



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

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

TESIS DOCTORAL

**“APOLIPOPROTEÍNAS Y RECEPTIVIDAD
ENDOMETRIAL”**

Autora:

Gemma Tamarit

Licenciada en Medicina

Directores:

Dr. José Antonio Horcajadas Almansa

Dr. Antonio Pellicer

Dr. José Bellver

Valencia 2015

AGRADECIMIENTOS

En este pequeño capítulo quisiera expresar mi agradecimiento a aquellas personas que de alguna forma han participado en el desarrollo de la tesis. Y los que me conocen no se ofenderán si me dejo a alguien, ya que mi despiste ya no tiene solución.

En primer lugar, a mi codirector de tesis el Dr. José Antonio Horcajadas, sin el cual me hubiese sido imposible finalizar y escribir esta tesis. Por sus múltiples correos electrónicos, por el tiempo que me ha dedicado en sus idas y venidas a Valencia. Y porque de él he aprendido y leído no solamente ciencia. Por su calidad humana.

Al Prof. Antonio Pellicer, con el que empecé este trabajo y mi profesión. Por las veces que me dijo que debía escribir esta tesis. Las personas que hemos tenido la suerte de formarnos a su lado hemos podido adquirir un poco de ese sentido de superación y visión crítica de las cosas, y hemos entendido la importancia de incluir la investigación en el día a día de la medicina.

Al Dr. José Bellver, mi codirector, que ha corregido este trabajo con el perfeccionismo y rigor que le caracteriza.

A la Dra. Pilar Alamà, sin su ayuda ésto sería imposible. Una de las personas con mayor capacidad de trabajo, implicación y sentido de responsabilidad que conozco.

A mis compañeros del Peset, por ese ambiente de trabajo y amistad, que hacían posible que toda tarea extra se viese con la más absoluta normalidad y nadie se sintiese más cansado de lo habitual.

A mis compañeros de Manises, con los que pude crear un proyecto nuevo y me ayudan a que siga manteniendo la ilusión por mi profesión. Entre ellos Fernando Gil, que potencia los mejor de cada uno de nosotros.

A Sílvia, mi hermana y compañera, que me ayudo a recoger alguna que otra muestra. Y porque a pesar de ser la pequeña, ha tenido que ser ella la que me diese el ejemplo en éste tema.

A Miguel, mi marido. Por su increíble insistencia y ánimos para que finalizase este proyecto. En él tengo a un compañero, amigo, padre y pareja.

A Ferran, que ha tenido que soportar mis ausencias, a pesar de ser la cosa que más quiero del mundo.

Y finalmente, a mis padres, a ellos les debo todo lo que soy. De ellos he aprendido lo que significa el sacrificio y la responsabilidad. Por su ayuda y amor hacia sus hijos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Obesidad y fertilidad	3
1.2. Alteraciones endocrinas relacionadas con la obesidad y su efecto en la fertilidad	7
1.3. Calidad embrionaria y receptividad endometrial en mujeres obesas	11
1.4. Implantación embrionaria y receptividad endometrial	21
1.5. Función lipídica en la implantación y la receptividad endometrial	29
2. HIPÓTESIS	43
3. OBJETIVOS	47
4. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1. Diseño del estudio	53
4.2. Medición de hormonas sexuales y lípidos en plasma	56
4.3. Purificación de proteínas	56
4.4. Cuantificación de apolipoproteínas	57
4.5. Análisis estadísticos	58
5. RESULTADOS	61
5.1. Apolipoproteínas y lípidos del plasma	63
5.2. Apolipoproteínas en el endometrio	69
6. DISCUSIÓN	79
7. CONCLUSIONES	89
8. BIBLIOGRAFÍA	93

Lista de siglas, abreviaturas, acrónimos y anglicismos

2-AG: 2-araquidonil-glicerol.

AA: Ácido araquidónico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AEA: Araquidonoiletanolamina.

apo: Apolipoproteína.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

CI: Intervalo de confianza (de sus siglas en inglés, *confidence interval*)

COL: Colesterol.

COX: Ciclooxygenasa.

DP: Receptor de prostaglandina D.

EEC: Células del epitelio endometrial (de sus siglas en inglés, *endometrial epithelial cells*).

ERA: Array de receptividad endometrial (de sus siglas en inglés, *endometrial receptivity array*).

ESC: Células del estroma endometrial (de sus siglas en inglés, *endometrial stromal cells*).

TE: Transferencia de embriones.

EP: Receptor de prostaglandina E.

EVCT: Células extra-vellosas citotrofoblásticas (de sus siglas en inglés, *extra-villous cytotrophoblast cells*).

E2: Estradiol.

FAAH: Amida ácido graso hidrolasa (de sus siglas en inglés, *fatty acid amide hydrolase*).

FC: Tasa de cambio (de sus siglas en inglés, *fold change*).

FF: Fluido folicular.

FIV: Fecundación in vitro.

FP: Receptor de prostaglandina F.

FSH: Hormona folículo estimulante (de sus siglas en inglés, *follicle-stimulating hormone*).

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas (de sus siglas en inglés, *gonadotropin-releasing hormone*).

hCG o HCG: Gonadotropina coriónica humana (de sus siglas en inglés, *human chorionic gonadotropin*).

HDL: Lipoproteína de alta densidad (de sus siglas en inglés, *high density lipoprotein*).

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (de sus siglas en inglés, *intracytoplasmic sperm injection*).

IMC: Índice de masa corporal.

IP: Receptor de prostaglandina I.

LDL: Lipoproteína de baja densidad (de sus siglas en inglés, *low density lipoprotein*).

LH: Hormona luteinizante (de sus siglas en inglés, *luteal hormone*).

LPA: Ácido lisofosfatídico (de sus siglas en inglés, *lisosphosphatidic acid*).

LPA3: Receptor 3 del ácido lisofosfatídico (de sus siglas en inglés, *lisosphosphatidic acid receptor 3*).

MEC: Matriz extracelular.

MGL: Monoacilglicerol lipasa.

MMP: Metaloproteinasas de matriz (de sus siglas en inglés, *matrix metalloproteinase*).

NAPE: N-araquidonil-fosfatidil etanolamina (de sus siglas en inglés, *n-arachidonil-phosphatidyl ethanolamine*).

NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico (de sus siglas en inglés, *non-alcoholic fatty liver disease*).

NK: Células asesinas naturales (de sus siglas en inglés, *natural killers*).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

oxLDL: LDL oxidado.

P: Progesterona.

PBS1x: Tampón fosfato salino 1x (de sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline 1x*).

PE: Fosfatidil etanolamina (de sus siglas en inglés, *phosphatidyl ethanolamine*).

PFA: Paraformaldehído.

PG: Prostaglandina.

PGT: Transportador de prostaglandinas (de sus siglas en inglés, *prostaglandin transporter*).

PLA2: Fosfolipasa A2 (de sus siglas en inglés, *phospholipase A2*).

PLD: Fosfolipasa D (de sus siglas en inglés, *phospholipase D*).

PPAR γ : Receptor γ de proliferadores activados de peroxisoma (de sus siglas en inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor γ*).

PR: Pre-receptivas.

PS: Post-receptivas.

R: Receptivas.

RIF: Fallo de implantación recurrente (de sus siglas en inglés, *recurrent implantation failure*).

ROS: Especies reactivas de oxígeno (de sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*).

SELDI-TOF-MS: Espectrometría de masas asociada a tiempo de vuelo y desorción/ionización por láser inducida en superficie (de sus siglas en inglés, *surface enhancer laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*).

SHBG: Globulina portadora de hormonas sexuales (de sus siglas en inglés, *sexual hormones binding globulin*).

SOP: Síndrome de ovario poliquístico.

S-DHEA: Dehidroepiandrosterona-sulfato (de sus siglas en inglés, *sulphate- dehydroepiandrosterone*)

TG: Triglicéridos.

T4: Hormona tiroidea.

TP: Proteína receptora de tromboxano (de sus siglas en inglés, *tromboxane receptor protein*).

TRA: Técnica de reproducción asistida.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad (de sus siglas en inglés, *very low density lipoprotein*).

vs.: del latín *versus*

WOI: Ventana de implantación (de sus siglas en inglés, *window of implantation*).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Obesidad y fertilidad

La obesidad es cada vez más frecuente en las mujeres, principalmente en los países occidentales donde más de la mitad de la población adulta tiene sobrepeso y más del 30% tienen obesidad clínica (Bellver y cols., 2003; Haslam y James, 2005; Bellver y cols., 2006; Bellver, 2013). Se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer aterosclerosis, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, diabetes, apnea del sueño, enfermedades gastrointestinales, artritis y cáncer (Bellver y cols., 2003; Haslam y James, 2005; Bellver y cols., 2006; Bellver, 2013). Además, la dislipemia y en particular la hipertrigliceridemia se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la cual puede dar lugar a esteatohepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Barr y cols., 2012). También se sabe que un peso corporal excesivo altera la función reproductiva femenina (Green y cols., 1988), alargando el tiempo para conseguir un embarazo en mujeres obesas y con sobrepeso en comparación con mujeres con peso normal, especialmente en mujeres nulíparas (figura 1) (Wise y cols., 2010).

En este campo, la obesidad se relacionado con un riesgo elevado de aborto espontáneo y recurrente, desórdenes menstruales, hirsutismo, infertilidad y complicaciones obstétricas, principalmente en el tercer trimestre, como hipertensión, preeclampsia, diabetes gestacional, tromboembolismo, infección del tracto urinario, macrosomía fetal, hemorragia post-parto, muerte intrauterina, distocia o endometritis en el

puerperio (Bellver y cols., 2003; Haslam y James, 2005; Bellver y cols., 2006; Bellver y cols., 2007; Galliano y Bellver, 2013).

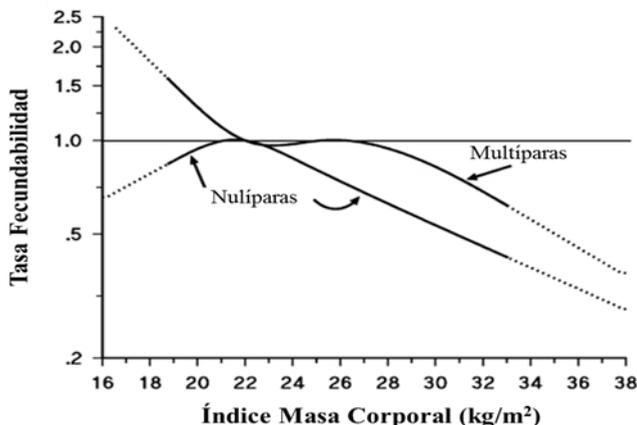


Figura 1. Relación entre IMC y fecundabilidad, con el estatus de parto, ajustada por splines cúbicos segmentarios. El nivel de referencia para la tasa de fecundabilidad es un IMC de 22 kg/m². La línea punteada representa rangos pertenecientes al último nudo usado en el ajuste por splines, indicando los rangos que tienen menos información. Las curvas se ajustaron para edad, edad de la pareja, regularidad del ciclo, longitud del ciclo, IMC de la pareja, actividad física, hábito de fumar, consumo de alcohol, frecuencia coital y circunferencia de las caderas (adaptado de Wise y cols., 2010).

En la tabla 1 se resumen las complicaciones a corto y a largo plazo para la descendencia y la madre asociadas con la obesidad. Todos estos problemas llevan a que exista un menor número de nacimientos vivos y bebés sanos en mujeres obesas (Bellver y cols., 2006). En las técnicas de reproducción asistida (TRA), aunque no hay consenso, se deja entrever una reducción significativa de las tasas de implantación, embarazo y recién nacidos vivos en mujeres obesas con ciclos de fecundación in vitro (FIV) (figura 2) (Nichols y cols., 2003; Bellver y cols., 2010; Bellver y cols., 2011; Bellver, 2013); así como una reducción

de hasta la mitad en la probabilidad de conseguir un embarazo durante el tratamiento (Wang y cols., 2000). Estas mujeres obesas presentan una mejora significativa en la fertilidad cuando se reduce el índice de masa corporal (IMC) (Norman y cols., 2004). Algunos estudios no han encontrado una relación entre índices de masa corporal elevados y una mayor tasa de aborto, quizás por considerar umbrales de IMC para determinar la obesidad demasiado bajos: $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ o $\geq 27 \text{ kg/m}^2$ (Bellver y cols., 2006). En cambio, sí se observa dicha relación cuando se toman como referencia los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que determinan la obesidad cuando el IMC es igual o superior a 30 kg/m^2 (Bellver y cols., 2006).

La obesidad se asocia con un aumento dramático de los niveles de triglicéridos en el fluido folicular de las mujeres con este problema, así como en los niveles de ácidos grasos libres. Este aumento en los niveles lipídicos se sabe que es un iniciador de las respuestas de lipotoxicidad que ocurren como resultado de la obesidad, incluyendo estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); las cuales pueden tener efectos perjudiciales por la generación de complejos oxidados como LDL oxidado (Robker y cols., 2011). Además, se puede alterar la función mitocondrial en los ovocitos, pudiendo contribuir a los defectos en la maduración de ovocitos, fertilización y desarrollos embrionario y fetal observados en ratones obesos (Minge y cols., 2008; Robker y cols., 2011).

Maternas	Fetales/Neonatales	Post-natales
Aborto	Anomalías congénitas:	Obesidad
Hipertensión gestacional no proteinúrica	- Defectos de tubos neurales	Diabetes tipo 2
Preeclampsia	- Hidrocefalia	Enfermedades cardiovasculares
Diabetes Mellitus Gestacional	- Onfalocelo	Osteoporosis
Infecciones urinarias	- Enfermedad congénita del corazón	Cáncer
Partos prematuros	Sufrimiento fetal agudo	Retraso neurodegenerativo
Parto instrumental	Macrosomía (> 4,5 kg)	Autismo
Cesarea	Hidramnios	Esquizofrenia
Infección post-operatoria	Distocia de hombros	Envejecimiento prematuro
Hemorragia post-parto	Hipoglucemia	
Endometritis en el puerperio	Ictericia	
Tromboembolismo post-parto		
Complicaciones anestésicas		
Hospitalización más larga		
Pérdida del feto		

Tabla 1. Complicaciones a corto y a largo plazo para la descendencia y la madre asociadas con la obesidad materna.

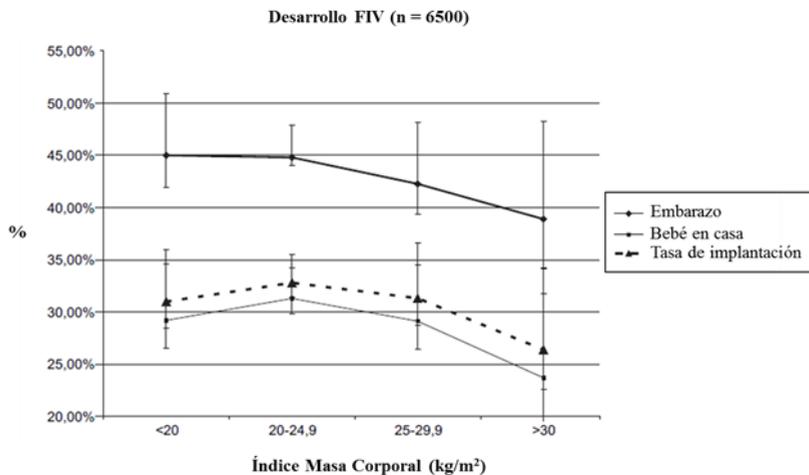


Figura 2. Tasas de implantación, embarazo y recién nacido vivo en ciclos de FIV-ICSI de acuerdo al IMC de la mujer. Cada punto representa porcentaje y 95% de intervalo de confianza (adaptado de Bellver y cols., 2010).

1.2. Alteraciones endocrinas relacionadas con la obesidad y su efecto en la fertilidad

Existe un consenso en que los fallos en la función ovárica y en el resultado reproductivo debido a la obesidad son consecuencia de distintas alteraciones endocrinas y metabólicas como efectos en el metabolismo esteroideo y secreción y función alterada de insulina, y otras hormonas como leptina, grelina, resistina, adiponectina y péptido PYY3-36. Estas alteraciones pueden afectar el crecimiento folicular, el desarrollo del embrión y la implantación, ya sea en ciclos naturales o en ciclos ováricos sustituidos (Bellver y cols., 2006; Budak y cols., 2006).

