentaban diferencias en el grupo tratado con Cb2 frente al grupo control (Álvarez y cols, 2007b).

A partir de este momento comienzan a aparecer nuevos estudios basados en los resultados publicados en los trabajos de Álvarez y colaboradores. De este modo, estos resultados han sido contrastados por diferentes grupos en diferentes ensayos clínicos con diferentes tipos de agonistas dopaminérgicos (Cabergolina, Pergolida, Quinagolida y Bromocriptina).

En un estudio prospectivo donde se reclutaron 166 mujeres con riesgo de desarrollar SHO, éstas fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos, administrando 0,5 mg/día de Cb2 durante 3 semanas y comparadas frente al grupo control donde no se administró el tratamiento (Carizza y cols, 2008). En el grupo tratado no hubo ningún caso de SHO temprano, y tan solo un 10,8% en el SHO tardío. Con respecto al grupo control, el 15% desarrolló SHO temprano y el 3,8% el SHO tardío. La tasa de implantación o de aborto no presentó diferencias significativas, poniendo de manifiesto de nuevo, que la administración del agonista dopaminérgico Cabergolina actuaba sobre la PV sin comprometer la angiogénesis (Carizza y cols, 2008). Dos años después, se publicó un completo estudio basado en una revisión y un

meta-análisis donde se vuelve a evidenciar que el agonista dopaminérgico Cb2 como un tratamiento preventivo, es capaz de disminuir significativamente la incidencia de SHO en pacientes con alto riesgo de desarrollarlo, sin afectar la tasa de embarazo, aborto, o nacimiento vivo cuando se compara con los controles no tratados (Youssef y cols, 2010).

A pesar de que no se observaron malformaciones en los niños cuyas madres habían sido tratadas con los agonistas dopaminérgicos, todavía no existe una evidencia de si un tratamiento a largo plazo mantendría estos resultados deseados. Recientemente se ha reportado que el uso de agonistas dopaminérgicos como la cabergolina o la pergolida a largo plazo, podrían incrementar el riesgo de desarrollar regurgitación cardíaca, ya que se ha visto incrementada esta incidencia en pacientes con Parkinson tratados con estos agonistas a altas dosis y larga duración (Schade y cols, 2007; Zanettini y cols, 2007). Aunque por otro lado, la mayoría de los estudios con agonistas dopaminérgicos para el tratamiento de pacientes hiperprolactinémicos, donde la dosis de agonistas son hasta 10 veces superiores a las tratadas en enfermos de Parkinson, no han observado ningún tipo de anomalía valvular (Cheung y Heaney, 2009; Herring y cols, 2009; Vallette y cols, 2009) concluyendo que la caberbolina parece ser un tratamiento seguro en estas mujeres hiperprolactinémicas.

En cualquier caso, teniendo en cuenta el hipotético riesgo de regurgitación cardíaca, se planteó un nuevo ensayo clínico mediante el uso de agonistas dopaminérgicos sobre mujeres con riesgo de desarrollar SHO, pero esta vez se usó quinagolida (Busso y cols, 2010), un agonista del receptor 2 de la dopamina de origen no ergótico, que no presenta los mismos efectos que los agonistas comentados anteriormente sobre las válvulas cardíacas (Roth, 2007). En este nuevo estudio prospectivo, doble ciego y multicéntrico en pacientes sometidas a FIV, se contó con 182 mujeres con riesgo de desarrollar el SHO las cuales se volvieron a distribuir en 4 grupos: placebo, tratadas con 50 µg/día de quinagolida, 100 µg/día y 200 µg/día. Los resultados mostraron que la incidencia del SHO temprano moderado/severo fue del 23% en el grupo placebo, mientras que en los grupos tratados con diferentes dosis de quinagolida fue de 12%, 13% y 4% respectivamente. Como se puede apreciar, la tasa de SHO en los grupos tratados fue significativamente menor que en el grupo placebo. En el grupo de mayor dosis no se registró ningún caso de SHO severo. También se observó que el tratamiento era más efectivo cuando no había embarazo, mostrando que, en estos casos, las evidencias mediante ultrasonidos de la aparición de ascitis se reducían significativamente del 31% en el placebo al 11% en el resto de grupos de tratamiento. En los casos donde se producía el embarazo, no se observaron diferencias entre grupos en cuanto a la presencia de ascitis. Ante estos resultados se pudo plantear que bien por los niveles elevados de hCG liberados por el trofoblasto, y/o por otros mecanismos fisiopatológicos que podrían ser activados durante el embarazo, se podría

estar generando una cascada de eventos que dan lugar a un incremento de la PV que no es posible modular mediante las dosis de agonistas dopaminérgicos que se habían administrado de forma oral en este estudio (Busso y cols, 2010).

También en 2010 se publicó otro trabajo en la misma línea que los anteriores, pero con el agonista dopaminérgico bromocriptina. En este estudio prospectivo se incluyeron 40 pacientes sometidos a reproducción asistida con alto riesgo de desarrollar SHO, a las cuales se les administró 2,5 mg de bromocriptina durante 16 días a partir del día de la punción ovárica, y fueron comparadas con un grupo control de 44 pacientes. Los resultados mostraron de nuevo una reducción significativa en la incidencia del SHO moderado, el SHO temprano y el número de ingresos hospitalarios así como la duración de los mismos. La incidencia clínica de SHO supuso un 17,5% de los casos tratados con bromocriptina mientras que en el grupo control esta incidencia se mostró incrementada hasta el 40,9%. Por otra parte, en concordancia con los resultados publicados en los trabajos citados previamente, entre ambos grupos no existieron diferencias significativas en cuanto a las tasas de embarazo (Sherwal y cols, 2010).

A partir del conjunto de estos estudios reportados sobre la efectividad del agonista dopaminérgico Cabergolina para el tratamiento del SHO, se ha llevado a cabo un meta-análisis en el que se observa que a pesar de la heterogeneidad de los resultados, se manifiesta una tendencia a reducir la incidencia de SHO hasta un 50%, aunque también se concluye que este tratamiento como profiláctico es efectivo en la reducción de la incidencia de SHO temprano, pero sin mostrar diferencias significativas en la incidencia del SHO tardío frente a controles (Youssef y cols, 2010).

A modo de resumen de las conclusiones que se desprenden de todos estos trabajos, cabe mencionar que si bien los tratamientos con agonistas dopaminérgicos para el SHO se presentan con resultados prometedores, también dejan incógnitas abiertas que dan sentido a esta tesis doctoral. Por un lado, para el síndrome temprano se muestran efectivos tan solo en el 50% de los casos, mientras que por otro lado para el SHO tardío se muestran totalmente ineficientes. Es de suponer que un mejor conocimiento del mecanismo molecular de actuación de los agonistas dopaminérgicos sobre el SHO, permitiría desvelar estas cuestiones y para ello, quizá sea necesario caracterizar en primer lugar la existencia del sistema dopaminérgico en el órgano clave implicado en el proceso patológico del síndrome: el ovario.

1.14.- RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS. SISTEMA DOPAMINÉRGICO OVÁRICO

Comparativamente entre los diferentes tipos de receptores de dopamina que existen, de forma general, los receptores D1 y D2 poseen altos niveles de expresión y tienen más agonistas y antagonistas selectivos que los receptores D3, D4 y D5 (Missale y cols, 1998). El DrD2 tiene una elevada expresión en la sustancia nigra, área ventral e hipocampo; mientras que las amígdalas contienen sobre todo DrD1 y muy poco DrD2. Ambos receptores se expresan de forma elevada en el putamen caudal, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio (Mansour y cols, 1990).

A pesar de que la estructura, la genética y las propiedades transduccionales de los receptores de dopamina han sido bastante estudiados, la función biológica y localización de los diferentes subtipos de receptores de dopamina, todavía sigue sin ser esclarecida, sobre todo en ciertos tejidos y órganos (Vallone y cols, 2000). Los receptores D2 han sido descritos también en células endoteliales (Basic y cols, 1991), linfocitos (Basu y Dasgupta, 2000), y en plaquetas (Emerson y cols, 1999) y hasta existen evidencias que señalan que existe un sistema de señalización a través de la dopamina en el sistema circulatorio humano a través de las células inmunitarias (Mckenna y cols, 2002).

Los altos niveles de dopamina en el ovario humano (Bodis y cols, 1992; Lara y cols, 2001), plantean cuestiones sobre el papel que podría estar ejerciendo en el aparato reproductor femenino (Rey-Ares y cols, 2007), máxime teniendo en cuenta que la expresión de receptores de dopamina en el ovario humano aún no ha sido totalmente caracterizada. El repertorio de receptores de dopamina presentes específicamente en las células de la granulosa ha sido descrito, de tal forma que todos los receptores de dopamina (D1, D2, D4 y D5) están presentes excepto el D3, haciéndose notar que el D2 es el que mayor expresión mostraba mediante marcaje inmunohistoquímico (Rey-Ares y cols, 2007). Sin embargo, la primera vez que se describió el receptor DrD2 en el ovario humano fue precisamente en un estudio de nuestro grupo, el trabajo de Álvarez y colaboradores en 2007, donde se confirmaba mediante técnicas de biología molecular, la presencia del DrD2 en células de la granulosa aisladas tras la punción folicular de mujeres sometidas a un tratamiento de reproducción asistida (Álvarez y cols, 2007a). Además, la cuantificación de expresión del ARNm mostró diferentes patrones de expresión de este receptor entre pacientes, llegando incluso a ser indetectable en algunos casos. Estos datos llevaron a nuestro grupo a hipotetizar que, diferencias en la cantidad de expresión de DrD2 a nivel ovárico entre pacientes podría explicar, al menos en parte, las diferentes respuestas al tratamiento del SHO con agonistas dopaminérgicos obtenidas en los diferentes ensayos clínicos anteriormente citados, donde unas mujeres responden al tratamiento y otras no. De hecho por extensión nos planteábamos

si la reducción de dicho receptor a lo largo del ciclo menstrual y más en concretamente con la fase lútea tardía/cuerpo lúteo del embarazo, podría también estar relacionado con la total ineficiencia de los agonistas dopaminérgicos en el tratamiento del SHO tardío mencionado en el apartado anterior.

Dado que todavía no se ha caracterizado la expresión de DrD2 en el ovario completo, siguen siendo desconocidas las poblaciones celulares responsables de su expresión. En este sentido y atendiendo a los hallazgos previos en otros órganos humanos, al inicio de esta tesis hipotetizábamos que cabría esperar encontrar DrD2 en ovario asociado a granulosa, poblaciones leucocitarias y en las células endoteliales que componen el entramado vascular ovárico, el cual responde con la disminución de PV tras administrar agonistas dopaminérgicos.

Así pues, estudiar la expresión ovárica del DrD2 en humanos durante el ciclo ovárico podría suponer un avance importante para comprender el funcionamiento del sistema VEGF/VEGFR2 del ovario y su implicación en el desarrollo de SHO. No menos importante sería la posible regulación de los niveles de VEGF observada en ratones knockout para el DrD2, donde como se ha comentado previamente, el VEGF aparece incrementado en la pituitaria de estos ratones, sugiriendo una posible vía de regulación del sistema VEGF/VEGFR2 (Cristina y cols, 2005). Partiendo de estas observaciones, esta tesis doctoral se planteó con el objetivo primigenio de caracterizar la expresión de DrD2 en las poblaciones ováricas a lo largo del ciclo para posteriormente aislarlas y estudiar *in vitro* cómo la administración de agonistas dopaminérgicos ejerciese un efecto sobre el VEGF y sobre el sistema VEGF/VEGFR2 en cada una de ellas.

Mediante dichas acciones pretendíamos elucidar el mecanismo de acción de los agonistas dopaminérgicos sobre la permeabilidad vascular ovárica durante el SHO y por extensión el por qué de su ya mencionada limitada eficacia en el tratamiento del síndrome. A pesar de las restricciones éticas y metodológicas en cuanto a la obtención del material biológico ovárico disponible, planteamos con ilusión la realización de la experimentación metodológica en esta tesis bajo la guía de una hipótesis de partida prometedora, la cual ya hemos mencionado sutilmente y que detallamos a continuación.

2.- HIPÓTESIS

2.- HIPÓTESIS

Los agonistas dopaminérgicos presentan, tanto a nivel de estudios animales como en ensayos clínicos realizados en humanos, una eficacia considerable en la reducción del SHO. A pesar de ser desconocidas las bases moleculares del tal efecto, los estudios en animales han sugerido que podría tratarse de una internalización o bien fosforilación parcial del VEGFR2 mediada por el agonista dopaminérgico que evitase su activación a pesar de la presencia de su ligando VEGF. Otra alternativa podría considerar que la activación del DrD2 es capaz de disminuir la secreción y por tanto la disponibilidad del ligando VEGF, tal y como se ha referido anteriormente en animales *knock out* para el DrD2. Postulamos que diferencias o deficiencias en la expresión o regulación del sistema dopaminérgico ovárico, pueden estar relacionadas con el funcionamiento anormal del cuerpo lúteo y la susceptibilidad al desarrollo de patologías ovario-dependientes como el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.

Nuestra hipótesis plantea que los agonistas dopaminérgicos, a través de la unión a su receptor DrD2, son capaces de interactuar con el sistema VEGF/VEGFR2, bien produciendo una disminución de la secreción de VEGF en las células de la granulosa o bien inhibiendo la activación del receptor VEGFR2 presente en las células endoteliales ováricas, llevando en ambos casos al descenso de la PV ovárica y consecuentemente a la inhibición del SHO. En este escenario, la diferente expresión individual de DrD2 a nivel ovárico, podría explicar la diferente respuesta a los agonistas dopaminérgicos en el tratamiento del SHO entre mujeres. Del mismo modo una disminución o desaparición de la expresión del DrD2 ovárico durante la fase lútea tardía, podría justificar la ineficacia del tratamiento con dichos agonistas en la inhibición del SHO tardío en todas ellas.

3.- OBJETIVOS

3.- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GENERAL

Pretendemos generar la información necesaria sobre el sistema dopaminérgico ovárico en condiciones fisiológicas y determinar cómo la activación de éste actuaría sobre los fenómenos vasculares responsables del desarrollo del SHO.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Localizar la expresión del DrD2 en tejido ovárico humano, determinando cuáles son las poblaciones celulares que lo expresan a lo largo de las distintas fases del ciclo menstrual.
- Evaluar como varía la expresión de DrD2 en las distintas poblaciones celulares ováricas a lo largo del ciclo menstrual.
- Estudiar en aquellas poblaciones celulares ováricas que muestran diferencias de expresión de DrD2 a lo largo del ciclo, el efecto que los agonistas dopaminérgicos tienen sobre la secreción de VEGF en dichas poblaciones in vitro.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental del presente estudio consta de dos partes bien definidas. La primera parte está representada por un estudio descriptivo longitudinal retrospectivo, basado en el estudio inmunohistoquímico del receptor DrD2 sobre cortes histológicos de ovario humano incluidos en bloques de parafina a lo largo del ciclo menstrual. A través de la inmunohistoquímica del receptor DrD2 pretendíamos caracterizar qué poblaciones celulares ováricas expresan este receptor y además definir su patrón de expresión a lo largo del ciclo, ya que, posibles diferencias en la expresión de DrD2 durante las distintas fases, podrían explicar las diferentes respuestas al tratamiento del SHO con agonistas dopaminérgicos en algunas mujeres, o la ineficiencia del mismo principalmente en la fase tardía del síndrome.

En la segunda parte del estudio, se lleva a cabo un diseño experimental in vitro sobre células de la granulosa luteínicas aisladas de mujeres sanas. Estas células de la granulosa fueron expuestas a diferentes situaciones experimentales con el fin de establecer si, esta población celular aislada, era capaz de responder al estímulo tanto del receptor DrD2 como del resto de sus receptores dopaminérgicos, y de este modo regular la secreción de VEGF en el medio de cultivo. Con ello pretendíamos determinar si la eficacia observada en el tratamiento del SHO con agonistas dopaminérgicos, se debía a un mecanismo adicional o incluso alternativo en contra de lo previamente hipotetizado en otros trabajos.

4.2.- DESCRIPCIÓN PORMENORIZADA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

4.2.1.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DrD2 DURANTE EL CICLO OVÁRICO

Para el estudio retrospectivo se usaron muestras obtenidas de bloques de parafina procedentes de los archivos histológicos del departamento de anatomía patológica de la Universidad de Córdoba, bajo la aprobación del Comité Ético de la misma Universidad, donde habían sido recopilados desde 1980 hasta el año 2000. De una gran serie, se estudiaron un total de 45 ovarios procedentes de mujeres normales, 5 en fase folicular y 20, 12 y 8 en fase lútea temprana, media y tardía respectivamente. También se realizó el estudio sobre 5 cuerpos lúteos procedentes del embarazo. Estas mujeres habían sido sometidas a intervención

quirúrgica con ooforectomía por causas relacionadas con patologías uterinas, tales como carcinoma cervical y endometrial, tumor neuroendocrino primitivo de la pelvis, tumores malignos del ovario contralateral, fibroides uterinos, dolor pélvico y resecciones en cuña realizadas para descartar patología ovárica. Además, presentaban ciclos menstruales normales y no habían sido tratadas hormonalmente. Todas las muestras ováricas fueron re-evaluadas por personal experimentado del mismo departamento, determinando la fase del ciclo a través de la historia menstrual y el dataje del cuerpo lúteo, en base a criterios previamente descritos por (Gaytán y cols, 1998), y descartando una posible patología ovárica.

Todos estos tejidos ováricos habían sido fijados en paraformaldehído al 4% en PBS (Phosphate Buffered Saline. Sigma Aldrich) e incluidos en parafina. Posteriormente fueron cortados en secciones de 5 μm , para llevar a cabo la evaluación histológica y la inmunohistoquímica.

Como control positivo de expresión inmunohistoquímica de DrD2 se usaron 3 tipos de tejidos donde se pudo confirmar el patrón de expresión generado por la unión específica del anticuerpo frente al receptor, estos tejidos humanos fueron glándula pituitaria, córtex cerebral y ganglios periféricos (plexo de Auerbach). Como control negativo se utilizó tejido procedente del córtex cerebral, sobre el cual se siguió el procedimiento inmunohistoquímico completo excepto la incorporación del anticuerpo primario que se sustituyó por diluyente.

4.2.2.- ESTUDIO IN VITRO DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANAS

Las células de la granulosa luteínicas procedentes del líquido folicular, son un material biológico obtenido de forma indirecta tras la punción folicular para recuperar los ovocitos después de la hiperestimulación ovárica controlada. Estas células se obtienen en el momento previo a la ovulación correspondiendo con una fase pre-lútea, las cuales se luteinizan en respuesta a la hCG administrada como inductor ovulatorio.

Las células de la granulosa fueron aisladas y purificadas a partir de los líquidos foliculares a partir de un total de 82 mujeres incluidas en un programa de donación de ovocitos, las cuales presentaban una media de edad entre 25 y 35 años, un índice de masa corporal (IMC) menor de 30, unos niveles de estradiol por debajo de 2000 pg/ml y una recuperación de 10-15 ovocitos durante la punción ovárica. Las mujeres seleccionadas que cumplieron con los criterios de inclusión, habían sido sometidas a un protocolo de estimulación ovárica mediante inyecciones diarias de GnRH de forma subcutánea, comenzando el día 21 del ciclo menstrual y ajustando las dosis en función de la respuesta

individual de cada caso. Finalmente la ovulación fue inducida mediante administración de hCG una vez que el folículo más desarrollado alcanzase los 17 mm de diámetro. La punción folicular se llevó a cabo 35 horas después de la inyección de hCG, donde se recuperaron los ovocitos y el líquido folicular rico en células de la granulosa. En todos los casos se informó debidamente de la finalidad de las muestras solicitadas y se obtuvo el consentimiento informado por parte de las donantes. El estudio de esta tesis además, fue presentado y aprobado por el Comité Ético del Instituto Valenciano de Infertilidad CEIC-IVI Valencia.

Debido a la contaminación por células inmunitarias que se produce en el momento de la punción folicular, de las 76 muestras obtenidas, 10 muestras de granulosa aislada fueron sometidas a citometría de flujo para el marcador pan-leucocitario CD45 con el fin de determinar si nuestro método de purificación nos proporcionaba un material celular enriquecido en células de la granulosa y con una contaminación por células inmunitarias menor del 5%.

Las 66 muestras restantes se cultivaron in vitro para poder desarrollar una serie de experimentos enfocados a determinar la fisiología dopaminérgica ovárica.

Para intentar comprender cómo se regula el sistema VEGF/VEGFR2 a través del sistema dopaminérgico, se llevaron a cabo cultivos de células de la granulosa obtenidas como se ha comentado anteriormente, en los que se dispusieron diferentes escenarios en los medios de cultivo (Tabla 3) para evaluar la respuesta de estas células in Vitro.

NOMBRE	REFERENCIA	FUNCIÓN	BIBLIOGRAFÍA
Cabergolina (Cb2)	Dostinex (Pfizer)	Agonista del receptor D2 de la dopamina (DrD2)	Miglio y cols, 2004
L-741,626	L135 (Sigma Aldrich)	Antagonista del receptor D2 de la dopamina (DrD2)	Rey Ares y cols, 2007
SKF-38,393	S101 (Sigma Aldrich)	Agonista de los receptores D1 y D5 de la dopamina (DrD1, DrD5).	Mayerhofer y cols, 1999
SCH-23,390	D054 (Sigma Aldrich)	Antagonista de los receptores D1 y D5 de la dopamina (DrD1, DrD5).	Mayerhofer y cols, 1999
PD-168,077	P233 (Sigma Aldrich)	Agonista del receptor D4 de la dopamina (DrD4)	Chang y cols, 2008
L-745,870	L131 (Sigma Aldrich)	Antagonista del receptor D4 de la dopamina (DrD4)	Chang y cols, 2008
hCG	Profasi (Merck Serono)	Gonadotropina coriónica humana	Polan y cols, 1984; Rey Ares y cols, 2007
Prolactina (PRL)	L7009-50UG (Sigma Aldrich)	Prolactina humana	Perks y cols, 2003
Etanol Absoluto	121086.1212 (Panreac)	Alcohol etílico 100%. (Disolvente)	---
DMSO	D-8418-100ML (Sigma Aldrich)	Dimetil Sulfoxido. (Disolvente)	---

Tabla 3. Principales características que definen a los compuestos ensayados sobre cultivos de células de la granulosa, para evaluar su efecto sobre los distintos parámetros de análisis del estudio. Se identifica el nombre de cada compuesto, su referencia comercial, así como su implicación fisiológica y la bibliografía donde se puede encontrar previamente ensayado.

De forma generalizada, se realizaron 2 experimentos funcionales principales y un experimento piloto para determinar las condiciones óptimas de cultivo de la granulosa, los cuales se describen siguiendo la secuencia lógico-temporal siguiente:

4.2.2.1.- EXPERIMENTO PILOTO: Establecimiento de las condiciones de cultivo de células de la granulosa.

Con el fin de determinar las condiciones de cultivo estándares que serán aplicadas al resto de experimentos, se establecieron tres subexperimentos:

- ***Estudio de tiempo respuesta de hCG:***

Para evaluar los efectos de la hormona hCG sobre la expresión del VEGF (N=6), la prolactina (N=3) y el estradiol (N=3), se cultivaron células de la granulosa, a las que se adicionó al medio una dosis de hCG 10 UI. Los niveles de VEGF, PRL y E2 fueron determinados mediante ELISA/EIA en el medio tomado a los 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.

- ***Estudio de dosis respuesta de hCG y PRL:***

Para determinar la dosis óptima a la que se secretaba una mayor cantidad de VEGF en respuesta a hCG y PRL, se realizaron ensayos de dosis respuesta en los que se evaluaron estos efectos sobre la secreción de VEGF tras 72 horas de cultivo con diferentes dosis de hCG (0, 1, 10 y 50 UI/ml) (N=6) y de PRL (0, 1, 10, 200, 500 y 1000 ng/ml) (N=6), esta última suplementada con 5 UI de hCG. Este punto de medición a los 3 días, fue elegido a partir de los datos obtenidos del experimento previo de tiempo respuesta a la hCG. Puesto que sabemos que la administración de agonistas dopaminérgicos inhibe la secreción de PRL circulante, mediante estos experimentos también pretendíamos evaluar o descartar la contribución de dicho lactógeno a la secreción de VEGF de modo que, nos permitiese extrapolar sus efectos al modelo humano in vivo. Para ello, se cultivaron células de la granulosa procedentes de distintas mujeres y se analizaron los medios de cultivo mediante ELISA a los 3 días tras administrar las diferentes dosis de los compuestos anteriormente citados.

- ***Ensayos de toxicidad celular:***

Los siguientes ensayos fueron basados en el uso de fármacos de acción sobre el repertorio de receptores de la dopamina presentes en las células de la granulosa humana. Mediante este experimento pretendíamos determinar cuáles serían las dosis de estos fármacos que íbamos a poder administrar en posteriores experimentos funcionales de modo seguro. De esta forma cualquier efecto observado sobre los parámetros de estudio, estaría producido por la acción específica del fármaco sobre su receptor y no por un efecto tóxico producido sobre las células en cultivo.

Concretamente los agonistas/antagonistas empleados aparecen resumidos en la tabla 3. A continuación se citan estos compuestos y el número de casos que se han llevado a cabo en cada ensayo:

DrD2: El agonista ensayado para este receptor 2 de la dopamina fue la cabergolina (Cb2) (N=3), mientras que para el antagonista del mismo receptor se utilizó el compuesto L-

741,626 (N=3). Ambos compuestos fueron diluidos en etanol absoluto (121086.1212, Panreac).

DrD1/DrD5: ambos receptores comparten tanto el agonista como el antagonista, ya que comercialmente no existe un compuesto específico para uno y otro que permita usarlo de forma selectiva, por lo que los resultados obtenidos se tuvieron en cuenta para ambos receptores del mismo modo. El agonista empleado para DrD1/DrD5 fue el compuesto SKF-38,393 (N=4) y el antagonista fue SCH-23,390 (N=4). Ambos compuestos fueron diluidos en agua destilada.

DrD4: Para este receptor dopaminérgico, el agonista empleado fue PD-168,077 (N=4), mientras que el antagonista fue el compuesto L-745,870 (N=4). En este caso, el antagonista de DrD4 fue diluido en agua destilada, mientras que el agonista PD-168,077, debido a sus propiedades físicas tuvo que ser diluido en DMSO (D-8418-100ML, Sigma Aldrich).

Para llevar a cabo estos cultivos de células de la granulosa se utilizaron placas de 24 pocillos, empleando las condiciones estandarizadas establecidas a partir de la información obtenida de los ensayos previos (5 UI hCG durante 3 días de cultivo). Para cada fármaco se utilizaron las mismas dosis crecientes (0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 400 μ M), y cada dosis fue dispuesta en cada placa por duplicado. Los compuestos empleados no permitían ser diluidos directamente en el medio de cultivo, necesitando un procedimiento específico para poder ser administrados a los cultivos. Cada fármaco fue diluido en una solución vehículo, formado por un disolvente específico dependiendo del fármaco (Etanol, agua destilada o DMSO). Una vez diluido el fármaco tendremos una solución stock, de la cual se toma el volumen necesario que nos permita tratar cada pocillo (500 μ l de volumen total) con el fármaco a la concentración deseada. De forma paralela a cada dosis, se cultivó por duplicado otro pocillo sin fármaco, pero con el mismo volumen de vehículo, usado para diluir el compuesto a la dosis correspondiente (Figura 4). Tras 72 horas de cultivo, la viabilidad sobre las células cultivadas en los diferentes pocillos fue determinada mediante la técnica de Hoechst/ioduro de propidio, y cuantificada en un *IN CELL analyzer*.

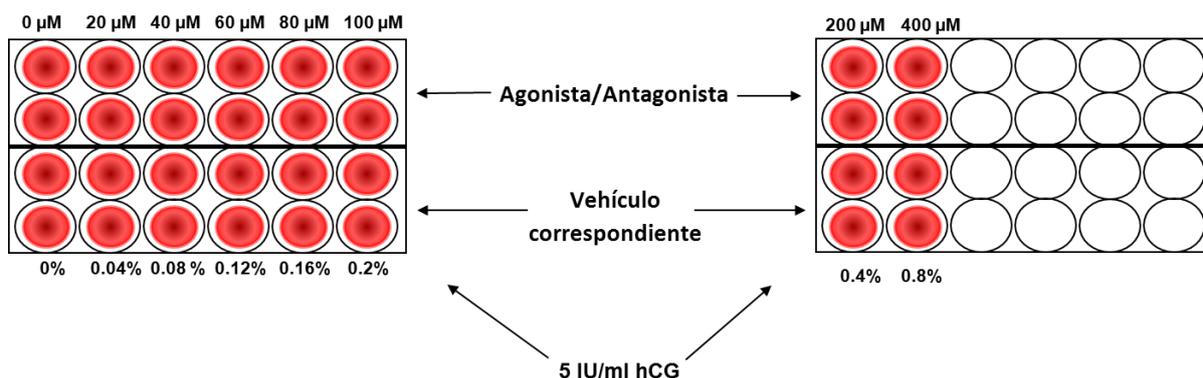


Figura 4. Distribución de los compuestos empleados para el ensayo de viabilidad. Diferentes dosis crecientes se fueron incorporando a cada pocillo por duplicado (valores en μM). Del mismo modo, de forma paralela se adicionó el mismo vehículo usado para cada dosis pero sin fármaco, con el fin de determinar cambios en la viabilidad de los cultivos (valores en %).

4.2.2.2.- EXPERIMENTO N° 1: Modulación del sistema dopaminérgico de las células de la granulosa: efecto sobre la secreción de VEGF.

Una vez determinadas las condiciones de cultivo estándar sobre las células de la granulosa (hCG 5 UI; cultivo durante 3 días), y descartado el efecto tóxico que pudieran tener las dosis empleadas de los fármacos ensayados o de sus diluyentes, se pretendía establecer un ensayo con estos fármacos donde se pudiese determinar el efecto sobre la secreción del VEGF.

- Ensayo de dosis respuesta para DrD2:

Por un lado se ensayaron diferentes dosis de agonista o antagonista del receptor DrD2 para conocer el posible efecto sobre la secreción de VEGF en las células de la granulosa humana. Tanto la administración del agonista Cb2 como la del antagonista L-741,626 a los medios de cultivo (N=6), se llevó a cabo en función de las mismas dosis crecientes para cada uno de los fármacos: 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μM . La dosis máxima de 100 μM , se estableció a partir de la información proporcionada por el estudio piloto realizado previamente. En este estudio se observaron ligeros descensos de la viabilidad a partir de 200 μM de agonista/antagonista, la cual fue causada por la cantidad de vehículo (etanol) utilizado para diluir estos compuestos. Por este motivo, también se consideró una reducción del vehículo al 50% en todas las dosis empleadas de Cb2 o L-741,626.

En cada placa, procedente de muestras de células de la granulosa obtenidas de mujeres diferentes, se dispusieron controles negativos donde no se adicionó ningún fármaco (dosis 0 μM), pero sí que se incorporó la misma cantidad de vehículo que había sido necesaria para diluir el fármaco empleado en su dosis más alta (dosis 100 μM).

Los niveles de VEGF sobre los medios de cultivo de las células tratadas con cada fármaco, fueron cuantificados al tercer día de cultivo mediante ELISA.

- ***Ensayo de dosis respuesta para DrD1/DrD5 y DrD4:***

Por otro lado, además del receptor DrD2, se realizó el mismo estudio sobre los otros 3 receptores dopaminérgicos expresados en las células de la granulosa: DrD1, DrD4 y DrD5. Para determinar si estos receptores fueran capaces de producir un efecto sobre la secreción del VEGF en las células de la granulosa, se llevó a cabo un ensayo en condiciones estándar donde se adicionó al medio de cultivo dosis crecientes de un agonista o un antagonista de cada receptor y se midieron los niveles de VEGF mediante ELISA al tercer día de cultivo.