Hay una estrecha relación entre el síndrome de ovario poliquístico (SOP) y la infertilidad (Bellver y cols., 2003; Budak y cols., 2006; Bellver y cols., 2007). Además, se sabe que las mujeres con SOP tienen una mayor prevalencia de obesidad; por lo que se ha establecido una relación causa-efecto entre ambas entidades. Ambos desórdenes comparten alteraciones endocrinas que podrían ser responsables de abortos tempranos como hiperandrogenemia, resistencia a insulina o aumento de los niveles de leptina (Bellver y cols., 2003; Budak y cols., 2006; Bellver y cols., 2007). El éxito de la implantación embrionaria depende tanto del endometrio como del embrión; así que mientras los factores ambientales podrían afectar la receptividad endometrial, la calidad del embrión también es importante. En este aspecto, se ha visto que los embriones donados de pacientes con SOP no tienen efecto ninguno en el desarrollo del embarazo, salvo en los casos en los que también hay obesidad y resistencia a insulina. Por lo tanto, se podría

considerar que la obesidad es un factor de riesgo independiente de aborto espontáneo, afectando al embrión, al endometrio o a ambos (Bellver y cols., 2003).

En un estudio de Bellver y cols. (Bellver y cols., 2003) se comprobó que la obesidad está asociada con un aumento significativo de hasta cuatro veces, comparado con pacientes normales, de abortos tempranos; así como una tendencia hacia peores tasas de implantación y de embarazo. De los datos presentados en este estudio se puede determinar que los ovocitos de mala calidad y los embriones resultantes no son la causa de los abortos espontáneos tempranos de mujeres con SOP; sino que un factor endometrial es el responsable de ello (Bellver y cols., 2003). De los tres factores con mayor riesgo de aborto comunes entre SOP y obesidad se ha visto que la hiperandrogenemia, caracterizada por niveles elevados de hormona luteinizante (LH) y de hormona tiroidea (T4), no es un factor de riesgo en estos pacientes (Bellver y cols., 2003). En cambio, el uso de metformina (un sensibilizador de insulina) que reduce el peso de los pacientes y los niveles séricos de insulina y andrógenos sí que tiene un impacto en la reducción de las tasas de aborto (Bellver y cols., 2003). El uso de ratones deficientes de leptina y de receptores de leptina ha permitido ver que la alteración de los niveles de leptina per se afectan a la fertilidad, la implantación embrionaria y la placentación (Bellver y cols., 2003; Budak y cols., 2006).

Varios estudios han descrito un estado de “resistencia a gonadotropina”, en el cual se requieren grandes cantidades de gonadotropina en mujeres obesas para estimular los ovarios en FIV o en

inyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI) (Bellver y cols., 2006). Además, los períodos de estimulación ovárica suelen ser más largos y con tasas de cancelación más altas en mujeres obesas, resultado de una respuesta insuficiente a la estimulación (Bellver y cols., 2006). De hecho, se ha encontrado una correlación negativa entre el IMC y la concentración intrafolicular de gonadotropina coriónica humana (HCG), pudiendo estar relacionado con la disminución de la calidad de los embriones y de los índices de embarazo observados en pacientes con sobrepeso y con obesidad (Bellver y cols., 2006). Durante la estimulación ovárica controlada, para seleccionar los folículos, se necesita que los niveles de FSH en plasma superen un umbral; pero en mujeres obesas el efecto umbral de FSH administrado es más bajo, haciendo que se seleccionen menos folículos, menos ovocitos y que se necesiten cantidades más altas de hormona para la estimulación (Bellver y cols., 2006). Algunos autores han postulado que las dosis elevadas de gonadotropina que se administran para compensar la resistencia inducida por la obesidad podrían perjudicar la calidad del ovocito o del embrión, afectar a la implantación y generar complicaciones en el embarazo, explicando así la gran cantidad de abortos recurrentes (Bellver y cols., 2006).

Volviendo a la leptina, esta hormona también podría generar resistencia a gonadotropina ya que inhibe el efecto estimulador de FSH en la síntesis de esteroides a través de las células granulosas y se ha relacionado una concentración intrafolicular elevada de leptina con la aparición de resistencia a gonadotropina en ciclos de FIV en mujeres con

SOP, las cuales comparten alteraciones metabólicas y endocrinas con mujeres obesas (Bellver y cols., 2006). Por otro lado, la existencia de niveles altos en plasma de esta hormona, clave en la regulación del peso corporal y del gasto energético, se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo en el cuerpo y cuanto mayores son los adipocitos, más leptina secretan (Budak y cols., 2006). Los efectos de la leptina sobre la función reproductiva femenina se pueden resumir en: inicio del desarrollo de la pubertad, aceleración de la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), estimulación de LH y FSH en la pituitaria, ayuda al desarrollo embrionario, facilitación de la implantación y el embarazo, posible papel patofisiológico en la endometriosis y posible relación entre niveles bajos de leptina y amenorrea hipotalámica (Budak y cols., 2006). En cuanto al hombre, se ha sugerido también un papel de la leptina sobre la función testicular (Budak y cols., 2006).

Además de la correlación negativa existente entre niveles de grelina e IMC, esta hormona estimuladora del apetito y promotora de la adiposidad también se ha relacionado con la función reproductora (Budak y cols., 2006). Se ha demostrado que la grelina puede disminuir el número total de células en los blastocistos e inhibir el desarrollo embrionario (de manera para- y autocrina), la implantación, y la proliferación y la diferenciación de células de Leydig inmaduras y células espermatoogénicas (Budak y cols., 2006).

Las adipocitoquinas o proteínas secretadas por adipocitos, resistina y adiponectina, poseen efectos reguladores de la sensibilidad a la insulina, pudiendo contribuir a la resistencia insulínica existente en

obesidad y diabetes tipo 2 (Budak y cols., 2006). En cambio, existen diferencias en cuanto a sus posibles efectos en la función reproductora ya que no se ha encontrado ninguna relación entre adiponectina y reproducción; mientras la resistina podría operar como un mediador entre la energía homeostática y la reproducción al igual que leptina y grelina (Budak y cols., 2006). Además, la resistina se expresa, regulada por gonadotropinas, en los testículos; por lo que podría tener un papel en la espermatogénesis (Budak y cols., 2006).

Por último, el péptido YY3-36 producido por el intestino también tiene un papel inhibitor del apetito y del consumo alimenticio. Aunque se ha detectado su presencia en la placenta y en las membranas fetales, se necesitan más estudios para determinar su posible papel en el embrión o el endometrio (Budak y cols., 2006).

1.3. Calidad embrionaria y receptividad endometrial en mujeres obesas

Las mujeres obesas necesitan más tiempo para la concepción, tienen tasas de infertilidad más altas, tasas de embarazo más bajas, más abortos y más complicaciones en el embarazo. Estas alteraciones podrían deberse a la actuación de la obesidad en el ovario y/o en el endometrio; de hecho, existe controversia en este aspecto (Bellver y cols., 2006; Bellver y cols., 2007; Bellver, 2013).

La mayoría de los investigadores han sugerido un papel clave del ovario en las alteraciones reproductivas de mujeres obesas, basándose en diferentes observaciones de inducción ovulatoria y técnicas de reproducción asistida (TRA) (Robker y cols., 2011; Valckx y cols., 2012; Ramírez 2013; Seli y cols., 2014). La respuesta ovárica y la calidad del ovocito podrían estar comprometidas como consecuencia de la obesidad, como han sugerido algunos estudios en los que se han visto una respuesta reducida del ovario a la estimulación controlada, menos ovocitos recuperados, menos ovocitos maduros, ovocitos y embriones de peor calidad y tasas de fertilización más bajas (Robker y cols., 2011; Valckx y cols., 2012; Ramírez 2013; Seli y cols., 2014); sin embargo, otros han fallado en encontrar dicha relación (Robker y cols., 2011; Ramírez, 2013). Por ejemplo, en un modelo murino de obesidad el tratamiento con el agente insulina-sensibilizante rosiglitazona genera embriones desarrollados a tiempo y aumenta el porcentaje de masa celular interna por embrión, indicando una mejora en el desarrollo embrionario (Minge y cols., 2008). Además, el fluido folicular de las mujeres obesas posee niveles elevados de insulina y lípidos, lo que se asocia con una peor calidad ovocitaria (Seli y cols., 2014).

La tecnología “time-lapse” o lapso temporal permite mejorar la selección de los embriones de mejor calidad, en comparación con los criterios morfológicos tradicionales, en base a parámetros dinámicos como el patrón temporal de divisiones celulares (tiempo de división de blastómeras) o la duración de cada ciclo celular; pudiendo así determinar el efecto de la obesidad de mujeres receptoras de óvulos sobre la calidad

de los embriones (Bellver y cols., 2013a). Haciendo uso de esta tecnología y los parámetros morfocinéticos del desarrollo embrionario en un estudio preliminar, no se han encontrado efectos deletéreos significativos de la obesidad femenina sobre el embrión; aunque sí se vio una tendencia diferente de la morfocinética embrionaria de mujeres infértiles de peso normal frente a la de mujeres infértiles obesas (Bellver y cols., 2013a). De hecho, si asumimos que una división más temprana de las blastómeras es un indicador de buena calidad embrionaria, entonces habría embriones mayor calidad en el grupo de mujeres fértiles (Bellver y cols., 2013a). En cualquier caso, hay que tener en cuenta que se trata de un estudio preliminar en el que se determina el efecto de la obesidad sobre la calidad embrionaria sólo hasta el día 3 de desarrollo, sabiendo además que quizás los efectos más importantes ocurren en estados del desarrollo más avanzados.

Por otro lado, el endometrio está sujeto a cambios periódicos morfológicos y funcionales tanto en la capa epitelial como en el estroma (Ramírez, 2013). Por tanto, el endometrio podría estar afectado por la obesidad, y una receptividad endometrial inadecuada podría ser una explicación para los fallos de implantación y los abortos (Bellver y cols., 2006; Bellver y cols., 2007; Bellver y cols., 2010). La receptividad endometrial es un set de circunstancias temporales y espaciales en el endometrio que facilita la implantación embrionaria (Giudice, 1999a). Un ambiente intrauterino desfavorable podría ser responsable de la alta prevalencia de abortos precoces; pero el hecho de que dichos abortos no tiendan a ser recurrentes parece señalar de nuevo a la calidad del ovocito

como principal implicado (Bellver y cols., 2006). La mayoría de las complicaciones del segundo y del tercer trimestre se deben al síndrome metabólico de la madre junto con la inflamación subclínica consecuente y la deficiencia vascular. Sin embargo, lo que ocurre entre la concepción y el primer trimestre parece ser consecuencia de una mala relación entre embrión y endometrio (Bellver y cols., 2010; Bellver y cols., 2011).

Para diseccionar entre calidad ovocitaria o alteraciones en la implantación, el mejor modelo es el de donación de óvulos, en el que se usan ovocitos de buena calidad procedentes de mujeres sanas y jóvenes; por lo que cualquier influencia de la obesidad en el desarrollo del embarazo será causa del endometrio de la mujer receptora o de su ambiente (Bellver y cols., 2006; Bellver y cols., 2007; Bellver y cols., 2010). Sólo unos pocos estudios han analizado el éxito reproductivo siguiendo este modelo, determinando las tasas de implantación, de embarazo y de aborto según los índices de masa corporal (IMC) de las mujeres que reciben los óvulos (Bellver y cols., 2006; Bellver y cols., 2007).

En algunos casos no se observan efectos del IMC en las tasas de implantación, de embarazo o de aborto (Seli y cols., 2014); pero se trata de estudios con algunos problemas como un número no significativo de mujeres obesas, población de estudio baja, uso de primeros y segundos ciclos de estimulación ovárica o tasas de aborto demasiado altas en los grupos control (Bellver y cols., 2006; Bellver y cols., 2007). El grupo de Bellver y cols. (Bellver y cols., 2007) en cambio, realizó un estudio retrospectivo en el que se compara entre mujeres receptoras delgadas y

obesas, donde considera un elevado número de mujeres receptoras, sólo primeros ciclos de donación ovocitaria y excluyen varios factores que aumentan el riesgo de aborto. Aunque no se observan diferencias significativas en un principio, sí que se ve una tendencia hacia peores resultados cuando aumenta el IMC e incluso diferencias significativas cuando se toman en conjunto mujeres obesas y con sobrepeso en comparación con mujeres normales y delgadas (Bellver y cols., 2007). De este estudio se puede concluir que: 1) el ovario no es el único responsable de los fallos reproductivos en pacientes obesas, es decir, el endometrio o su ambiente también contribuyen; 2) las mujeres delgadas no presentan peores resultados en el embarazo en el modelo de donación ovocitaria; y 3) el sobrepeso también debería tenerse en cuenta puesto que mujeres con sobrepeso, pero no obesas, tenían una prognosis reproductiva negativa (Bellver y cols., 2007).

En un estudio retrospectivo posterior, en el que también se evalúan una gran cantidad de ciclos de FIV, se estudió la morfología de los embriones (número de embriones y fragmentación) como parámetro de la calidad embrionaria y las tasas de implantación, embarazo, aborto y nacimientos vivos en comparación con el IMC (Bellver y cols., 2010). No se encontró correlación entre el IMC y el hábito de fumar, el factor masculino, número de ciclos por paciente, protocolo de estimulación, niveles de E₂ el día de administración de hCG, procedimiento de inseminación o número de embriones transferidos; aunque sí había una mayor proporción de mujeres con oligo-ovulación o anovulación, una mayor duración de la infertilidad, menores tasas de implantación y de

nacimientos vivos, índices mayores de aborto y se usaron cantidades más altas de FSH en la estimulación en mujeres obesas (Bellver y cols., 2010). Además, se determinó que no existían asociaciones significativas entre el IMC y la tasa de fertilización, IMC y calidad embrionaria en día 2 ni entre IMC y calidad en día 3 (Bellver y cols., 2010). En definitiva, este estudio demuestra que la calidad del embrión determinada según el criterio morfológico convencional no se ve afectada por la obesidad y, por tanto, que el papel del endometrio es mayor de lo que se había sugerido hasta entonces (Bellver y cols., 2010).

Para determinar una posible asociación clínica del IMC con la receptividad endometrial, el mismo grupo de investigadores llevó a cabo un estudio retrospectivo de 9.587 primeros ciclos de donación de óvulos (Bellver y cols., 2013b). En este estudio se comprobó que las mujeres donantes tenían edad, IMC y parámetros de estimulación ovárica similares; por lo que cualquier efecto sobre la receptividad endometrial sería causa de la mujer receptora. En este grupo existía una diferencia significativa de 1 año en la edad y de 6 a 8 meses en el tiempo de infertilidad, diferencia explicada por mayor tiempo de infertilidad asociado a las mujeres con sobrepeso o con obesidad. Teniendo en cuenta el efecto del IMC, las tasas de implantación, de embarazo y de nacidos vivos eran significativamente más bajas en las mujeres obesas (figura 3). Por lo tanto, existen evidencias clínicas de que las mujeres obesas presentan una receptividad endometrial reducida (Bellver y cols., 2013b).

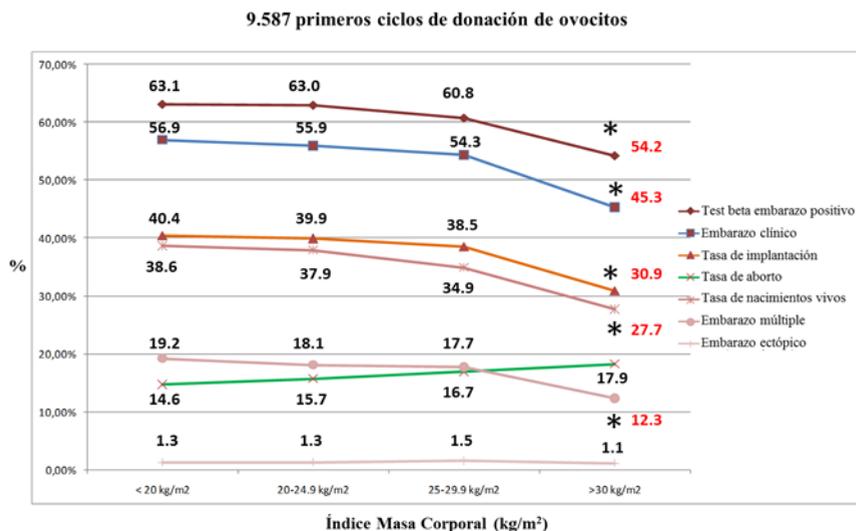


Figura 3. Variación de embarazo positivo, embarazo clínico, tasas de implantación, aborto y nacimientos vivos, embarazos múltiples y embarazos ectópicos en base al índice de masa corporal de la mujer receptora en 9.587 primeros ciclos de donación de ovocitos (adaptado de Bellver y cols., 2013b). * Significancia estadística.

El análisis de expresión génica del endometrio durante el periodo de tiempo considerado como la ventana de implantación es otra herramienta muy útil para determinar el efecto del endometrio en las complicaciones del embarazo de mujeres obesas. De hecho, algunos autores han identificado entre 500 y 600 genes con una expresión controlada en biopsias endometriales temporizadas durante la ventana de implantación usando microarrays (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Horcajadas y cols., 2004; Horcajadas y cols., 2007); incluso se ha desarrollado y comprobado clínicamente un array de receptividad endometrial (ERA) como un método de diagnóstico de dicho estado del endometrio (Díaz-

Gimeno y cols., 2011; Díaz-Gimeno y cols., 2013) mejor que los criterios de histología clásicos de Noyes (Noyes y cols., 1950, 1975). Además, en otro estudio de expresión génica durante la implantación en el endometrio de mujeres con infertilidad se identificaron varios aspectos del metabolismo lipídico que estaban afectados por la alteración en la regulación génica observada en estas mujeres como el metabolismo de ácido linoleico, metabolismo de ácido araquidónico y la biosíntesis de glicosfingolípidos (Altmäe y cols., 2010). En un estudio similar se vio una expresión disregulada significativamente de dos genes relacionados con el metabolismo lipídico: receptor de leptina (LEPR) y apolipoproteína D (APOD) (Allegra y cols., 2012).

Siguiendo con esta estrategia, Bellver y cols. (Bellver y cols., 2011) determinaron que las mujeres obesas presentan una expresión génica diferente durante la implantación que las mujeres de peso normal, siendo más pronunciada la diferencia cuando la obesidad se asocia con la infertilidad. Esto se hizo mediante el análisis de expresión génica por microarrays de biopsias de tejido endometrial de mujeres separadas en cinco grupos: mujeres de peso normal (control), obesas fértiles y obesas infértiles en los tres casos con ciclos naturales; y mujeres obesas con SOP y obesas infértiles con ciclos sustituidos en ambos casos (Bellver y cols., 2011). Se comprobó también que las mujeres obesas con SOP poseen el perfil de expresión génica más alterado, después de eliminar el posible efecto negativo sobre el endometrio de la estimulación ovárica controlada en los ciclos sustituidos (Bellver y cols., 2011). Había 151 genes presentes únicamente en los grupos de mujeres obesas de ciclos

naturales, 39 de ellos sobre-expresados y relacionados con el desarrollo, la regulación transcripcional y regulación de diferentes procesos metabólicos. De estos genes, 101 no se habían asociados previamente con endometrio, infertilidad, esterilidad, útero, implantación, receptividad, embarazo, obesidad o aborto. De los 41 genes que se habían relacionado, 4 de ellos estaban implicados en la reproducción: proteína de la zona de embarazo (PZP), caspasa 8 (CASP8), molécula CD4 (CD4) y el factor de coagulación II (F2). En cuanto a los genes relacionados con SOP, después de extraer el efecto de la estimulación ovárica, se encontraron 634 genes regulados únicamente en el grupo de mujeres obesas con SOP, la mayoría pertenecientes a desarrollo, morfogénesis y sistema inmune. Además, todos estaban presentes en la región extracelular o en la membrana; hecho muy interesante puesto que la remodelación de la membrana plasmática en el endometrio es esencial para conseguir un estado receptivo durante la ventana de implantación (Bellver y cols., 2011). De los 25 genes con expresión alterada que se habían relacionado previamente con el desarrollo de la receptividad endometrial durante la ventana de implantación (Horcajadas y cols., 2007), se encontraron 12 de ellos entre los 634 genes de SOP: glutatión peroxidasa 3 (GPx3), glicodelina (PAEP), regulador 2 del transporte iónico que contiene dominio FXYP (FXYP2), factor inhibidor de leucemia (LIF), proteína alfa inducible por arresto del crecimiento y daño en ADN (GADD45A), proteína 2 de unión a hialurónico (HABP2), clusterina (CLU), calpaína 6 (CAPN6), inhibidor 2 de ruta de factor de tejido (TFPI2), quinasa 6 de proteína quinasa activada mitogénicamente (MAP2K6), sorbitol deshidrogenasa (SORD) y el complejo principal de

histocompatibilidad de clase II DO beta (HLA-DOB) (Bellver y cols., 2011).

Además del debate existente entre ovocito y endometrio, algunos estudios dejan entrever un papel importante de la obesidad masculina sobre los fallos en los embarazos y las tasas más bajas de fertilidad (Bellver, 2013). Los análisis morfológicos y de movilidad del seminograma clásico quizás no son suficientes para determinar el efecto negativo de la obesidad en la calidad del espermatozoides y por ende, en la viabilidad embrionaria, siendo necesarias herramientas moleculares para este análisis. Pero es obvio pensar que la obesidad masculina también influya en la fertilidad, puesto que las parejas, a menudo, comparten hábitos alimenticios y físico-deportivos. Además, los investigadores deberían tener en cuenta no sólo el IMC, sino también otros factores como dieta, ejercicio, consumo de drogas o alcohol, tabaco, distribución de la grasa y patologías asociadas (diabetes, resistencia a insulina, hipertensión y síndrome de ovario poliquístico). Así, se podría tener un mayor conocimiento de la influencia de la obesidad en la fertilidad y, por tanto, un mejor control o tratamiento (Bellver, 2013). De hecho, en ratones obesos masculinos se ha visto que la obesidad masculina genera embriones con un desarrollo retrasado y que la dieta y el ejercicio mejoran el estado metabólico en el tiempo de la concepción, la salud del embrión y el feto conseguidos; pudiendo mejorar potencialmente las tasas de implantación y de nacidos vivos ya que se reestablece la distribución celular y la mitosis en el blastocisto (McPherson y cols., 2013).

A pesar de todos los avances, hay que tener en cuenta que existen claras limitaciones éticas que dificultan los estudios de interacción embrión-endometrio que puedan esclarecer todos los mecanismos moleculares que gobiernan dicha relación y, por consiguiente, el efecto de algunas patologías como la obesidad en este caso. Los modelos animales transgénicos pueden servir para intentar abordar esta problemática y, de hecho, han permitido descubrir o elucidar la función de muchos genes en la receptividad endometrial y en la implantación (Cha y cols., 2012); aunque a veces es difícil extrapolar los resultados a humanos.

1.4. Implantación embrionaria y receptividad endometrial

La implantación embrionaria es un paso crítico en el proceso reproductivo (Cakmak y Taylor, 2011; Makker y Goel, 2013), altamente regulado y que requiere de un estrecho diálogo entre el embrión y el endometrio, donde se produce una sincronización de la maduración del embrión hasta la fase de blastocisto con la diferenciación del endometrio para conseguir un estado receptivo del embrión (Wang y Dey, 2005; Achache y Revel, 2006; Kennedy y cols., 2007; Achache y cols., 2010; Cakmak y Taylor, 2011; Altmäe y cols., 2012; Ramírez, 2013). Se sabe que la interacción entre los factores embrionarios y maternos secretados es crucial para las fases de aposición, adhesión e invasión (Cavagna y Mantese, 2003; Hoozemans y cols., 2004; Achache y Revel, 2006; Cakmak y Taylor, 2011).

Durante la fase de aposición, que tiene lugar entre los días 5 y 6 postovulación, el embrión se posiciona en el fundus uterino y el tercio superior de la cara posterior uterina. Esto es importante porque va a determinar la localización de la placenta (Simón y cols., 2009). La salida del embrión de la zona pelúcida es un requisito necesario para la implantación, la cual también puede darse in vitro o fuera del endometrio con un retraso de un día. Se desconoce cómo el blastocisto llega a su lugar final de implantación pero se cree que puede estar relacionado con la presencia de receptores de quimoquinas en su superficie como el CCR2 (receptor de MCP-1) o CCR5 (receptor de RANTES) y se sabe que el endometrio secreta multitud de quimoquinas (Domínguez y cols., 2005). Por tanto, se piensa que un determinado grupo de citoquinas y quimoquinas guían al embrión hacia las células del epitelio endometrial (EEC) y hormonas como progesterona y estradiol empiezan a preparar al endometrio para la implantación y promueven la expresión de MUC1 en el endometrio; actuando como molécula anti-adhesiva para la unión del embrión (Aplin y cols., 2001; Hoozemans y cols., 2004; Ramírez, 2013).

En la siguiente fase, las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión célula-célula y en la adhesión célula-matriz extracelular son cruciales para la unión del blastocito al endometrio materno (Simón y cols., 2009). El endometrio gracias a la exposición en la superficie de las células trofoblásticas de receptores factor inhibidor de leucemia (LIF), factor estimulador de colonias (CSF) y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), L-selectina e integrinas y a la liberación de mensajeros químicos como interleukina 1- β (IL-1 β) permite la unión y

la fijación del embrión a la pared uterina (Hoozemans y cols., 2004; Ramírez, 2013).

Por último, en la fase de invasión, el blastocisto se adhiere a la monocapa epitelial e induce una reacción apoptótica paracrina mediada por el sistema fas-Fas ligando que permite al blastocisto atravesar la barrera epitelial (Simón y cols., 2009). Posteriormente, el embrión atraviesa las EEC y se embebe en el estroma por la rotura de la matriz extracelular a través de metaloproteasas y serina proteasas sintetizadas por células sinciotroblásticas y citotroblastos diferenciadas a partir de células trofoblásticas (Cavagna y Mantese, 2003; Ramírez, 2013).

La angiogénesis endometrial y embriónica es necesaria para desarrollar un endometrio receptivo que permita la implantación, la decidualización y la formación de la placenta. VEGF y PGs son los principales factores angiogénicos implicados en este proceso y su expresión depende de condiciones locales como hipoxia (Hoozemans y cols., 2004). Además, durante la implantación tiene lugar un aumento de la permeabilidad vascular endometrial en el sitio donde se colocan los blastocistos; donde las prostaglandinas, por sus propiedades vasoactivas, tienen un papel importante (Wang y Dey, 2005).

El embrión, debido a su naturaleza genética paterna y materna, puede generar una respuesta inmunológica en la madre conocida como “restricción materna”; la cual puede ser causa de un fallo en la implantación o en la placentación (Cavagna y Mantese, 2003; Hoozemans y cols., 2004; Achache y Revel, 2006; Cakmak y Taylor,

2011). El estudio de la relación entre el sistema inmune y el sistema reproductor ha permitido demostrar la función de determinadas citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión en los órganos del tracto reproductor (Domínguez y cols., 2005). De hecho, el proceso de implantación embrionaria presenta muchas similitudes con el proceso de migración leucocitaria (figura 4), ya que el leucocito en su migración a través del endotelio presenta unas fases similares a las del embrión cuando atraviesa el epitelio endometrial e incluso comparte la funcionalidad de determinados grupos de moléculas como integrinas, selectinas y tetraspaninas (Domínguez y cols., 2005; Simón y cols., 2009). Además, es esencial una inmunomodulación para que el embrión se implante adecuadamente; donde la glicodelina A juega un papel importante inhibiendo la actividad de las células NK (natural killer), junto con otras moléculas inmunomoduladoras como la inhibina y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) secretados por el endometrio e IL-1 β liberada por el embrión (Hoozemans y cols., 2004).

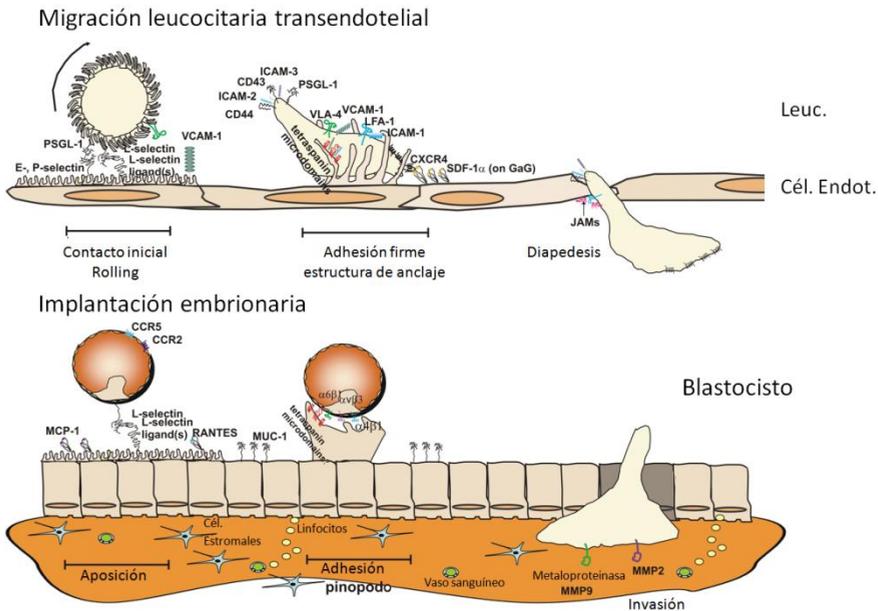


Figura 4. Similitudes de los procesos de migración leucocitaria transendotelial e implantación embrionaria (Domínguez y cols., 2005).

Se define receptividad endometrial como el estado diferencial que el endometrio alcanza para recibir al embrión en estado de blastocisto y permitir su implantación. El endometrio presenta profundos cambios tanto a nivel morfológico, tisular y celular, como molecular que son provocados por la acción de hormonas esteroideas, principalmente 17 β -estradiol (E₂) y progesterona (P) (Simón y cols., 2009). El endometrio adquiere en esta etapa del ciclo menstrual una mayor actividad secretora, aumenta la vascularización y presenta unas protusiones llamadas pinópodos en la superficie luminal del epitelio (Cavagna y Mantese, 2003; Ramírez, 2013). Además, expresa moléculas de aposición y fijación como integrinas, laminina, fibronectina, mucina 1 (MUC-1),

inhibina, LIF, CSF, prostaglandinas (PGs), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), glicodelina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y HB-EGF (Hoozemans y cols., 2004). Este estado receptivo se adquiere entre los días 20 y 21 de un ciclo menstrual regular de 28 días, en el día +7 después del pico de LH endógena que desencadena la ovulación (LH+7). Este día representa el centro de la ventana de implantación, que es como se conoce este periodo, llamado *Window of Implantation* (WOI) en inglés (Wilcox y cols., 1999; Achache y Revel, 2006; Achache y cols., 2010; Bellver y cols., 2011; Ramírez, 2013; Vilella y cols., 2013b) (figura 5). De este modo, se denomina día LH 0 al día que se produce el pico, y siguiendo con esta nomenclatura, el endometrio pre-receptivo correspondería al intervalo de LH+1 a LH+5 (días 14 al 18 del ciclo menstrual); el endometrio receptivo, correspondiente a la WOI, al intervalo de LH+6 a LH+8 (días 19 al 21 del ciclo); y el endometrio post-receptivo al intervalo de LH+9 a LH+13 (días 22 al 26 del ciclo) (Díaz-Gimeno, 2011).