Las dosis empleadas tanto para el agonista (SKF-38,393) y el antagonista (SCH-23,390) de DrD1/DrD5 como para el agonista (PD-168,077) y el antagonista (L-745,870) de DrD4 fueron 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μM , donde cada fármaco fue diluido en su vehículo correspondiente.

Detalladamente, al igual que para el ensayo sobre el receptor DrD2, se consideró la mitad de cada placa de cultivo procedente de cada donante de ovocitos para ser tratada con el agonista y la otra mitad con el antagonista (Figura 5), tanto para los receptores DrD1/DrD5 (N=4) como para el receptor DrD4 (N=4). Para cada agonista/antagonista se incluyó un control negativo (sin fármaco), en el que sólo se adicionó al medio de cultivo la misma cantidad de vehículo usado para diluir la dosis más concentrada del fármaco empleado. Este vehículo, usado para diluir tanto los fármacos como para los controles negativos, en todos los casos fue agua destilada estéril, excepto para el PD-168,077 que requería ser diluido en DMSO.

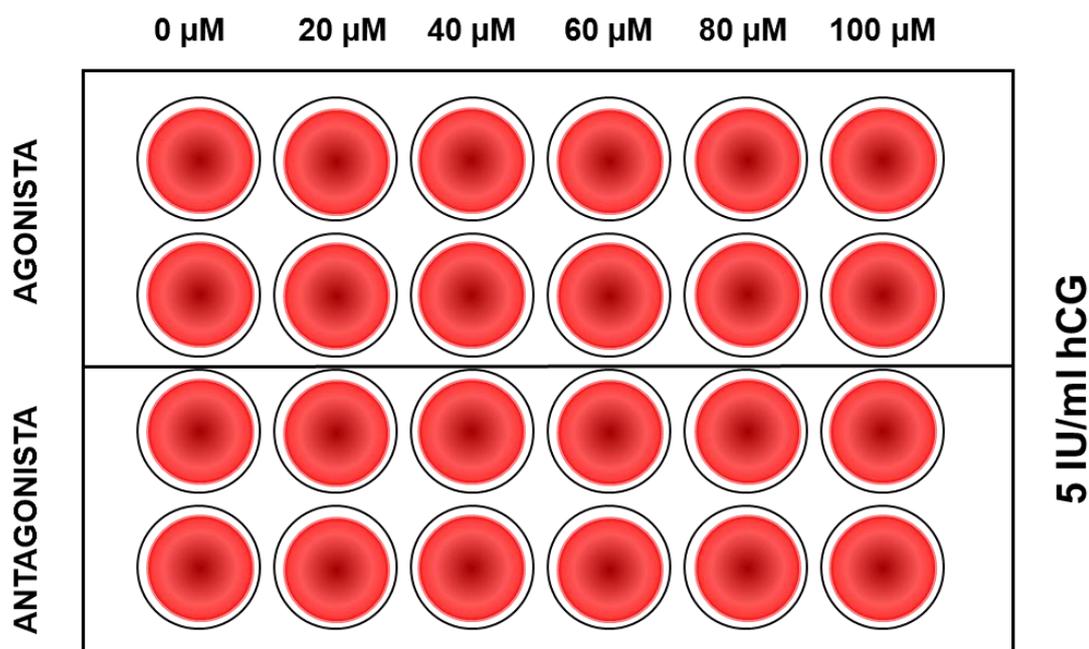


Figura 5. Distribución de los compuestos empleados para el ensayo de dosis respuesta. Sobre cultivos de células de la granulosa en condiciones estándar (3 días de cultivo, 5 UI/ml de hCG), se fueron incorporando a dosis crecientes de cada compuesto en cada pocillo por duplicado, tanto para el agonista como para el antagonista de cada receptor. Así mismo también se incorporaron controles negativos donde se adicionó tan solo el vehículo sin fármaco usado para diluir las dosis más altas (100 μM).

4.2.2.3.- EXPERIMENTO nº 2: Papel del DrD2 en la regulación de la secreción del VEGF

La información proporcionada por el ensayo de dosis respuesta de los agonistas/antagonistas dopaminérgicos permitió descartar cualquier efecto sobre la secreción de VEGF a las dosis empleadas para cualquier receptor, excepto para el agonista del receptor D2, el cual mostró un efecto dosis dependiente sobre el VEGF en los medios de cultivo. Para evaluar si estos efectos observados estaban mediados a través de la unión de la Cb2 al DrD2, o por el contrario se presentaban como un resultado de acciones inespecíficas no mediadas por su receptor, se cultivaron de nuevo células de la granulosa en condiciones estándar (N=6). Así por tanto, se determinaron los efectos que se producían sobre los niveles de VEGF cuando se administraban a la vez en el mismo medio de cultivo, el antagonista del DrD2 (L-741,626; 100 μM) y el agonista cabergolina (100 μM).

Los resultados obtenidos se compararon con los efectos producidos tanto por el agonista Cb2 (100 μM) como con el antagonista L-741,626 (100 μM) cuando fueron adicionados por separado, y a su vez, con un control negativo donde tan solo se adicionó el vehículo necesario para diluir ambos fármacos cuando se adicionaron a la vez. En base a este

diseño, el VEGF secretado por las células de la granulosa procedentes de diferentes mujeres, fue cuantificado mediante ELISA en los medios de cultivo en día 3.

4.3.- MÉTODOS EMPLEADOS PARA EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL

4.3.1.- INMUNOHISTOQUÍMICA

Como paso previo a la realización de las técnicas inmunohistoquímicas es necesario realizar una fijación de los tejidos que permitía mantener la morfología celular y mantener las características de funcionalidad y reactividad de los componentes (proteínas, ácidos nucleicos, etc) contenidos en la misma. En el caso de bloques histológicos de ovarios humanos conseguidos del archivo de anatomía patológica, éstos ya estaban incluidos en parafina, por lo que tan solo fue necesario realizar los cortes histológicos y continuar con el procedimiento de inmunohistoquímica indicado. A partir de los bloques de parafina previamente enfriados sobre una base de hielo, se colocaron en un microtomo y se realizaron cortes seriados en láminas de 5 µm. Estos cortes se pasaron a un baño de agua destilada a 37°C para poder extenderlos y colocarlos sobre porta-objetos tratados con poli-L-lisina (lo que incrementa su adherencia al cristal y evita que los cortes se despeguen en los posteriores lavados y procesamientos). Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente y se mantuvieron ordenados en cajas archivadoras hasta el momento de ser usadas. Además, se introdujeron en una estufa a 37 °C al menos durante las 24 horas previas a ser desparafinados, para mejorar la adherencia de los cortes al porta-objetos.

Los cortes seriados de ovario humano sobre porta-objetos, fueron seleccionados para determinar la expresión de DrD2 y sobre un corte consecutivo, la expresión del marcador de macrófagos CD68. Estos fueron colocados en estufa de 60°C durante al menos una hora para facilitar la eliminación de la parafina. Un buen desparafinado es esencial para conseguir un marcaje limpio sobre nuestros tejidos, evitando el un posible ruido de fondo producido por los restos de parafina que pudiesen quedar. Para sustituir la parafina que embebe el tejido, seguidamente se introdujeron los cortes dos veces en xilol durante 5 minutos cada vez, y una vez desparafinado se procedió a rehidratar los cortes mediante inmersiones de 5 minutos en etanol en concentraciones decrecientes (100%, 90%, 80%, 70%). Durante el baño de etanol al 100%, los cortes se fueron sacando uno a uno y se rodearon con Pap-Pen (Sigma Aldrich), un

líquido hidrófobo que permite mantener los cortes cubiertos por el anticuerpo durante su incubación posterior. Finalmente los cortes fueron totalmente re-hidratados con su inmersión en agua destilada, donde se realizaron dos lavados de 5 minutos.

Una vez rehidratadas las muestras fue necesario bloquear la enzima peroxidasa endógena que de forma natural puede estar presente en algunas células o tejidos, ya que la reacción cromogénica que nos indica dónde se expresa nuestro antígeno objetivo, depende de la enzima peroxidasa que nosotros incorporamos posteriormente durante el procedimiento. Por ello las muestras se incubaron dentro de una cámara húmeda en una solución de peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H₂O₂) al 3% en PBS durante 30 minutos, seguido de un lavado de 5 minutos en PBS.

A pesar de que los fijadores de base aldehídica como el paraformaldehído, consiguen unos resultados excelentes en cuanto a la preservación de la morfología celular, por otro lado dan lugar a entrecruzamientos proteicos que resultan en la imposibilidad de algunos epítomos de esas proteínas a unirse correctamente a sus anticuerpos correspondientes. Este fenómeno se conoce como enmascaramiento antigénico, el cual se puede corregir en cierta medida mediante el uso de ciertas técnicas basadas en el calor o en digestión enzimática, las cuales son indicadas o recomendables en base al tipo de anticuerpo que se use o al epítomo que se trate de reconocer. Por un lado para el anticuerpo DrD2 recurrimos al desenmascaramiento antigénico conocido como HIER (*Heat-Induced Epitope Retrieval*). De forma general este método está basado en la aplicación de calor sobre las muestras en un medio tamponado, resultando en la rotura de los enlaces cruzados que se producen en las proteínas por la fijación, dejándolas de nuevo en su estado original con la correspondiente exposición de sus epítomos, y manteniendo su conformación adecuada debido al buffer tamponado en el que están inmersos durante el procedimiento. El HIER utilizado sobre nuestras muestras fue la inmersión en tampón citrato 0,01 M (pH=6) y el autoclavado de las mismas a 1,5 atmósferas, 121 °C durante 3 minutos. Un paso muy importante para que el proceso de Antigen Retrieval se complete y no se produzca el desprendimiento de los tejidos desde sus porta-objetos, es dejar enfriar las muestras lentamente hasta temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos), para posteriormente continuar con el protocolo de inmunotinción. En el caso de las secciones paralelas donde se usó el anticuerpo CD68 para el marcaje de macrófagos, el desenmascaramiento antigénico usado fue enzimático, mediante incubación en cámara húmeda con tripsina 1% en PBS durante 15 minutos a 37 °C. A continuación se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Pasado este tiempo, tras los desenmascaramientos antigénicos, las muestras fueron lavadas en PBS dos veces durante 5 minutos y de nuevo en cámara húmeda se bloquearon los

epítomos inespecíficos con una solución de bloqueo basada en BSA (Bovine Serum Albumin) al 5% en PBS. Esta solución de bloqueo es rica en inmunoglobulinas que se unirán a determinados epítomos inespecíficos favoreciendo que los anticuerpos primarios que usaremos a continuación se unan exclusivamente a las regiones para las cuales han sido generados. De nuevo los cortes se lavan 2 veces en PBS durante 5 minutos y se incuban con sus anticuerpos primarios correspondientes. La mitad de los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal primario (IgG2a) hecho en ratón frente al DrD2 humano (sc-5303, dilución 1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y la otra mitad en los cortes consecutivos de los anteriores, se incubaron con otro anticuerpo primario monoclonal (IgG3k) hecho en ratón (PG M1; DakoCytomation; dilución 1:500) frente al marcador de macrófagos CD68, con el fin de poder diferenciar y establecer si la expresión de DrD2 localizada en ovario se debe a células de la granulosa o a macrófagos, los cuales también expresan este receptor de dopamina.

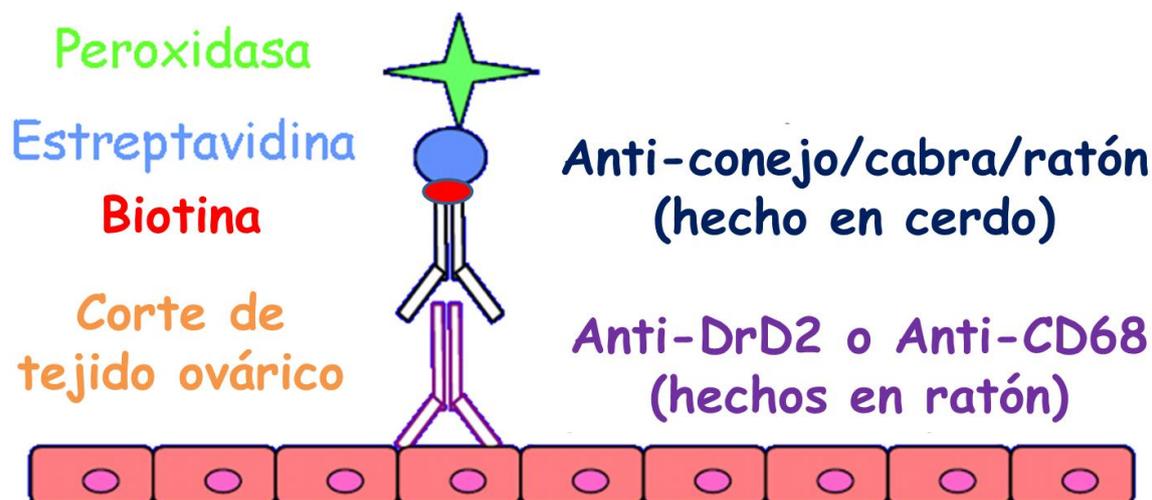


Figura 6. Esquema ilustrativo de la inmunohistoquímica llevada a cabo para el marcaje del receptor DrD2 y CD68. Ambos anticuerpos primarios reconocen específicamente el antígeno frente al cual han sido desarrollados, uniéndose a él y quedando expuestos en su fracción constante que identifica en qué animal han sido hechos, para a su vez ser reconocidos con otro anticuerpo secundario ligado a biotina. Esta biotina presenta afinidad por la estreptavidina, la cual también aparece asociada a la peroxidasa, enzima responsable de la reacción que dará lugar a color que indicará el lugar donde se ha generado este complejo inmunitario, y por tanto donde se encuentra expresado la molécula concreta que se pretende localizar.

Ambos anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo y se incubaron durante toda la noche (*overnight*) a 4 °C en cámara húmeda para evitar que la evaporación en los cortes haga que los anticuerpos se concentren o que los tejidos se sequen.

Al día siguiente los cortes fueron lavados en PBS 2 veces durante 5 minutos y a continuación de nuevo en la cámara húmeda, se incubaron a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario biotinilado (*link*) procedente del kit LSAB de DAKO (K0679, LSAB+ kit;

Dakocytomation) durante 30 minutos. Este link posee inmunoglobulinas biotiniladas producidas en cerdo capaces de reconocer la fracción constante de anticuerpos hechos en ratón, conejo y cabra, y sirve de anticuerpo intermediario en la reacción ABC (*Avidin Biotin Complex*) (Figura 6). Pasados los 30 minutos de incubación, el link se lavó por inmersión en PBS 2 veces durante 5 minutos y de nuevo se incubaron los cortes con la *Streptavidin-HRP* (estreptavina unida a peroxidasa de rábano) presente en el kit de DAKO (K0679, LSAB+ kit; Dakocytomation) durante 30 minutos adicionales. Finalmente las muestras se lavaron de nuevo 2 veces en PBS durante 5 minutos y se incubaron con una disolución de 3,3'-Diaminobencidina (DAB) con el sustrato cromógeno de la peroxidasa (Figura 7), la cual se pudo preparar a partir de los componentes presentes en el kit de DAKO (K0679, LSAB+ kit; Dakocytomation).

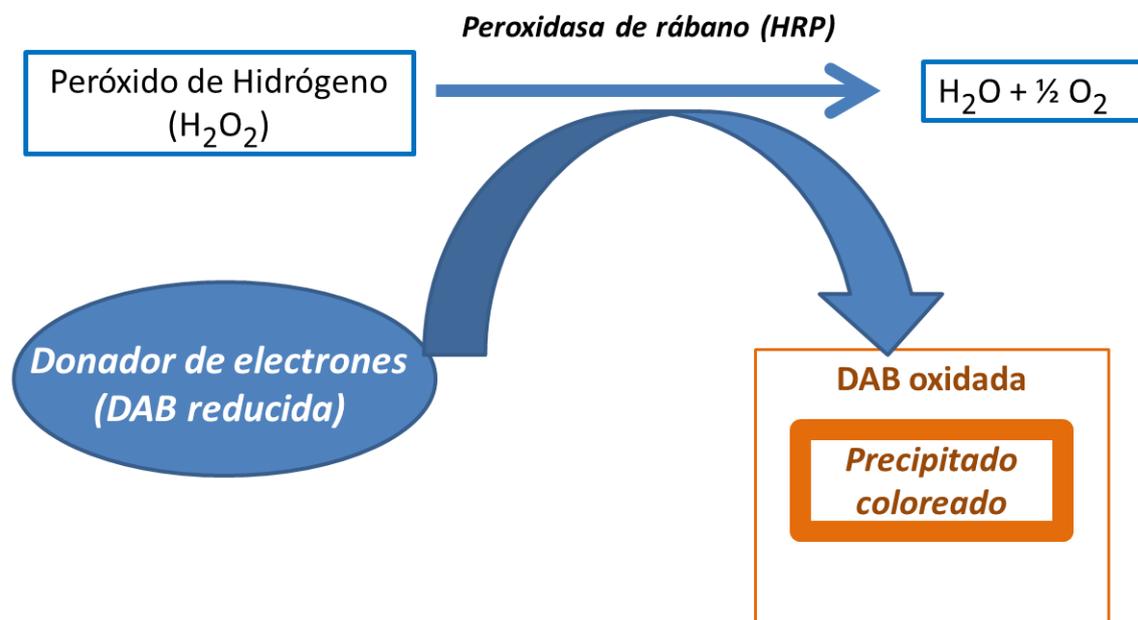


Figura 7. Reacción enzimática durante la inmunohistoquímica. Al incorporar el sustrato peróxido de hidrógeno, la enzima HRP cataliza la reacción de oxidación de la Diaminobencidina, la cual cede los electrones para formar H₂O y O₂. La Diaminobencidina en su estado oxidado forma un precipitado marrón fácilmente identificable que sirve para indicar el lugar exacto donde se ha formado el complejo inmunitario que indica la presencia del DrD2 o el CD68.

Para evitar que la intensidad de señal producida por la reacción de oxidación de la DAB sea diferente entre diferentes cortes, para cada anticuerpo primario (DrD2 y CD68), se determinó el tiempo necesario de incubación con DAB basándose en el tiempo que, el control positivo usado, requería para conseguir una señal óptima (el seguimiento de la señal se realizó bajo microscopio). Ese tiempo se aplicó a la incubación de DAB en cada uno de los cortes y seguidamente la reacción se detuvo introduciendo cada corte en agua destilada, aplicando 3

lavados de 5 minutos. Las secciones fueron contrateñidas con un baño de hematoxilina de Mayer diluida en agua destilada (1 parte de hematoxilina y 3 de agua) durante 1 minuto, y deshidratadas a continuación en pases de 2 minutos por alcoholes crecientes (Etanol 70, 80, 90 y 100 %) y dos pases finales en xilol, 2 minutos el primero, y mantenidos en el segundo baño mientras se van sacando y montando con medio de montaje (Eukitt™ 15320) y un cubre de cristal, con cuidado de no generar burbujas. Una vez montadas se dejan *overnight* hasta que sequen bien y puedan ser observadas al microscopio.

4.3.2.- PROCESAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA

4.3.2.1.- Obtención de las células de la granulosa

Como se comenta anteriormente, para poder aislar las células de la granulosa luteínicas, fue necesario recurrir a los líquidos foliculares obtenidos por aspiración folicular guiada con ecografía transvaginal, de mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada en un programa de donación de ovocitos realizado en las instalaciones de IVI Valencia.

Los ovocitos junto al líquido folicular fueron vertidos en una placa calefactada para poder visualizarlos y poder recuperarlos. Con el fin de evitar lo máximo posible la contaminación eritrocítica, se seleccionaron los líquidos foliculares que presentaban menos evidencias de presencia de sangre en su composición, pasando el contenido de las placas de Petri a un tubo Falcon cónico de 14 ml (Becton Dickinson), previamente rotulado e identificado para garantizar la trazabilidad entre pacientes. Rápidamente, los tubos obtenidos fueron trasladados al laboratorio de cultivos celulares.

4.3.2.2.- Aislamiento y purificación de las células de la granulosa

Las células de la granulosa son el tipo celular más abundante de los líquidos foliculares que se obtienen tras la punción folicular. Estos líquidos foliculares en el momento de la punción deberían ser representados prácticamente en su totalidad por los ovocitos aspirados y por las células de la granulosa que los acompañan en esa aspiración, ya que no es hasta el momento en que se produce la ovulación, cuando los glóbulos blancos invaden el folículo. Sin embargo debido a la punción folicular se produce una contaminación con sangre periférica, que puede ser variable entre los aspirados de unos folículos y otros, y que supone la presencia de células inmunitarias en los aspirados. Estas células son capaces de producir citoquinas y

otras moléculas secretoras que actúan sobre el comportamiento de las células de la granulosa; incluso se ha llegado a confirmar *in vitro* que los macrófagos son capaces de incrementar la producción de P4 y otras moléculas inflamatorias (Beckmann y cols, 1991; Best y cols, 1994) en cultivos de granulosa, lo cual podría alterar o malinterpretar los resultados obtenidos en nuestros cultivos. Por otro lado, en base a nuestro objeto de estudio, el sistema dopaminérgico en ovario, es importante tener en cuenta que los posibles linfocitos, monocitos y macrófagos procedentes de la sangre periférica, que pudiesen aparecer contaminando las muestras, poseen el receptor DrD2, por lo que al igual que las células de la granulosa, deberán responder ante los agonistas dopaminérgicos, y su respuesta podría enmascarar o confundir el efecto que esperamos determinar sobre las células de la granulosa. Existen diferentes métodos de aislamiento y purificación de las células de la granulosa, pero básicamente se presentan dos problemas durante este procesamiento que se contraponen entre sí: a) la celularidad obtenida; b) la contaminación con células inmunitarias. Normalmente para conseguir que las células de la granulosa reduzcan la presencia de células inmunitarias contaminantes, es necesario recurrir a métodos que reducirán a su vez el número total disponible de células de la granulosa. Evidentemente, en los casos donde el número de células de la granulosa disponible de inicio no supone un problema para el diseño experimental, la eliminación de estas células inmunitarias es un paso asumible. Pero por otro lado, las células de la granulosa que se obtienen durante la punción folicular, no se encuentran en un número demasiado generoso, por lo que para realizar ensayos como el nuestro, donde necesitamos cultivar un número determinado de células por pocillo, con sus replicados y sus controles, se complica esta tarea depurativa.

El método que elegimos para aislar y purificar las células de la granulosa se basó en las diferencias de tamaño que existen entre los eritrocitos, las distintas células inmunitarias y las células de la granulosa, ya que la mayor parte de estas se encuentran conformando agregados. Los líquidos foliculares se hicieron pasar directamente por filtros de 40 μm , dejando pasar los glóbulos rojos, las plaquetas, y la gran mayoría de células inmunitarias (<5% confirmado por citometría de flujo del marcador panleucocitario CD45) (Figura 8). El filtro con las células retenidas, fue volteado sobre un tubo Falcon cónico y se hizo pasar PBS de forma inversa a través del filtro, haciendo que las células se liberasen y se lavasen a un tubo cónico. Posteriormente fueron centrifugadas a 350 xg durante 5 minutos y el pellet resultante se resuspendió con 1 ml de medio de cultivo, compuesto por medio M-199 (Sigma Aldrich) con 10% de suero bovino fetal (FBS; Gibco-Invitrogen), 100 U/ml de penicilina (Gibco-Invitrogen), 0,1 mg/ml de estreptomina (Gibco-Invitrogen), 0,1 mg/ml de gentamicina (Gibco-Invitrogen) y 0,55 $\mu\text{g/ml}$ de fungizona-anfotericina B (Gibco-Invitrogen). Mediante pipeteo con 3 pipetas

de cristal estiradas a la llama de diámetros decrecientes durante 1 minuto para cada una, se realizó la individualización de las células a partir de los agregados. Una vez creada una suspensión celular homogénea, se contaron las células en la cámara Neubauer (Figura 11) y se determinó su viabilidad celular mediante el uso de Trypan Blue (Sigma Aldrich).

4.3.2.3.- Citometría de flujo sobre CD45

Para a establecer el método de purificación de células de la granulosa, se realizó citometría de flujo sobre las células ya purificadas y sin purificar. La Figura 8 muestra un esquema ilustrado que establece los pasos realizados para llevar a cabo la citometría de flujo sobre las células de la granulosa aisladas a partir de líquidos foliculares. De esta forma se pretendía confirmar que el método empleado reduce el contenido de células inmunitarias contaminantes a unos niveles aceptables.

Los datos de contaminación por células CD45+, en las células de la granulosa no purificada, fueron comparados con la contaminación observada en otra fracción de estas mismas células una vez purificadas por nuestro método (Figura 8).

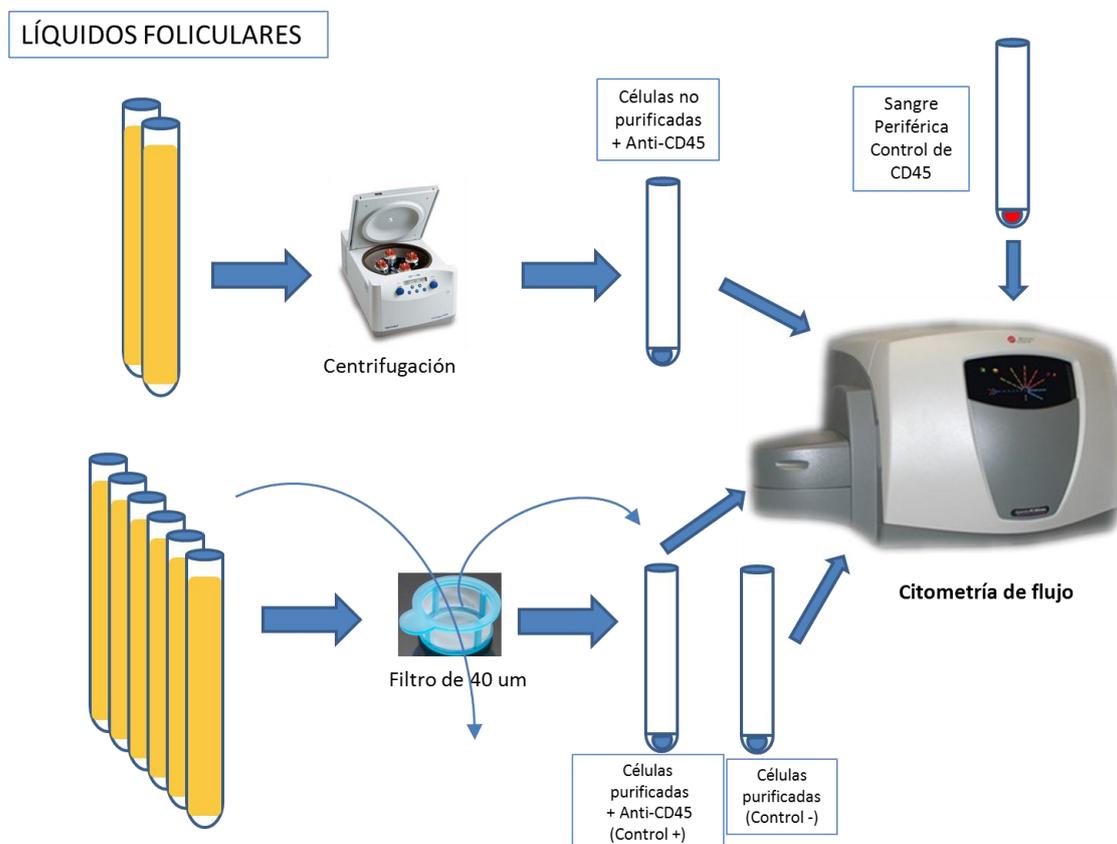


Figura 8. Método de purificación de células de la granulosa y validación. La purificación de las células de la granulosa a partir de los líquidos foliculares se basó en la capacidad de retención de estas células al pasar por un filtro de 40 micras. La citometría de flujo para el marcador de células inmunitarias CD45, se llevó a cabo para establecer el grado de contaminación de la fracción sin purificar y la fracción purificada, y así determinar la validez de este método de aislamiento. Por un lado los líquidos foliculares fueron centrifugados para obtener la fracción no purificada y por otro lado fueron pasados por un filtro de 40 μ m para conseguir

la fracción retenida la cual es considerada como purificada. Ambas fracciones fueron citometradas con el anticuerpo CD45 junto a un control del marcaje del anticuerpo en sangre periférica, y con un control negativo formado por la fracción purificada sin anticuerpo CD45. Estos controles se usaron para determinar las regiones de marcaje necesarias para el análisis tras la adquisición de las muestras.

Previamente al aislamiento de las células de la granulosa, se seleccionaron 2 tubos con líquido folicular de cada donante de ovocitos, correspondientes cada uno a un folículo puncionado, estos se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Estas células de la granulosa sin purificar ($0,5 \times 10^6$ aprox.) se resuspendieron en 100 μ l de BSA al 1% y se llevó a cabo citometría de flujo de un marcador pan-leucocitario para cuantificar la contaminación inicial por células inmunitarias, del mismo modo que se describe a continuación para las células purificadas.

Las células de la granulosa purificadas en un número aproximado de 1×10^6 , procedentes de diferentes mujeres, fueron individualmente resuspendidas en 200 μ l de BSA al 1% en PBS y divididas en 2 alícuotas de 100 μ l en todos los casos. En la primera alícuota no se incorporó ningún anticuerpo, con el fin de usarla como control negativo de su alícuota paralela, a la cual se le incorporó un anticuerpo frente a las células inmunitarias anti-CD45 ligado a un fluorocromo PC5 (CD45-PC5; A07785, Beckman Coulter) a una dilución 1:10 durante 15 minutos en oscuridad. Tras la incubación de las muestras de granulosa, estas fueron lavadas mediante centrifugación a 400 x G durante 10 minutos, y los pellets generados se resuspendieron en 500 μ l de PBS.

A su vez, se preparó un control para confirmar el correcto funcionamiento del anticuerpo, para ello se incubaron 50 μ l de sangre periférica humana en un tubo adicional con 10 μ l de anticuerpo CD45-PC5 en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Del mismo modo, se preparó otro tubo con otros 50 μ l de la misma sangre periférica pero sin incorporar el anticuerpo Anti-CD45. Tras este tiempo de incubación, se añadieron 2 ml de tampón de lisis en cada tubo (PharmLyse, Becton Dickinson) y se dejó actuar durante 5 minutos previamente a ser pasados por el citómetro de flujo.

Las suspensiones celulares fueron pasadas a través de un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500 hasta completar 10.000 eventos. Los datos adquiridos fueron analizados mediante el software VenturiOne (v4.0.2.5116.x86. Applied Cytometry, U.S.) para poder establecer y comparar la contaminación inicial frente a la contaminación resultante tras la purificación. Mediante los datos de dispersión obtenidos sobre muestras de células de la granulosa sin anticuerpo, se pudo determinar la región de positividad a partir de la cual se representarán las células marcadas con el anticuerpo CD45. A su vez, el funcionamiento del

anticuerpo empleado se verificó sobre una muestra de sangre periférica en la que no se adicionó anticuerpo CD45 durante su incubación y otra muestra que sí había sido incubada con este anticuerpo. La figura 9 muestra los gráficos de citometría donde se representan las regiones de marcaje positivo y negativo de las células de la granulosa y de la sangre periférica.