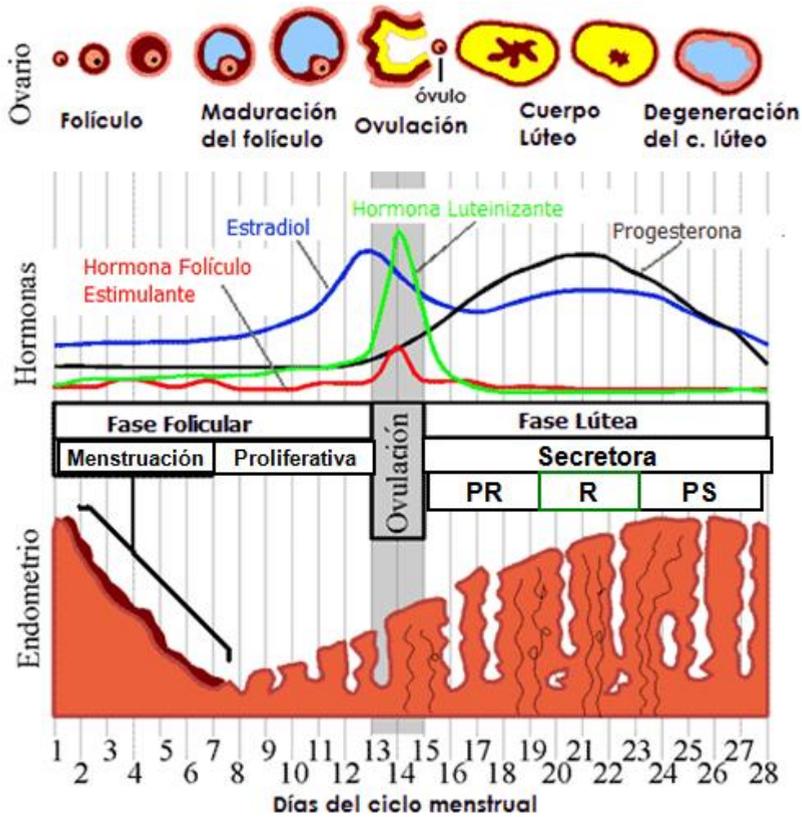


Figura 5. Ciclo menstrual y ovárico. En la parte superior de esta figura se pueden observar los cambios que suceden en el ciclo ovárico en función de los niveles hormonales. En la parte intermedia se muestran los niveles hormonales que acoplan el ciclo ovárico con el ciclo menstrual. En la zona inferior se indican los cambios que acontecen en el endometrio en cuanto al grosor, desarrollo glandular y vascular. Se muestran las fases del ciclo ovárico (folicular y lútea) y las del ciclo menstrual (proliferativa y secretora). Atendiendo a la receptividad del endometrio, podemos distinguir en la fase secretora, un periodo pre-receptivo (PR), el receptivo (R), y el postreceptivo (PS) que culmina con la menstruación. En la parte de debajo del endometrio se marcan los días del ciclo, considerando día 1 el día de comienzo de la regla (Aghajanova y cols., 2008a, 2008b; Simón, 2009; Díaz-Gimeno, 2011).

El análisis computacional de la red de interacciones moleculares entre endometrio y embrión durante la implantación, usando los perfiles transcriptómicos de muestras de endometrio y células embrionarias

cultivadas *in vitro*, ha permitido confirmar la implicación de muchos genes que ya se habían relacionado con la receptividad endometrial como LIF, proteína de unión a hialuronato 2 (HABP2), interleukina 15 (IL15), proteína endometrial asociada a progestágeno (PAEP) y fosfoproteína secretada 1 u osteopontina (SPP1); así como determinar posibles nuevas moléculas con un papel en la interacción embrión-endometrio como apolipoproteína D, biglicano, endotelina 1 (EDN1), fibulina 2 (FBLN2), factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF7), gastrina, Kremen 1 (KREMEN1), neuropilina 1 (NRP1), inhibidor de serina peptidasa, miembro 3, clado A (SERPINA3) y versicano (VCAN), entre otras (Altmäe y cols., 2012). Además, se han identificado varias redes genéticas que no se habían relacionado con la receptividad endometrial como las vías de señalización de JAK-STAT, cascadas de complemento y coagulación, adhesión focal, uniones adherentes y respuestas inflamatorias (Altmäe y cols., 2012). Aunque no se conoce exactamente todos los mecanismos moleculares que rigen este estado, está claro que la receptividad endometrial constituye el cuello de botella del proceso reproductivo (Achache y Revel, 2006).

Parece ser que existe un sitio predeterminado para la implantación del embrión ya que el endometrio se encuentra recubierto por una capa de mucina, que lo protege contra infecciones, reacciones inmunes y ataques enzimáticos, donde MUC-1 se encuentra regulado positivamente en el momento de la implantación (Aplin y cols., 2001). Como ya se ha comentado, el embrión debe atravesar la barrera para implantarse, lo que se facilita por la regulación negativa hormonal materna de MUC1

coincidiendo con la fase de implantación. No se sabe cómo se determina ese sitio de implantación, pero las prostaglandinas también podrían tener una función aquí (Hoozemans y cols., 2004).

1.5. Función lipídica en la implantación y la receptividad endometrial

Los lípidos forman un grupo muy heterogéneo, con una gran variedad estructural y funcional, lo que dificulta su clasificación. La clasificación del consorcio LIPID MAPS se basa en el concepto de dos bloques fundamentales: grupos cetoacilos y grupos isoprenoides (Fahy y cols., 2011). Por tanto, los lípidos se definen como pequeñas moléculas hidrofóbicas o anfipáticas que puede tener su origen entero o en parte por condensaciones carbaniónicas de cetoacil tioesteres y/o por condensaciones carbacatiónicas de unidades de isopreno. Según esta clasificación, los lípidos se han dividido en 8 categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, saccarolípidos y policétidos (derivados de la condensación de subunidades de cetoacil), y esteroides y prenoides lipídicos (derivados de la condensación de subunidades de isopreno) (figura 6). Cada categoría se divide después en clases, subclases o incluso en un cuarto nivel (Fahy y cols., 2011).

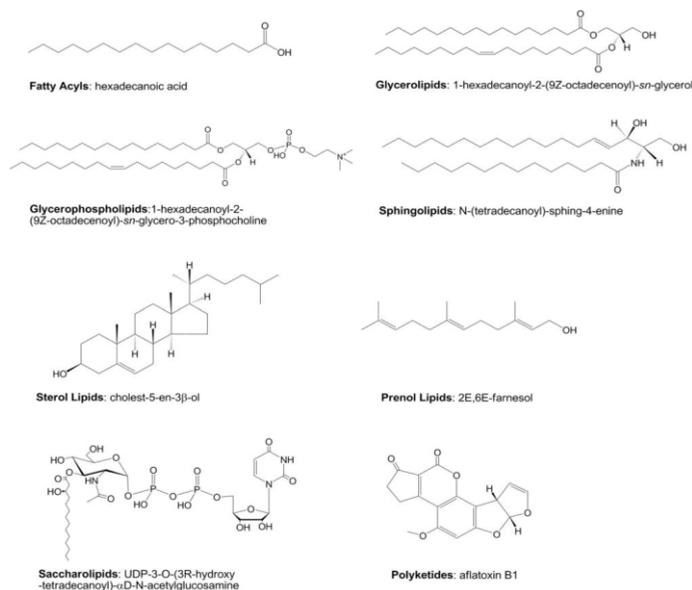


Figura 6. Representación de las estructuras de las 8 categorías lipídicas del consorcio LIPID MAPS (Fahy y cols., 2011).

Se han estudiado distintos grupos lipídicos por su posible efecto en la implantación y en la receptividad endometrial, incluyendo endocannabinoides, ácido lisofosfatídico, prostaglandinas y apolipoproteínas, principalmente.

Los endocannabinoides se generan “a demanda” desde precursores de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga derivados del ácido araquidónico, siendo la anandamida y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) los más estudiados (Taylor y cols., 2007; Maccarrone, 2009a, 2009b). Las anandamidas (N-araquidonoiletanolamina, AEA) son amidas etanolaminas de ácido araquidónico, principal precursor de la síntesis de prostaglandinas, que se generan a partir de la hidrólisis del precursor N-araquidonil-fosfatidil etanolamina (NAPE) y la acción de la fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) (Wang y Dey, 2005; Sun y Dey, 2008; Lipina y

cols., 2012). Una vez sintetizada, AEA se libera al espacio extracelular y su concentración se controla por la acción de un transportador específico de anandamida y de la principal enzima degradadora intracelular FAAH (amida ácido graso hidrolasa); la cual da lugar a ácido araquidónico y etanolamina (figura 7) (Wang y Dey, 2005). El 2-araquidonil-glicerol se sintetiza por la hidrólisis consecutivas de fosfatidilinositoles a través de fosfolipasa C (Lipina y cols., 2012) y como última instancia por la acción de diacilglicerol lipasas selectivas 1 y 2 (Taylor y cols., 2007); y puede ser degradada por FAAH o por monoacilglicerol lipasa (MGL) (Fowler 2007; Sun y Dey, 2008; Maccarrone, 2009a, 2009b). Los endocannabinoides ejercen su acción por la unión a dos receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana, CB1 y CB2 (Sun y Dey, 2008).

La sobre-activación patológica del sistema endocannabinoide se relaciona cada vez más con la dislipemia, la obesidad y la diabetes (Lipina y cols., 2012). Las anandamidas y 2-araquidonil-glicerol (2-AG) están implicados en la implantación en ratones y la existencia de niveles alterados de estos lípidos produce fallos en implantación, desarrollo del embrión, transporte por los oviductos y placentación, comprometiendo el resultado del embarazo (Cha y cols., 2012; Ramírez, 2013). Además, existen evidencias de que los niveles periféricos elevados de anandamida se correlacionan con abortos recurrentes en mujeres (Cha y cols., 2012). La actividad de la FAAH uterina está regulada por hormonas sexuales, por lo que el sistema endocannabinoide podría estar implicado en el mantenimiento del embarazo en humanos (Taylor y cols., 2007). La

existencia de niveles bajos de expresión de FAAH se relaciona con el aumento de AEA y por tanto con un estado no receptivo del endometrio; mientras niveles bajos de AEA se correlacionan con la receptividad endometrial (Sun y Dey, 2008; Maccarrone, 2009a, 2009b; Ramírez 2013; Vilella y cols., 2013a, 2013b). De hecho, los niveles bajos de FAAH en los linfocitos periféricos se han reconocido como un predictor de abortos espontáneos en mujeres sanas y de fallos en el embarazo tras una transferencia de embriones fertilizados en ciclos de FIV (Maccarrone, 2009a, 2009b). De la misma forma, una expresión o una activación elevada de NAPE-PLD y, por tanto, de AEA se relaciona con un útero no receptivo y sitios inter-implantatorios; mientras en el útero receptivo y en los sitios de implantación hay niveles bajos de NAPE-PLD (Maccarrone, 2009a, 2009b). Por tanto, la señalización endocannabinoide participa en la determinación del éxito de la implantación del embrión: niveles críticos de endocannabinoides uterinos interaccionan con los receptores CB1 del blastocisto en sincronía con la activación del blastocisto y la receptividad endometrial para la implantación; mientras niveles demasiado altos de endocannabinoides y/o CB1 dan lugar a fallos de implantación y de desarrollo embrionario (Wang y Dey, 2005; Sun y Dey, 2008; Paria y cols., 2001).

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un fosfolípido esencial para el tamaño normal del embrión y se ha relacionado con un efecto positivo sobre la implantación embrionaria (Ramírez, 2013; Vilella y cols., 2013a, 2013b). LPA ejerce su acción a través de cuatro receptores acoplados a proteína G, LPA₁₋₄ (Ye y cols., 2005; Sordelli y cols., 2012). La síntesis

de LPA ocurre por la actividad secuencial de fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A₂ (PLA₂) o bien por la actividad secuencial de PLA₂ y lisofosfolipasa D (lisoPLD) (Choi y cols., 2010). El papel más importante de la señalización de LPA tiene lugar en la implantación embrionaria a través del receptor LPA₃ (Choi y cols., 2010). De hecho, las ratonas deficientes de LPA₃ producen una descendencia con un tamaño menor del 50%, comparado con los controles silvestres y heterocigotos para la mutación en PLA₃; además, los embarazos son más largos, poseen una implantación retardada y un posicionamiento alterado o un agrupamiento de los embriones (Ye y cols., 2005). Estos dos últimos fenómenos se relacionan con un retraso en el desarrollo del embrión (Ye y cols., 2005). La expresión de este receptor aumenta durante las primeras fases del embarazo y vuelven a un estado basal desde que el embrión tiene 4,5 días hasta el final del embarazo. En los blastocistos pre-implantatorios silvestres no se observa expresión de LPA₃; por lo que la señalización materna de LPA₃ es la única responsable de los fenotipos observados (Ye y cols., 2005). Sordelli y cols. (Sordelli y cols., 2012) demostraron que el receptor LPA₃ es esencial para la implantación en ratas y que su expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína aumenta cuando empieza la invasión del trofoblasto en el endometrio. Esta regulación sugiere que la expresión de LPA₃ depende de la presencia del blastocisto y de su estado de activación. La enzima liso-PLD (lisofosfolipasa D), la principal enzima generadora de lisofosfolípidos como PLA, también aumenta su expresión durante la ventana de implantación en el útero de las ratas (Sordelli y cols., 2012).

Las prostaglandinas (PGs), pertenecientes a la familia de los eicosanoides junto a leucotrienos y tromboxanos, son sintetizadas a partir de ácido araquidónico (AA) de fosfolípidos de membrana por la acción de fosfolipasa A₂ y ciclooxigenasas (COX), que dan lugar a un intermediario (PGH₂), y por la activación de prostaglandinas sintetasas, dando lugar a PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂ (figura 7) (Wang y Dey, 2005; Achache y Revel, 2006; Kennedy y cols., 2007; Ruan y cols., 2012; Ramírez, 2013). COX-2 puede ser inducida por factores de crecimiento, citoquinas y estímulos inflamatorios (Wang y Dey, 2005; Achache y Revel, 2006). Se considera a COX-1 como una enzima constitutiva; aunque también se ha observado su expresión durante el período post-implantatorio, por lo que también podría ser importante para la síntesis de PGs en la decidualización (Wang y Dey, 2005; Ramírez, 2013). Estos lípidos difunden mal por las membranas lipídicas, por lo que se necesita de un transportador, PGT (Ramírez, 2013). En cuanto a su mecanismo de señalización, las prostaglandinas pueden ejercer su función de forma autocrina y paracrina mediante la unión a sus receptores (acoplados a proteínas G): EP1-4 para PGE₂, FP para PGF_{2α}, IP para PGI₂ y DP para PGD₂ (Ramírez, 2013; Wang y Dey, 2005). Las prostaglandinas I₂ y D₂ pueden servir como ligandos del receptor γ de proliferadores activados de peroxisoma (PPAR γ) (Wang y Dey 2005). PPAR γ se expresa en gran medida en la placenta humana y se ha visto que su activación inhibe la invasión trofoblástica in vitro; por lo que la modulación de su expresión y/o actividad podría estar implicada en las patologías del embarazo de origen placentario (Fournier y cols., 2007).

Los niveles de PGs en el endometrio humano tienen una variación cíclica a lo largo del ciclo menstrual (Downie y cols., 1974) y preparan el endometrio para la implantación en la fase lútea, después parece ser que el embrión dirige la inhibición la síntesis de PGs en la decidua y la estimula en el sitio de implantación (Hoozemans y cols., 2004). Por tanto, las prostaglandinas tienen un papel importante en la implantación y la decidualización, ya que establecen el microambiente necesario para estos dos procesos (Wang y Dey, 2005; Ruan y cols., 2012; Ramírez, 2013), como se ha visto en estudios con modelos animales (Biggers y cols., 1981; Pakrasi, 1997; Yang y cols., 1997; Scherle y cols., 2000; Matsumoto y cols., 2001; Wang y Dey, 2005; Kennedy y cols., 2007; Cha y cols., 2012). Estos lípidos son necesarios para la acumulación de fluido en el blastocisto, importante para la eliminación de fluido uterino antes de la fijación del embrión; lo cual produce un contacto entre las células trofoblásticas y el epitelio endometrial, dando lugar a un aumento local de la permeabilidad de los capilares maternos cerca del sitio de implantación (Biggers y cols., 1981). PGE₂ y PGF_{2α} se han postulado como las principales prostaglandinas con efectos sobre la implantación; aunque debido a las propiedades vasoactivas de PGI₂ y su elevada expresión durante la implantación observadas en un estudio reciente, esta PG podría intervenir en la adquisición de la permeabilidad vascular que se produce en el útero durante la implantación (Ramírez, 2013; Vilella y cols., 2013a, 2013b).