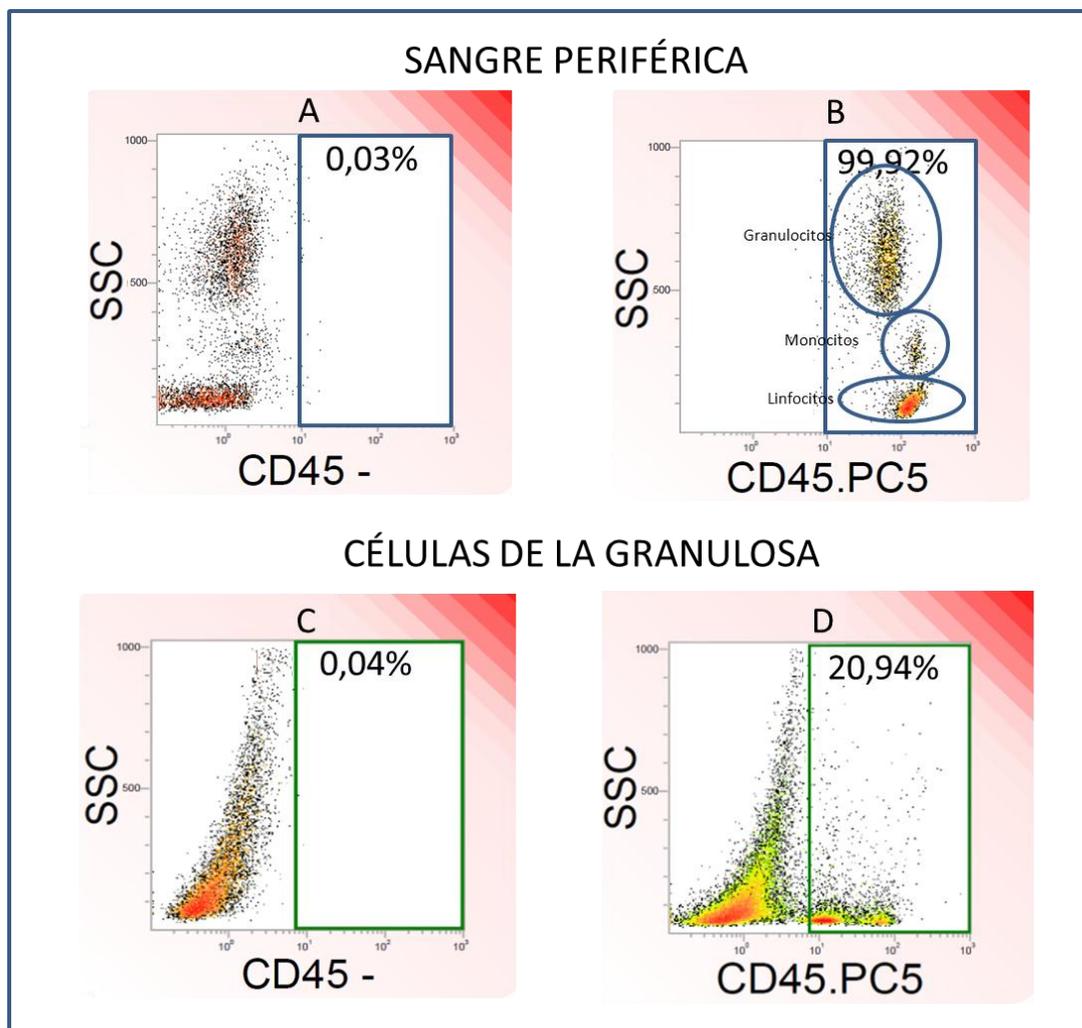


Figura 9. Gráficos de citometría de flujo del marcador panleucocitario CD45 marcado con el fluorocromo PC5. Se representa la complejidad (SSC) de las células analizadas frente a la intensidad de la señal de fluorescencia detectada. La citometría de sangre periférica sin Anti-CD45 (A) mostró una región negativa donde las células inmunitarias analizadas no mostraban marcaje (0,03%). Al incorporar el anticuerpo frente al CD45 en una muestra de la misma sangre periférica (B), se pudo confirmar el correcto funcionamiento del anticuerpo empleado. Obsérvese la distribución con marcaje positivo para diferentes poblaciones celulares inmunitarias (99,92%), linfocitos, monocitos y granulocitos. En el caso de las células de la granulosa, del mismo modo se pudo establecer la región de marcaje negativo (0,04%) (C) y la región de marcaje positivo para el anti-CD45-PC5 (D) representado por las células inmunitarias contaminantes (20,94%).

4.3.2.4.- Cultivo de células de la granulosa

La suspensión celular cuyo conteo era conocido, fue sembrada en placas de 24 pocillos a una densidad de 50000 células por pocillo, donde se tuvieron en cuenta controles negativos, representados por pocillos donde no se administró ningún tratamiento en el medio de cultivo

o en su caso, pocillos donde se administraba tan solo el vehículo (Etanol, agua destilada o DMSO en función del fármaco empleado).

Los volúmenes de medio de cultivo en cada placa de 24 pocillos fueron 500 μ l por pocillo, de los cuales para cada tratamiento se realizaron por duplicado, y a los que se incorporó el volumen necesario de muestra para conseguir la densidad celular correspondiente. Estas placas se dejaron durante toda la noche en un incubador a 37°C y 5% de CO₂, con el fin de permitir que las células vivas se adhieran al plástico, mientras que las células muertas de diferente linaje quedan en suspensión junto a los restos celulares, polimorfonucleares, linfocitos y principalmente eritrocitos, que aún puedan quedar contaminando. Todas estas células se eliminan con el cambio de medio de cultivo, al cual se incorporan los diferentes tratamientos a sus dosis correspondientes usados para los 3 experimentos anteriormente detallados, así como el vehículo necesario para diluir el compuesto.

4.3.3.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS MEDIANTE ELISA.

El ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) es una prueba analítica que usa complejos de anticuerpo y antígeno como medio para generar un resultado perceptible, del mismo modo que ocurre con la inmunohistoquímica pero en este caso el anticuerpo secundario está ligado a la superficie de las placas, el cual reconocerá al anticuerpo primario unido al antígeno estudiado y a su vez existirá un sistema de detección debido a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color. Finalmente ese color se puede medir mediante espectrofotometría y determinar la concentración de nuestro analito en base a una curva patrón de concentraciones conocidas.

Concretamente usamos un Kit de ELISA comercial altamente referenciado para determinar los niveles del VEGF-A humano (ChemiKine™ VEGF EIA KIT, Chemicon, Temecula, CA, USA). El principio de este kit está basado en el uso de placas con anticuerpos secundarios pre-absorbidos generados en cabra frente a conejo usados para capturar los complejos que forme un anticuerpo primario hecho en conejo capaz de detectar el VEGF humano. Estos complejos pueden ser el conjugado de el anticuerpo primario unido a VEGF biotinilado, un anticuerpo primario unido al VEGF cuya concentración es conocida, el cual se usará para generar la curva patrón, o un anticuerpo primario unido al VEGF de la nuestros medios de cultivo, el cual queremos cuantificar (Figura 10). Finalmente se añade a los pocillos un conjugado de estreptavidina con fosfatasa alcalina, que será la que dé lugar a la reacción coloreada cuando se incorpore su sustrato. Según esta preparación, el conjugado biotinilado

será el competidor del estándar o de nuestra muestra de estudio, por lo que se produce una relación inversa entre la concentración de VEGF y la densidad óptica (DO) que se registre en el espectrofotómetro.

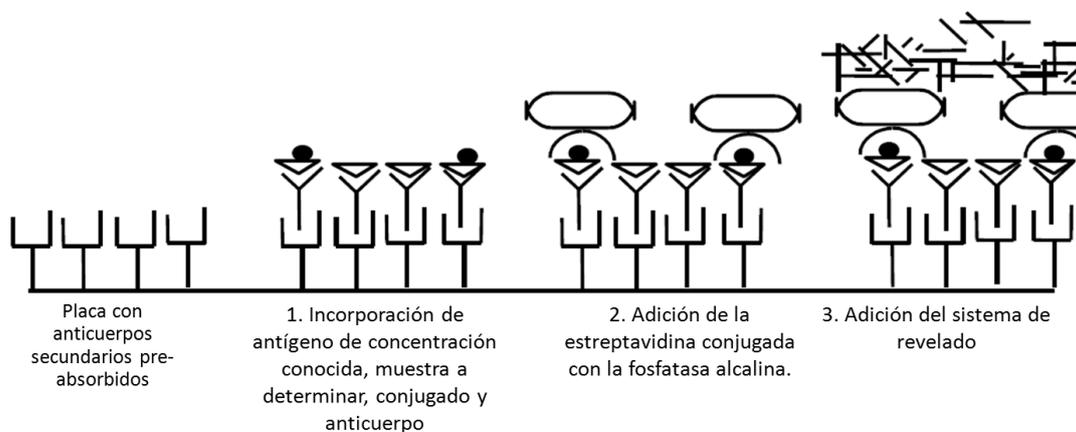


Figura 10. Esquema ilustrativo del protocolo desarrollado para el ELISA. Sobre los pocillos de la placa de ELISA se encuentran los anticuerpos secundarios recubriendo la base del pocillo. Estos anticuerpos secundarios reconocen específicamente el anticuerpo primario que se usará frente al VEGF humano. 1. En los diferentes pocillos se irán incorporando el estándar, nuestra muestra problema, el VEGF biotinilado, y finalmente el anticuerpo primario frente al VEGF humano. 2. La incorporación de la estreptavidina-fosfatasa alcalina se unirá específicamente solo donde se encuentren los complejos con VEGF biotinilado. Finalmente se añade el sustrato para la fosfatasa alcalina a través del cual se producirá el color detectable.

Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo (CVs) de este kit fueron 8,9 y 11.1% respectivamente.

Por otro lado, las determinaciones de PRL y E2 también se realizaron mediante kits comerciales de enzimo-inmunoensayo, en el laboratorio general de determinaciones analíticas presente en el Instituto Valenciano de Infertilidad.

4.3.4.- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Durante el desarrollo del trabajo de esta tesis, se presentaron dos momentos concretos donde fue necesario determinar la viabilidad celular, para los que se recurrió dos técnicas específicas:

4.3.4.1.- Método de exclusión del colorante vital Trypan Blue

Una vez que tuvimos las células purificadas, previamente a poder sembrarlas en cultivo, fue necesario determinar la viabilidad celular para que la densidad celular empleada sea apropiada en el cultivo. La viabilidad se pudo establecer ya que el Trypan Blue es un colorante azul que penetra dentro de las células que presentan alguna alteración en su

membrana, bien porque estén muertas o porque estén en proceso, mientras que las células vivas mantienen su membrana intacta y no permiten la entrada de este colorante. Al microscopio usando una cámara Neubauer, es posible establecer la proporción (%) de células refringentes (vivas) y células azules (muertas) (Figura 11).

La cámara Neubauer es un portaobjetos con zonas ligeramente deprimidas y que en el fondo de las cuales se ha marcado con un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Al poner un cubrecámaras se introdujo una suspensión de células a una dilución 1:3 con Trypan Blue (10 μ l de muestra con 20 μ l de Trypan blue) y al microscopio se contaron las células que aparecían en cada uno de las 4 cuadrículas de 16 cuadrados que se representan en la gradilla (Figura 11). Finalmente se calcula el número de células por ml presentes en nuestra suspensión mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} / 4 \times 10.000 \times \text{dilución (1/3)} = \text{número de células por ml}$$

La viabilidad se calculó como el porcentaje de células de color refringente frente al total de células contadas.

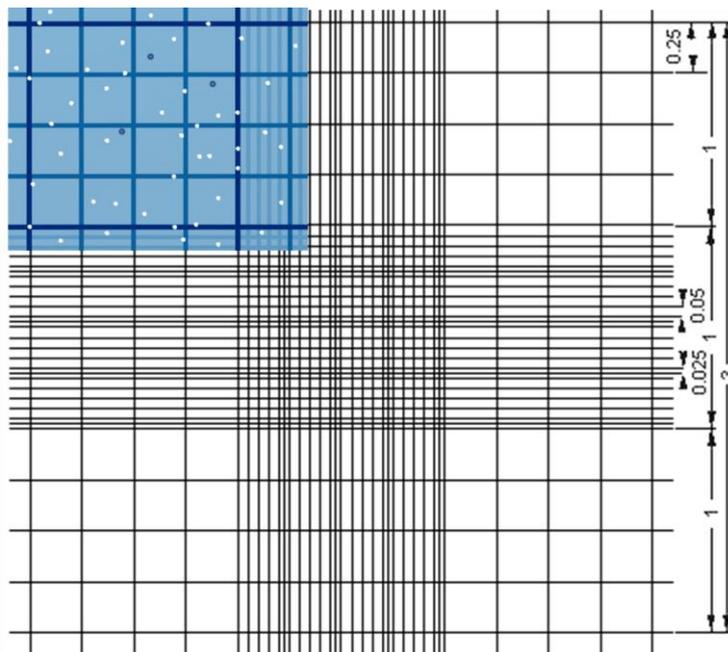


Figura 11. Cuadrícula microscópica grabada sobre el cristal de la cámara Neubauer. El cálculo de células totales presentes se tiene en cuenta mediante el conteo de los 16 cuadrados de cada cuadrante de las esquinas. La viabilidad se establece fácilmente contando las células que aparecen de color azul (muertas) y las que se observan refringentes (vivas), calculando el porcentaje que suponen las refringentes sobre el total de células contadas.

4.3.4.2.- Método de Hoechst/Ioduro de propidio

Pretendemos confirmar que los efectos sobre los niveles de VEGF están directamente relacionados con la unión del agonista o el antagonista dopaminérgico de los receptores estudiados y no a una toxicidad celular producida por los compuestos, lo cual podría propiciar un artefacto sobre los resultados. Para confirmar este supuesto, se usaron cultivos de células de la granulosa en placas de 24 pocillos los cuales fueron tratados con dosis crecientes de agonista o antagonista de los receptores dopaminérgicos D2, D1/D5 y D4, o con el vehículo utilizado para diluir estos compuestos en la misma proporción que en cada dosis de durante 72 horas. Pasado este tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con Hoechst y ioduro de propidio. Esta técnica fue descrita por Abu-Shakra (Abu-Shakra y cols, 1997) modificada para usar estas dos sondas. El Hoechst es un fluorocromo capaz de penetrar en todas nuestras células de la granulosa, tanto vivas como muertas tiñendo su material genético con un máximo de absorción a 356 nm y una emisión a 492 nm. Para poder discriminar las células muertas, utilizamos una segunda tinción con ioduro de propidio, que es también un fluorocromo pero no permeable a través de la membrana plasmática y que presenta un pico máximo de absorción a 530 nm y de emisión a 617 nm. El protocolo de marcaje seguido es el siguiente: Lavamos las células 2 veces con 1 ml de PBS y añadimos al cultivo 2 ml de Locke K519 sobre el que se añaden 60 µl de Hoechst 33258 10 mg/ml diluido en agua destilada y se incuba 30 minutos a 37°C. A continuación, se lava con PBS y se añaden 2 ml de una solución de ioduro de propidio a 10 µg/ml en PBS. Se incuba a 37°C durante 5 minutos y se lava la placa con PBS para eliminar el exceso de fluorocromo no unido, a continuación y en el menor tiempo posible se observan las muestras en el In-Cell Analyzer, que consiste en un microscopio con un láser confocal que captura una imagen de alta resolución y que nos permite cuantificar los marcajes, de tal forma que nos permitirá saber el porcentaje de células vivas (Hoechst+/Ioduro de propidio-) y cuantas están muertas (Hoeschst+/Ioduro de propidio+).

4.3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos fueron expresados como media + Desviación Estándar (D.E). Estos datos fueron analizados para determinar la distribución normal de los mismos mediante el test de Kolmogrov-Smirnov. Una vez comprobada esta premisa, el análisis estadístico de los datos fue realizado mediante el test de la *t-Student* para las comparaciones entre datos paramétricos y los no paramétricos mediante los test de Wilcoxon y de la χ^2 .

Todos estos análisis fueron llevados a cabo mediante el uso del programa informático *Statistical Package for the Social Sciences for Windows, version 12.0* (SPSS, Chicago, EEUU). El nivel de significancia elegido *a priori* fue el de p-valor < 0,05.

4.4.- LUGARES DE EJECUCIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

- Fundación IVI (fIVI)
- Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) de Valencia.
- Laboratorio de Pediatría, Ginecología y Obstetricia (POG) de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.
- Centro de Investigación Príncipe Felipe.

5.- RESULTADOS

5.- RESULTADOS

5.1.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DRD2 DURANTE EL CICLO OVÁRICO.

La inmunolocalización de DrD2 se llevó a cabo mediante el uso de un anticuerpo monoclonal frente al receptor humano DrD2. El marcaje que este anticuerpo nos proporcionó, se caracterizaba por la presencia de una señal inmunohistoquímica intensa en el citoplasma de las células positivas siguiendo un patrón punteado, coincidente con el marcaje obtenido en los controles positivos y siendo totalmente inapreciable en el control negativo (Figura 12).

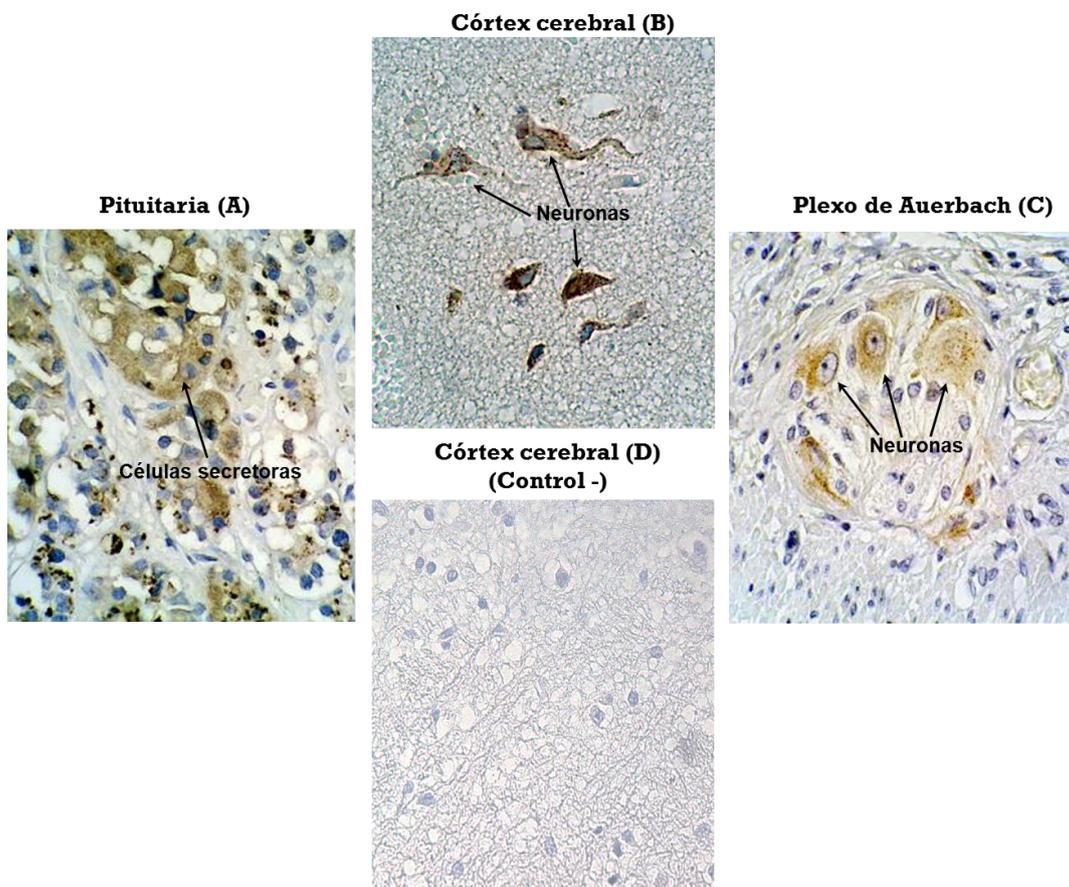


Figura 12. Controles de inmunoexpresión del receptor D2 de la dopamina. Las células inmuno-reactivas (flechas negras) para el anticuerpo DrD2, sobre los tejidos usados como controles positivos (A: Pituitaria humana; B: Córtex cerebral humano; C: Tejido humano del plexo de Auerbach), muestran un patrón de marcaje punteado con distribución citoplasmática. El control negativo (D: Córtex cerebral humano), el cual ha seguido el mismo procedimiento que el resto de tejidos, excepto la incubación con el anticuerpo primario frente al DrD2, muestra tan solo tinción de contraste debida a la hematoxilina, mostrando de esa forma que la tinción observada en los otros tejidos se debe al reconocimiento inmunitario específico del anticuerpo empleado y no a marcajes inespecíficos o ruido de fondo.

La expresión de DrD2 en el ovario se evidenció representada principalmente por 3 tipos celulares diferentes: células de la teca, células de la granulosa y macrófagos. La expresión de DrD2 detallada en cada compartimento ovárico a lo largo del ciclo se describe a continuación.

5.1.1.- EXPRESIÓN DE DrD2 EN FOLÍCULOS OVÁRICOS

En los folículos ováricos, la inmunolocalización del DrD2 fue dependiente de la fase de desarrollo. Las células de la granulosa mostraron una expresión transitoria de DrD2 en las fases tempranas del desarrollo folicular, mientras que el marcaje fue más intenso y consistente en las células de la teca durante este crecimiento folicular. Con más detalle se puede establecer que los folículos primordiales y transicionales (formados por una capa simple de células de la granulosa aplanadas o por una capa mixta de células planas y cuboidales de células de la granulosa), fueron negativos para el marcaje del receptor (Figura 13 A). La mayoría de los folículos primarios (formados por una capa simple de células de la granulosa cuboidales; Figura 13 B) y secundarios (con 2-3 capas de células de la granulosa, pero sin células de la teca interna diferenciadas; Figura 13 C y D) mostraron un patrón de marcaje punteado en el citoplasma de las células de la granulosa.

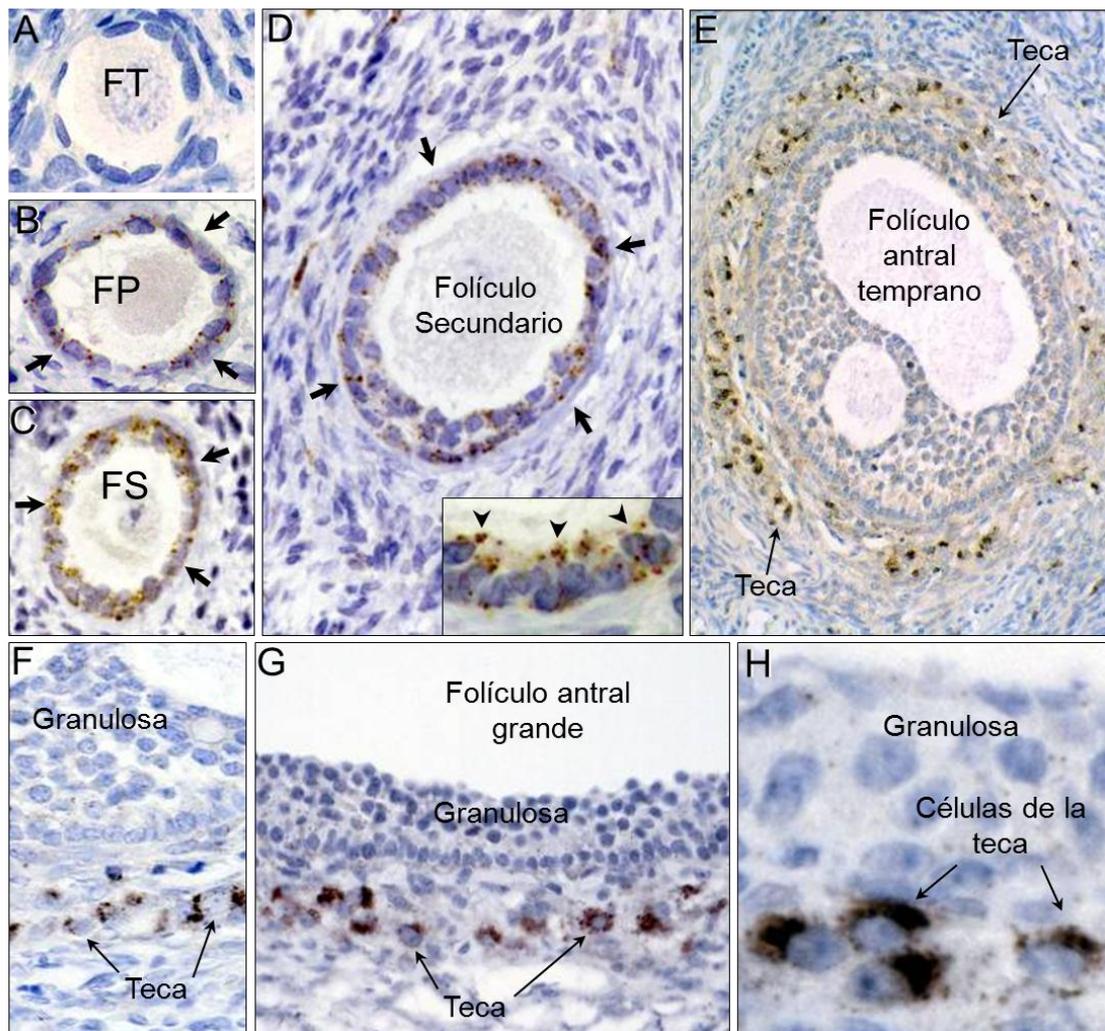


Figura 13. Expresión de DrD2 en los folículos ováricos. Los folículos primordiales y transicionales fueron negativos (A). La mayoría de los folículos primarios formados por una capa simple de células de la granulosa cúbicas (B) y los folículos secundarios (C,D) con 2-3 capas de células de la granulosa pero sin células de la teca diferenciadas, mostraron un patrón de marcaje citoplasmático punteado en las células de la granulosa (flechas en C, D y cabezas de flecha en el recuadro de detalle). Los folículos antrales tempranos (E, F) y grandes (G, H), mostraron fuerte marcaje citoplasmático en las células de la teca interna, mientras que en la granulosa, el marcaje fue difícilmente detectable (F,H). FT: Folículo transicional; FP: Folículo primario; FS: Folículo secundario.

En contraste con lo anterior, los folículos antrales tempranos, con un pequeño antro y una capa de células de la teca distinguible del resto, mostraron un marcaje inmunohistoquímico apenas detectable en las células de la granulosa pero fuerte y definido en las células de la teca (Figura 13 E y F). Del mismo modo, los folículos antrales bien formados mostraron una intensa señal en las células de la teca, mientras que las células de la granulosa el marcaje estaba prácticamente ausente (Figura 13 G y H).

5.1.2.- EXPRESIÓN DE DrD2 EN EL CUERPO LÚTEO MENSTRUAL

El día 14 del ciclo menstrual, inmediatamente tras la ovulación los folículos recién ovulados (correspondientes con cuerpos lúteos de reciente formación), todavía seguían mostrando características foliculares con una cavidad central, células de la granulosa luteinizada dispersa y una capa de células de la teca luteinizada edematizada. En estos cuerpos lúteos, se evidenció una fuerte expresión de DrD2 tanto en la capa de teca luteínica como en la capa de granulosa luteínica (Figura 14 A), siendo la capa teca luteínica la que, tal y como ocurría en fases más tempranas del ciclo, seguía manteniendo una expresión más notable. Por su parte, aunque sin haber sido cuantificado, en las células de la granulosa se observó un cierto patrón diferencial en el que unos cuerpos lúteos parecían presentar un marcaje menos intenso para el DrD2 con respecto a otros.

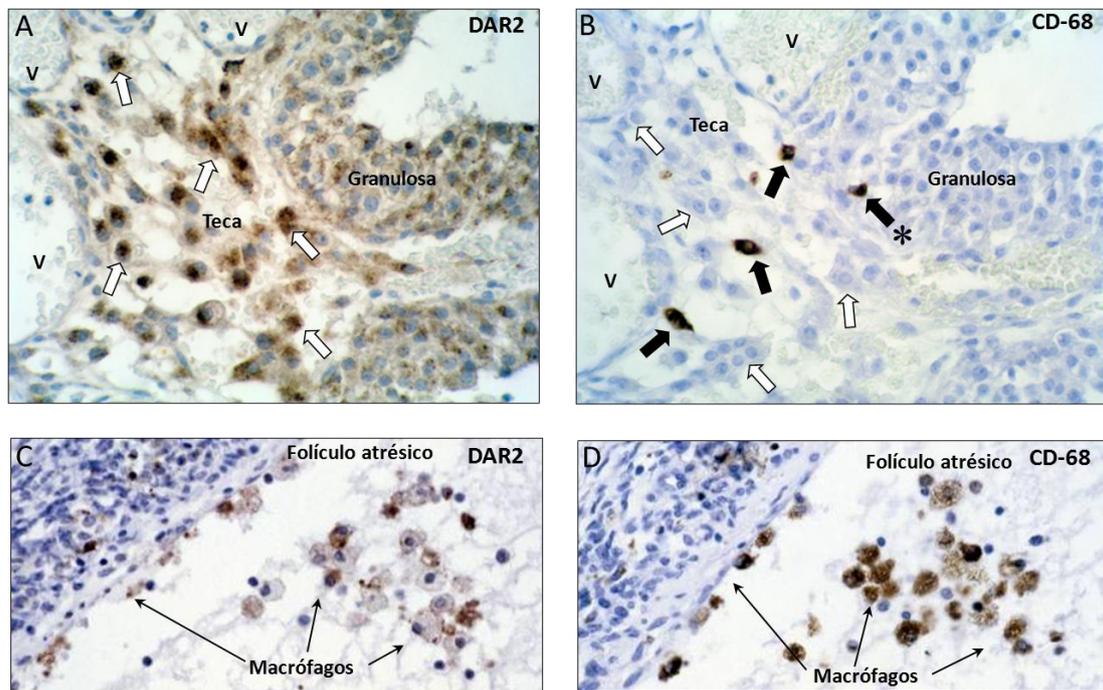


Figura 14. Expresión de DrD2 en el folículo recién ovulado. El marcaje es intenso tanto en la teca luteínica (flechas blancas) como en la granulosa luteínica (A). Los cortes paralelos con el marcador de macrófagos CD68 (B) muestran que la mayoría de las células marcadas en la teca luteínica no corresponden con macrófagos y que estos se encuentran en muy poca cantidad dispersos por la teca luteínica (flechas negras) y de forma muy ocasional aparecen en la granulosa luteínica (asterisco). En la parte inferior se observan cortes paralelos de folículos atrésicos, mostrando macrófagos abundantes en el antro reactivos para DrD2 (C) y CD68 (D), los cuales permiten apreciar un fuerte marcaje para DrD2 presente en los macrófagos. V: vasos sanguíneos, los cuales se muestran no reactivos para el receptor DrD2 o CD68.

Debido a que los macrófagos también estaban expresando el DrD2 de forma intensa, se recurrió a realizar cortes paralelos sobre los tejidos ováricos para inmunomarcarlos con el

marcador específico de macrófagos CD68 (Figura 14B), y de esta forma poder distinguir si el marcaje de DrD2 era debido a las células esteroideogénicas marcadas o a los macrófagos positivos para el DrD2. Al comparar los cortes paralelos, demostramos que la mayoría del marcaje de DrD2 en los cortes correspondió con las células de la granulosa y teca luteinizadas de estos cuerpos lúteos recién formados y que los macrófagos estaban presentes en un bajo número en la teca luteínica, mientras que sobre la granulosa luteínica aparecían de forma ocasional (Figura 14 B). Esta diferenciación se aprecia mucho mejor en la tinción paralela de folículos atrésicos, en los que abundan los macrófagos en el antro marcados con DrD2 y CD68. (Figura 14 C, D).