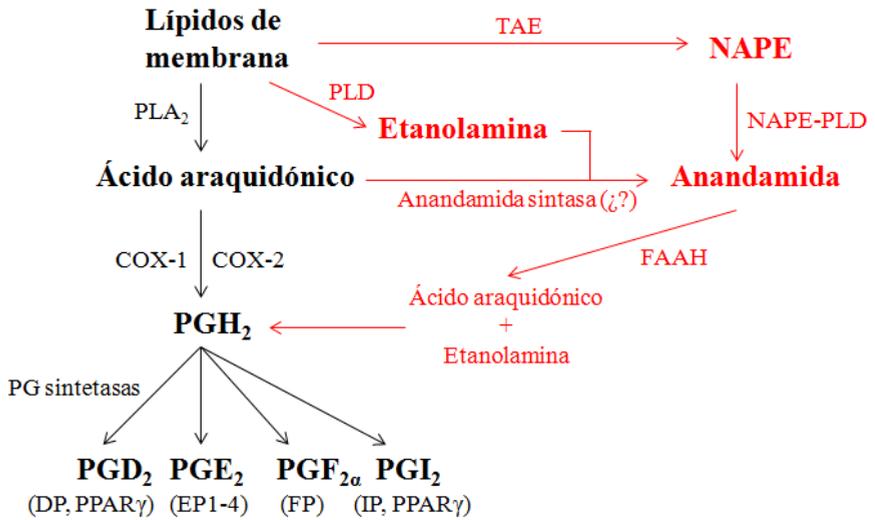


Figura 7. Biosíntesis de prostaglandinas y anandamida. El ácido araquidónico es liberado de lípidos de membrana por la enzima fosfolipasa A₂ y las ciclooxigenasas 1 y 2 dan lugar al intermediario reducido de la síntesis de prostaglandinas, PGH₂. Las prostaglandinas sintetasas específicas convierten el intermediario en PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂. La anandamida se genera a través del precursor NAPE por la NAPE-fosfolipasa D; este precursor se produce por la acción de una transacilasa. La anandamida es degradada por FAAH dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina. No se sabe con certeza si hay una anandamida sintasa que genere anandamida a partir de etanolamina y ácido araquidónico. Abreviaturas: PLA₂ (fosfolipasa A₂); COX (ciclooxigenasa); PG (prostaglandina); DP (receptor PGD₂); PPARγ (receptor γ de proliferadores activados de peroxisoma); EP (receptor PGE₂); FP (receptor PGF_{2α}); IP (receptor PGI₂); TAE (transacilasa); PLD (fosfolipasa D); NAPE (N-araquidonil-fosfatidil etanolamina); FAAH (amida ácido graso hidrolasa).

La expresión de COX-2 y de cPLA_{2α} aumenta durante la ventana de implantación, pero la alteración en la síntesis normal de PGs en el endometrio podría ser responsable de los fallos de implantación repetidos que constituyen un reto para FIV (Achache y cols., 2010). De hecho, se observó que la fosfolipasa citosólica (cPLA_{2α}) es la enzima limitante en la síntesis de PGs y que las mujeres con fallo de implantación recurrente (RIF) muestran niveles muy bajos de esta enzima y de COX-2, con una

reducción significativa en el 85% de los casos (Achache y cols., 2010). Además, se demostró que la expresión de LPA₃ se encuentra significativamente reducida en pacientes con RIF (Achache y cols., 2010), confirmando que la deficiencia de LPA₃ en ratones muestra una implantación alterada y efectos similares a la deficiencia de cPLA_{2α} (Ye y cols., 2005).

De forma similar, usando la técnica SELDI-TOF-MS (*Surface Enhancer Laser desorption/ionization-Time of flight-Mass spectrometry*), en muestras de biopsias endometriales de mujeres con fallos de implantación recurrente (RIF) y de mujeres fértiles control, se han detectado diferencias entre los grupos de estudio en la apolipoproteína A-I (apoAI) (Brosens y cols., 2010), la cual al encontrarse en concentraciones muy altas puede explicar que el endometrio pierda su receptividad. Además, tanto en modelos babuinos de endometriosis como en humanos con esta enfermedad se ha visto que hCG no es capaz de inhibir la expresión de apoAI en presencia de endometriosis, disparándose así la expresión de apoAI y dando lugar a problemas de fertilidad (Norman y cols., 2004; Mains y cols., 2011).

Aunque apoAI es sintetizada por el hígado y el intestino, trabajos recientes sugieren que las células de la granulosa del ovario también sintetizan apoAI tras el pico de LH, y que SR-B1 (receptor scavenger de HDL) media la absorción siendo este el método por el cual el ovario adquiere el colesterol de la esteroidogénesis (Mains y cols., 2011). Los niveles de lipoproteínas y apoAI de alta densidad en el fluido folicular están asociados negativamente con la fragmentación del embrión, lo que

sugiere que el ovocito es dependiente de HDL incluso antes de la fertilización y el desarrollo embrionario (Mains y cols., 2011). El aumento de los niveles de apoA1 en medios de cultivo se asociaron con blastocistos de grado morfológico superior y pueden estar relacionados con una mayor probabilidad de implantación (Mains y cols., 2011). Otras investigaciones llevadas a cabo en animales demuestran lo mismo: las hembras *SR-BI*^{-/-} de ratón son infértiles y generan ovocitos disfuncionales (Trigatti y cols., 1999; Miettinen y cols., 2001; Fujimoto y cols., 2010). La fertilidad se recupera cuando la estructura y/o la cantidad de HDL anormal se altera por la inactivación del gen *apoA1* o administración de drogas reductoras del colesterol (Miettinen y cols., 2001).

La capacidad de sintetizar y secretar lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, se ha conocido durante mucho tiempo para enterocitos y hepatocitos. Los enterocitos utilizan los quilomicrones para secretar el colesterol y los triglicéridos reabsorbidos (TG) y los hepatocitos usan VLDL para exportar el colesterol y TG sintetizado de manera endógena o internalizado (Gautier y cols., 2010). Las lipoproteínas que contienen apoB también son secretadas por la placenta humana, supuestamente para transferir lípidos a partir de la circulación materna al feto (Gautier y cols., 2010).

Los ovocitos en desarrollo dentro de los folículos ováricos crecen rápidamente y requieren el suministro de energía y el colesterol (Gautier y cols., 2010). Estos, están rodeados por el fluido folicular (FF) que en contraste con el plasma humano contiene principalmente colesterol HDL;

aunque también se ha visto expresión del receptor de LDL en ovocitos de mamíferos (Gautier y cols., 2010). Considerando que el HDL entra en el FF por difusión, no se espera que las lipoproteínas que contienen apoB, que son considerablemente más grandes en tamaño, puedan hacerlo (Gautier y cols., 2010). Sin embargo, dada la presencia de receptores para las lipoproteínas que contienen apoB en el ovocito, el grupo de Gautier y cols., (Gautier y cols., 2010) llevó a cabo un estudio para comprobar la capacidad de las células de la granulosa humanas para ensamblar lipoproteínas con apoB como el VLDL. Se obtuvo el fluido folicular y muestras de sangre de mujeres sobre las que se estaba llevando a cabo un tratamiento de FIV para medir tanto los niveles de los diferentes tipos de colesterol como la expresión génica de las células granulosas. Así se determinó que los niveles de HDL eran iguales en las muestras de FF y de plasma; pero que las cantidades de VLDL eran mayores en FF que en el plasma, lo que sugiere una síntesis directa en las células granulosas (Gautier y cols., 2010). Las células granulosas resultaron expresar apoB y MTP (proteína de transferencia de triglicéridos microsomales), los dos genes relevantes para la producción de VLDL (Gautier y cols., 2010).

Aunque la función concreta de las lipoproteínas que contienen apoB secretadas por las células granulosas no está muy clara, parece razonable que tengan una función nutritiva, ya que las lipoproteínas HDL pobres en triglicéridos no son capaces de cumplirla. Lo que si se establece es una relación positiva entre los niveles de apoB en FF y los parámetros de fertilidad que se reflejan en la calidad embrionaria y la

tasa de embarazo en una pequeña cohorte de mujeres sometidas a FIV-TE (Gautier y cols., 2010).

Se ha comprobado que apoD y apoE se expresan de forma diferencial en el endometrio durante el ciclo menstrual en un estudio de microarray en el que se compara la expresión en el endometrio en fase proliferativa y en fase secretora (Kao y cols., 2002). El estudio de expresión de Altmäe y cols. (Altmäe y cols., 2012) también apoya la sobre-regulación de apoD en el endometrio en fase secretora como un factor potencial de la comunicación feto-madre. Germeyer y cols. (Germeyer y cols., 2013) estudiaron la expresión de apoE y apoD en el endometrio en fase proliferativa tardía y en fase secretora media, separando además las poblaciones celulares en células endometriales estromales (ESC), células epiteliales endometriales (EEC) y leucocitos CD45+. Se confirmó que apoD y apoE se encuentran sobre-expresadas en el endometrio durante la fase secretora, habiendo una mayor expresión de apoD. Con respecto a las poblaciones celulares, apoE no variaba su expresión; pero apoD se expresaba más ESC y EEC, regulada por hormonas. Esta sobre-regulación de apoD durante la fase secretora en el endometrio podría contribuir a la homeostasis endometrial y a la preparación para una implantación embrionaria adecuada aportando la demanda energética de la fase secretora (Germeyer y cols., 2013). El hecho de que apoE y apoD parecen estar reguladas diferencialmente en el endometrio humano podría sugerir un papel diferente y complementario de estas dos apolipoproteínas en el tracto reproductivo (Germeyer y cols., 2013).

Como se ha comentado, el metabolismo lipídico se ve profundamente alterado durante el embarazo y se han registrado aumentos en el plasma de las concentraciones de triglicéridos (Pavan y cols., 2004a, 2004b). Los LDL, implicados en el transporte de triglicéridos por el plasma, son más susceptibles a la oxidación durante el embarazo, y los LDL oxidados (oxLDL) son metabolizados por los trofoblastos. En ensayos in vitro se comprobó que el oxLDL reduce el grado de invasividad de las células de forma dependiente de la concentración, encontrando por primera vez que el oxLDL está presente en las células extra-vellosas citotrofoblásticas (EVCT) en el primer trimestre de gestación (Pavan y cols., 2004a, 2004b).

2. HIPÓTESIS

Que el perfil lipídico a nivel de apolipoproteínas de mujeres sanas obesas y mujeres con peso normal está alterado a nivel endometrial y que los tratamientos hormonales para ciclos sustituidos modifican estos perfiles, estando estos cambios relacionados con un normal desarrollo de la receptividad endometrial en el momento de la implantación embrionaria.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Comprobar si existen modificaciones en el perfil lipídico en plasma en mujeres con ciclos regulares en estado pre-receptivo y durante la ventana de implantación, según su IMC; estudiar la proporción de apolipoproteínas a nivel endometrial; y si la realización de un ciclo sustituido modifica el perfil lipídico independientemente del IMC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análisis del contenido proteico y lipídico de lipoproteínas en mujeres obesas y con peso normal con ciclos naturales en LH+2 (pre-receptivo) y LH+7 (receptivo) en plasma y endometrio.
2. Análisis de la modificación del perfil lipídico y la receptividad endometrial en plasma y endometrio durante ciclos sustituidos en mujeres obesas y con peso normal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio y recogida de muestras

Se realizó un estudio prospectivo en el Hospital Doctor Peset de Valencia y en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) de Valencia aprobado por el comité ético. Las pacientes del estudio debían de cumplir unos criterios para su inclusión: edad comprendida entre los 18 y 40 años, raza caucásica, ausencia de enfermedades hepáticas, ausencia de patología ovárica o uterina, ausencia de dislipemia o enfermedades metabólicas que puedan alterar la composición de lípidos en el organismo y presencia de ciclos regulares cada 25-30 días; quedando excluidas, por tanto, mujeres con síndrome de ovarios poliquísticos.

La población de estudio se reclutó durante un periodo de 24 meses (entre Marzo de 2008 y Marzo de 2010), de la consulta de esterilidad, cuya causa de esterilidad era de etiología masculina o esterilidad de causa desconocida que iba a ser tratada con inseminación artificial, y mujeres que acudieron al programa de donación de ovocitos. Las pacientes se dividieron en función de su IMC, y fueron separadas de forma aleatoria, en la visita en la que se les entregó el consentimiento informado, para pertenecer al grupo de ciclo natural o al grupo de ciclo sustituido. Se crearon 4 grupos de estudio, con 5 pacientes en cada uno de ellos: ciclo natural 1 (N1), mujeres con ciclos regulares con un IMC $<25 \text{ kg/m}^2$; ciclo natural 2 (N2), mujeres con ciclos regulares y obesas (IMC $>30 \text{ kg/m}^2$); ciclo sustituido 1 (S1), mujeres con un ciclo sustituido con IMC $<25 \text{ kg/m}^2$; ciclo sustituido 2 (S2), mujeres con ciclo sustituido con IMC $>30 \text{ kg/m}^2$.

En todas las mujeres se realizó una analítica basal en día 1 a 3 de ciclo para conocer su estado hormonal y perfil lipídico inicial, determinando colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicéridos, apolipoproteína A1, apolipoproteína B, FSH, LH, 17- β estradiol, dehidroepiandrosterona-sulfato (S-DHEA), Δ -4 androstendiona, testosterona y SHBG (globulina portadora de hormonas sexuales).

En las mujeres que pertenecían a los grupos con ciclo natural se realizaron controles ecográficos hasta observar un folículo de 16 mm. A partir de ese momento se les realizaron visitas diarias y determinación analítica de los niveles de LH hasta constatar el pico de la LH. En los días +2 y +7 tras el pico de LH (días LH+2 y LH+7, respectivamente), se obtuvo una determinación analítica y se tomó una biopsia de endometrio.

En las mujeres incluidas en los grupos con ciclo sustituido se realizó un primer control con la regla, se citó el día 21 de ciclo para comprobar ovulación por ecografía. Al observar el cuerpo lúteo, se administró un análogo de la GnRH depot. Con la regla, se realizó un nuevo control ecográfico, y se inició un tratamiento con estrógenos orales a dosis de 6 mg diarios, repartidos en 3 tomas (2-2-2) (Progynova®). Tras 10-12 días bajo el tratamiento con estrógenos orales, se llevó a cabo un nuevo control ecográfico para determinar el grosor de la línea endometrial. Cuando la línea endometrial fue >7 mm, se programó el inicio de la progesterona micronizada vía vaginal a dosis de 400 mg/12 horas. En los días +2 y +7 después de la administración de progesterona

(P+2 y P+7, respectivamente), se realizó la determinación analítica y la biopsia de endometrio.

Las muestras de biopsias endometriales se tomaron con catéteres Pipell (Genetics, Namont.Achel, Belgium) y fueron tomadas de cada mujer en los días LH+2 y LH+7 (en los grupos con ciclo natural), y en los días P+2 y P+7 (en los grupos con ciclo sustituido). Las muestras de endometrio se enjuagaron con PBS1X y se congelaron a -80 °C. Se fijó una porción de cada muestra con PFA 4% (p/v) y se examinó histológicamente por datado usando el criterio de Noyes (Noyes, Hertig, and Rock 1975, 1950). Las muestras de plasma fueron recogidas en los mismos días en los que se tomaron las biopsias endometriales. Las muestras de plasma se recogieron después de la coagulación a temperatura ambiente y la centrifugación a baja velocidad (a 3.400 g durante 12 minutos). El sobrenadante, correspondiente al plasma fue separado y almacenado a -80 °C para el análisis posterior.

En las analíticas de sangre de +2 y +7 (tanto LH+2 y LH+7, como P+2 y P+7) se midieron los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicéridos, apolipoproteína AI y apolipoproteína B. En las biopsias de endometrio se analizaron las apoproteínas: apoAI, apoB, apoE, apoCII y apoCIII.

4.2. Análisis de hormonas sexuales y lípidos en plasma

Las concentraciones de hormonas sexuales como andrógenos (testosterona, SHBG, S-DHEA y androsteína), FSH, LH y estradiol se midieron por Inmunoensayo de Micropartículas Quimioluminescentes (CMIA) (Abbott Científica S-A., Madrid, España). Los lípidos como colesterol total, HDL, VLDL, LDL y triglicéridos fueron medidos por ensayo enzimático colorimétrico (Targa Plus, QCA SA, Tarragona, España). Las concentraciones de apoA y apoB se determinaron por turbidimetría (Behring Turbitimer, Barcelona, España) usando los reactivos y protocolos de Dade Behring (Siemens).

4.3. Purificación de proteínas

El lisado de todas las proteínas celulares se extrajo con tampón de lisis (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH=7,3, 1% (v/v) Triton X-100, conteniendo proteasas: 1 mM PMSF, 5 mg/mL aprotinina, 5 mg/mL pepstatina, 5 mg/mL leupeptina, 1 mM NaVO₄). Las muestras se incubaron durante 30 min a 4 °C y se centrifugaron a 9.000 g a 4 °C durante 10 min. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de proteínas usando el método Bradford (Bradford, 1976).

4.4. Cuantificación de apolipoproteínas

La cuantificación de 5 apolipoproteínas seleccionadas (apoAI, B, CII, CIII y E) se llevó a cabo usando tecnología Luminex con un kit de Millipore (Milliplex MAP MapHuman Apolipoprotein Immunoassay cat# APO-62K-05). Resumidamente, los kits de Millipore utilizan ensayos basados en bolitas de poliestireno para medir las apolipoproteínas en 400 μ L de muestras (lisados de plasma y de endometrio) a través de un panel que contiene todas las apolipoproteínas en estudio. Las muestras se ensayaron por duplicado y se hizo la media de las medidas duplicadas. Basándose en las medidas de 7 concentraciones estándar proporcionadas por el fabricante, se usó una curva estándar de 5 parámetros para convertir los valores de densidad óptica en concentraciones (pg/mL). Usando el ajuste de curvas de las medidas de cada estándar, también estimamos los cvs (coeficientes de variación) a través de los duplicados no cegados así como de la recuperación, calculada como el ratio entre las concentraciones observadas y esperadas. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.5. Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de regresión múltiple en el plasma y en el endometrio con lípidos y apolipoproteínas como variables dependientes mientras el IMC, el ciclo menstrual y el reemplazamiento hormonal se consideraron como variables independientes. Los lípidos y las apolipoproteínas se modelaron como variables continuas distribuidas

normalmente mientras las variables independientes fueron dicotomizadas. Se consideraron los modelos de único efecto principal o *main-effects-only*, así como otros más complejos con términos de interacción de primer y segundo orden. La validación de los modelos se hizo por sus F-estadísticos y su p-valor asociado así como asegurando la aleatoriedad de los residuales. La calidad del ajuste, medida en términos de ajuste de R^2 , determinó qué modelo era el mejor ajuste para los datos. Para las interacciones, calculamos la significancia usando test-T de los coeficientes β . Los coeficientes de correlación de Pearson se usaron para asegurar la asociación entre la concentración de lípidos y apolipoproteínas en plasma y endometrio.

Se analizaron estadísticamente tres comparativas en los niveles de apolipoproteínas estudiadas en el endometrio: LH/P+2 vs. LH/P+7, mujeres obesas vs. peso normal, y ciclo natural vs. ciclo sustituido. Para la comparativa LH/P+2 vs. LH/P+7, que se trata de un experimento de medidas repetidas sobre los mismos sujetos, se aplicó una t-Student para muestras apareadas si las muestras seguían una distribución normal; en caso contrario, dado que la variable cuantitativa era continua, se aplicó el Test de Wilcoxon (que resulta más potente para muestras pequeñas no paramétricas). La normalidad de las muestras analizadas se determinó mediante el test de Shapiro-Wilks. Para la comparativa de mujeres obesas vs. peso normal y ciclo natural vs. ciclo sustituido, donde se pretende contrastar los niveles medios de cada apolipoproteína en poblaciones independientes, se aplicó una t-Student para muestras independientes si la distribución era normal; en caso contrario, dado que la variable

cuantitativa era continua, se aplicó el test de Mann-Whitney (que resulta más potente para muestras pequeñas no paramétricas). La normalidad de las muestras analizadas en esta comparativa se determinó mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene. Los cálculos se llevaron a cabo con el software estadístico R (versión 3.0.1). Para todos los análisis, $\alpha < 0,05$ y los p-valores $< 0,05$ se consideraron como indicativos de significancia estadística.

5. RESULTADOS

Dentro del período experimental de 24 meses, se obtuvo el consentimiento informado de 20 mujeres involucradas en el estudio (cinco mujeres por grupo). Los efectos de los IMC ($<25 \text{ kg/m}^2$ vs. $>30 \text{ kg/m}^2$), la sustitución del ciclo (natural vs. sustituido) y la fase del ciclo (LH+2 vs. LH+7) en las variables medidas se modelaron usando un diseño tri-factorial. El primer objetivo de este diseño era determinar los principales efectos de los factores. Adicionalmente ensayamos las interacciones de primer y de segundo orden para proporcionar hipótesis explicativas.

La edad promedio de las mujeres del estudio era $29,3 \pm 6,2$ años (media \pm DS). No se observaron diferencias significativas en la edad entre los subgrupos de IMC ($30,1 \pm 5,3$ vs. $28,4 \pm 7,3$ para no obesas y obesas, respectivamente, $p=0,062$) o entre los subgrupos de sustitución de ciclo (27 ± 6 vs. $31,9 \pm 5,6$ para mujeres con ciclo natural y con ciclo sustituido, respectivamente, $p=0,10$). También se observaron IMC similares en el último subgrupo ($27,1 \pm 5,8 \text{ kg/m}^2$ vs. $28,6 \pm 6,7 \text{ kg/m}^2$ para mujeres con ciclo natural y con ciclo sustituido, respectivamente, $p=0,10$).

5.1. Apolipoproteínas y lípidos del plasma

La tabla 2 y la figura 8 muestran las medidas de lípidos y apolipoproteínas en el plasma, en miligramos por decilitro (mg/dL), para mujeres con y sin obesidad de acuerdo a su estatus de sustitución de ciclo en dos puntos diferentes del ciclo menstrual.

stats2	Ciclo normal			
	Normal		Obesa	
	LH+2	LH+7	LH+2	LH+7
COL	148,4±43,8	153±30,4	165±43,5	161,6±41,2
HDL	36,8±5,6	35,4±4,3	40,2±12,5	38,6±12,2
TG	75,2±48,5	94,2±43,6	90,8±31,8	91,8±44,7
VLDL	15,2±9,6	19±8,7	18,2±6,2	18,4±8,9
LDL	96,6±29,5	98,8±18,5	106,8±32,3	104,2±27,2
apoA	126,6±12,5	122,8±13,8	170±9,1	171±7,2
apoB	70,8±23,5	70,8±22,6	71±19,2	66,6±18,4
stats2	Ciclo sustituido			
	Normal		Obesa	
	P+2	P+7	P+2	P+7
COL	165,7±7,5	163±23,1	170,3±44,9	190,7±50,2
HDL	44,8±9,2	47,6±10,3	39,3±11,5	41±8,6
TG	89±33,4	67,6±11,7	162±86,2	129,2±89,8
VLDL	17,8±6,4	15,4±4,3	32,3±17,2	25,8±18,1
LDL	102,8±9,8	99,8±10,5	98,7±29,8	122,2±37
apoA	173,5±18,3	172,8±15,6	159,9±17,2	168±11,4
apoB	71±13,9	65,2±9,9	83,1±21,8	95,2±24,3

Tabla 2. Concentración de lípidos y apolipoproteínas en plasma, en miligramos por decilitro (mg/dL), en los diferentes grupos analizados: COL (colesterol), HDL, TG (triglicéridos), VLDL, LDL, apoA (apolipoproteína A) y apoB (apolipoproteína B).

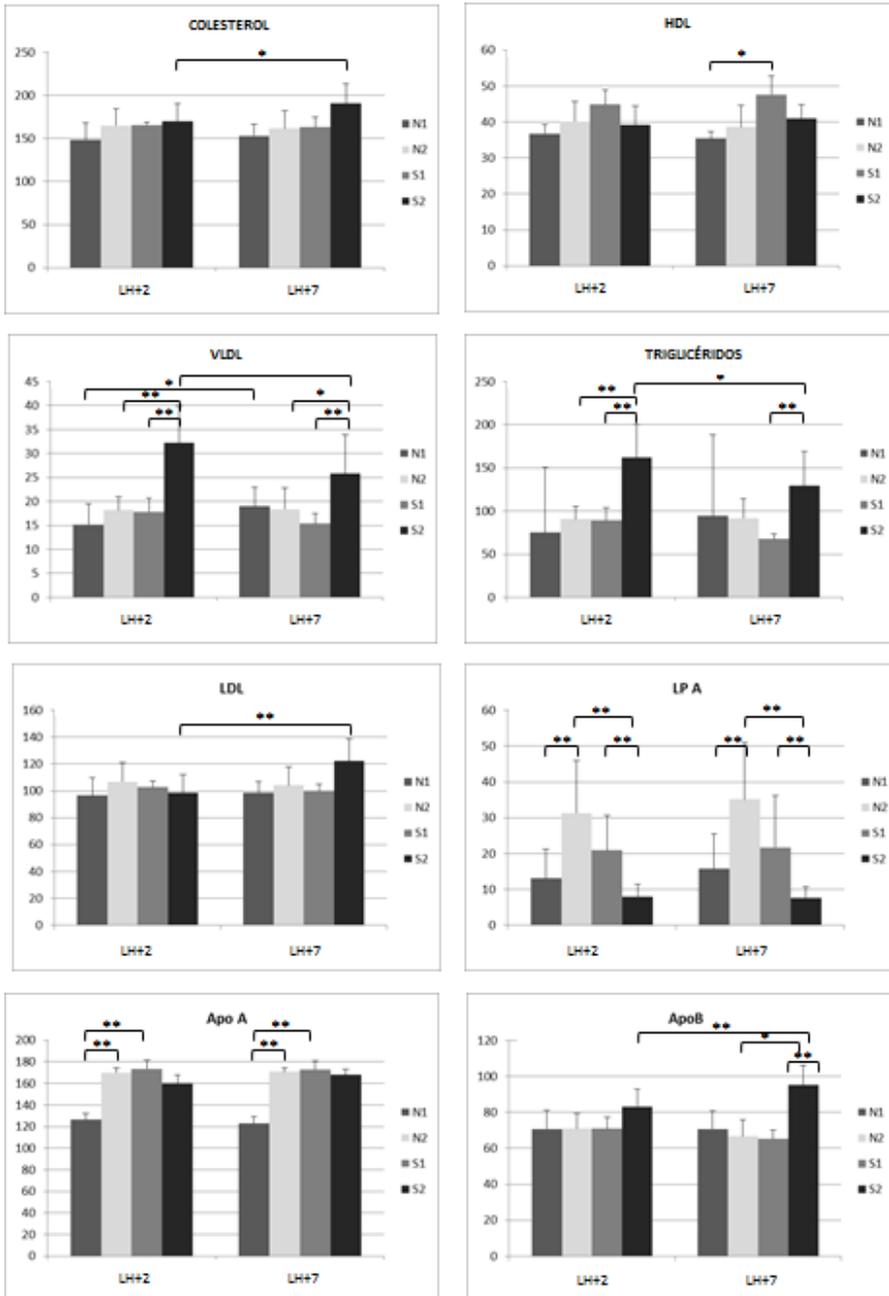


Figura 8. Niveles de colesterol, HDL, VLDL, triglicéridos, LDL, LP A (lipoproteína A), apolipoproteína A (apoA) y apolipoproteína B (apoB) en mujeres normales con ciclo natural (N1), obesas con ciclo natural (N2), normales en ciclo sustituido (S1) y obesas en ciclo sustituido (S2), en los días LH+2 y LH+7.

Analizando los cambios producidos en los niveles de cada lípido y apolipoproteína estudiados (figura 8), se puede determinar lo siguiente:

- En los niveles de colesterol total sólo existe un cambio significativo en mujeres obesas con ciclo sustituido en día P+2 vs. P+7.
- Los niveles de HDL en el plasma sanguíneo se mantienen sin cambios estadísticamente significativos entre los distintos subgrupos; salvo en el día LH/P+7 en mujeres de peso normal (N1 y S1), donde se puede ver un aumento significativo de HDL en ciclo sustituido (S1) con respecto a los niveles en ciclo normal (N1).
- La variación de los niveles de VLDL, en cambio, es mayor. Se produce un aumento significativo en día LH/P+7 vs. LH/P+2 en mujeres de peso normal con ciclo normal (N1) y en mujeres obesas con ciclo sustituido (S2). Además, tanto en el día LH/P+2 como en el día LH/P+7, se puede observar un aumento significativo en mujeres obesas con ciclo natural (N2) frente a mujeres obesas con ciclo sustituido (S2) y una subida aún mayor en mujeres de peso normal en ciclo sustituido (S1) frente a mujeres obesas en ciclo sustituido (S2).
- Los niveles de triglicéridos disminuyen de forma significativa en mujeres obesas con ciclo sustituido (S2) del día P+2 al día P+7. Al igual que ocurre con los niveles de VLDL, los triglicéridos también aumentan de manera significativa en mujeres de peso

normal en ciclo sustituido (S1) frente a mujeres obesas en ciclo sustituido (S2), tanto en P+2 como en P+7. Además, los niveles de TG en personas obesas con ciclo sustituido (S2) son significativamente más altos con respecto a los niveles en mujeres obesas con ciclo natural (N2).

- Los niveles de LDL sólo varían de manera estadísticamente significativa entre los días P+2 y P+7 en mujeres obesas con ciclo sustituido (S2).
- La concentración sérica de lipoproteína A aumenta significativamente tanto en LH+2 como en LH+7 en mujeres de peso normal con ciclo natural (N1) con respecto a la concentración en mujeres obesas con ciclo natural (N2). Por el contrario, en mujeres con ciclo sustituido se produce un descenso significativo tanto en P+2 como en P+7 en mujeres obesas (S2) con respecto a mujeres con peso normal (S1). Además, este descenso es aún mayor si comparamos mujeres obesas con ciclo natural (N2) frente a mujeres obesas con ciclo sustituido (S2).
- Los niveles de apolipoproteína AI son significativamente más bajos en mujeres con peso normal y ciclo natural (N1) en comparación con los niveles en mujeres obesas con ciclo natural (N2) y también en comparación con los niveles de mujeres de peso normal con ciclo sustituido (S1), tanto en LH/P+2 como en LH/P+7.

- En la apolipoproteína B se produce un aumento estadísticamente significativo en mujeres obesas con ciclo sustituido (S2) entre los días P+2 y P+7. Además, en LH/P+7 existe un cambio significativo entre mujeres obesas con ciclo natural (N2) y mujeres obesas con ciclo sustituido (S2); así como entre mujeres de peso normal con ciclo sustituido (S1) y mujeres obesas con ciclo sustituido (S2).

Por lo tanto, sólo existen cambios estadísticamente significativos entre mujeres de peso normal con ciclo natural (N1) y mujeres obesas con ciclo natural (N2) en los niveles de apoAI y lipoproteína A. En cambio, con la sustitución del ciclo menstrual se pueden ver cambios significativos entre mujeres con peso normal y mujeres obesas en VLDL, TG y LP A tanto en P+2 como en P+7, y en los niveles de apoB sólo en P+7.