Por otro lado, se observó que tanto los vasos sanguíneos ováricos (Figura 14 A) como el estroma ovárico fueron negativos para la inmunodetección del receptor DrD2, salvo por la presencia de macrófagos dispersos.

En los cuerpos lúteos maduros mostraron fuerte expresión de DrD2 en la capa teca luteínica (Figura 15 A), donde las células que presentaban el marcaje correspondieron a células teca luteínicas (Figura 15 B) y a macrófagos. Sobre la capa de células de la granulosa luteinizadas el marcaje para DrD2 fue tenue (Figura 15 C), a diferencia del fuerte marcaje que mostraban estas mismas células en el cuerpo lúteo recién formado justo después de producirse la ovulación. Aunque no las cuantificamos objetivamente, a simple vista las diferencias interindividuales en la intensidad de expresión no eran excesivamente acusadas con dos excepciones. Durante al fase lútea temprana pudimos observar diferencias de expresion de DrD2 entre pacientes bastante acusados a nivel de granulosa. Así mismo durante la fase lútea tardía, también se pudieron observar diferencias de expresión a nivel de la teca de diferentes cuerpos lúteos más allá de la propia variabilidad esperada por cada individuo. En algunos casos, la teca se mostraba dramáticamente reducida respecto a la mayoría de los cuerpos lúteos. Todo esto mientras que los macrófagos presentes, marcados con CD68 a la par que con DrD2, mostraron un marcaje fuertemente positivo (Figura 15 D).

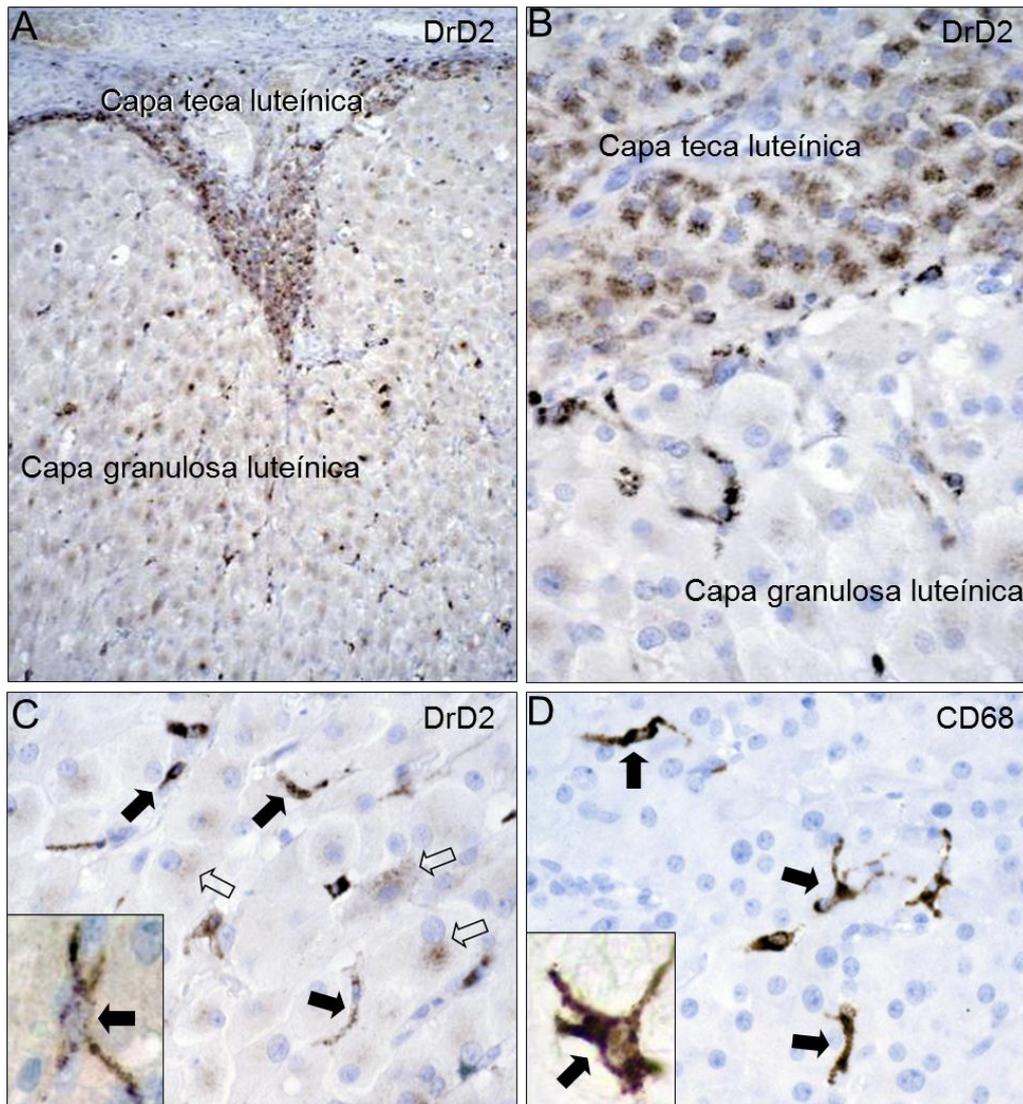


Figura 15. Expresión de DrD2 en el cuerpo lúteo maduro. La señal inmunohistoquímica para DrD2 fue más intensa en la capa teca luteínica (A, flechas blancas) y más tenue en la granulosa luteínica. A una mayor magnificación (B), las células esteroideogénicas de la teca luteínica (núcleo redondeado) mostraban el típico marcaje citoplasmático. En la capa granulosa luteínica, el marcaje intenso para DrD2 se observaba en los macrófagos dendríticos (C, flechas negras) coincidentes sobre los cortes paralelos con CD68 (D), mientras que la las células de la granulosa luteínica (C, flechas blancas) mostraron un marcaje citoplasmático débil. Las características morfológicas de los macrófagos dendríticos en la capa de la granulosa luteínica pueden apreciarse tanto para el marcaje de DrD2 (C, detalle) como para el marcador CD68 (D, detalle).

En los cuerpos lúteos tardíos, la presencia del receptor DrD2 fue menos representativa que en fases anteriores aparentemente debido a dos causas, por un lado, la leve expresión en las células luteínicas del parénquima y por otro a la disminución del número de macrófagos. Sin embargo, los cuerpos lúteos en regresión, así como los restos de cuerpos lúteos procedentes de ciclos previos, formados por una mezcla de macrófagos, material fibroso y células luteínicas en degeneración, mostraron una fuerte expresión de DrD2 (Figura 16 A, C).

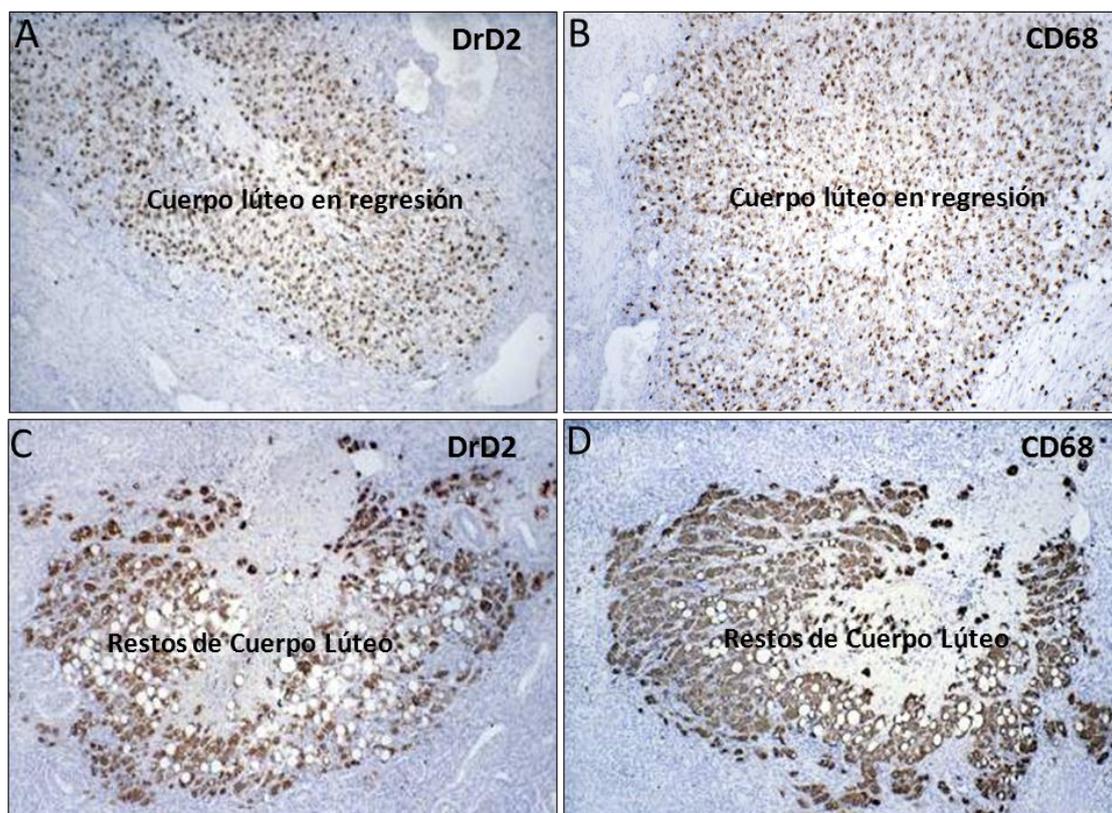


Figura 16. Cuerpos lúteos en regresión mostrando expresión para DrD2 (A) o CD68 (B), así como restos de cuerpos lúteos de ciclos anteriores del mismo modo marcados para DrD2 (C) o CD68 (D). Ambas estructuras estaban formadas por una mezcla de macrófagos y células en degeneración, las cuales mostraron fuerte marcaje para el DAR2. En esta fase, las células luteínicas esteroidogénicas (A, C) son difícilmente distinguibles de los macrófagos (B, C) ya que ambas expresan marcadores de macrófagos.

En esta fase, difícilmente se pudieron distinguir las células esteroidogénicas lúteas de los macrófagos ya que, coincidiendo con publicaciones anteriores (Bukovsky y cols, 1995; Best y cols, 1996; Gaytán y cols, 1998; Morales y cols, 2000), ambos tipos celulares expresaron marcadores de macrófagos (Figura 16 B, D).

5.1.3.- EXPRESIÓN DE DrD2 EN EL CUERPO LÚTEO DEL EMBARAZO

Puesto que tuvimos accesibilidad a muestras procedentes de cuerpos lúteos durante el primer trimestre del embarazo, quisimos seguir profundizando en el conocimiento de la expresión de DrD2 en esta situación fisiológica del ovario. Estos cuerpos lúteos mostraron unas células esteroidogénicas agrandadas, vasos sanguíneos prominentes así como abundantes macrófagos. La señal inmunohistoquímica del DrD2 fue intensa en las células teca luteínicas pero de nuevo se mostraba moderada en las células de la granulosa luteínica (Figura 17 A). Los macrófagos presentaban un aspecto dendrítico con un fuerte marcaje para DrD2 y aparecían íntimamente relacionados con los vasos sanguíneos dispuestos a su alrededor (Figura 17 B, C y

D), donde como en el resto de fases del ciclo ovárico, el endotelio de estos vasos no mostraba la presencia de DrD2.

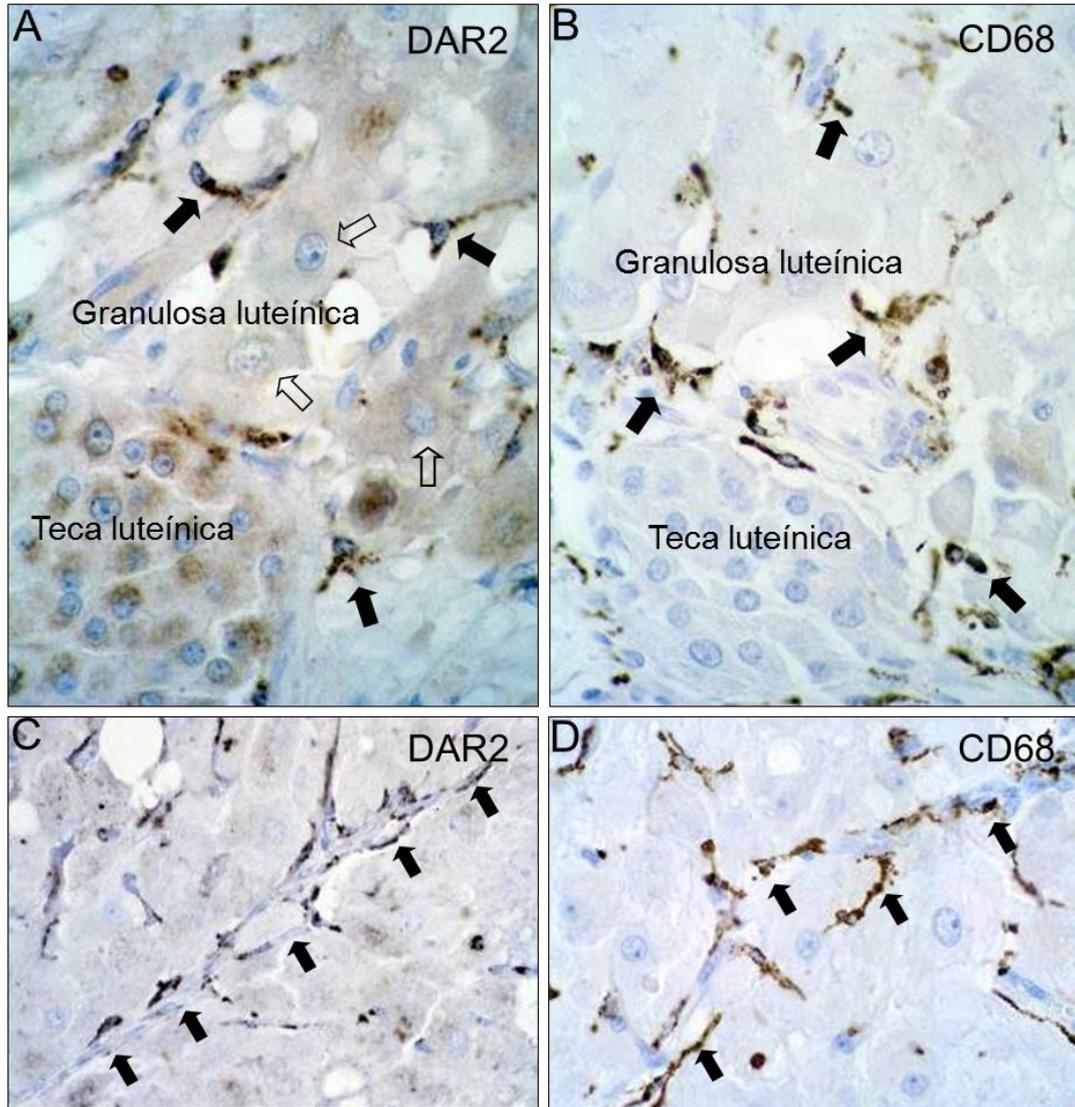


Figura 17. Cuerpo lúteo del embarazo (segundo mes). Continúa la positividad en las células teca luteínicas (A), siendo débil en las granulosa luteínicas (A, flechas blancas) e intensa en los macrófagos de la granulosa (A, B, flechas negras). Al observar con detalle la capa granulosa-luteínica de un cuerpo lúteo del embarazo, se pudo apreciar cómo los macrófagos siendo intensamente positivos para DrD2, delimitan los vasos sanguíneos carentes de DrD2, dispuestos sobre ellos de una forma íntimamente relacionada (C, D).

5.2.- ESTUDIO IN VITRO DEL RECEPTOR DrD2 EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANAS

5.2.1.- PURIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA AISLADAS.

Las células de la granulosa humana empleadas para llevar a cabo los diferentes ensayos in vitro que estaban previstos, fueron aisladas y purificadas a partir de líquidos foliculares obtenidos mediante punción folicular de mujeres sometidas a un programa de donación de ovocitos. La evaluación del método de aislamiento y purificación empleado sobre estas células, demostró que los resultados obtenidos fueron aceptables para poder llevar a cabo el resto de estudios. La viabilidad y la contaminación fueron evaluadas mediante el método de exclusión del colorante vital Trypan Blue y mediante citometría de flujo del marcador panleucocitario CD45 (Figura 18), respectivamente. Los resultados de viabilidad mostraron una media cercana al 100% ($97,8 \pm 0,91\%$) con una contaminación por células inmunitarias menor del 5% ($4,43 \pm 1,63\%$). Por otro lado, el número medio de células de la granulosa aisladas a partir de los líquidos foliculares fue de $1,59 \pm 0,90 \times 10^6$ células totales, con una recuperación superior al 70% ($72,01 \pm 14,45\%$) tras la purificación o enriquecimiento de células de la granulosa por eliminación de células contaminantes.

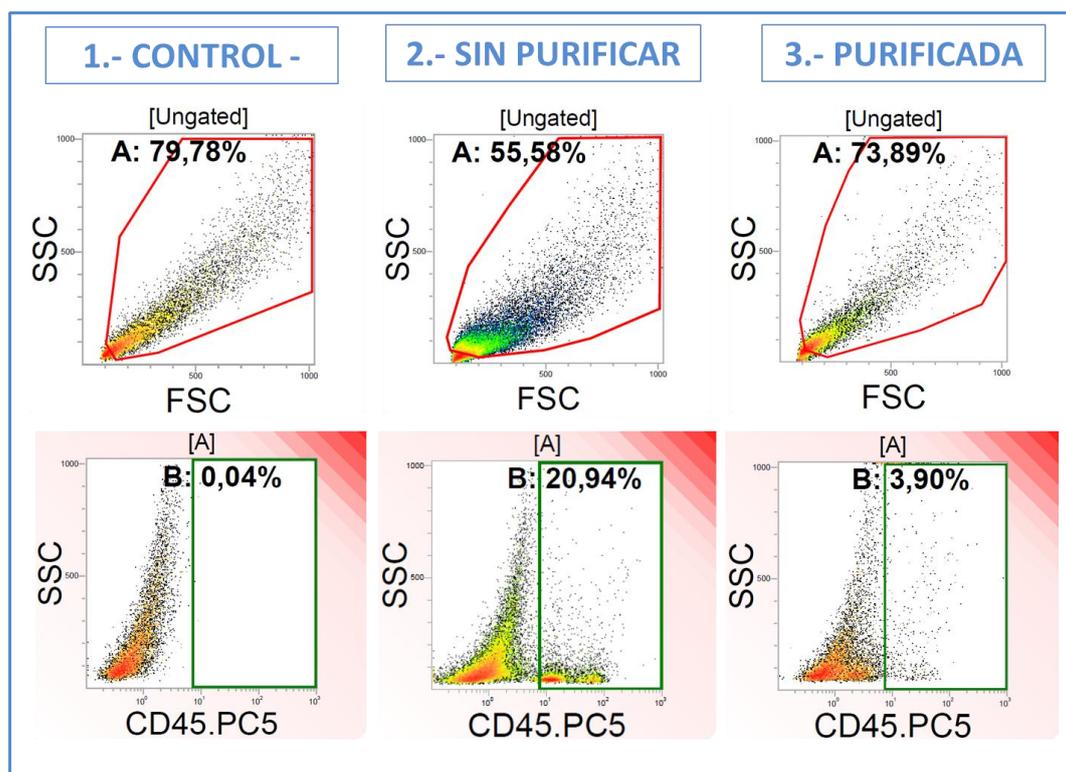


Figura 18. Citometría de flujo para el marcador panleucocitario CD45 sobre células de la granulosa humana. En cada caso, se muestra el scatter generado por las células citometradas (gráficos superiores), donde se compara la complejidad celular (SSC) con el tamaño (FSC). Los restos celulares o debris y los eritrocitos, son fácilmente reconocibles por su bajo FSC y SSC, por lo que han

sido excluidos (gráficos inferiores) generando la región (*gate*) que será considerada para los análisis. 1.- En la granulosa control negativo (0,04% del total del *gate*), se observa la ausencia de células marcadas para CD45, reconociendo así la autofluorescencia que generan estas células. 2.- Las células sin purificar presentan dos zonas bastante pobladas con positividad para CD45 (20,94% del total del *gate*), las cuales deben corresponder principalmente a linfocitos y monocitos. 3.- Por último, tras pasar las células por un filtro de 40 μm , las células retenidas presentan tan solo un 3,90% del total del *gate*, confirmando así, que prácticamente todas las células inmunitarias contaminantes no han sido retenidas en el filtro y se han podido separar de las células de la granulosa.

5.2.2.- EXPERIMENTO PILOTO: ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA

Las células de la granulosa en cultivo presentaron un aspecto fibroblástico con prolongaciones pseudopódicas citoplasmáticas, generando un aspecto estrellado similar a neuronas. El citoplasma de estas células se caracterizaba por estar cargado de gotas lipídicas acumuladas en la periferia citoplasmática, mientras que la membrana celular mostraba una forma poliédrica predominante (Figura 19). A pesar de ser lavados con cada cambio de medio, algunos eritrocitos permanecen de forma residual y despreciable entre las células de la granulosa, las cuales poco a poco van ocupando la superficie del pocillo. Estas células de la granulosa presentan una tasa de multiplicación lenta, llegando a necesitar hasta dos semanas para poder duplicar su número inicial de 50.000 células.

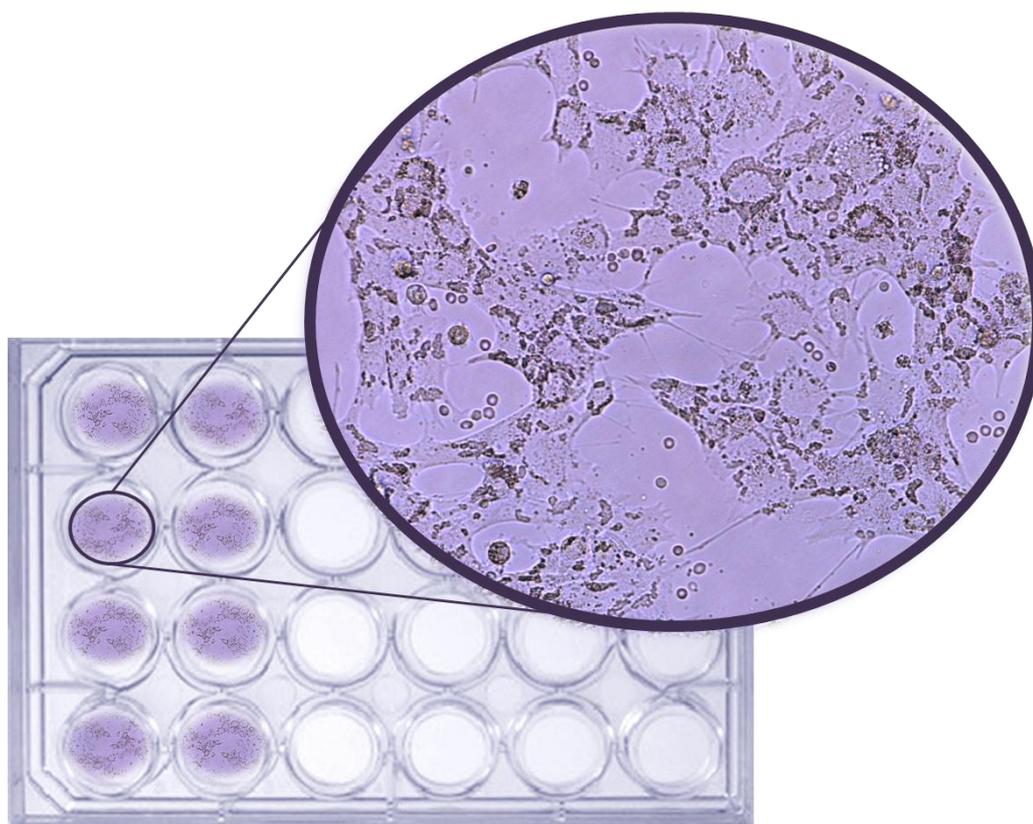


Figura 19. Imagen de un pocillo de cultivo de células de la granulosa en Día 4. Las células de la granulosa en cultivo presentan un aspecto fibroblástico con prolongaciones citoplasmáticas que recuerdan a los axones de las neuronas. El crecimiento de estas células de la granulosa es lento, llegando a tomar hasta 2 semanas para duplicar su número inicial. En el citoplasma se pueden

observar gotas lipídicas localizadas principalmente en las zonas próximas a la membrana. Se pueden observar también otros tipos celulares más pequeños correspondientes a eritrocitos residuales que persisten entre las células y que van desapareciendo con los cambios de medio.

5.2.2.1.- Estudio de tiempo respuesta

En el momento de la punción folicular, las células de la granulosa habían sido expuestas a una dosis de hCG, administrada a la donante para alcanzar la maduración ovocitaria, por lo que en estas células, los receptores de hCG se supone estarían desensibilizados hasta pasado un tiempo en que volverían a estar disponibles. Antes de continuar con el resto del estudio, era necesario establecer en qué momento la presencia de hCG en el medio es capaz de producir un efecto sobre las células de la granulosa en cultivo. Para llegar a cabo este ensayo, se administró hCG a una dosis fija de 10 UI en los medios de cultivo durante 7 días. Respecto a los niveles de E2 (Figura 20), no se observó ningún patrón claro de secreción durante los días de cultivo evaluados, presentando una tendencia a incrementarse sin llegar a ser significativa ($p=0,85$). Por otra parte, la PRL mantenía los niveles indetectables ya que no es secretada por la células de la granulosa (Figura 21).

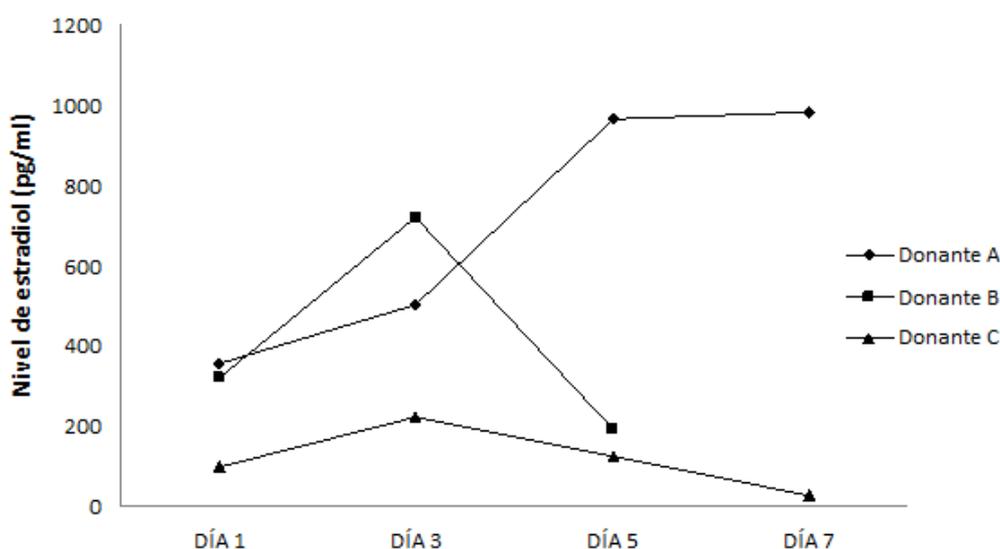


Figura 20. Medición de los niveles de estradiol en medio de cultivo de células de la granulosa tras 7 días con 10 UI de hCG. Se observa una tendencia al incremento de la secreción de E2 al medio de cultivo al tercer día sin llegar a ser significativo. El valor correspondiente al día 7 del donante B no se ha podido representar debido a un resultado no concluyente durante su determinación.

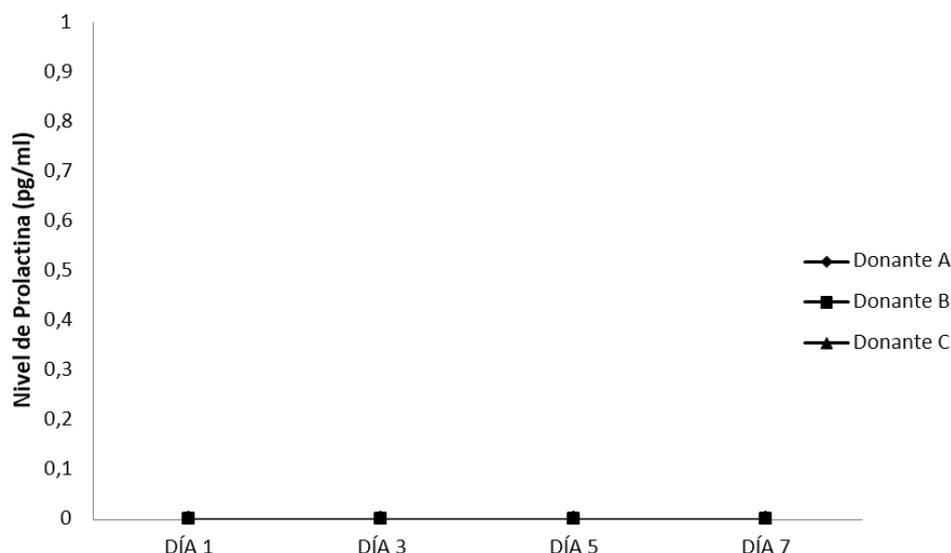


Figura 21. Niveles de Prolactina en los medios de cultivo de células de la granulosa a lo largo de 7 días de tratamiento con hCG 10 UI. Ya que las células de la granulosa no secretan prolactina, estos niveles no fueron detectables en el medio de cultivo en ningún caso.

En contraste con los resultados anteriores, los niveles de VEGF experimentaron un efecto estadísticamente significativo en respuesta a la administración de hCG. Estos niveles de VEGF fueron incrementándose en el medio de cultivo hasta alcanzar un valor máximo al tercer día ($p < 0,01$) y manteniéndose constantes a partir de entonces hasta el día 5 ($p < 0,01$). A partir del séptimo día de cultivo, la secreción de VEGF aparecía disminuida con respecto a la anterior medición (día 3), sin embargo, sus niveles eran todavía lo suficientemente elevados como para ser significativamente superiores a los encontrados en el control ($p < 0,05$) (Figura 22).

En base a estos resultados, el tercer día desde el comienzo del cultivo de las células de la granulosa, fue considerado el día más adecuado para determinar la dosis respuesta de los diferentes tratamientos ensayados y para llevar a cabo los subsecuentes ensayos funcionales. Por otro lado, al no verse afectados tras la administración de hCG, los niveles de E2 y PRL no se tuvieron en cuenta para el resto de ensayos.

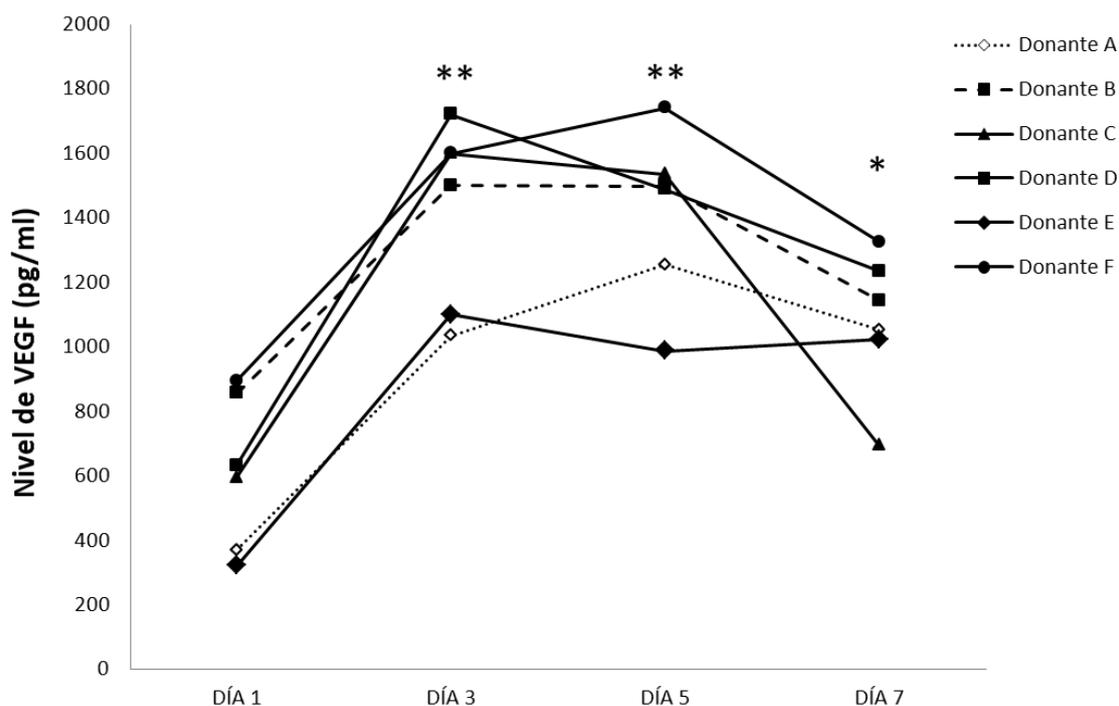


Figura 22. Medición de los niveles de VEGF secretados por las células de la granulosa cultivadas a lo largo de 7 días tras administrar 10 UI de hCG. Obsérvese cómo los niveles de VEGF secretados al medio de cultivo presentaron un incremento significativo a los 3 días ($p < 0,01$). De forma similar, estos niveles de VEGF se mantuvieron elevados cuando se determinaron al quinto día ($p < 0,01$), mientras que en la medición del séptimo día se observó una disminución de esta secreción, la cual a pesar de todo seguía siendo significativamente superior al inicio del cultivo en día 1 ($p < 0,05$).

5.2.2.2.- Estudio de dosis respuesta

Durante los ensayos de respuesta a la hCG por parte de las células de la granulosa en cultivo, se observó que los niveles de VEGF secretados al medio de cultivo, se incrementaban de forma dosis-dependiente a medida que se incrementa la dosis de hCG. Con la menor dosis empleada (1 UI de hCG), al tercer día ya se pudo constatar en el medio de cultivo, un incremento estadísticamente significativo del VEGF secretado ($p < 0,05$). Este incremento fue mayor al incrementar la dosis administrada de hCG, alcanzando un pico máximo de secreción de VEGF al administrar 5 UI de hCG ($p < 0,01$). A partir de este punto, al incrementar la dosis de hCG (10 UI y 50 UI), los valores de VEGF detectados continuaban siendo estadísticamente superiores que los determinados en el control ($p < 0,01$), y se mantuvieron estables con respecto a los obtenidos con la dosis de 5 UI de hCG (Figura 23). Ante la evidencia de estos resultados, se pudo establecer la dosis de 5 UI de hCG, como condición estándar para el resto de ensayos realizados.

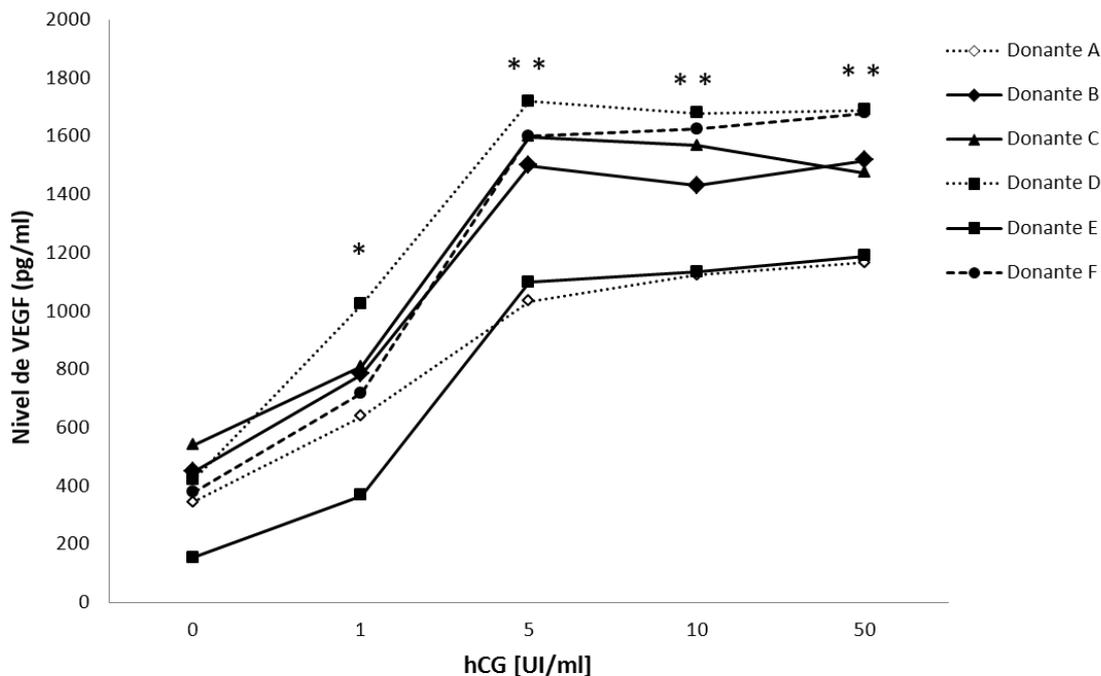


Figura 23. Gráfico representando el efecto dosis-dependiente de hCG sobre los niveles de VEGF en cultivo de células de la granulosa, tras 3 días con diferentes dosis crecientes de hCG. Se observa una correlación directa entre la hCG y la secreción de VEGF, con un máximo de secreción de VEGF con la dosis de 5 UI de hCG y a partir de la cual, con dosis superiores se alcanza una meseta de secreción. En estos medios suplementados con hCG, existen diferencias significativas en la secreción de VEGF al comparar con el control donde no se ha adicionado hCG (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Como se ha mostrado previamente, las células de la granulosa no secretan PRL, pero el receptor de PRL sí que está presente en estas células (Vlahos y cols, 2001). Por ello, con el fin de determinar si la PRL fuese capaz de producir algún efecto en la secreción del VEGF mediado por hCG (5 UI), se llevó a cabo un ensayo de dosis-respuesta sobre estas células de la granulosa. Este ensayo nos permitió conocer que la adición de dosis crecientes de PRL no mostraba ningún efecto sobre los niveles de VEGF ($p=0,71$). Estos niveles fueron cuantificados el día 3 de cultivo mostrando un patrón constante en todos los casos (Figura 24), por lo que la PRL no se tuvo en cuenta para las condiciones estándar del resto de cultivos sometidos las diferentes condiciones experimentales que se desarrollaron posteriormente.

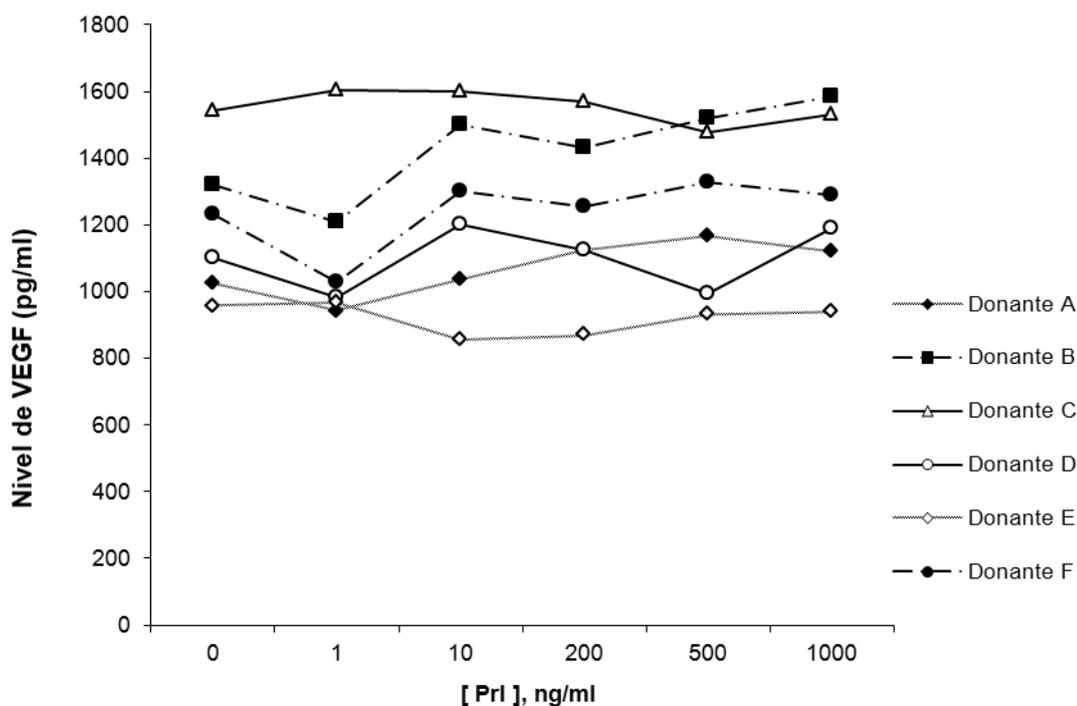


Figura 24. Gráfico mostrando los niveles de VEGF detectados al tercer día en medio de cultivo de células de la granulosa tratadas con dosis crecientes de Prolactina. A pesar de incrementar considerablemente la dosis de Prolactina administrada, no se produce ningún efecto cuantificable sobre los niveles de VEGF secretado por las células de la granulosa ($p=0,71$).

5.2.2.3.- Ensayos de toxicidad celular

Nuevamente, sobre cultivos de células de la granulosa, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular basados en la técnica de Hoechst/ioduro de propidio, para determinar en qué rango de dosis de agonistas y antagonistas de la dopamina podíamos trabajar sin que se produjesen efectos de toxicidad celular.

En los gráficos representados en la figura 25 (A y B), se puede observar que ninguno de los agonistas o antagonistas empleados causa toxicidad celular a las dosis que se han estado considerando para los ensayos.

Tras la administración de diferentes dosis crecientes de Cabergolina y L-741,626, se observó una reducción no significativa de viabilidad del 11,1% y 10,45% respectivamente, correspondiente a la dosis de 200 μM , mientras que con la dosis superior (400 μM), se observó una reducción significativa de la viabilidad casi del 50%, suponiendo una disminución del 68,3% para la Cb2 y del 56,9% para L-741,626 ($p<0,05$) (Figura 25 A). Sin embargo, al observar los datos proporcionados en los controles, se manifestó que la toxicidad observada no es debida al fármaco en sí mismo, sino al etanol usado como vehículo necesario para diluir los tratamientos. Este hecho se confirmó al observar que en los pocillos control correspondientes

tanto para la dosis de 200 μM (0,4% de etanol) como para la dosis de 400 μM (0,8% de etanol), donde sólo se había añadido el vehículo a la misma concentración que la usada para diluir el fármaco, se produjo una disminución de viabilidad equivalente a la observada su respectivo tratamiento, concretamente del 12,15% para el vehículo de 0,4% de etanol, y del 65,8% para el vehículo de 0,8% ($p < 0,05$) (Figura 25 A). Por este motivo, a la hora de trabajar con el agonista y el antagonista del receptor 2 de la dopamina, se decidió considerar una reducción del 50% del vehículo usado para diluir las diferentes dosis de fármaco y continuar con el resto de experimentos con dosis no superiores a 100 μM , asegurando de esta forma que los resultados obtenidos se debieran tan solo al efecto que ejerce el fármaco y no a su toxicidad o a la del vehículo.

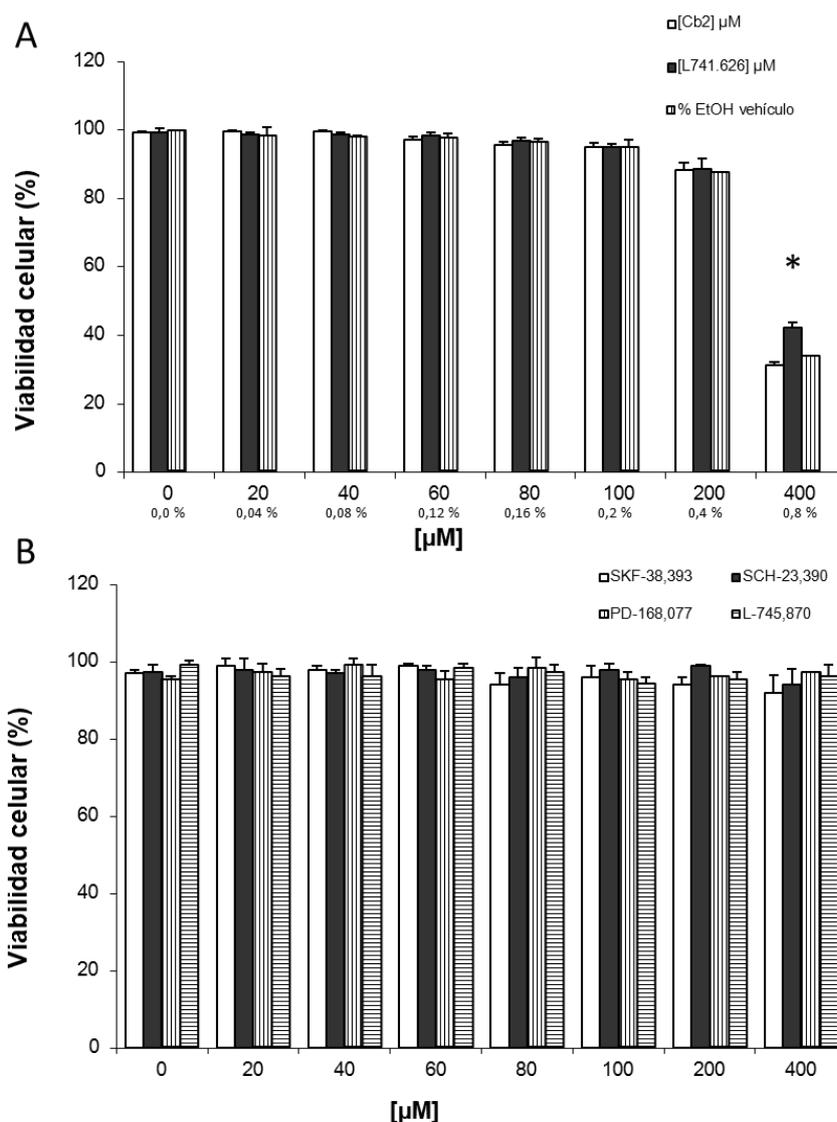


Figura 25. Resultados del ensayo de viabilidad de los diferentes agonistas/antagonistas de los receptores de dopamina sobre las células de la granulosa en cultivo. El porcentaje de células muertas fue determinado usando el método de Hoechst/ioduro de propicio. (A) La cantidad de vehículo utilizado se representa como porcentaje de etanol en medio de cultivo utilizado para diluir tanto el agonista dopaminérgico Caberbolina como el antagonista L-741,626 (valores en porcentaje en el eje X del gráfico). La dosis 0, tan solo incorporaba medio de cultivo, sirviendo como referencia o control negativo para el resto de tratamientos. Ningún efecto sobre la viabilidad se observó a 100 μM o menor dosis tanto de agonista como de antagonista de DrD2. Sin embargo se observa una disminución de la viabilidad celular a partir de 200 μM de tratamiento, coincidente con la disminución observada en

los pocillos paralelos sin fármaco pero con el mismo porcentaje de vehículo etanol, la cual se hace significativa para la dosis mayor de 400 μM de ambos fármacos ($p < 0,05$). (B) Los agonistas/antagonistas del receptor DrD1/DrD5 y DrD4 no mostraron ningún efecto sobre la viabilidad celular a las dosis empleadas, ni tampoco a través del vehículo necesario para diluirlos (agua destilada o DMSO).

Por otro lado, los resultados de viabilidad obtenidos para los ensayos de diferentes dosis de agonista/antagonista de DrD1-DrD5 (SKF-38,393/ SCH-23,390; ambos diluidos en agua destilada) y de agonista/antagonista de DrD4 (L-745,870/ PD-168,077; diluidos en agua destilada y DMSO respectivamente), no mostraron ningún efecto sobre la viabilidad de las células de la granulosa cultivadas a las diferentes dosis crecientes de estos compuestos (Figura 25 y Figura 26 B). A pesar de estos resultados, para ser consistentes con las dosis ensayadas de agonista y antagonista se consideraron dosis inferiores a 100 μM para los subsecuentes experimentos realizados con el resto de receptores dopaminérgicos.

5.2.3.- EXPERIMENTO N° 1: MODULACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA: EFECTO SOBRE LA SECRECIÓN DE VEGF

5.2.3.1.- Ensayo de dosis respuesta para DrD2

El antagonista del receptor DrD2 (L-741,626) no generó ningún cambio en la secreción de VEGF por parte de las células de la granulosa, cuando se adicionó a diferentes dosis crecientes en el medio de cultivo ($p = 0,069$) (Figura 26). Sin embargo, el agonista dopaminérgico Cb2 sí que mostró un efecto inhibitorio significativo en la secreción de VEGF en respuesta a dosis crecientes de este agonista. Esta reducción de la secreción de VEGF comenzó a hacerse significativa a partir de la dosis de 40 μM de Cb2 ($p < 0,05$), observándose para dosis mayores (60 μM , 80 μM y 100 μM) una caída más pronunciada de los niveles de VEGF ($p < 0,01$) (Figura 26). El porcentaje de inhibición representado en la Figura 27, muestra cómo la Cabergolina ejerce un efecto dosis dependiente en la inhibición de la secreción de VEGF, alcanzando una media de reducción del $79,4 \pm 2,1\%$ con la dosis máxima de 100 μM .

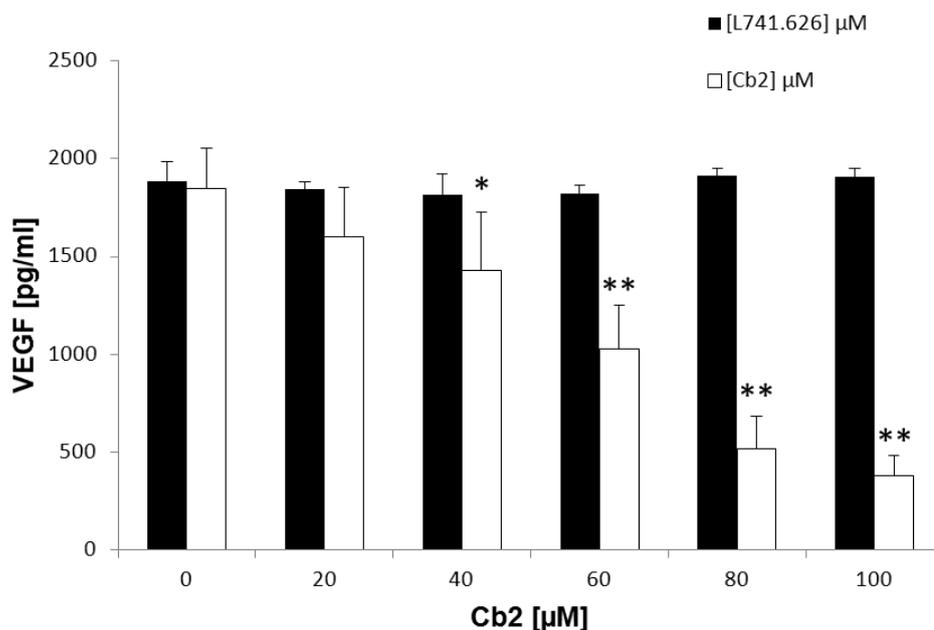


Figura 26. Ensayo de dosis respuesta del antagonista (L-741,626) y del agonista (Cb2) del receptor D2 de la dopamina sobre la secreción del VEGF en el medio de cultivo de células de la granulosa. Ninguna de las dosis empleadas de antagonista de DrD2, mostró efecto alguno sobre la secreción de VEGF (columnas color negro). La administración de dosis crecientes de agonista Cb2 produce un descenso de la secreción de VEGF al medio de cultivo que se hace más intenso a medida que se incrementa la dosis del compuesto (columnas de color blanco). *P<0,05 y **P<0,01 vs control (dosis 0 μM).

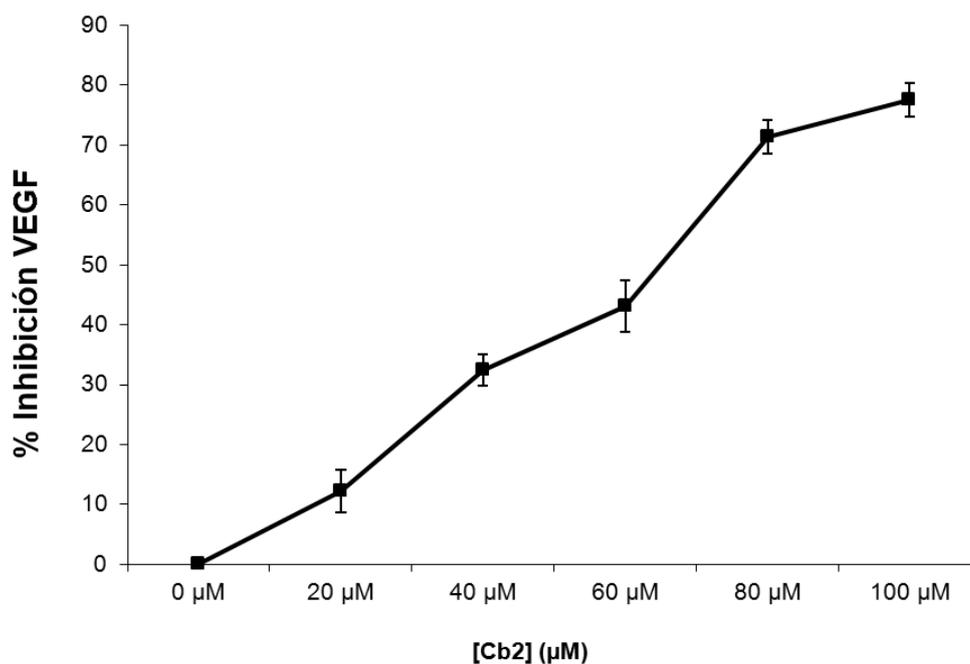


Figura 27. Gráfico representando el porcentaje de inhibición de la secreción de VEGF al medio de cultivo, producido por las diferentes dosis crecientes de Cb2. A medida que se incrementa la concentración del agonista Cb2, se produce una respuesta inhibitoria directamente proporcional, mostrando hasta un 79,4±2,1% de inhibición cuando se administra la dosis más alta de 100 μM de Cb2.

5.2.3.2.- Ensayo de dosis respuesta para DrD1/DrD5 y DrD4

De igual modo, se ensayaron los agonistas y antagonistas para el resto de receptores dopaminérgicos, DrD1/DrD5 y DrD4. Estos compuestos fueron adicionados al medio de cultivo a diferentes dosis crecientes durante 3 días, sin embargo, los niveles detectados de VEGF secretado en el medio de cultivo, no mostraron ningún cambio respecto a los controles negativos en todas las dosis empleadas (Figura 28 y Figura 29).

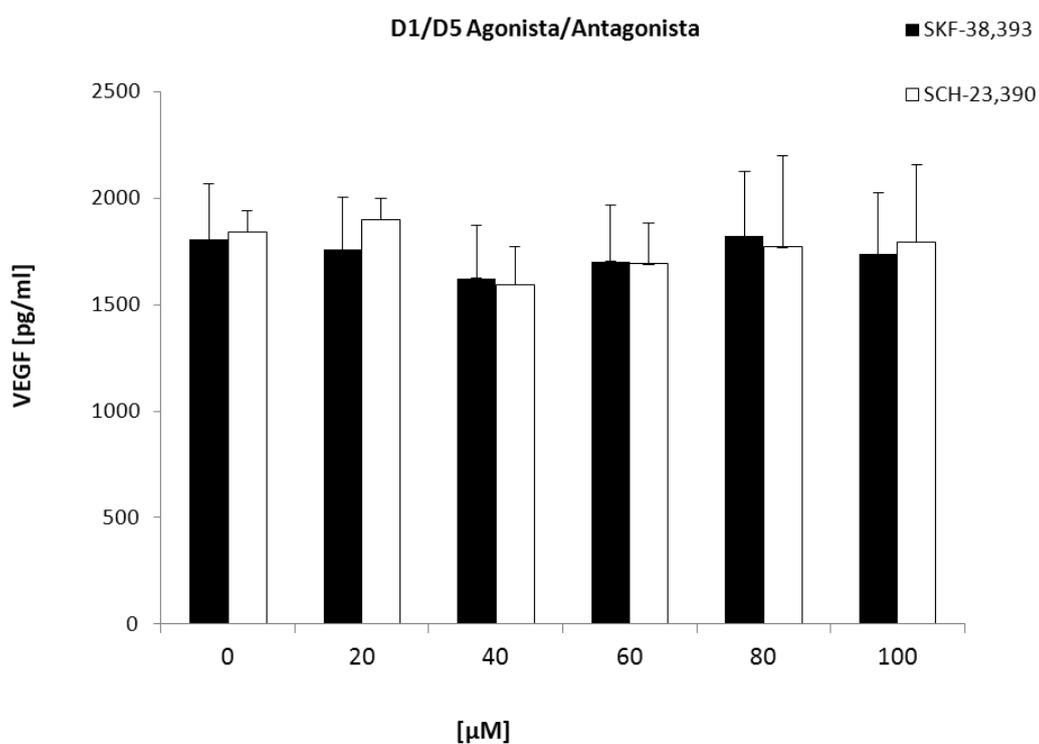


Figura 28. Representación gráfica del ensayo de dosis respuesta para la administración de agonistas (SKF-38,393. Columnas de color negro) y antagonistas (SCH-23,390. Columnas de color blanco) de los receptores DrD1/DrD5. La concentración de VEGF secretado en el medio de cultivo por parte de las células de la granulosa, se mantuvo constante a pesar de la adición de dosis crecientes de estos fármacos (SKF-38,292: $p=0,53$; SCH-23,390: $p=0,99$).

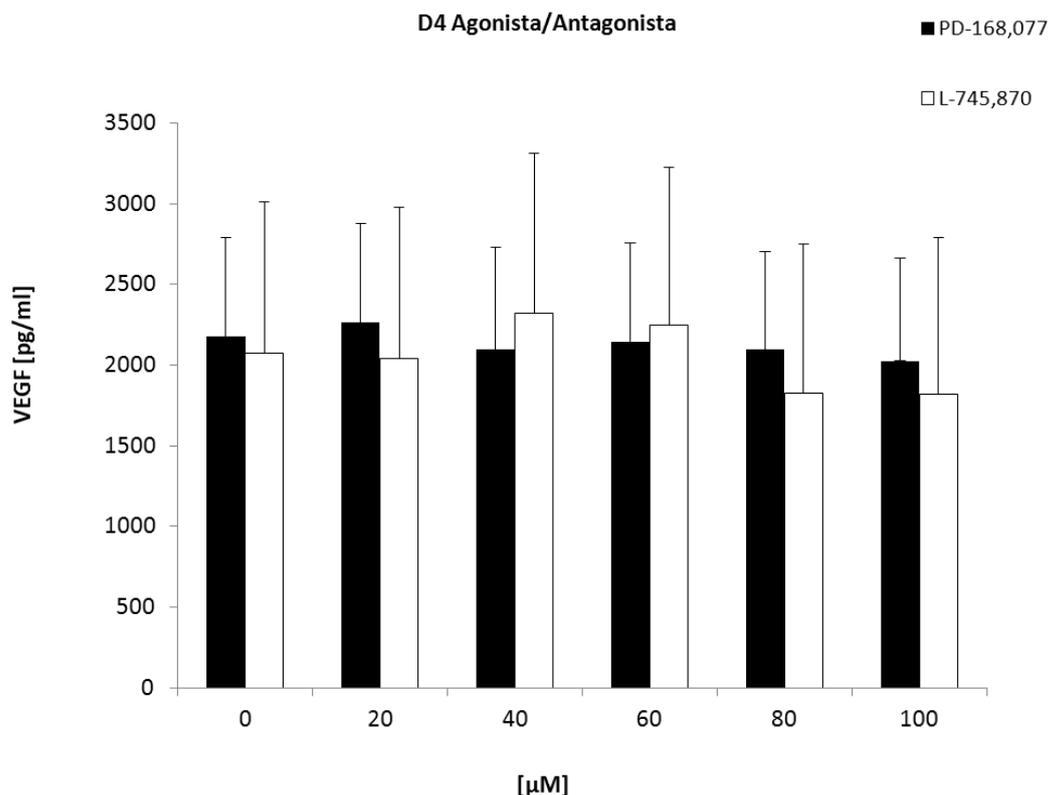


Figura 29. Gráfico representativo de la secreción de VEGF al medio de cultivo por parte de las células de la granulosa en respuesta a la administración de dosis crecientes de un agonista y un antagonista de DrD4 (PD-168,077 y L-74,870 respectivamente). A los tres días tras el inicio del ensayo, los niveles de VEGF secretados se mostraron invariables a pesar del incremento de la dosis del compuesto ensayado (PD-168,077: $p=0,96$; L-74,870: $p=0,84$).

5.2.4.- EXPERIMENTO Nº 2: REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE VEGF A TRAVÉS DE DrD2.

Tras observar la reducción de los niveles de VEGF en los medios de cultivo de células de la granulosa tratadas con Cb2, se pretendía confirmar que esta inhibición estaba mediada por la unión del agonista con su receptor DrD2 y no por efectos inespecíficos NO-receptor mediados. El efecto inhibitorio detectado se pudo relacionar directamente al DrD2, al comparar el efecto que la Cb2 produce sobre el VEGF frente al efecto que se produce cuando se adiciona a su vez un antagonista dopaminérgico (L-746,212). Al igual que en el ensayo funcional de dosis respuesta previo, el VEGF se redujo dramáticamente con la administración de Cb2 ($p<0,01$), mientras que el antagonista de DrD2 no fue capaz de modificar estos niveles en los medios de cultivo. Sin embargo, en este ensayo, cuando se administró el agonista Cb2 (100 μM) junto al antagonista L-746,212 (100 μM) en el mismo pocillo, los niveles de VEGF,

aun mostrando todavía secreción disminuida de forma significativa ($p < 0,05$), no alcanzaron una inhibición de igual intensidad a la que se observó cuando se administró Cb2 sin el antagonista de DrD2 (Figura 30).