Por último, si analizamos el efecto del ciclo sustituido sobre mujeres de peso normal y mujeres obesas, se observan cambios significativos en mujeres de peso normal en los niveles de HDL en P+7, de TG en P+2 y de apoAI tanto en P+2 como en P+7. En mujeres obesas, se pueden ver variaciones estadísticamente significativas en los niveles de VLDL, TG y LP A tanto en P+2 como en P+7, y en los niveles de apolipoproteína B únicamente en P+7.

5.2. Apolipoproteínas en el endometrio

Los niveles proteicos en el endometrio de apoAI, apoB, apoCII, apoCIII y apoE, en nanogramos por cien miligramos de proteína total, se muestran en la tabla 3.

stats2	Ciclo normal			
	Normal		Obesa	
	LH+2	LH+7	LH+2	LH+7
apoA	15,1±4,4	32,2±12,1	28,8±10,9	22,2±8,6
apoB	0,9±0,7	3,7±2,3	6,2±7,4	1,8±1,9
apoCII	1,2±1	1,5±0,8	2,8±1,1	1,7±0,5
apoCIII	1,2±0,3	3,5±2,8	5,5±1,6	6,5±0,9
apoE	1,5±1,3	2,7±1,3	4,7±1,8	4,3±2,2
stats2	Ciclo sustituido			
	Normal		Obesa	
	P+2	P+7	P+2	P+7
apoA	19,8±4,3	17,3±2,5	21,4±4,6	18,2±4,3
apoB	0,5±0,4	1,4±0,4	0,9±0,8	0,7±0,3
apoCII	1,4±0,5	1,2±0,8	2,3±1,9	1,1±0,4
apoCIII	7,6±5,1	4,4±2,8	6,1±3,2	5,1±2,9
apoE	2,8±1,4	2,2±0,9	4,1±1,8	4±2,2

Tabla 3. Concentración de apolipoproteínas en nanogramos por cien miligramos de protein total en el endometrio en los diferentes grupos analizados: apoA (apolipoproteína A), apoB (apolipoproteína B), apoCII (apolipoproteína CII), apoCIII (apolipoproteína CIII) and apoE (apolipoproteína E).

Dadas las concentraciones de cada apolipoproteína en el endometrio de los distintos subgrupos de mujeres (tabla 3), se llevó a

cabo un estudio estadístico a distintos niveles para determinar si las variaciones en los niveles de dichas apolipoproteínas eran estadísticamente significativos en tres supuestos o comparativas: LH+2 vs. LH+7, mujeres de peso normal vs. obesas y ciclo natural vs. ciclo sustituido.

Para la comparativa LH+2 vs. LH+7 en ciclo natural, los niveles de las apolipoproteínas estudiadas no varían significativamente en mujeres obesas. Lo mismo ocurre en mujeres de peso normal, salvo para apoAI y apoE que aumentan de forma significativa, con un p-valor de 0,043 y 0,046 respectivamente.

Para la comparativa P+2 vs. P+7 en ciclo sustituido, ocurre lo contrario, los niveles de apolipoproteínas no varían para las mujeres de peso normal; mientras que las personas obesas muestran cambios significativos en los niveles de apoAI y apoCII, con un p-valor de 0,043 en ambos casos.

En la comparativa de mujeres de peso normal vs. obesas, se puede concluir que, tanto para ciclo normal como para ciclo sustituido, no existen diferencias significativas en los niveles de apolipoproteínas entre personas obesas y de peso normal en día LH/P+7. Sin embargo, en LH+2 podemos decir que en el ciclo natural hay diferencias significativas en los niveles de las apolipoproteínas entre personas de peso normal (donde suelen ser niveles más bajos) y obesas, salvo para apoB (con p-valor de 0,032 para apoAI; 0,049 para apoCII; 0,010 para apoCIII y 0,012 para apoE). En cambio, en P+2 en ciclo sustituido ocurre todo lo contrario: los

niveles de apolipoproteínas entre mujeres de peso normal y mujeres obesas pueden considerarse iguales, salvo para apoB que aumenta en mujeres obesas (p-valor=0,023).

En la comparativa de ciclo natural vs. ciclo sustituido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en día +2 ni en día +7 en los niveles de apolipoproteínas para personas de peso normal. Para personas obesas, la única diferencia significativa radica en los niveles de apoB en P+7, que disminuyen cuando el ciclo es sustituido con un p-valor de 0,042.

También se realizó un análisis de correlación de lípidos y apolipoproteínas en el plasma y sus cambios en el endometrio, que se representan en forma de mapa de calor en la figura 9. Los resultados muestran que las concentraciones de los lípidos en el plasma no estaban asociadas con las mismas en el endometrio.

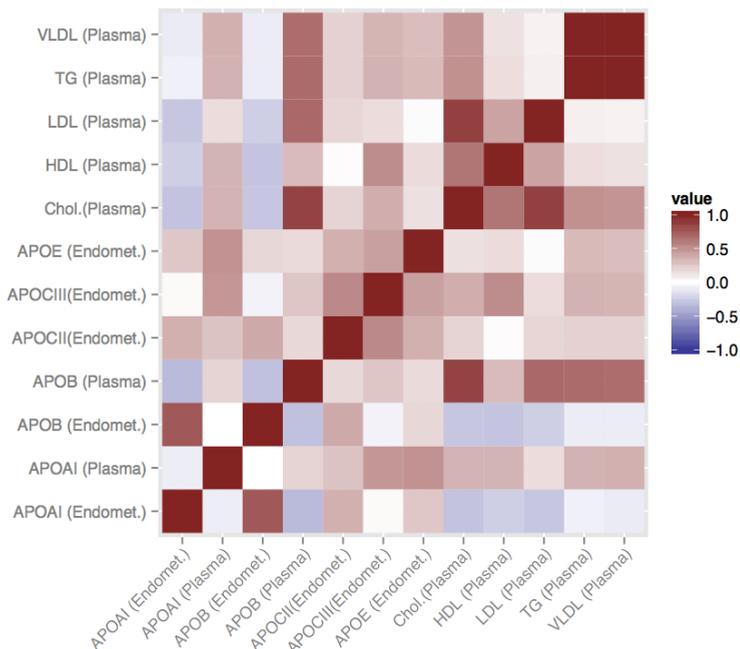


Figura 9. Mapa de calor mostrando los coeficientes de correlación entre las concentraciones de lipoproteínas en el plasma y la abundancia de lipoproteínas en el endometrio.

El porcentaje de cada apolipoproteína, en el entorno de apolipoproteína total, se analizó como un indicativo del tipo de lipopartículas presentes en el endometrio (figuras 10 y 11).

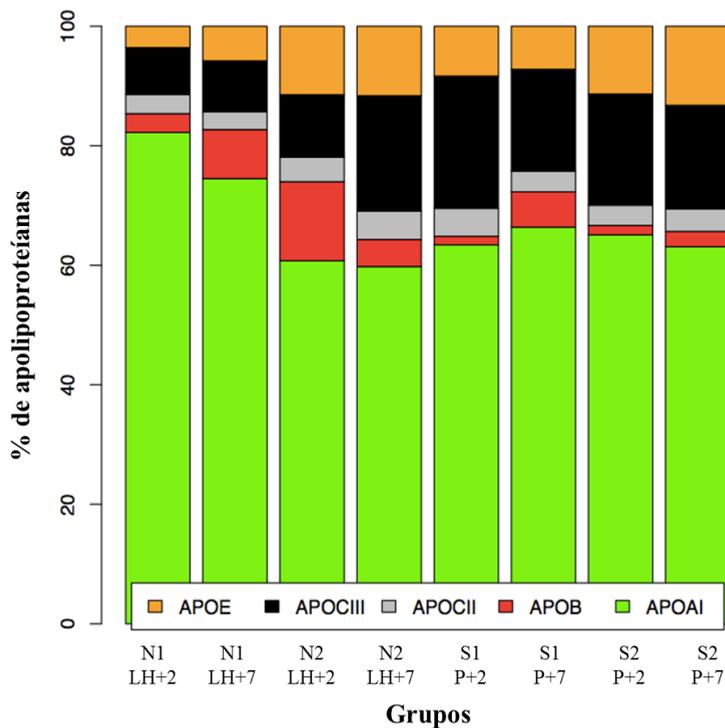


Figura 10. Porcentaje de apolipoproteínas AI, B, CII, CIII y E en el ambiente endometrial de mujeres con peso normal en ciclo normal (N1) y obesas en ciclo normal (N2) en los días LH+2 y LH+7, y peso normal en ciclo sustituido (S1) y obesas en ciclo sustituido (S2) en los días P+2 y P+7.

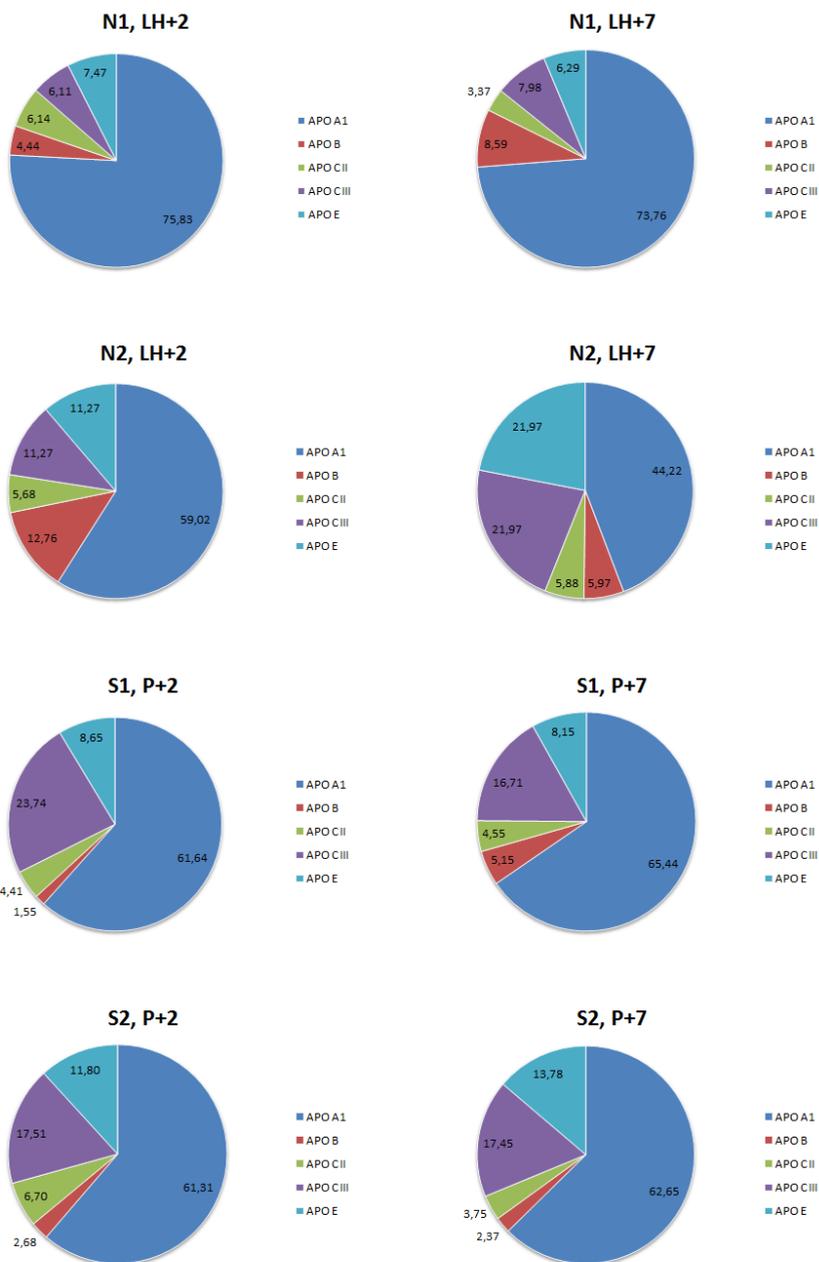


Figura 11. Diagrama de sectores representando los niveles proteicos en el endometrio de las apolipoproteínas AI, B, CII, CIII y E en mujeres normales con ciclo natural (N1) y obesas con ciclo natural (N2) en los días LH+2 y LH+7, y normales en ciclo sustituido (S1) y obesas en ciclo sustituido (S2) en los días P+2 y P+7.

En todos los casos, apoAI era la apolipoproteína más abundante oscilando del 60% en N2 LH+7 al 82% en N1 LH+2 (figura 11). La variación de esta apolipoproteína en los grupos de estudio fue explicada por el modelo con apoAI como variable dependiente e IMC, sustitución y fase del ciclo como variables independientes, además de sus términos de interacción de primer orden. Este modelo consiguió un ajuste R^2 de 0,39 ($p=0,01$) y mostró que los niveles de apoAI endometrial dependían del IMC y del tipo de ciclo menstrual. Esta expresión de apoAI fue mayor en el grupo N1 LH+2 comparado con el resto de mujeres estudiadas ($p=0,01$ para la interacción IMC*ciclo).

El mejor ajuste para los niveles de apoCIII, la segunda proteína más abundante, y los niveles de apoB en el endometrio se observó en los modelos que tenían en cuenta los efectos principales así como las interacciones de primer y de segundo orden. Estos modelos consiguieron un 24% de la varianza de apoCIII ($p=0,05$) y 34% de varianza de apoB ($p=0,03$) en los contenidos endometriales de ambas proteínas. Se observó un aumento significativo de apoCIII en mujeres con ciclo sustituido, cuando se comparó con sus homólogas con ciclo natural ($p=0,004$ para el efecto del ciclo). Este modelo también mostró que la expresión de apoB estaba modulada por una interacción de IMC y si la mujer tenía o no una fase de ciclo luteal o folicular. Por tanto, apoB endometrial apareció aumentada durante el día LH+7 sólo en las mujeres no obesas ($p=0,006$ para la interacción IMC*día). Aunque se ajustaron diferentes modelos, no se encontraron diferencias al mirar los niveles de apoCII entre los subgrupos de mujeres incluidos en el análisis, independientemente de sus

estatus de IMC además de la sustitución y la fase del ciclo. Cuando se tuvieron en cuenta los modelos de único efecto principal se observó un efecto fuerte de IMC en la proporción de apoE en las lipopartículas endometriales ($R^2=0,36$ para el modelo, $p=0,003$). Las mujeres obesas tenían un aumento en la fracción de apoE en el entorno lipoproteico presente en el endometrio ($p=0,001$ para las diferencias de IMC).

Tomando los niveles de mujeres con ciclo natural y peso normal (N1) como los niveles basales, se puede determinar las siguientes variaciones en los niveles de las apolipoproteínas estudiadas:

- Dentro de este subgrupo se observa un aumento del porcentaje de apoB en el día LH+7 con respecto a LH+2, pasando de un 4,5% a un 8,6% (figura 11). No se observan cambios en la proporción de las apolipoproteínas CII y CIII, siendo muy leves para la apolipoproteína E (figura 10).
- En las mujeres obesas con ciclo natural (N2), la proporción de apoAI es mucho más baja tanto en LH+2 como en LH+7 en comparación con mujeres con peso normal (N1). La proporción de apoB es anormalmente alta en LH+2 y anormalmente baja en LH+7. Los porcentajes de apoCIII son más altos en LH+7 y los de apoE son más altos tanto en LH+2 como en LH+7; mientras que los porcentajes de apoCII no sufren grandes cambios.
- En mujeres de peso normal con ciclos sustituidos (S1), la proporción de la apoAI es más baja tanto en P+2 como en P+7, en comparación con las mujeres con ciclo natural (a niveles similares

a las obesas en ciclos naturales). Por el contrario, la proporción de apoCIII es más alta tanto en P+2 como en P+7 en comparación con las mujeres con ciclos naturales (N1).

- Las mujeres obesas con ciclos sustituidos (S2) presentan unas proporciones de las apolipoproteínas estudiadas similares a las mujeres con peso normal (S1); por lo que se puede decir que la sustitución de ciclo estrecha las diferencias en los perfiles apolipoproteicos entre mujeres obesas y mujeres con peso normal.