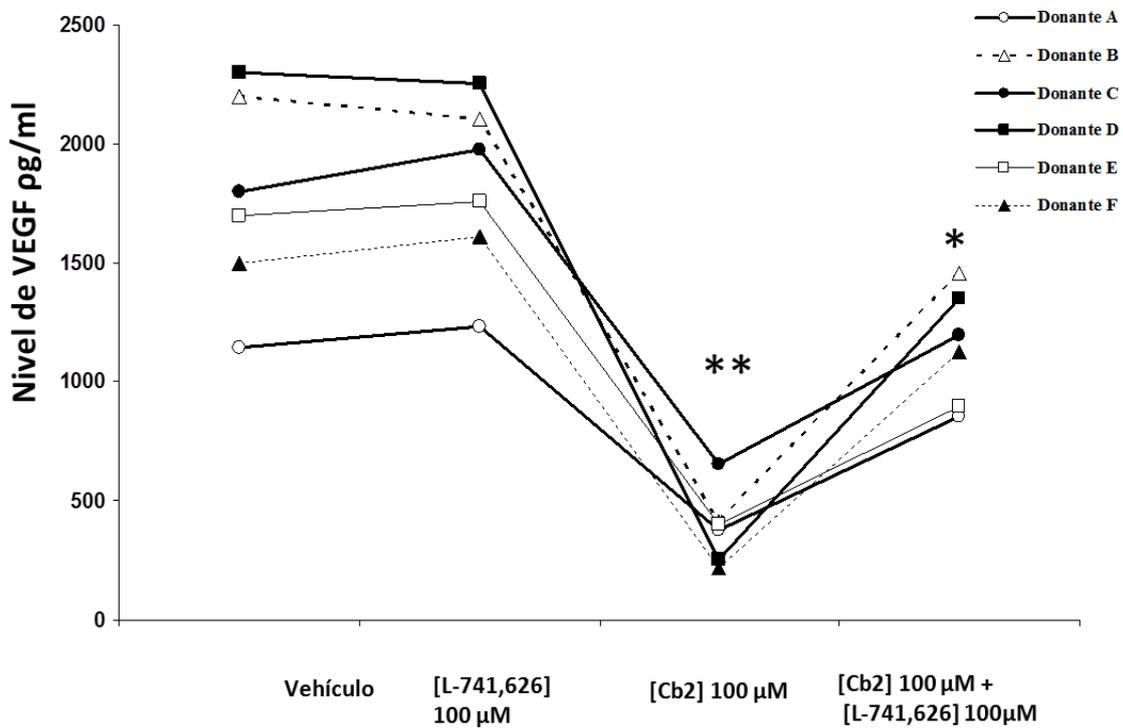


Figura 30. Inhibición funcional del DrD2 mediante el uso de Cb2 y L-741,626. Del mismo modo que en resultados previos, Cb2 es capaz de inhibir significativamente (** $p < 0,01$) la secreción de VEGF al medio de cultivo de células de la granulosa. Cuando a la vez que Cb2 se administra un antagonista del DrD2, se observa una recuperación la secreción de VEGF, la cual sigue estando inhibida aunque con menor eficiencia que cuando en el medio tan solo se encuentra Cb2 (* $p < 0,05$).

6.- DISCUSIÓN

6.- DISCUSIÓN

Llegados a este punto, no cabe duda de la existencia de un sistema dopaminérgico activo en el ovario humano. Es más que plausible pensar, que a partir de la activación del receptor DrD2 en granulosa luteínica se genera una cascada molecular que establece una vía de comunicación con el sistema vascular capaz de interferir el desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica a través de la modulación de la permeabilidad vascular. A lo largo de esta discusión trataremos de hipotetizar razonadamente basándonos en nuestros resultados por qué este efecto terapéutico no se reproduce de igual modo en todas las mujeres y además se muestra ineficiente en las fases avanzadas del síndrome (Álvarez y cols, 2007a; Carizza y cols, 2008; Busso y cols, 2010; Youssef y cols, 2010).

A pesar de saber qué tipos de receptores dopaminérgicos se expresan en la granulosa ovárica en humanos (Rey-Ares y cols, 2007), hasta nuestro trabajo, no se había definido su expresión en otros tipos celulares ováricos, así como su modulación en los distintos compartimentos ováricos a lo largo del ciclo. Este trabajo de tesis doctoral fue desarrollado para determinar con más detalle el comportamiento biológico del sistema dopaminérgico y los mecanismos moleculares a través de los cuales el DrD2 podría ejercer un efecto terapéutico en el tratamiento del SHO. El eje del estudio oscila entre dos cuestiones principales: a) la expresión de DrD2 en el ovario humano; y b) las diferentes respuestas al tratamiento con agonistas del DrD2 mostradas entre diferentes mujeres.

Varios estudios han reportado que tanto el VEGF como su receptor VEGFR2 se expresan en ovarios humanos (Neulen y cols, 1995; Laitinen y cols, 1997; Sugino y cols, 2000), siendo también localizados en células de la granulosa luteinizadas procedentes de los aspirados foliculares (Gordon y cols, 1996). De este modo, se sugiere que el VEGF juega un papel relevante en el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (Yan y cols, 1993; Kamat y cols, 1995; Neulen y cols, 1995; Gordon y cols, 1996; Laitinen y cols, 1997; Suzuki y cols, 1998). Tanto la vascularización y la permeabilidad del cuerpo lúteo (Otani y cols, 1999), como la vascularización del endometrio (Nardo, 2005), dependen fundamentalmente de la acción del VEGF a través de la activación del receptor VEGFR2 en el endotelio vascular. En el cuerpo lúteo, y bajo condiciones fisiológicas, la secreción de VEGF es máxima durante la fase lútea temprana (días 14-18 del ciclo), se mantiene a niveles más bajos durante la fase lútea media (días 19-23) y disminuye mucho en la fase lútea tardía (días 24-28) (Gaytán y cols, 1998; Otani y cols, 1999; Sugino y cols, 2000). Esto coincide con el proceso de vascularización de la capa granulosa-luteínica en los días 14-18, donde los vasos han alcanzado la cavidad central el día

17 (Douglas y cols, 2005; Gaytán y cols, 1998). Adicionalmente, el bloqueo del VEGF en la fase lútea temprana inhibe la vascularización del cuerpo lúteo, mientras que el bloqueo del VEGF durante la fase lútea media (después de la angiogénesis) inhibe la secreción de progesterona e induce luteolisis precoz (Fraser y cols, 2006). Esto sugiere un papel del VEGF (además del angiogénico), posiblemente como regulador de la permeabilidad vascular necesaria para el aporte de gonadotropinas, factores de crecimiento e intercambio metabólico en el cuerpo lúteo, responsables del rápido crecimiento folicular y el mantenimiento de la viabilidad del endotelio (Fraser y cols, 2006).

Naturalmente, el intenso proceso de vascularización del cuerpo lúteo, así como la permeabilidad vascular mediada por el sistema VEGF/VEGFR2, deben ser mecanismos que estén estrictamente controlados (Otani y cols, 1999). Estudios en otras estructuras fisiológicas (Basu y cols, 1995, 2001; Chakroborty y cols, 2009) así como en el ovario (Gómez y cols, 2006; Álvarez y cols, 2007a; Carizza y cols, 2008; Busso y cols, 2010), sugieren que el sistema DA/DrD2 podría modular los efectos angiogénicos y el aumento de permeabilidad vascular inducidos por el VEGF, aunque el mecanismo molecular responsable de esta modulación, todavía no había sido establecido. Por este motivo decidimos llevar a cabo el estudio de la expresión y de la actividad fisiológica del receptor DrD2 en el ovario humano.

Mediante la evaluación inmunohistoquímica del receptor DrD2, hemos podido confirmar que se expresa principalmente en tres líneas celulares diferentes en el ovario, y que la mayor expresión se produce durante la fase lútea temprana descendiendo en su intensidad de forma paralela a la maduración del cuerpo lúteo. Estos tipos celulares son:

1.- Células de la teca interna en folículos y células teca-luteínicas del cuerpo lúteo. Estas células presentan una intensa inmunotinción, que se mantiene a lo largo de toda la vida funcional del cuerpo lúteo (fases lútea temprana y media, con una ligera disminución en la fase tardía). Es interesante mencionar que la expresión del DrD2 a nivel folicular, comienza a nivel de la teca de los folículos secundarios, coincidiendo con el desarrollo de la vascularización folicular en la transición del folículo primario al secundario (Douglas y cols, 2005).

2.- Células granulosa-luteínicas. Estas constituyen el principal componente del cuerpo lúteo y proceden de la luteinización de la granulosa. Mientras que en los folículos primarios, las células de la granulosa son negativas, hay una fuerte expresión del DrD2 en las células granulosa luteínicas coincidiendo con la ovulación en el día 14. Esto sugiere que su expresión podría estar mediada por la inducción ovulatoria de LH/hCG. La expresión de DrD2 en estas células de la granulosa luteínicas, se mantiene durante los días 14-17, disminuye considerablemente en los siguientes días y es mínima en la fase lútea media, mostrando de este modo un patrón de expresión transitoria. Adicionalmente, su expresión coincide con la

vascularización de esta zona, donde los vasos llegan a la cavidad central, es decir ocupan todo el espesor de la capa granulosa-luteínica hacia el día 17. Esta coincidencia, al igual que ocurre con la vascularización de la teca, sugiere que a la vez que se activan los mecanismos angiogénicos del ovario, se estaría poniendo en marcha también un mecanismo modulador de control a través del sistema DA/DrD2 que serviría hipotéticamente para evitar un incremento excesivo de la angiogénesis y de permeabilidad vascular. Es pues lógico hipotetizar que una expresión disminuida de DrD2 podría dar lugar o facilitar del desarrollo del SHO.

3.-Macrófagos: Son las células que presentan la más intensa inmunotinción para el DrD2 (similar a la de las células teca luteínicas). Los macrófagos son muy abundantes en el cuerpo lúteo humano principalmente en la capa teca luteínica (Lei y cols, 1991; Wang y cols, 1992b). Invaden la granulosa a partir de la ovulación y alcanzan las mayores concentraciones en el cuerpo lúteo maduro, para después ir disminuyendo durante la fase lútea tardía (Gaytán y cols, 1998). Además en el cuerpo lúteo maduro cambian su morfología, adoptando una morfología dendrítica (Gaytán y cols, 1998). También, hemos podido observar que en el cuerpo lúteo durante el embarazo, los macrófagos aparecen mayoritariamente dispuestos alrededor de los vasos sanguíneos de la capa granulosa luteínica, ejerciendo una posible interacción sobre estos vasos, la cual, del mismo modo que se ha sugerido en otros sistemas fisiológicos, podría ser responsable o estar relacionada con una remodelación vascular mediada por macrófagos (Arras y cols, 1998; Buschmann y cols, 2003; Schneider y cols, 2007).

Varios estudios han remarcado la importancia de los macrófagos para el correcto funcionamiento de la fertilidad a través de sus funciones en los tejidos reproductivos (Norman y Brännström, 1994; Cohen y cols, 1999; Wu y cols, 2004). En el cuerpo lúteo, los macrófagos se han relacionado con la esteroidogénesis (Chen y cols, 1992; Serta y Seibel, 1993; Yan y cols, 1993b; Chen y cols, 2000b), aunque éste ha sido un punto bastante discutido, ya que también hay resultados que afirman lo contrario, donde los macrófagos peritoneales disminuyen la producción de progesterona en cultivos de células de la granulosa (Shakil y Whitehead, 1994). A los macrófagos también se les ha asignado un papel importante en la luteogénesis y la vascularización del cuerpo lúteo, facilitando el establecimiento de la vasculatura en el cuerpo lúteo a través de la secreción de VEGF y otros factores angiogénicos (Sunderkötter y cols, 1994).

En un principio, partiendo de los hallazgos reportados sobre modelos in vitro de células endoteliales (Basu y cols, 2001; Sinha y cols, 2009) y sobre un modelo animal de SHO (Gómez y cols, 2006), habíamos especulado que el mecanismo de acción de la Cb2 sobre la permeabilidad vascular, pudiese estar relacionado con la inactivación de ciertos sitios tirosina del VEGFR2 a través de la activación del DrD2 de forma autocrina en las células endoteliales

(Sinha y cols, 2009). De hecho, atendiendo a los resultados obtenidos posteriormente en el estudio de Álvarez y colaboradores (2007a), donde se observó por imagen de resonancia magnética (MRI) que la propia permeabilidad ovárica se veía reducida por el tratamiento con Cb2, pensamos que este efecto estaría producido por la inhibición de la PV del endotelio ovárico tras la activación del DrD2 mediante Cb2. Sin embargo, de forma sorprendente, el patrón histológico de expresión de DrD2 obtenido en la presente tesis doctoral, demostró que en mujeres adultas este receptor, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, no se encuentra expresado en la vasculatura ovárica durante la fase folicular y lútea (Basu y cols, 2001; Sarkar y cols, 2004; Gómez y cols, 2006). Esta ausencia del receptor DrD2 en el endotelio de los vasos sanguíneos ováricos fue totalmente inesperada, hecho que pudiera resultar llamativo teniendo en cuenta que nunca antes se había siquiera evaluado su presencia. Sin embargo la importancia de la ausencia del DrD2 en endotelio ovárico es tal que nos hizo desechar aspectos esenciales de nuestra hipótesis de partida y con ello desestimar nuestra intención primigenia en la que se pretendía estudiar si existían expresiones diferenciales o disminución de expresión en el DrD2 del endotelio ovárico entre las mujeres estudiadas, de forma que se pudiese relacionar este hecho con el mayor riesgo de desarrollar SHO y con una menor eficacia del tratamiento con agonistas dopaminérgicos. Como se ha comentado anteriormente, durante la fase folicular, la expresión de DrD2 se encuentra principalmente relacionada con las células de la teca en los folículos antrales en crecimiento. Seguidamente, en la fase lútea del ciclo menstrual, el receptor DrD2 se encuentra en las células luteínicas tanto de la teca como de la granulosa del cuerpo lúteo. Por este motivo, un efecto terapéutico del DrD2 en el tratamiento del SHO, donde se modulase la permeabilidad vascular a través de la fosforilación del VEGFR2, no podría ocurrir a través de una interacción directa entre el DrD2 y el VEGFR2 de los vasos sanguíneos ováricos, tal y como se pensó en el trabajo de Álvarez y colaboradores (2007a), sino que debe existir otro mecanismo fisiológico que implique otros tipos celulares.

Por otro lado, tanto los macrófagos como las células teca-luteínicas, no fueron considerados para el estudio in vitro realizado en este trabajo, a pesar de haberse presentado como poblaciones celulares ováricas que expresan el DrD2. En el caso de los macrófagos, no fueron incluidos en los ensayos in vitro debido a que la presencia de estas células inmunitarias en los aspirados foliculares no podía ser asociada a células residentes únicamente, sin considerar la posibilidad de una contaminación por células inmunitarias procedentes de la sangre periférica. Además su escasa presencia en la capa de la granulosa en el momento de la punción folicular (Best y cols, 1996; Gaytán y cols, 1998) así como en el cuerpo lúteo durante las fases del ciclo en que se desarrolla el síndrome, nos acabaron por convencer que su estudio

no estaba justificado ya que no cumplía las características establecidas a priori en nuestros objetivos. En este sentido las células de la teca presentaban unas credenciales similares a las de la granulosa de tal modo que su nula variación en la expresión del DrD2 a lo largo del ciclo no justificaba su estudio. A todo ello se unía el hecho de que las células de la teca, no podían ser obtenidas de forma sencilla mediante la punción folicular. Teniendo en cuenta que las consideraciones éticas motivadas por las dificultades/limitaciones técnicas de su obtención no son un tema baladí, nuevamente razones de peso nos aconsejaban no considerar tampoco estas células para su estudio in vitro. Al contrario, que las anteriores descritas sin embargo, debido a su facilidad de obtención o disponibilidad en el momento de la punción ovárica, a la gran cantidad de VEGF que son capaces de producir (Neulen y cols, 1998; Wang y cols, 2002a) y a las variaciones de expresión de DrD2 observadas durante esa fase del ciclo en los estudios inmunohistoquímicos previos, decidimos centrar nuestros ensayos funcionales in vitro sobre las células de la granulosa.

Aunque todavía no se conoce el mecanismo mediante el cual la dopamina actúa sobre el síndrome de hiperestimulación ovárica, se ha podido conocer a través de diversos trabajos citados anteriormente, que el sistema dopaminérgico está relacionado de algún modo con el riesgo de desarrollar SHO. En este sentido sería interesante mencionar un estudio comparativo retrospectivo de casos-controles recientemente publicado, donde se han confirmado que los mejores predictores del SHO son las mujeres con síndrome de ovario poliquístico, las gestaciones múltiples y las migrañas (Rollene y cols, 2010). Tanto PCOS como las gestaciones múltiples, ya se habían relacionado previamente con el SHO en la literatura (MacDougall y cols, 1992; Delvigne y cols, 1993; Abramov y cols, 1998; Papanikolau y cols, 2006), pero en ningún estudio previo se había observado una relación entre las migrañas y el SHO, la cual, además fue el mejor predictor para el desarrollo del síndrome. Esta relación presenta una concordancia biológica o un punto en común entre ambas patologías, ya que en estudios sobre la migraña se ha evidenciado por *screening* genético que existen varios genes relacionados con la dopamina implicados en su etiología (Akerman y cols, 2007; Fernández y cols, 2009). Considerando esta relación, y teniendo en cuenta que el uso de agonistas dopaminérgicos reduce la incidencia de SHO (Álvarez y cols, 2007a; Carizza y cols, 2008; Busso y cols, 2010, Youseff y cols, 2010), esta asociación observada en el trabajo anterior no hace sino apoyar la noción de que el SHO podría ser consecuencia de una baja expresión o desregulación del sistema dopaminérgico.

Por su parte, las mujeres con síndrome de ovario poliquístico presentan mayor riesgo de desarrollar SHO (Peitsidis y Agrawal, 2010), por lo que deben existir diferencias con respecto a normales que propicien ese incremento de la probabilidad de desarrollar el

síndrome. Sobre estas mujeres, además de una expresión elevada de VEGF durante la fase lútea tras la administración de gonadotropinas (Peitsidis y Agrawal, 2010), también se asocian unos niveles de prolactina elevados (Hernández y cols, 2000), sugiriendo que el tono dopaminérgico de estas mujeres pudiese estar disminuido y por ello se produciría la disregulación del sistema VEGF/VEGFR2 observada en estos casos (Peitsidis y Agrawal, 2010). Basándose en esta hipótesis, nuestro grupo recientemente ha publicado un estudio en el que se compararon tanto la expresión de DrD2 como la vascularización a nivel de la teca sobre folículos antrales y cuerpos lúteos procedentes de mujeres normales frente a mujeres con ovario poliquístico. Los resultados mostraron que efectivamente los niveles de expresión de DrD2 en mujeres PCO estaban significativamente disminuidos, mientras que la vascularización de la teca era significativamente superior al compararse con mujeres normales (Gómez y cols, 2011).

Durante los ensayos *in vitro*, coincidiendo con otros autores (Neulen y cols, 1995a; Wang y cols, 2002), hemos visto que las células de la granulosa luteínicas al ser estimuladas con hCG se convierten en una fuente principal de VEGF/VPF, el cual es considerado como el responsable del incremento de la permeabilidad vascular durante el SHO (Levin y cols, 1998; McClure y cols, 1994). En este trabajo hemos conseguido evidenciar un efecto fisiológico no considerado hasta el momento, donde al administrar un agonista dopaminérgico (Cb2) al medio de cultivo *in Vitro*, se produce una dramática disminución de la secreción del VEGF dependiente de hCG en células de la granulosa humana.

Para verificar que la inhibición en la secreción de VEGF por los agonistas dopaminérgicos se debía a fenómenos mediados por su receptor y no debidos a efectos inespecíficos, llevamos a cabo un ensayo adicional basado en el uso de agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos. De todos los receptores dopaminérgicos descritos en granulosa humano (Rey-Ares y cols, 2007) DrD1, DrD4 y DrD5, tan solo el DrD2 presentó un efecto inhibitorio sobre la secreción del VEGF, al ser activado mediante su agonista (Figuras 26, 28 y 29). De hecho, los resultados presentados en la figura 30, verificaron que la secreción de VEGF era dependiente de la activación del DrD2, ya que al inhibir la activación de DrD2 a través de la administración conjunta de su antagonista (L-741,626) y de Cb2, no fue posible conseguir la misma eficiencia de inhibición de la secreción de VEGF en las células de la granulosa, probablemente debido a la competitividad por ocupar el mismo receptor D2 por parte del agonista y el antagonista dopaminérgico, ya que ambos compuestos presentan una alta afinidad por este receptor (Rains y cols, 1995; Colao y cols, 1997; Pillai y cols, 1998). En este caso, parte de los receptores D2 habrían sido activados por la unión del agonista dopaminérgico, ejerciendo el efecto inhibitorio de la secreción de VEGF, mientras que

el resto de receptores de D2 se encontrarían inactivos al estar ocupados por el antagonista, dando lugar a un menor grado de inhibición de secreción del VEGF en estas células de la granulosa y estableciendo a todas luces que este efecto está directamente relacionado con el DrD2.

Existen interesantes paralelismos que relacionan los sistemas VEGF/VEGFR2 y DA/DrD2 tal y como se ha observado en la pituitaria y en el ovario. Con respecto a estas interacciones Cristina y colaboradores, mostraron que la pituitaria de ratones knockout para el DrD2 secretaban mayores cantidades de VEGF que los ratones normales (Cristina y cols, 2005). En estos estudios, un antagonista del DrD2, el haloperidol, era capaz de incrementar significativamente los niveles de VEGF en la pituitaria de los animales normales, mientras que la Cb2 no producía ningún efecto, como si el DrD2 ejerciese una función reguladora sobre la producción de VEGF, la cual desaparece cuando DrD2 se inactiva con el antagonista, permitiendo así que los niveles de VEGF se eleven. Pero en el caso contrario, cuando el DrD2 se activa con su agonista, este no ejerce ningún efecto sobre los niveles de VEGF. La justificación para estas diferencias en la respuesta de las células de la granulosa y la pituitaria ante la activación/inactivación del DrD2, podría encontrarse en las diferentes aportes de DA/VEGF a los que se encuentran expuestos ambos tipos celulares in vivo. Como en las hembras de ratones normales, el DrD2 recibe constantemente un aporte dopaminérgico procedente del hipotálamo, estando todos los receptores DrD2 ya activados, por lo que una estimulación adicional del DrD2 podría no suponer un efecto visible en la inhibición de la secreción del VEGF en este tipo celular. Por otro lado, como las células de la granulosa en cultivo reciben un aporte constante de hCG, el cual produce un incremento de los niveles del VEGF hasta alcanzar un máximo de secreción a una dosis de 5 UI (Figura 23), cuando se inactiva el DrD2 con un antagonista, podría no resultar en un incremento apreciable en los niveles de VEGF, tal y como se confirma en los resultados del presente trabajo (Figura 26). Adicionalmente, el mecanismo mediante el cual el DrD2 modifica la secreción de VEGF en ambos tipos celulares, debe ser distinto. De hecho, la regulación llevada a cabo en la pituitaria se produce de forma paracrina, mientras que en las células de la granulosa luteínica, esta regulación se lleva a cabo de forma autocrina, existiendo incluso una contribución de dopamina propio de las células de la granulosa. Estas células, no son capaces de sintetizar dopamina por sí mismas, sin embargo, en un reciente trabajo, se ha descrito una actividad “*neuron-like*” de estas células de la granulosa, por la cual son capaces de captar y retener en su citoplasma, ciertas cantidades de dopamina e ir liberándola poco a poco en función de los estímulos que vayan recibiendo a través de transportadores específicos que poseen, como el de la dopamina (Greiner y cols, 2008).

De todos modos, tanto el trabajo sobre ratones knockout (Cristina y cols, 2005) como el nuestro coinciden en que el DrD2 podría ser un regulador de la expresión del VEGF tanto en condiciones patológicas como fisiológicas. Parece razonable pensar que la eficacia del tratamiento con Cb2 para prevenir el SHO radica principalmente en su habilidad para inhibir la producción del ligando VEGF por parte de las células de la granulosa luteínica, la mayor fuente de este factor de permeabilidad (McClure y cols, 1994; Neulen y cols, 1995a; Levin y cols, 1998; Wang y cols, 2002a).

El estudio descriptivo del patrón de expresión ovárico del DrD2 que hemos mencionado anteriormente, en combinación con los estudios funcionales donde se consigue modificar la secreción de VEGF en células luteínicas de la granulosa, proporciona un importante avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares a través de los cuales el DrD2 actúa en prevención del SHO y el por qué la eficacia de este fármaco se ha mostrado diferente entre unas mujeres y otras.

Adicionalmente, los resultados de expresión de DrD2 obtenidos a lo largo del ciclo ovárico, también podrían explicar la relativa ineficiencia del tratamiento con agonistas dopaminérgicos en la prevención del SHO tardío. La expresión de DrD2 en las células de la granulosa luteínicas va disminuyendo a medida que avanza la fase lútea y se hace prácticamente ausente durante la fase lútea tardía, momento en el cual se desarrolla el SHO tardío (Dahl Lyons y cols, 1994). Estas células, en mujeres con alto riesgo de desarrollar SHO, podrían estar generando una respuesta insuficiente ante la administración de agonistas de DrD2, dando como consecuencia una menor inhibición de la secreción de VEGF la cual sería responsable del fracaso del tratamiento con agonistas dopaminérgicos observado en esta manifestación tardía del síndrome.

Del mismo modo que una menor expresión de DrD2 a lo largo de ciclo podría ser responsable de la ineficacia de los agonistas dopaminérgicos durante el SHO tardío, es posible que diferencias en la expresión de DrD2 ovárico entre mujeres durante la fase lútea temprana sea responsable de que el tratamiento se muestre efectivo en unas sí y en otras no. Sería deseable poder profundizar en dicha cuestión en futuros estudios. Valga como adelanto para los mismos y quién se aventure en ellos, los datos observados en este trabajo donde observamos diferencias de expresión, bastante acusadas en la expresión de DrD2 de la granulosa en la fase lútea temprana de diferentes mujeres.

A pesar de todo, el uso de los agonistas del DrD2 es una de las estrategias más prometedoras para prevenir el SHO entre otras ya descritas y que comúnmente se usan en clínica (Humaidan y cols, 2010). Como hemos visto en nuestros resultados, la disminución de los niveles secretados de VEGF producida por Cb2 depende de la dosis del agonista

suministrada. Ante este efecto dosis dependiente es lógico pensar que la eficacia en la prevención del SHO podría mejorarse incrementando la dosis de agonista dopaminérgico utilizado. Al hilo de este planteamiento, de forma anecdótica se ha publicado un “*case report*” en el que incluso a mayores dosis, la Cb2 sigue siendo efectiva en el tratamiento del SHO sin comprometer la angiogénesis en humanos. En esta publicación, la paciente vuelve a recibir un tratamiento de reproducción asistida tras sufrir en un primer intento un SHO temprano moderado a pesar de haber sido tratada con 0,5 mg/día de Cb2. En esta segunda estimulación la administración de 1mg/día de Cb2, resolvió rápidamente el SHO a pesar del embarazo, y llevó a término el parto sin problemas (Ata y cols, 2009). Como se ha discutido anteriormente, una dosis mayor de agonistas dopaminérgicos podría compensar las deficiencias o alteraciones del receptor DrD2, inhibiendo de forma significativa la secreción de VEGF hasta un punto en que se diese lugar a efectos relevantes sobre el SHO.

Aun así, existen preocupaciones serias centradas en la seguridad de los fármacos comentados cuando se administran a muy altas dosis, las cuales podría ser inviables para un intento de uso. De hecho, la incidencia de efectos adversos gastrointestinales y relacionados con el sistema nervioso central, se estiman en incremento a medida que se administran mayores dosis de agonistas dopaminérgicos (Busso y cols, 2010). Otros efectos secundarios más serios son alucinaciones y fallo cardíaco, los cuales han sido reportados a altas dosis de Cb2 para el tratamiento del Parkinson (Lera y cols, 1993). Para evitar estas limitaciones sería recomendable caracterizar con más detalle las vías moleculares del sistema DA/DrD2 que dan lugar a la inhibición del VEGF. Encontrar algún punto en la cascada de señalización que se pueda controlar mediante el uso de fármacos más selectivos, podría inhibir la hipersecreción de VEGF sin presentar efectos secundarios relevantes.

7.- CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

1. El receptor DrD2 se expresa a nivel ovárico en tres tipos celulares diferentes: células de la teca, células de la granulosa y macrófagos.
2. El endotelio ovárico no expresa DrD2, por lo que el efecto regulador de la permeabilidad vascular ovárica que proporcionan los agonistas dopaminérgicos, no puede estar mediado directamente sobre el endotelio sino a través de otro mecanismo indirecto.
3. La administración del agonista dopaminérgico cabergolina induce una inhibición de la secreción de VEGF de forma dosis dependiente en las células de la granulosa humana.
4. Dicho efecto inhibitorio sobre la secreción de VEGF por parte de las células de la granulosa en respuesta a agonistas dopaminérgicos, se produce por activación específica del propio DrD2 expresado en la superficie de este tipo celular. La activación del resto de receptores dopaminérgicos del ovario no ejercen ningún efecto sobre la secreción de VEGF.
5. La expresión de DrD2 varía a lo largo del ciclo ovárico, siendo máxima tras la ovulación y disminuyendo a medida que avanza la edad del cuerpo lúteo.
6. La disminución de expresión de DrD2 durante la fase lútea media y tardía podría ser responsable de la total ineficacia del tratamiento con agonistas dopaminérgicos en la prevención del SHO tardío.
7. Nuestro trabajo sostiene que el aumento de las dosis de agonistas dopaminérgicos para el tratamiento del SHO podría repercutir en una disminución de la incidencia de este síndrome.

8.- BIBLIOGRAFÍA

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Abaé M, Glassberg M, Majercik MH, Yoshida H, Vestal R y Puett D. Immunoreactive endothelin-1 concentrations in follicular fluid of women with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization- embryo transfer. *Fertil Steril.* 1994; 61:1083-7.
- Aboulghar M, Evers JH, Al-Inany H. Intravenous albumin for preventing severe ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2002; 17:3027–32.
- Aboulghar MA, Mansour RT. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum Reprod Update.* 2003; 9:275–89.
- Aboulghar MA. Autotransfusion of the ascitis fluid in the treatment of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1992; 58:1056.
- Abramov Y, Elchalal U, Schenker JG. Obstetric outcome of in vitro fertilized pregnancies complicated by severe ovarian hyperstimulation syndrome: a multicenter study. *Fertil Steril.* 1998; 70:1070–6.
- Abu-Shakra, S, Alhalabi, MS, Nachtman, FC, Schemidt, RA, y Brusilow, WS, Anabolic steroids induce injury and apoptosis of differentiated skeletal muscle. *J Neurosci Res.* 1997; 47:186-97.
- Adashi EY, Resnick CE, D’Ercole AJ, Svoboda ME, VanWyk JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev.* 1985; 6:400–20.
- Agrawal R, Conway G, Sladkevicius P, Tan SL, Engmann L, Payne N, Bekir J, Campbell S y Jacobs H. Serum vascular endothelial growth factor and Doppler blood flow velocities in in vitro fertilization: relevance to ovarian hyperstimulation syndrome and polycystic ovaries. *Fertil Steril.* 1998; 70:651-8.
- Agrawal R, Tan SL, Wild S, Sladkevicius P, Engmann L, Payne N, Bekir S, Campbell S, Conway G y Jacobs H. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1999; 71: 287-93.
- Aisaka K, Tomonari R, Tawada T, Yoshimatsu J, Ando S, Kokuho K, Sasaki S, Yoshida K, Kaneda S y Mori H. Intended super-ovulation with HMG in the treatment of so-called functional sterility. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1989; 41: 196-202.
- Akerman S, Goadsby PJ. Dopamine and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia.* 2007; 27:1308–14.
- Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K. European Cetrorelix Study Group. Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective

- randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. *Hum Reprod.* 2000; 15:526–31.
- Al-Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod.* 2002; 17:874–85.
 - Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar M. Gonadotrophin releasing hormone antagonists for assisted conception: a Cochrane review. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14:640–9.
 - Al-Ramahi M. Severe OHSS: Decreasing the risk of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1999; 14: 2421-2.
 - Álvarez C, Martí-Bonmatí L, Novella-Maestre E, Sanz R, Gómez R, Fernández-Sánchez M, Simón C, Pellicer A. Dopamine agonist cabergoline reduces hemoconcentration and ascites in hyperstimulated women undergoing assisted reproduction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007a; 92:2931–2937.
 - Álvarez C, Alonso-Muriel I, García G, Crespo J, Bellver J, Simón C, Pellicer A. Implantation is apparently unaffected by the dopamine agonist Cb2 when administered to prevent ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing assisted reproduction treatment: a pilot study. *Hum Reprod.* 2007b; 22:3210–3214.
 - Amarin ZO. Bilateral partial oophorectomy in the management of severe ovarian hyperstimulation syndrome. An aggressive, but perhaps life-saving procedure. *Hum Reprod.* 2003; 18:659-64
 - Amso NN, Ahuja KK, Morris N, Shaw RW. The management of predicted ovarian hyperstimulation involving gonadotropin-releasing hormone analog with elective cryopreservation of all pre-embryos. *Fertil Steril.* 1990; 53:1087–90.
 - Ando H, Furugori K, Shibata D, Harata T, Murata Y, Mizutani S. Dual renin-angiotensin blockade therapy in patients at high risk of early ovarian hyperstimulation syndrome receiving IVF and elective embryo cryopreservation: a case series. *Hum Reprod.* 2003; 18:1219–22.
 - Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM y Gardner TW. VEGF induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vacular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem.* 1999; 274, 23463-7.
 - Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest.* 1998; 101:40–50
 - Artini PG, Fasciani A, Monti M, Luisi S, D’Ambrogio G y Genazzani AR. Changes in vascular endothelial growth factor concentrations and the risk of ovarian

- hyperstimulation syndrome in women enrolled in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1998a; 70: 560-4.
- Artini PG, Monti M y Fasciani A. Correlation between the amount of follicle-stimulating hormone administered and plasma and follicular fluid vascular endothelial growth factor, concentrations in women undergoing in vitro fertilization. *Ginecol. Endocrinol* 1998b; 12:243-7.
 - Asch RH, Balmaceda HP, Weckstein JP, et al. Severe ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology: definition of high risk groups. *Hum Reprod* 1991; 6:1395-1399.
 - Ata B, Seyhan A, Orhaner S, Urman B. High dose cabergoline in management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2009; 92:1168.e1-4.
 - Ata B, Yakin K, Alatas C, Urman B. Dual renin-angiotensin blockage and total embryo cryopreservation is not a risk-free strategy in patients at high risk for ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2008; 90:531-6.
 - Bacic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebrovascular endothelium. *J Neurochem* 1991; 57: 1774-80.
 - Baird DT y Smith KB. Inhibin and related peptides in the regulation of reproduction. *Oxf Rev Repr Biol* 1993; 15:191-232.
 - Balasch AJ, Carmona F, Llach J, Arroyo V, Jove Y y Vanrell JA. Acute prerenal failure and liver dysfunction in a patient with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1990; 5:348-51.
 - Balasch J, Arroyo V, Carmona F, Llach J, Jiménez W, Paré JC y Vanrell JA. Severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of peripheral vasodilation. *Fertil Steril* 1991; 56:1077-83.
 - Balasch J, Arroyo V, Fábregues F, Jiménez W, Saló J y Vanrell JA. Immunoreactive endothelin plasma levels in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1995; 64: 65-8.
 - Balasch J, Fabregues F y Arroyo V. Peripheral arterial vasodilatation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13:2718-30.
 - Balasch J, Fábregues F, Arroyo V, et al. Treatment of severe ovarian hyperstimulation syndrome by conservative medical approach. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:662-667.
 - Balasch, J, Fabregues, F, Arroyo, V. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. 1998; 13: 2718-30.

- Ballesteros A, Landeras J, Gómez E, Amorocho B, Martínez MC, Muñoz M, Carneiro P, Álvarez JC, Pellicer A y Remohí J. Síndrome de hiperestimulación ovárica. En: Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Remohí J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J, eds. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. 1999; pp. 97-114.
- Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kistner RW, Ryan KJ. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:904-10.
- Barron VJ, Pereyra QR, Esparza IJA y col. Tratamiento integral del síndrome de hiperestimulación ovárica severo mediante autotransfusión de ascitis e infusión intravenosa de albúmina. *Ginecol Obstet Mex* 1994; 66:347-349.
- Basic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M: Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebrovascular endothelium. *J Neurochem* 1991; 57:1774-1780.
- Basu S, Dasgupta PS, Chowdhury JR Enhanced tumor growth in brain dopamine-depleted mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment *J Neuroimmunol*. 1995; 60:1-8
- Basu S, Dasgupta PS: Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol* 2000; 102:113-124.
- Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupta PS, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001; 7(5):569-74.
- Bates DO y Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway *Am J Physiol* 1997; 273:H687-94.
- Battistini B, D'Orleans-Juste P y Srois P. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluid. *Lab Invest*. 1993; 68: 600-28.
- Beckmann MW, Polacek D, Seung L, Schreiber JR. Human ovarian granulosa cell culture: determination of blood cell contamination and evaluation of possible culture purification steps. *Fertil Steril*. 1991; 56:881-7
- Bellver J, Munoz EA, Ballesteros A, Soares SR, Bosch E, Simon C, et al. Intravenous albumin does not prevent moderate-severe ovarian hyperstimulation syndrome in high-risk IVF patients: a randomized controlled study. *Hum Reprod*. 2003; 18:2283-8.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL y Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E2 and interleukin-1: a potential mechanisms for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*. 1995; 372: 83-7.
- Ben-Shlomo I, Kokia E, Jackson MJ, Adashi EY y Payne DW. Interleukin-1 β stimulates nitrite production in the rat ovary: evidence for heterologous cell-cell interaction and

- for insulinmediated regulation of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Biol Reprod* 1994; 51:310-8.
- Berridge MJ e Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341:197-205
 - Best CL, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA. Modulation of human granulosa cell steroid production in vitro by tumor necrosis factor alpha: implications of white blood cells in culture. *Obstet Gynecol.* 1994; 84:121-7.
 - Best CL, Pudney J, Welch WR, Burger N, Hill JA. Localization and characterization of white blood cell populations within the human ovary throughout the menstrual cycle and menopause. *Hum. Reprod.* 1996; 11:790–797.
 - Bodis J, Bognar Z, Hartmann G, Torok A, Csaba IF: Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol Obstet Invest* 1992; 33:165-167.
 - Bodri D, Guillen JJ, A, Mataro D, Pujol A, Coll O. Triggering with human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated oocyte donor cycles: findings of a large retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2009; 91:365–71.
 - Bonello N, Mckie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brännström M y Norman RJ. Inhibition of nitric oxide: Effects on interleukin-1? enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1996; 54:436- 45.
 - Bonello N, Mckie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brännström M y Norman RJ. Inhibition of nitric oxide: Effects on interleukin-1? enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1996; 54: 436- 45.
 - Borm G, Mannaerts B. The European Orgalutran Study Group. Treatment with the gonadotrophin releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. *Hum Reprod.* 2000; 15:1877
 - Brinsden PR, Wada I, Tan SL et al. Review: diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 767–772.
 - Brock TA, Dvorak y Senger DR. Tumor secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol.* 1991; 138:213-21.
 - Buhendwa L, Zachariah R, Teck R, Massaquoi M, Kazima J, Firmenich P, Harries AD. Cabergoline for suppression of puerperal lactation in a prevention of mother-to-child HIV-transmission programme in rural Malawi. *Trop Doct.* 2008; 38:30–32.

- Bukovský A, Caudle MR, Keenan JA, Wimalasena J, Upadhyaya NB, Van Meter SE. Is corpus luteum regression an immune-mediated event? Localization of immune system components and luteinizing hormone receptor in human corpora lutea. *Biol Reprod.* 1995; 53:1373-84.
- Buschmann IR, Busch HJ, Mies G, Hossmann KA. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation.* 2003; 108:610–615.[
- 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(4):995-1004
- Buyalos RP, Watson JM y Martínez-Maza O. Detection of interleukin-6 in human follicular fluid. *Fertil Steril.* 1992; 57:1230-4.
- Cappa, F, Pasqua, C, Tobia, M, Ventura, T. Ascites and hydrothorax due to endogenous hyperstimulation of H.C.G. in a case of hydatidiform mole destruens with secondary irreversible kidney insufficiency due to disseminated intravascular coagulation. *Rivista Italiana di Ginecologia.* 1976; 56: 363-8.
- Cardoso CG, Graca LM, Dias T, Clode N, Soares L. Spontaneous ovarian hyperstimulation and primary hypothyroidism with a naturally conceived pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999; 93:809-11.
- Carizza C, Abdelmassih V, Abdelmassih S, Ravizzini P, Salgueiro L, Salgueiro PT, Jine LT, Nagy P, Abdelmassih R. Cabergoline reduces the early onset of ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:751–755.
- Cavender JL y Murdoch WJ. Morphological studies of the microcirculatory system of preovulatory ovine follicles. *Biol. Reprod.* 1988; 48:989-97.
- Cerrillo M, Pacheco A, Rodriguez S, Gomez R, Delgado F, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Differential regulation of vascular mediators by hCG versus GnRH agonists. *Hum Reprod* 2010; 25:i249.
- Cerrillo M, Rodriguez S, Mayoral M, Pacheco A, Martinez-Salazar J, Garcia-Velasco JA. Differential regulation of VEGF after final oocyte maturation with GnRH agonist versus hCG: a rationale for OHSS reduction. *Fertil Steril.* 2009; 91:1526–1528.
- Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2009; 69:3727-30
- Chang HW, Wu VC, Huang CY, Huang HY, Chen YM, Chu TS, Wu KD, Hsieh BS. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294:E622-9

- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA y Smith SK. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* 1993; 48:1120-8.
- Check JH, Choe JK & Nazari A. Hyperreactio luteinalis despite the absence of a corpus luteum and suppressed serum follicle stimulating concentrations in a triplet pregnancy. *Hum Reprod* 2000; 15(5): 1043–1045.
- Chen CD, Chen HF, Lu HF, Chen SU, Ho HN y Yang YS. Value of serum and follicular fluid cytokine profile in the prediction of moderate to severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2000a; 15:1037-42.
- Chen CD, Wu MY, Chao KH, Chen SU, Ho HN y Yang YS. Serum estradiol level and oocyte number in predicting severe ovarian hyperstimulation syndrome. *J Formos Med Assoc* 1997; 96:829-34.
- Chen HF, Shew JY, Chao KH, Chang LJ, Ho HN and Yang YS. Luteinizing hormone up-regulates the expression of interleukin-1 beta mRNA in human granulosa-luteal cells. *Am J Reprod Immunol.* 2000b; 43:125-133.
- Chen SU, Chou CH, Lin CW, Lee H, Wu JC, Lu HF, Chen CD, Yang YS. Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: dopamine targets their common pathways. *Hum Reprod.* 2010; 25:757-67.
- Chen TT, Lane TA, Doody MC and Caudle MR. The effect of peritoneal macrophage-derived factor(s) on ovarian progesterone secretion and LH receptors: the role of calcium. *Am J Reprod Immunol.* 1992; 28:43-50.
- Cheung D, Heaney A. Dopamine agonists and vulvar heart disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16:316–320.
- Ciccarelli E, Grottoli S, Razzore P, Gaia D, Bertagna A, Cirillo S, Cammarota T, Camanni M, Camanni F 1997 Long-term treatment with cabergoline, a new long-lasting ergoline derivate, in idiopathic or tumorous hyperprolactinaemia and outcome of drug-induced pregnancy. *J Endocrinol Invest* 20:547–551
- Ciccarelli E, Grottoli S, Razzore P, Gaia D, Bertagna A, Cirillo S, Cammarota T, Camanni M, Camanni F. Long-term treatment with cabergoline, a new long-lasting ergoline derivate, in idiopathic or tumorous hyperprolactinaemia and outcome of drug-induced pregnancy. *J Endocrinol Invest.* 1997; 20:547-551
- Cohen PE, Nishimura K, Zhu L and Pollard JW. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *J Leukoc Biol.* 1999; 66:765-772.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G y Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271:736-41.

- Colao A, Di Sarno A, Sarnacchiaro F, Ferone D, Di Renzo G, Merola B, et al. Prolactinomas resistant to standard dopamine agonists respond to chronic cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 876-883
- Colao A, Di Sarno A, Guerra E, Pivonello R, Cappabianca P, Caranci F, Elefante A, Cavallo LM, Briganti F, Cirillo S et al. Predictors of remission of hyperprolactinaemia after long-term withdrawal of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol*. 2007; 67:426–433.
- Connolly DT, Heuvelman DM y Nelson J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989; 84:1470-1478.
- Costello MF, Chapman M, Conway U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2006; 21:1387–99.
- Criscuolo GR y Balleux JP. Clinical neurosciences in the decade of the brain: hypotheses in neuro-oncology. VEG/PF acts upon the actin cytoskeleton and is inhibited by dexamethasone: relevance to tumor angiogenesis and vasogenic edema. *Yale J Biol Med* 1996; 69:337-55.
- Cristina C, Díaz-Torga G, Baldi A, Góngora A, Rubinstein M, Low MJ et al. Increased pituitary vascular endothelial growth factor- α in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* 2005; 146:2952-62
- D, Bergh PA y cols. The ovarian hyperstimulation syndrome, in: “Reproductive endocrinology, surgery and Technology”. Edited by EY Adashi, JA Rock, Z Rosenwaks. Philadelphia: Lippincott-Raven Pub. 1996; pp. 2225-32.
- D’Angelo A, Amso N. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17:2787–94.
- D’Angelo A, Amso N: “Coasting” (withholding gonadotrophins) for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002a; CD002811.
- Dahl Lyons CA, Wheeler CA, Frishman GN, Hackett RJ, Seifer DB, Haning Jr RV. Early and late presentation of the ovarian hyperstimulation syndrome: two distinct entities with different risk factors. *Hum Reprod*. 1994; 9:792–799
- Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P y Lamy M. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992; 215:356-62.
- Davies MG, Fulton GJ y Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82:1598-610.
- Davis, E. y Hellebaum, AA. Observations on the experimental use of gonadotropic extracts in the human female. *J Clin Endocrinol* 1944; 4:400-9.

- Daya S, Gunby J. Luteal phase support in assisted reproduction cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (3): CD004830.
- 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(5047):989-91.
- Delbaere A, Bergmann PJ, Gervy-Decoster C, Camus M, De Maertelaer V y Englert Y. Prorenin and active renin concentrations in plasma and ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1997b; 12:236-40.
- Delbaere A, Bergmann PJ, Gervy-Decoster C, Deschodt-Lanckman M, de Maertelaer V, Staroukine M, Camus M y Englert Y. Increased angiotensin II in ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome: role of early pregnancy and ovarian gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 1997a; 67:1038-45.
- Delbaere A, Bergmann PJ, Gervy-Decoster C, Staroukine M y Englert Y. Angiotensin II immunoreactivity is elevated in ascites during severe ovarian hyperstimulation syndrome: implications for pathophysiology and clinical management. *Fertil Steril* 1994; 62:731-7.
- Delvigne A, Demoulin A, Smitz J, Donnez J, Koninckx P, Dhont M, et al. The ovarian hyperstimulation syndrome in in-vitro fertilization: a Belgian multicentric study. I. Clinical and biological features. *Hum Reprod*. 1993; 8:1353-60.
- Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update*. 2002a; 8:559-77.
- Delvigne A, Rozenberg S. Systematic review of data concerning etiopathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Int J Fertil Womens Med* 2002b; 47:211-26.
- Derkx FH, Alberda AT, Zeilmaker GH y Schalekamp MA. High concentrations of immunoreactive renin, prorenin and enzymatically-active renin in human ovarian follicular fluid. *Br J Obstet Gynecol* 1987; 94:4-9.
- Diedrich K, Ludwig M, Felberbaum RE. The role of gonadotropin-releasing hormone antagonists in in vitro fertilization. *Semin Reprod Med*. 2001; 19:213-220
- Ditkoff EC, Cassidenti DL, Paulson RJ, Sauer MV, Paul WL, Rivier J, Yen SS, Lobo RA. The gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) acutely blocks the luteinizing hormone surge but allows for resumption of folliculogenesis in normal women. *Am J Obstet Gynaecol*. 1991; 165:1811-1817.
- Doldi N, Bassan M, Fusi F y Ferrari A. In controlled ovarian hyperstimulation, steroid production, oocyte retrieval, and pregnancy rate correlate with gene expression of vascular endothelial growth factor. *J Assist Reprod Genet*. 1997; 14:589-592.
- Doody KJ, Schnell VL, Foulk RA, Miller CE, Kolb BA, Blake EJ, et al. Endometrin for luteal phase support in a randomized, controlled, open-label, prospective in-vitro fertilization

- trial using a combination of Menopur and Bravelle for controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 2008; 91:1012–7.
- Douglas DC, Nakhuda GS, Sauer MV, Zimmermann RC. Angiogenesis and Ovarian Function. *J. Fertil. Reprod.* 2005; 15:7-14.
 - Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38:1165–74.
 - Dunaif A. Drug insight: insulin-sensitizing drugs in the treatment of polycystic ovary syndrome—a reappraisal. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4: 272–83.
 - Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146:1029-1039.
 - Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20(21):4368-80.
 - Edwards RG y Steptoe PC Current status of in-vitro fertilisation and implantation of human embryos. *Lancet* 1983; 2:1265-9.
 - Emerson M, Paul W, Page CP: Regulation of platelet function by catecholamines in the cerebral vasculature of the rabbit. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1652-1656.
 - 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.
 - Enskog A, Henriksson M, Unander M, et al. 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; 71:808-814.
 - Enskog A, Henriksson M, Unander M, Nilsson L y 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.
 - Eramaa M y Ritvos O Prostaglandin E2 induces inhibin alpha- and beta A-subunit mRNA and secretion of dimeric inhibin A in cultured human granulosa-luteal cells. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:815-22.
 - Erlik Y, Naot Y, Friedman M, Ben-David E y Paldi E. Histamine levels in ovarian hyperstimulation syndrome. *Obstet Gynecol* 1979; 53:580-2.

- Erstad BL, Gales BJ, Rappaport WD. The use of albumin in clinical practice. *Arch Intern Med* 1991; 151:901–11.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E y Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111:1853-65.
- Esteban-Altirriba J. Le syndrome d'hyperstimulation massive des obviars. *Rev Française de Gynécologie et d'Obstétrique* 1961; 7-8:555-64.
- European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 2001; 16:644–51.
- European and Middle East Orgalutran Study Group. Comparable clinical outcome using the GnRH antagonist ganirelix or a long protocol of the GnRH agonist triptorelin for the prevention of premature LH surges in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod.* 2001; 16:644–51.
- European Orgalutran Study Group. Treatment with the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone is effective, safe and convenient: results of a controlled, randomized, multicentre trial. *Hum Reprod.* 2000; 15:1490–8.
- European Recombinant LH Study Group. Human recombinant luteinizing hormone is as effective as, but safer than, urinary human chorionic gonadotropin in inducing final follicular maturation and ovulation in in vitro fertilization procedures: results of a multicenter double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:2607–18.).
- Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Papanikolaou E et al. An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Update* 2007; 13:581–90.
- Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF y Dvorak AM. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med.* 1996; 183:1981-6.
- Fernández F, Colson N, Quinlan S, MacMillan J, Lea RA, Griffiths LR. Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus. *Neurogenetics.* 2009; 10:199–208.
- Ferrara N y Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews.* 1997; 18:4-25.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6):669-76.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L y Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of properties. *Endocrine Reviews.* 1992; 13:18-32.

- Ferrara, N. y Alitalo, K. clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 1999; 5:1359-1364.
- Ferrara, N. y Henzel, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 161:851-858.
- Ferraretti AP, Gianaroli L, Diotallevi L, Festi C, Trounson A. Dopamine treatment for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1992; 7:180-3.
- Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli C, Fortini D, Selman HA, Feliciani E. Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety. *Hum Reprod.* 1999; 14:1457–60.
- Folkman J y Davis-Smith, T. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-4.
- Folkman J y Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235:442-7.
- Fong G, Rossant F y Breitman M. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 373:66-70.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP y McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 1999; 59:99–106.
- Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG y Werner S. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem.* 1995; 270:12607-13.
- Fraser HM, Wilson H, Wulff C, Rudge JS, Wiegand SJ. Administration of vascular endothelial growth factor Trap during the 'post-angiogenic' period of the luteal phase causes rapid functional luteolysis and selective endothelial cell death in the marmoset. *Reproduction.* 2006; 132:589-600.
- Friedlander MA, Loret de Mola JR y Goldfarb JM. Elevated concentrations of interleukin-6 in ascites and serum from women with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1993; 60:826-33.
- Fujisawa H, Okuno S. Regulation of the activity of tyrosine hydroxylase in the central nervous system. *Adv Enzym Reg* 1987; 28:93-110.
- Galindo A, Bodri D, Guillen JJ, Colodron M, Vernaeva V, Coll O. Triggering with HCG or GnRH agonist in GnRH antagonist treated oocyte donation cycles: a randomised clinical trial. *Gynecol Endocrinol.* 2009; 25:60–6.
- Gaona R, Cejudo E, Hernández L. Síndrome de hiperestimulación ovárica. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción* 2010; 2(3):67-73.

- García-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
- García-Velasco JA, Zuniga A, Pacheco A, Gomez R, Simon C, Remohi J, et al. Coasting acts through downregulation of VEGF gene expression and protein secretion. *Hum Reprod*. 2004; 19:1530–8.
- Garcia-Velasco JA. How to avoid ovarian hyperstimulation syndrome: a new indication for dopamine agonists. *Reprod Biomed Online*. 2009; 18:71-5.
- Gaytán F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C and Sanchez-Criado JE. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol Reprod* 1998; 59,417-425.
- Gera PS, Tatpati LL, Allemand MC, Wentworth MA, Coddington CC. Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertil Steril*. 2010; 94(1):173-8.
- Gergly RZ, Paldi E, Erlik Y y Makler A. Treatment of ovarian hyperstimulation syndrome by antihistamine. *Obstet Gynecol* 1976; 47:83-5.
- Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74:429–38.
- Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Azem F, Yovel I y Amit A. Elevated concentrations of interleukin-6 in the follicular fluid at the time of oocyte retrieval for in vitro fertilization may predict the development of early-form ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1997; 68:133-7.
- Giles J, Requena A, García-Velasco JA, Pacheco A, Pellicer J, Pellicer A. GnRH analogue for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: a pilot study. *Fertil Steril*. 2009; 91:1366-9
- Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev*. 2006; 27:485–534.
- Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N y Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*. 2001; 276:3222-30.
- Glade-Bender J, Kandel JJ, Yamashiro DJ. VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opinion Biological Therapy* 2003; 3: 263–76.
- Glorioso N, Atlas SA, Laragh JH, Jewelewicz R y Sealey JE. Prorenin in high concentrations in human ovarian follicular fluid. *Science* 1986; 233:1422-4.

- Gokmen O, Ugur M, Ekin M et al. Intravenous albumin versus hydroxyethyl starch for the prevention of ovarian hyperstimulation in an in-vitro fertilization programme: a prospective randomized placebo controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96: 187–192.
- Golan A, Ron-El R, Herman A, Soffer Y, Weinraub Z y Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv* 1989; 44:430-40.
- Golan A, Ron-El R, Herman A, Weinraub Z, Soffer Y y Caspi E. Ovarian hyperstimulation syndrome following D-Trp-6 luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules and menotropin for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 50:912-6.
- Goldsman MP, Pedram A, Domínguez CE, Ciuffardi I, Levin E y 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.
- 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.
- Gómez R, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Administration of Moderate and High Doses of Gonadotropins to Female Rats Increases Ovarian Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGFR-2 expression that Is Associated to Vascular Hyperpermeability. *Biology of Reproduction*. 2003a; 68: 2164-71
- Gómez R, González M, Simón C, Remohi J, Pellicer A. Tyroxine hydroxylase (TH) downregulation 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*. 2003b; 80:43-4.
- Gómez R, González-Izquierdo M, Zimmermann RC, Novella-Maestre E, Alonso-Muriel I, Sanchez-Criado J, et al. Low-dose dopamine agonist administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated vascular hyperpermeability without altering VEGF receptor 2-dependent luteal angiogenesis in a rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology*. 2006; 147:5400–11.
- Gómez R, Ferrero H, Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Zimmermann RC, Simón C, Gaytan F, Pellicer A. Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:2484-92
- Gonen Y, Balakier H, Powell W, Casper RF. Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71(4):918–22.
- Gonen Y, Powell WA, Casper RF. Effect of follicular aspiration on hormonal parameters in patients undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1991; 6:356–8.

- Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ y 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.
- Graf MA, Fischer R, Naether OGJ et al. Reduced incidence of ovarian hyperstimulation syndrome by prophylactic infusion of hydroxyethyl starch solution in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1997; 12(12): 2599–2602.
- Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, Lara HE. Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 2008; 149:4988-96.
- Griesinger G, Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Diedrich K, Van Steirteghem AC, Devroey P, et al. Triggering of final oocyte maturation with gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin. Live birth after frozen-thawed embryo replacement cycles. *Fertil Steril.* 2007; 88:616–21.
- Griffith OW y Stuehr DJ. Nitric oxide synthase properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:707-37.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodeger FE, Mather JP y McNeilly AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1401-5.
- Grossman LC, Michalakis KG, Browne H, Payson MD, Segars JH. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome: an unrecognized compartment syndrome. *Fertil Steril.* 2010 Sep; 94:1392-8.
- Gustofson RL, Segars JH, Larsen FW. Ganirelix acetate causes a rapid reduction in estradiol levels without adversely affecting oocyte maturation in women pretreated with leuprolide acetate who are at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 2006; 21:2830-7
- Hall JE, Welt CK y Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 1999; 14:409-15.
- Haning RV Jr, Austin CW, Carlson IH, Kuzma DL, Shapiro SS, Zweibel WJ. Plasma estradiol is superior to ultrasound and urinary estriol glucuronide as a predictor of ovarian hyperstimulation during induction of ovulation with menotropins. *Fertil Steril* 1983; 40: 31–6.
- Hernández I, Parra A, Méndez I, Cabrera V, Cravioto MC, Mercado M, Díaz-Sánchez V, Larrea F. Hypothalamic dopaminergic tone and prolactin bioactivity in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Med Res.* 2000; 31:216–222
- Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A, García-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(3):1137-40.
- Herring N, Szmigielski C, Becher H, Karavitaki N, Wass JA. Valvular heart disease and the use of cabergoline for the treatment of prolactinoma. *Clin Endocr* 2009; 70:104–108.
 - Heryanto B, Lipson KE, Rogers PA. Effect of angiogenesis inhibitors on oestrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. *Reproduction*. 2003; 125: 337–46
 - Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M y Suttorp N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998; 274:1678-84.
 - Ho Yuen B, Nguyen TA, Cheung AP, Leung PC: Clinical and endocrine response to the withdrawal of gonadotropin-releasing hormone agonists during prolonged coasting. *Fertil Steril*. 2008.
 - Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B y Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1806-14.
 - Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M. Winer, J. y Ferrara, N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 1992; 267:26031-26037.
 - Huddleston HG, Racowsky C, Jackson KV, Fox JH, Ginsburg ES. Coasting vs. cryopreservation of all embryos for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2008; 90:1259–62.
 - Humaidan P, Bredkjaer HE, Bungum L, Grondahl ML, Westergaard L, Anderson 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.
 - Humaidan P, Bredkjaer HE, Westergaard L, Andersen CY. 1500 IU hCG administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase when GnRH agonist is used for ovulation induction: a prospective randomized controlled study. *Fertil Steril*. 2009; 93:847–54.
 - Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Yding Anderson C. Rescue of corpus luteum function with peri-ovulatory HCG supplementation in IVF/ ICSI GnRH antagonist cycles in which ovulation was triggered with a GnRH agonist: a pilot study. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13:173–8.
 - Humaidan P, Kol S, Papanikolaou E; 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
 - Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil Steril*. 2010; 94:389-400.

- Isikoglu M, Berkkanoglu M, Senturk Z, Ozgur K. Human albumin does not prevent ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology program: a prospective randomized placebo-controlled double blind study. *Fertil Steril*. 2007; 88: 982–5.
- 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.
- Itskovitz, J., Boldes, R., Barlev, A. et al. (1988) The induction of LH surge and oocyte maturization by GnRH analogue (buserelin) in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Gynecol. Endocrinol.*, 2 (Suppl. 2), 165.
- Jelkmann W. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem*. 2001; 47:617-23. Review.
- JG y Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: A current survey. *Fertil Steril* 1978; 30:255-68.
- Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O y Alitalo K. A recombinant mutant VEGF-C has lost VEGFR2 binding activation and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 1998; 273:6599-602.
- Kaaja R, Sieberg R, Tiitinen A y Koskimies A. Severe ovarian hyperstimulation syndrome and deep venous thrombosis. *Lancet* 1989; 2: 1043.
- Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. *Am J Pathol*. 1995; 146:157–165.
- Kasum M. New insights in mechanisms for development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Coll Antropol*. 2010 Sep; 34(3):1139-43
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J y Connolly DT. Vascular permeability factor and endothelial mitogen related to PDGF. *Science*. 1989; 246: 1309-12.
- Kelly RA, Balligand JL y Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79:363-80.
- Kevil CG, Payne DK, Mire E y Alexander JS. VPF/VEGF mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctions proteins. *J Biol Chem* 1998; 273:15099-103.
- 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. *Gynecological Endocrinology*. 2006; 22: 110-3.

- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS y Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*. 1993; 362:841-4.
- Kishimoto T. The biology of IL-6. *Blood*. 1989; 74:1-10.
- Klagsbrun M y D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217-39.
- Knox G.E. Antihistamine blockade of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1974; 118:992-94
- Kol S. Luteolysis induced by a gonadotropin-releasing hormone agonist is the key to prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2004; 81:1-5
- Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2006; 12:651–71.
- Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A, Van Steirteghem AC, Devroey P, Diedrich K, et al. 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.
- König E, Bussen S, Sütterlin M et al. Prophylactic intravenous hydroxyethyl starch solution prevents moderate-severe ovarian hyperstimulation in in-vitro fertilization patients: a prospective, randomized, double-blind and placebocontrolled study. *Hum Reprod* 1998; 13(9): 2421–2424.
- Krasnow JS, Berga SL, Guzick DS, Zeleznik AJ y Yeo KT. VPF/VEGF in ovarian hyperstimulation syndrome: a preliminary report. *Fertil Steril* 1996; 65:552-5.
- Kuenen BC, Taberner J, Baselga J, Cavalli F, Pfanner E, Conte PF, Seeber P, Madhusudan S, Deplanque G, Huisman H, Scigalla P, Hoekman K, Harris AL. Efficacy and toxicity of the angiogenesis inhibitor SU5416 as a single agent in patients with advanced renal cell carcinoma, melanoma and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(5) 1648-55.
- Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology*. 1997; 138:4748–4756.
- Lanzendorf SE. Developmental potential of in vitro- and in vivomatured human oocytes collected from stimulated and unstimulated ovaries. *Fertil Steril*. 2006; 85:836–7.
- Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L: Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 2001; 15:187-192.

- Le Dall R. Le syndrome d'hyperlutéinisation massive des deux obvières par injection intempestive d'hormones gonadotropes. Thèse Paris, 1957; no. 915
- Lei ZM, Chegini N and Rao CV. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol Reprod.* 1991; 44:1148-1156.
- Lera G, Vaamonde J, Rodríguez M, Obeso JA. Cabergoline in Parkinson's disease: long-term follow-up. *Neurology.* 1993; 43:2587-90
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV y Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-9.
- Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, et al. Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Invest* 1998; 102:1978-85.
- Levy T, Orvieto R, Homburg R, Peleg D, Dekel A, Ben-Rafael Z. Severe ovarian hyperstimulation syndrome despite low plasma oestrogen concentrations in a hypogonadotrophic, hypogonadal patient. *Hum Reprod* 1996; 11:1177-9.
- Lewis CG, Warnes GM, Wang XJ, Matthews CD. Failure of body mass index or body weight to influence markedly the response to ovarian hyperstimulation in normal cycling women. *Fertil Steril* 1990; 53:1097-9.
- Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endego WO, Zhou F y Lee M. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270:308-12.
- Licht P, Engel N y Fischer O. HCG does not directly regulate circulating concentrations of vascular endothelial growth factor in IVF and embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 1997; 12:6-15.
- Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, Culler MD, Caride VJ, Negro-Vilar AF, Lennard D, DeCherney AH y Naftolin F. The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:808-16.
- Liu C, Tyrrell JB. Successful treatment of a large macroprolactinoma with cabergoline during pregnancy. *Pituitary.* 2001; 4:179-185
- Loret de Mola JR, Baumgardner GP, Goldfarb JM y Friedlander MA. Ovarian hyperstimulation síndrome: pre-ovulatory serum concentrations of Interleukin.6, interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-1 cannot predict its occurrence. *Hum Reprod.* 1996a; 11:1377-80.
- Loret de Mola JR, Flores JP, Baumgardner GP, Goldfarb JM, Gindlesperger V y Friedlander MA. Elevated interleukin-6 levels on the ovarian hyperstimulation syndrome: ovarian immunohistochemical localization of interleukin-6 signal. *Obstet Gynecol* 1996b; 87:581-7.

- Ludwig M, Gembruch U, Bauer O, Diedrich K. Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in a spontaneous pregnancy with fetal and placental triploidy: information about the general pathophysiology of OHSS. *Hum Reprod* 1998; 13:2082-7.
- Ludwig M, Jelkmann W, Bauer O, Diedrich K. Prediction of severe ovarian hyperstimulation syndrome by free serum vascular endothelial growth factor concentration on the day of human chorionic gonadotrophin administration. *Hum Reprod.* 1999; 14:2437-41.
- Ludwig M, Katalinic A, Diedrich K. Use of GnRH antagonists in ovarian stimulation for assisted reproductive technologies compared to the long protocol. Meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* 2001; 265:175–82.
- Lyons CA, Wheeler CA, Frishman GN, Hackett RJ, Seifer DB y 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.
- MacDougall MJ, Tan SL, Balen A y Jacobs HS. A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1993; 8:233-7.
- MacDougall MJ, Tan SL, Jacobs HS. In-vitro fertilization and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1992; 7:597–600.
- Magoffin DA y Jakimuk AJ. Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Hum Reprod* 1997; 12:1714-9.
- Manau D, Balasch J, Arroyo V, Jiménez W, Fábregues F, Casamitjana R, Creus M, et al. Circulatory dysfunction in asymptomatic in vitro fertilization patients. Relationship with hyperestrogenemia and activity of endogenous vasodilators. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1489–93.
- Manau D, Fabregues F, Arroyo V, Jimenez W, Vanrell JA, Balasch J. Hemodynamic changes induced by urinary human chorionic gonadotropin and recombinant luteinizing hormone used for inducing final follicular maturation and luteinization. *Fertil Steril.* 2002; 78:1261-1267
- Manno M, Tomei F. Renin-angiotensin system activation during severe OHSS: cause or effect? *Fertil Steril.* 2008; 89:488.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson, SJ. Localization of Dopamine D2 Receptor mRNA and D1 and D2 Receptor Binding in the Rat Brain and Pituitary: An In Situ Hybridization-Receptor Autoradiographic Analysis. *J. Neurosci.* 1990; 10:2587-2600.
- Manzanares MA, Gomez-Palomares JL, Ricciarelli E, Hernandez ER: Triggering ovulation with gonadotropin-releasing hormone agonist in in vitro fertilization patients with polycystic ovaries does not cause ovarian hyperstimulation syndrome despite very high estradiol levels. *Fertil Steril.* 2010; 93(4):1215-9

- Martin NM, Tan T, Meeran K. Dopamine agonists and hyperprolactinaemia. *Br Med J*. 2009; 338:554–555.
- Masaki T. Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine system. *Endocr Rev* 1993; 14:256-68.
- Mashlach S, Bider D, Moran O, Goldenberg M y Ben-Rafael Z. Adnexal torsion of hyperstimulated ovaries in pregnancies after gonadotropin therapy. *Fertil Steril* 1990; 53:76-80.
- Mathur R y Jenkins J. Selection of appropriate controls for outcome study of IVF pregnancies associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000a; 73:181-2.
- Mathur RS, Akande AV, Keay SD, Hunt LP y Jenkins JM. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000b; 73:901-7.
- Mayerhofer A, Fritz S, Grunert R, Sanders SL, Duffy DM, Ojeda SR, Stouffer RL: D1-Receptor, DARPP-32, and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4750-4757.
- Mayerhofer A, Hemmings HC Jr, Snyder GL, Greengard P, Boddien S, Berg U, Brucker C: Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:257-264.
- McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV Jr, Connolly DT y Robertson DM. Vascular endothelial growth factor as a capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet* 1994; 344:235-6.
- McClure N, Leya J, Radwanska E, Rawlins R y Haning RV. Luteal phase support and severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1992; 7:758-64.
- McElhinney B, Ardill J, Caldwell C, Lloyd F y McClure N. Ovarian hyperstimulation syndrome and assisted reproductive technologies: why some and not others? *Hum Reprod* 2002; 17:1548-53.
- McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, Sibbring, GC, Cummerson JA, Bowen-Jones D, Moots RJ. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol*. 2002; 132 (1-2): 34–40
- McLaren J, Prentice A, Charnock- Jones DS y Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*. 1996; 11:220-3.
- Meirow D, Schenker JG, Rosler A. Ovarian hyperstimulation syndrome with low oestradiol in non-classical 17 alpha-hydroxylase, 17,20-lyase deficiency: what is the role of oestrogens? *Hum Reprod* 1996; 11:2119–21.

- Melo, C. Busso, P. Alama, M. Meseguer, N. Garrido, J. Remohi. A randomized, prospective, assessor-blind, parallel groups, comparing GnRHa vs. rhCG as a trigger final oocyte maturation in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles. *Fertility and Sterility*, 2007; 88, (suppl 1) S43-S43.
- Michaelson-Cohen R, Altarescu G, Beller U, Reens R, Halevy- Shalem T, Eldar-Geva T. Does elevated human chorionic gonadotropin alone trigger spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome? *Fertil Steril*. 2008; 90:1869–74.
- Miglio G, Varsaldi F, Francioli E, Battaglia A, Canonico PL, Lombardi G. Cabergoline protects SH-SY5Y neuronal cells in an in vitro model of ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2004; 489:157-65.
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W y Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest FLK-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993; 72:835-46.
- Mingeot R. Syndrome of ovarian hyperstimulation with human gonadotropins. *Bull Soc R Belge Gynecol Obstet*. 1968; 38: 133-44.
- Missale C, Nash R, Robinson S, Jaber M, Caron M. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological rev* 1998; 78: 189-225.
- 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.
- Moon HS, Joo BS, Moon SE, Lee SK, Kim KS, Koo JS. Short coasting of 1 or 2 days by withholding both gonadotropins and gonadotropin-releasing hormone agonist prevents ovarian hyperstimulation syndrome without compromising the outcome. *Fertil Steril*. 2008; 90:2172–8.
- Morales C, García-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sánchez-Criado JE, Gaytán F. Different patterns of structural luteolysis in the human corpus luteum of menstruation. *Hum Reprod*. 2000; 15:2119-28
- Morbidelli L, Chang CH, Douglas J, Granger HJ, Ledda F y Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am Physiol Soc*. 1996; 411-5.
- Mornex R, Orgiazzi J, Hugues B, Gagnaire JC, Claustrat B. Normal pregnancies after treatment of hyperprolactinemia with bromocriptine, despite suspected pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 47:290–295
- Morris RS, Wong IL, Kirkman E, Gentschein E y Paulson RJ. Inhibition of ovarian-derived prorenin to angiotensin cascade in the treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1995; 10:1355-8.

- Motro B, Itin A, Sachs L y Keshet E. Pattern of IL-6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:3092-6.
- Murata Y, Ando H, Nagasaka T, Takahashi I, Saito K, Fukugaki H, Matsuzawa K, Mizutani S. Successful pregnancy after bromocriptine therapy in an anovulatory woman complicated with ovarian hyperstimulation caused by follicle-stimulating hormone-producing plurihormonal pituitary microadenoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(5):1988-93.
- Murdoch AP y Evbuomwan I. Severe complications of ovarian hyperstimulation syndrome are preventable. *Hum Reprod* 1999; 14:2922-3.
- Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A y Isner JM. VEGF/VPF enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998; 97:99-107.
- Nardo LG, Cheema P, Gelbaya TA, Horne G, Fitzgerald CT, Pease EH, et al. The optimal length of 'coasting protocol' in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome undergoing in vitro fertilization. *Hum Fertil (Camb)*. 2006; 9:175-80.
- Nardo LG. Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005; 17:419-23.
- Nargund G, Hutchison L, Scaramuzzi R, Campbell S. Low-dose HCG is useful in preventing OHSS in high-risk women without adversely affecting the outcome of IVF cycles. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14:682-5.
- Navot D, Bergh PA y cols. The ovarian hyperstimulation syndrome, in: "Reproductive endocrinology, surgery and Technology". Edited by EY Adashi, JA Rock, Z Rosenwaks. Philadelphia: Lippincott-Raven Pub. 1996; 2225-32.
- Navot D, Bergh PA y Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992; 58:249-61.
- Navot D, Margalioth EJ, Laufer N, Birkenfeld A, Relou A, Rosler A, et al. Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1987; 48:57-61.
- Navot D, Relou A, Birkenfeld A, Rabinowitz R, Brzezinski A, Margalioth E. Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:210-5.
- Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 83-9.
- Neulen J, Raczek S, Pogorzelski M, Grunwald K, Yeo TK, Dvorak HF, Weich HA y Breckwoldt M. Secretion of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability

- factor from human lutenized granulosa cells is hCG gonadotrophin dependent. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4:203-6.
- Neulen J, Wenzel D, Hornig C, Wunsch E, Weissenborn U, Grunwald K, Buttner R y Weich H. Poor responder-high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in ovarian stimulation protocols. *Hum Reprod* 2001; 16:621-6.
 - Neulen J, Yan Z y Raczek S. Ovarian hyperstimulation syndrome: vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor from luteinized granulosa cells in the pathophysiological principle. In abstracts of the 11th Annual Meeting of ESHRE. Hamburg. June 1995b; *Hum Reprod* 10. p3.
 - Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keek C, Weich HA, et al. 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* 1995a; 80:1967–71.
 - Norman RJ, Brännström M. White cells and the ovary—incidental invaders or essential effectors? *J Endocrinol* 1994; 140:333–336.
 - North American Ganirelix Study Group. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 2001; 75:38–45.
 - Olivennes F, Belaisch-Allart J, Empeaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, et al. Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH–RH) antagonist (cetorelix) or a depot formula of an LH–RH agonist (triptorelin). *Fertil Steril.* 2000; 73:314–20.
 - Ong AC, Eisen V, Rennie DP, Homburg R, Lachelin GC, Jacobs HS y Slater JD. The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a possible role for ovarian renin. *Clin Endocrinol* 1991; 34:43-9.
 - Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N y Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:617-48.
 - Orvieto R, Voliovitch I, Fishman P y Ben-Rafael Z. Interleukin-2 and ovarian hyperstimulation syndrome: a pilot study. *Hum Reprod* 1995; 10:24-7.
 - 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.

- Padilla SL, Zamaria S, Baramki TA y García JE. Abdominal paracentesis for the ovarian hyperstimulation syndrome with severe pulmonary compromise. *Fertil Steril* 1990; 53:365-7.
- Papaleo E, Doldi N, De Santis L, Marelli G, Marsiglio E, Rofena S, et al. Cabergoline influences ovarian stimulation in hyperprolactinaemic patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16(11):2263-6.
- Papanikolaou EG, Pozzobon C, Kolibianakis EM, Camus M, Tournaye H, Fatemi HM, Van Steirteghem A, Devroey P. Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2006; 85:112-20.
- Papanikolaou EG, Tournaye H, Verpoest W, Camus M, Vernaev V, Van Steirteghem A, Devroey P. Early and late ovarian hyperstimulation syndrome: early pregnancy outcome and profile. *Hum Reprod* 2005; 20:636-641.
- Park, J.E., Keller, H.A. y Ferrara, N. The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*. 1993; 4:1317-1326.
- 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.
- Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, Sauer MV, Kitajewski J, Zimmermann RC. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology*. 2005; 146: 1301-11
- Paulson RJ, Do YS, Hsueh WA, Eggena P y Lobo RA. Ovarian renin production in vitro and in vivo: characterization and clinical correlation. *Fertil Steril* 1989; 51:634-8.
- Peitsidis P, Agrawal R. Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20:444-452
- Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1b, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril*. 1999; 71:482-9.
- Pellicer A, Miro F, Sampaio M, Gomez E, Bonilla-Musoles FM. In vitro fertilization as a diagnostic and therapeutic tool in a patient with partial 17, 20-desmolase deficiency. *Fertil Steril*. 1991; 55:970-5.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L y Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189: 824-31.

- Pepper MS, Ferrara N, Orci L y Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189: 824-31.
- Perks CM, Newcomb PV, Grohmann M, Wright RJ, Mason HD, Holly JM. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum Reprod*. 2003; 18:2672-7.
- Peters K, De Vries C y Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggest a role in endothelial differentiation and blood vessels growth *Proc Natl Acad Sci*. 1993; 90:8915-9.
- Pillai G, Brown NA, McAllister G, Milligan G, Seabrook GR. Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a *Xenopus* oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology*. 1998; 37:983-7.
- Plöuet, J., Schilling, J. y Gospodarowicz, D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. *EMBO J*. 1989; 8:3801-3808.
- Polan ML, Laufer N, Dlugi AM, Tarlatzis BC, Haseltine FP, DeCherney AH, Behrman HR. Human chorionic gonadotropin and prolactin modulation of early luteal function and luteinizing hormone receptor-binding activity in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984; 59:773-9.
- Polishuk WZ y Schenker JG. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1969; 20: 443-50.
- Prakash A, Karasu T, Mathur R. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology, prevention and management. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. 2009; 19:247-252
- Pride SM, Ho Yuen B y Moon YS. Clinical, endocrinological and intraovarian prostaglandin-F response to H-1 receptor blockade in the ovarian hyperstimulation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 670-4.
- Queenan JT Jr, Veeck LL, Toner JP, Oehninger S, Muasher SJ. Cryopreservation of all prezygotes in patients at risk of severe hyperstimulation does not eliminate the syndrome, but the chances of pregnancy are excellent with subsequent frozen-thaw transfers. *Hum Reprod* 1997; 12:1573-6.
- Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Young E, Yovanovich C, Paz DA. Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Fertil Steril*. 2008; 90:1511-6.
- Rabau E, David A, Serr DM, Mashiach S y Lunenfeld B. Human menopausal gonadotropin for anovulation and sterility. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 98:92-8.

- Rabau E, David A, Serr DM, Mashiach S, Lunenfeld B. Human menopausal gonadotropins for anovulation and sterility. Results of 7 years of treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 98:92–8.
- Ragni G, Vegetti W, Riccaboni A, Engl B, Brigante C, Crosignani PG. Comparison of GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction cycles of patients at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 2005; 20:2421–5.
- Rains CP, Bryson HM, Fitton A. Cabergoline. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinemia and inhibition of lactation. *Drugs* 1995; 49: 255-279.
- Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N y Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992; 131:254-60.
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, et al. Transvaginal drainage of ascites as an alternative to abdominal paracentesis in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome, obesity and generalized edema. *Fertil Steril* 1999; 69:780-783.
- Revel A, Barak V, Lavy Y, Anteby E, Abramov Y, Schenker JJ, Amit A, Finci-Yeheskel Z, Mayer M, Simon A, Laufer N y Hurwitz A. Characterization of intraperitoneal cytokines and nitrites in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1996; 66:66-71.
- Rey-Ares V, Lazarov N, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A. Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007; 5:40.
- Ricci E, Parazzini F, Motta T, Ferrari CI, Colao A, Clavenna A, Rocchi F, Gangi E, Paracchi S, Gasperi M et al. Pregnancy outcome after cabergoline treatment in early weeks of gestation. *Reprod Toxicol.* 2002; 16:791–793.
- Robert E, Musatti L, Piscitelli G, Ferrari CI. Pregnancy outcome after treatment with the ergot derivative, cabergoline. *Reprod Toxicol.* 1996; 10:333–337.
- Rockwell LC, Pillai S, Olson CE, Koos RD. Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogeninduced uterine edema and implantation in rodents. *Biol of Reprod.* 2002; 67: 1804–10
- Rockwell P, Neufeld G, Glassman A, Caron D, y Goldstein, N. (1995) In-vitro neutralization of vascular endothelial growth factor activation of flk-1 by a monoclonal antibody. *Mol. Cell. Diff.* 1995; 3:91-109.
- Rodewald M, Herr D, Duncan WC, Fraser HM, Hack G, Konrad R, et al. Molecular mechanisms of ovarian hyperstimulation syndrome: paracrine reduction of endothelial claudin 5 by hCG in vitro is associated with increased endothelial permeability. *Hum Reprod.* 2009; 24:1191–9.
- Rollene NL, Khan Z, Schroeder DR, Cutrer FM, Coddington CC. Migraines and ovarian hyperstimulation syndrome: a dopamine connection. *Fertil Steril.* 2011; 95:417-9.

- Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller PJ y Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1534-52.
- Roth BL. Drugs and valvular heart disease. *NEJM* 2007; 356:6–7.
- Rouchy R y Le Dall R. The syndrome of massive hyperluteinization of the ovary caused by the administration of gonadotropins. *Rev Fr Gynecol Obstet* 1959; 54:135-51.
- Rydberg, E. y Pedersen-Bjergaard, K. Effect of serum gonadotropin and chorionic gonadotropin on the human ovary. *JAMA* 1943; 121:1117-22.
- Ryley NG, Forman R, Barlow D, Fleming KA y Trowell JM. Liver abnormality in ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1990; 5:938-43.
- Salat-Baroux J, Alvarez S, Antoine JM, Cornet D, Tibi C, Plachot M, et al. Treatment of hyperstimulation during in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1990; 5:36–9.
- Sandner P, Wolf K, Bergmaier U, Gess B y Kurtz A. Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: Divergent regulation in vivo and in vitro. *Kidney International*. 1997; 51:448-53.
- Santen RJ. Inhibition of aromatase: insights from recent studies. *Steroids* 2003; 68:559–67.
- Sarkar C, Chakroborty D, Basu Mitra R, Banerjee S, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Circ Physiol* 2004; 287(4): H1554-60.
- Sassi D. On the syndrome of gonadotropic hyperstimulation of the ovary. *Quad Clin Ostet Ginecol* 1964; 19:207-15.
- Schade R, Andersson S, Suissa S, Haverkamp W, Garbe E. Dopamine agonists and the risk of cardiac-valve regurgitation. *N Eng J Med* 2007; 356:29–38.
- Schenker JG y Polishuk WZ. The role of prostaglandins in ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1976; 6:47-52.
- Schenker JG, Weinstein D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril* 1978; 30:255–68.
- Schipper I, de Jong FH y Fauser BCJM. Lack of correlation between maximum early follicular phase serum follicle stimulating hormone concentrations and menstrual cycle characteristics in women under the age of 35 years. *Hum Reprod* 1998; 13:1442-8.
- Schmidt DW, Maier DB, Nulsen JC, Benadiva CA. Reducing the dose of human chorionic gonadotropin in high responders does not affect the outcomes of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 82:841–6.

- Schneider UC, Schilling L, Schroeck H, Nebe CT, Vajkoczy P, Woitzik J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced vessel growth restores cerebral blood supply after bilateral carotid artery occlusion. *Stroke*. 2007; 38:1320-8.
- Schwartz SM, Heimark RL y Majesky MW. Developmental mechanism underlying pathology of arteries. *Physiol Rev*. 1990; 70:1177-209.
- Sealey JE, Glorioso N, Itskovitz J y Laragh JH. Prorenin as a reproductive hormone. New form of the renin system. *Am J Med* 1986; 81:1041-6.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS y Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascitis fluid. *Science*. 1983; 219:983-5.
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM y Dvorak HF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*. 1993; 12:303-24.
- Serour GI, Aboulghar M, Mansour R et al. Complications of medically assisted conception in 3,500 cycles. *Fertil Steril* 1998; 70(4): 638–642.
- Serta RT and Seibel MM. The influence of epidermal growth factor on progesterone production by human granulosa-luteal cells in culture. *Hum Reprod*. 1993; 8:005-1010.
- Shakil T, Whitehead SA. Inhibitory action of peritoneal macrophages on progesterone secretion from co-cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod*. 1994; 50:1183–1189.
- 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(6535):62-6.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D y Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359:843-5.
- Sills ES, McLoughlin LJ, Genton MG, Walsh DJ, Coull GD, Walsh AP. Results from the advanced reproductive technologies: fresh vs. frozen? *J Ovarian Res*. 2008; 1(1):7.
- Simón C, Tsafiri A, Pellicer A y Polan ML. The role of interleukins in the ovary. *Reprod Med Rev* 1996; 5:51-63.
- Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, Dutta S, Sinha S, Mukhopadhyay D. Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J Cell Sci*. 2009; 122:3385-92
- Smith DJ, Iqbal J, Purewal A, Hamblin AS y Edington N. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus -1 from CD5+/CD8+ leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin. *J Gen Virol* 1998; 79:2997-3004.
- Snyder SH. Nitric oxide: NO endothelial NO. *Nature* 1995; 377:196-7.

- Soares SR, Gomez R, Simon C, García-Velasco JA, Pellicer A. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008; 14:321–33.
- Soker S, Fidler H, Neudfeld G y Klagsbrun. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF 165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*. 1996; 271:761-7.
- Sommergruber M, Yaman C, Ebner T, Hartl J, Moser M, Tews G. A case of ovarian hyperstimulation during pituitary downregulation caused by plurihormonal macroadenoma. *Fertil Steril* 2000; 73:1059-60.
- Son WY, Chung JT, Chian RC, Herrero B, Demirtas E, Elizur S, et al. A 38 h interval between hCG priming and oocyte retrieval increases in vivo and in vitro oocyte maturation rate in programmed IVM cycles. *Hum Reprod*. 2008b; 23:2010–6.
- Son WY, Chung JT, Demirtas E, Holzer H, Sylvestre C, Buckett W, et al. Comparison of in-vitro maturation cycles with and without in-vivo matured oocytes retrieved. *Reprod Biomed Online*. 2008a; 17:59–67.
- Southam AL y Janovskin A. Massive ovarian hyperstimulation with clomiphene citrate. *JAMA* 1962; 181:443-5.
- Speroff L, Glass RH y Kase NG eds. 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. pp: 1999.1115-7. Induction of ovulation. En: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*.
- Stanek MB, Borman SM, Molskness TA, Larson JM, Stouffer RL, Patton PE. Insulin and insulin-like growth factor stimulation of vascular endothelial growth factor production by luteinized granulosa cells: comparison between polycystic ovarian syndrome (PCOS) and non-PCOS women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:2726–2733
- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978; 2:366.
- Strawn LM, McMahon G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP y Shawver LK. Flk-1 as a target for Tumor Growth inhibition. *Canc Res* 1996; 56:3540-5.
- Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:3919-3924.
- Suikkari AM. In-vitro maturation: its role in fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008; 20:242–8.
- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 1994; 55:410-22.

- Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod.* 1998 ; 13:953–959.
- Tao M, Kodama H, Kagabu S, Fukuda J, Murata M, Shimizu Y, Hirano H y Tanaka T. Possible contribution of follicular interleukin-1 β to nitric oxide generation in human pre-ovulatory follicles. *Hum Reprod* 1997; 12:2220-5.
- Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, McMahon G, Waltenberger J, Voelkel NF y Tudor RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J* 2001; 15:427–438
- The ganirelix dose finding study group. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Hum Reprod.* 1998; 13:3023–31.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertility and Sterility*, 2008 Vol. 90, Suppl 3.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva S, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternate exon splicing. *J Biol Chem.* 1991; 266: 11947–11954
- Tollan A, Holst N, Forsdahl F, Fadnes HO, Oian P y Maltau JM. Transcapillary fluid dynamics during ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:554-8.
- Tong XM, Zhang SY, Song T, Xu WH, Lin XN, Shu J, Liu L. Effects of gonadotropin-releasing hormone antagonists on the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Chin Med J.* 2008; 121:2434-9.
- Torry DS, Holt VJ, Keenan JA, Harris G, Caudle MR y Torry RJ. Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertil Steril.* 1996; 66:72-80.
- Tsunoda T, Shibahara H, Hirano Y, Suzuki T, Fujiwara H, Takamizawa S, et al. Treatment for ovarian hyperstimulation syndrome using an oral dopamine prodrug, docarpamine. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17(4):281–6.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA y Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992; 153:557-62.
- Urman B, Pride SM y Yuen BH. Management of overstimulated gonadotrophin cycles with a controlled drift period. *Hum Reprod* 1992; 7:213-7.

- Vallette S, Serri K, Rivera J, Santagata P, Delorme S, Garfield N, Kahtani N, Beauregard H, Aris-Jilwan N, Houde G et al. Long-term cabergoline therapy is not associated with valvular heart disease in patients with prolactinomas. *Pituitary* 2009; 12:153–157.
- Vallone DA, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000; 24:125–132.
- Vane JR, Anggaard EE y Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36.
- Varnagy A, Bodis J, Manfai Z, Wilhelm F, Busznyak C, Koppan M: Low-dose aspirin therapy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2009.
- Vasseur C, Rodien P y Beau I. A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the folliclestimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *N Engl J Med* 2003; 349: 753-9.
- Verheul HM, Hoekman K, Jorna AS, Smit EF, Pinedo HM. Targeting vascular endothelial growth factor blockade: ascites and pleural effusion formation. *Oncologist* 2000; 5:45–50.
- Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, García-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:314–21.
- Vlahos NF, Gregoriou O. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1092:247–64.
- Vlahos NP, Bugg EM, Shambloott MJ, Phelps JY, Gearhart JD, Zacur HA. Prolactin receptor gene expression and immunolocalization of the prolactin receptor in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:1033-8
- Vloeberghs V, Peeraer K, Pexsters A, D'Hooghe T. Ovarian hyperstimulation syndrome and complications of ART. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2009; 23(5):691-709
- Vrtacnik-Bokal E, Virant Klun I, Verdenik I. Follicular oestradiol and VEGF after GnRH antagonists or GnRH agonists in women with PCOS. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18:21-8.
- Wada I, Matson PL, Troup SA, Hughes S, Buck P, Lieberman BA. Outcome of treatment subsequent to the elective cryopreservation of all embryos from women at risk of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 1992; 7:962–6.
- Waltenberger J, Claesson Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994; 268:26988-26995.
- Waltenberger J, Mayr U, Frank H y Hombach V. Suramin is a potent inhibitor of VEGF. A contribution to the molecular basis of its angiogenic action. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:1523-29.

- Wang LJ y Norman RJ. Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 1992a; 2:147-50.
- Wang LJ, Pascoe V, Petrucco OM, Norman RJ. Distribution of leukocyte subpopulations in the human corpus luteum. *Hum Reprod* 1992b; 7:197–202.
- Wang TH, Horng SG, Chang CL, Wu HM, Tsai YJ, Wang HS, et al. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002a; 87: 3300–8.
- Wang J, Luo F, Lu JJ, Chen PK, Liu P y Zheng W. VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *Int J Canc.* 2002b; 97:163-7.
- Watkins R.H, D'Angio C y Maniscalco M. Differential expression of VEGF mRNA splice variants in newborn and adult hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999; 276:L858-67.
- Wayne J, Wells A y Cunningham B. Novel peptides selected to bind VEGF target the receptor binding site. *Biochem* 1998; 37:17754-64.
- Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Curwen JO, Hennequin LF, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH y Wadsworth PF. ZD4190: an orally active inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling with broad-spectrum antitumor efficacy. *Cancer Res* 2000; 60:970–5.
- 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(6):794-7.
- Whelan III JG y Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73:883-96.
- Wick MM. Dopamine: a novel antitumor agent active against B-16 melanoma in vivo. *J Invest Dermatol* 1978; 71: 163-4.
- Wick MM. Levodopa and dopamine analogs: dihydroxy and trihydroxybenzylamines as novel quinol antitumor agents in experimental leukemia in vivo. *Cancer Treat Rep* 1981; 65:861-7.
- Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The CDC 2005 Report—2005 Assisted Reproductive Technology (ART) Report. *MMWR Surveill Summ.* 2008; 57(5):1-23.
- Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update.* 2004; 10:119-33.
- Wulff C, Wilson H, Rudge JS, Wiegand SJ, Lunn SF, Fraser HM. Luteal angiogenesis: prevention and intervention by treatment with vascular endothelial growth factor trap(A40). *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism.* 2001; 86: 3377–86.

- Yan Z, Weich HA, Bernart W, Breckwoldt M y Neulen J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metabol* 1993a; 77:1723-5.
- Yan Z, Hunter V, Weed J, Hutchison S, Lyles R and Terranova P. Tumor necrosis factor- α alters steroidogenesis and stimulates proliferation of human ovarian granulosa cells in vitro. *Fertil Steril*. 1993b; 59:332-338.
- Yilmaz N, Uygur D, Ozgu E, Batioglu S: Does coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome, affect assisted reproduction cycle outcome? *Fertil Steril*. 2010 Jun; 94(1):189-93
- Younis JS, Zeevi D, Rabinowitz R, Laufer N y Schenker JG. Transient liver function tests abnormalities in ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1988; 50:176-8.
- Youssef MA, van Wely M, Hassan MA, Al-Inany HG, Mochtar M, Khattab S, van der Veen F. Can dopamine agonists reduce the incidence and severity of OHSS in IVF/ICSI treatment cycles? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010; 16:459-66
- Zaidise I, Friedman M, Lindenbaum ES, Askenazi R, Peretz BA y Paldi E. Serotonin and the ovarian hyperstimulation syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1983; 15:55-60.
- Zalel Y, Katz Z, Caspi B, Ben-Hur H, Dgani R, Insler V. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome concomitant with spontaneous pregnancy in a woman with polycystic ovary disease. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:122-4.
- Zanettini R, Antonini A, Gatto G, Gentile R, Tesi S, Pezzoli G. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2007; 356:39-46.
- Zhu Z, Lu D y Witte L Inhibition of VEGF induce mitogenesis of human endothelial cells by a chimeric anti-kinase insert domain-containing receptor antibody. *Canc Lett* 1999; 136:203-13.
- Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppeti P y Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994; 94:2036-44.
- Zigmond M, Schwarzschild M, Rittenhouse A. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Ann Rev Neurosci*. 1989; 12:415-461.
- Zimmermann RC, Hartman T, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microvascular Research*. 2001b; 62: 15-25.
- Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for

- gonadotropin-dependent follicle development. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 112: 659–69.
- Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J y Ferin M Short-term administration of antivasular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001a; 86:768-72.
 - Zosmer A, Katz Z, Lancet M, Konichezky S y Schwartz-Shoham Z. Adult respiratory distress syndrome complicating ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1987; 47:524-6.