Además, se puede observar que en las mujeres con peso normal y ciclo natural (N1) aumentaron todos los niveles de apolipoproteínas en día LH+7 en comparación con LH+2 (figuras 10 y 11). En cambio, esta regulación al alza se perdió en sus homólogas obesas (N2), que tenían niveles anormalmente altos en LH+2. Por el contrario, en los ciclos sustituidos (S1 y S2) no se observaron diferencias significativas entre los niveles de apolipoproteínas entre los días P+2 y P+7.

6. DISCUSIÓN

El proceso de implantación embrionaria implica la interacción entre el embrión y el endometrio receptivo, a través de una serie de moléculas producidas por ambos tejidos (Giudice, 1999a, 1999b). Se han identificado un gran número de moléculas mediadoras hasta ahora, incluyendo entre otros, moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento y lípidos (Achache y Revel, 2006; Horcajadas y cols., 2007; Aghajanova y cols., 2008a, 2008b). Se ha sugerido que la disrupción de la receptividad endometrial en mujeres obesas, así como los bajos índices de embarazos con las técnicas de fertilización in vitro, no se deben a alteraciones en la ovulación (Cano y cols., 2001; Bellver y cols., 2003; Bellver y cols., 2007). Así que parece plausible que este perfil lipídico disfuncional podría desencadenar una respuesta local y, al menos en parte, explicar la situación entre las alteraciones cualitativas y cuantitativas de lipoproteínas y el descenso en la fertilidad.

En este estudio usamos muestras de plasma y de biopsias endometriales obtenidas de donantes con peso normal (grupos N1 y S1) u obesas (grupos N2 y S2) con ciclos naturales (grupos N) o ciclos hormonales sustituidos (grupos S). Los resultados principales de este trabajo fueron 1) la falta de asociación de lipoproteínas del plasma y de endometrio y 2) que la obesidad era una fuerza conductora principal de cambio en los lípidos del plasma y en el ambiente lipoproteico endometrial.

Analizando los niveles de colesterol total, HDL, VLDL, LDL, triglicéridos, lipoproteína A, apolipoproteína AI y apolipoproteína B en plasma, se ha podido demostrar que la obesidad únicamente produce

cambios estadísticamente significativos en los niveles de apoAI y lipoproteína A en ciclo natural. En cambio, cuando se realiza una sustitución del ciclo menstrual con la administración de progesterona, sólo se producen variaciones significativas en los niveles de VLDL, TG, LP A y apoB. Además, si analizamos el efecto del ciclo sustituido sobre mujeres de peso normal, se observan cambios significativos en los niveles de HDL, TG y apoAI cuando se sustituye el ciclo menstrual. Por tanto, se puede concluir que la sustitución hormonal del ciclo menstrual altera el contenido lipoproteico en el plasma sanguíneo tanto en mujeres de peso normal como en mujeres obesas.

Se analizó la posible correlación entre el contenido lipídico y lipoproteico en el plasma sanguíneo y en el endometrio de los distintos subgrupos de mujeres analizados; pero se no se encontraron correlaciones significativas.

Considerando el contenido apolipoproteico endometrial, se estudió en su totalidad como sustituto del tipo de lipopartículas presentes en el endometrio. Por ejemplo, apoAI se relaciona con las lipopartículas HDL, las que controlan posteriormente el desarrollo del ovocito y del embrión [Revisado en (Fujimoto y cols., 2010)]. Los niveles relativos de apoAI son significativamente más bajos en LH+2 en comparación con LH+7 en el grupo de mujeres con peso normal y con ciclo natural (N1). Esto apoya los resultados previos en los que se vio que los niveles de apoAI deben ser bajos para la implantación del embrión (Brosens y cols., 2010). En mujeres obesas con ciclo natural (N2), sin embargo, el nivel de apoAI es significativamente más alto (en LH+2) en comparación con los

niveles de mujeres de peso normal. Se ha sugerido que la molécula apoAI es producida por el embrión en la fase de blastocisto, y que podría servir como una señal del embrión implantado de forma que podría necesitarse la supresión de apoAI endometrial para reducir el ruido de fondo de apoAI (Mains y cols., 2011). ApoAI posee propiedades antiinflamatorias y la capacidad de inhibir la síntesis de mediadores de la inflamación y moléculas de adhesión celular con un papel crucial en la inflamación; y se ha visto que la expresión de apoAI aumenta en la fase secretora media en mujeres infértiles y, en cambio, disminuye en mujeres fértiles (Manohar y cols., 2014). Este hecho puede relacionarse con la decidualización del estroma en las mujeres fértiles. Además, la endometriosis, el síndrome de ovario poliquístico y el fallo recurrente de implantación (RIF) se ha asociado con un aumento anormal de los niveles de apoAI (Fowler y cols., 2007; Brosens y cols., 2010; Gupta y cols., 2014); ya que esta proteína estaba presente en biopsias de endometrio de mujeres con problemas de implantación pero no en mujeres fértiles, y el tratamiento con hCG no conseguía reducir los niveles de apoAI en cultivos procedentes de pacientes con endometriosis (Brosens y cols., 2010). Todas estas evidencias señalan hacia un papel perjudicial de esta apolipoproteína a nivel endometrial. De hecho, apoAI se emplea como biomarcador sérico de cáncer de ovario, capaz de distinguir un cáncer endometrial de fase temprana con una sensibilidad del 71% y de fase tardía con una sensibilidad del 82% (Farias-Eisner y cols., 2010).

ApoB es la apolipoproteína principal transportadora de lipopartículas con baja densidad (LDL y VLDL). Los ovocitos en desarrollo dentro de los folículos ováricos crecen rápidamente y requieren el suministro de energía y colesterol (Gautier y cols., 2010). Estos, están rodeados por el fluido folicular (FF) que en contraste con el plasma humano contiene principalmente colesterol HDL; aunque también se ha visto expresión del receptor de LDL en ovocitos de mamíferos y receptores para lipoproteínas que contienen apoB en las células de la granulosa (Gautier y cols., 2010). Además, las células granulosas expresan apoB y MTP (proteína de transferencia de triglicéridos microsomales), los dos genes relevantes para la producción de VLDL (Gautier y cols., 2010). Aunque la función concreta de las lipoproteínas que contienen apoB secretadas por las células granulosas no está muy clara, parece razonable que tengan una función nutritiva, ya que las lipoproteínas HDL pobres en triglicéridos no son capaces de cumplirla. Nuestros resultados muestran que apoB endometrial está regulada positivamente durante la implantación en mujeres con peso normal, en ciclos normales y sustituidos, y reducida en sus homólogas obesas de forma dependiente del peso; aunque estas variaciones no son estadísticamente significativas. Aun así, este hallazgo es consistente con los estudios previos donde se encontró que los niveles de apoB en el fluido folicular estaban correlacionados positivamente con la calidad del embrión y con las tasas de gestación (Gautier y cols., 2010; Scalici y cols., 2013); por lo que los niveles de apoB podrían utilizarse como valor predictivo de estos parámetros en técnicas de reproducción asistida (Scalici y cols., 2013).

ApoE, por otro lado, es un activador de lipasas bien conocido y las lipoproteínas que contienen apoE estaban significativamente aumentadas en mujeres obesas de ciclo natural (N2) señalando hacia la existencia de lipopartículas cargadas de triglicéridos en el endometrio de estas mujeres obesas. Esto confirma de nuevo que el IMC afecta el perfil apolipoproteico del endometrio alterando su expresión durante el ciclo menstrual. Esto concuerda con los resultados obtenidos por un estudio de Germeyer en el que encontraron que apoE y apoD parecen estar reguladas diferencialmente en el endometrio humano; y esto podría sugerir un papel diferente y complementario de estas dos apolipoproteínas en el tracto reproductivo (Germeyer y cols., 2013). Además, los niveles de esta apolipoproteína también se encuentran alterados en mujeres con endometriosis (Sundqvist y cols., 2012).

Nuestros resultados muestran que el peso corporal determina la fertilidad, al menos parcialmente, modificando el ambiente de algunas apolipoproteínas en el endometrio, un reservorio de colesterol que podría ser necesario en la implantación embrionaria. Tanto para ciclo natural como para ciclo sustituido, no existen diferencias significativas en los niveles de apolipoproteínas entre personas obesas y de peso normal en día LH/P+7. Sin embargo, en LH+2 podemos decir que en el ciclo natural todas las apolipoproteínas muestran variaciones entre mujeres de peso normal (donde suelen ser niveles más bajos) y mujeres obesas; siendo estas diferencias significativas salvo para apoB (con p-valor de 0,032 para apoAI; 0,049 para apoCII; 0,010 para apoCIII y 0,012 para apoE). En cambio, en LH+2 en ciclo sustituido ocurre todo lo contrario:

los niveles de apolipoproteínas entre mujeres de peso normal y mujeres obesas pueden considerarse iguales, salvo para apoB que aumenta en mujeres obesas (p-valor=0,023). Sin embargo, hay que tener en cuenta que se trata de una muestra con una “n” baja, que quizás no sea totalmente representativa de la población por lo que se ha planteado la posibilidad de realizar un estudio con un mayor número de muestras. De cualquier manera, las alteraciones existentes en LH+2 podrían estar afectando al desarrollo normal del endometrio durante la ventana de implantación y que pudieran influir en la tasa de éxito en la implantación embrionaria.

Se ha podido demostrar que la aplicación de terapia hormonal sustitutiva modifica el perfil lipoproteico endometrial; haciendo que desaparezca el aumento de los niveles de apoAI, apoCII, apoCIII y apoE en mujeres obesas que se observa en mujeres con ciclo natural y que ahora (con el ciclo sustituido) sean los niveles de apoB los únicos que aumentan de forma significativa en mujeres obesas en comparación con mujeres de peso normal. Además, si comparamos ciclo natural vs. ciclo sustituido, no se ven diferencias estadísticamente significativas en LH+2 ni en LH+7 en los niveles de apolipoproteínas para personas de peso normal. Para personas obesas, la única diferencia significativa radica en los niveles de apoB en LH+7, que disminuyen cuando el ciclo es sustituido con un p-valor de 0,042. Por consiguiente, se puede afirmar que la sustitución del ciclo menstrual atenúa de forma general los cambios que se producen en el contenido de apolipoproteínas cuando aumenta el IMC, haciendo que los niveles de dichas apolipoproteínas en

mujeres de obesas sean muy similares a los niveles presentes en mujeres de peso normal.

7. CONCLUSIONES

1. La obesidad produce cambios significativos a nivel de lípidos en plasma en mujeres con ciclo natural aumentando la en la apoA1 y la lipoproteína A. No hay cambios en el resto de lípidos.
2. Las mujeres con ciclo sustituido presentan una mayor alteración del contenido lipoproteico (VLDL, TG, LpA, apoB, HDL, y apoAI) en plasma tanto en mujeres con peso normal como obesas.
3. No existen correlaciones significativas entre el contenido lipídico y lipoproteico en el plasma sanguíneo y en el endometrio.
4. La apoAI es la más abundante en el endometrio. La proporción de ApoAI es mayor en caso de mujeres con peso normal y ciclo natural en LH+2.
5. Los niveles de apoAI son significativamente más bajos en LH+2 en comparación con LH+7, en mujeres con ciclo natural y peso normal. En mujeres con ciclo natural obesas el nivel de ApoAI es significativamente más alto ya en LH+2 en comparación con las de peso normal.
6. La proporción de apoCIII en endometrio es mayor en caso de mujeres con ciclo sustituido que en mujeres con ciclo natural.
7. La proporción de apoB endometrial aumenta en día LH/P+7 únicamente en mujeres con peso normal.
8. La proporción de apoE en endometrio es mayor en caso de mujeres obesas.

9. Las mujeres con peso normal y ciclo natural sufren un aumento de todos los niveles de apolipoproteínas en día LH+7 en comparación con LH+2, en su endometrio. Esto no ocurre en obesas, que presentan los niveles más elevados ya en LH+2. En los ciclos sustituidos tampoco se observan diferencias entre P+2 y P+7, ya que en P+2 también presentan niveles anormalmente elevados en P+2.

8. REFERENCIAS

- Achache H y Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006: **12**; 731-746.
- Achache H, Tsafrir A, Prus D, Reich R, y Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010: **94**; 1271-1278.
- Aghajanova L, Hamilton AE, y Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008a: **19**; 204-211.
- Aghajanova L, Simón C, y Horcajadas JA. Are favorite molecules of endometrial receptivity still in favor? *Exp Rev Obst & Gynecol* 2008b: **3**; 487-501.
- Altmäe S, Martínez-Conejero JA, Salumets A, Simón C, Horcajadas JA, and Stavreus-Evers A. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod* 2010: **16**; 178-187.
- Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, Saare M, Peters M, Vilo J, Stavreus-Evers A, y cols., Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol* 2012: **26**; 203-217.
- Allegra A, Marino A, Peregrin PC, Lama A, Garcia-Segovia A, Forte GI, Nunez-Calonge R, Agueli C, Mazzola S, y Volpes A. Endometrial expression of selected genes in patients achieving pregnancy spontaneously or after ICSI and patients failing at least two ICSI cycles. *Reprod Biomed Online* 2012: **25**; 481-491.
- Aplin JD, Meseguer M, Simón C, Ortiz ME, Croxatto H, y Jones CJ. MUC1, glycans and the cell-surface barrier to embryo implantation. *Biochem Soc Trans* 2001: **29**; 153-156.
- Barr J, Caballeria J, Martínez-Arranz I, Domínguez-Diez A, Alonso C, Muntane J, Perez-Cormenzana M, Garcia-Monzon C, Mayo R, Martin-Duce A, y cols., Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res* 2012: **11**; 2521-2532.
- Bellver J. Obesity and poor reproductive outcome: female and male body weight matter. *Fertil Steril* 2013: **99**; 1558-1559.
- Bellver J, Ayllon Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, Remohi J, y Meseguer M. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril* 2010: **93**; 447-454.

- Bellver J, Busso C, Pellicer A, Remohi J, y Simón C. Obesity and assisted reproductive technology outcomes. *Reprod Biomed Online* 2006: **12**; 562-568.
- Bellver J, Martínez-Conejero JA, Labarta E, Alama P, Melo MA, Remohi J, Pellicer A, y Horcajadas JA. Endometrial gene expression in the window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011: **95**; 2335-2341, 2341 e2331-2338.
- Bellver J, Melo MA, Bosch E, Serra V, Remohi J, y Pellicer A. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril* 2007: **88**; 446-451.
- Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, y Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013a: **28**; 794-800.
- Bellver J, Pellicer A, Garcia-Velasco JA, Ballesteros A, Remohi J, y Meseguer M. Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors. *Fertil Steril* 2013b: **100**; 1050-1058.
- Bellver J, Rossal LP, Bosch E, Zuniga A, Corona JT, Melendez F, Gomez E, Simón C, Remohi J, y Pellicer A. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. *Fertil Steril* 2003: **79**; 1136-1140.
- Biggers JD, Baskar JF, y Torchiana DF. Reduction of fertility of mice by the intrauterine injection of prostaglandin antagonists. *J Reprod Fertil* 1981: **63**; 365-372.
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, y Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003: **9**; 19-33.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976: **72**; 248-254.
- Brosens JJ, Hodgetts A, Feroze-Zaidi F, Sherwin JR, Fusi L, Salker MS, Higham J, Rose GL, Kajihara T, Young SL, y cols., Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2010: **16**; 273-285.
- Budak E, Fernandez Sánchez M, Bellver J, Cervero A, Simón C, y Pellicer A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil Steril* 2006: **85**; 1563-1581.

- Cakmak H y Taylor HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update* 2011: **17**; 242-253.
- Cano F, Landeras J, Molla M, Gomez E, Ballesteros A, y Remohi J. The effect of extreme of body mass on embryo implantation at oocytes donation program. *Fertil Steril* 2001: **76**; 160-161.
- Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, y Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002: **8**; 871-879.
- Cavagna M y Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta* 2003: **24 Suppl B**; S39-47.
- Cha J, Sun X, y Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 2012: **18**; 1754-1767.
- Cheong Y, Boomsma C, Heijnen C, y Macklon N. Uterine secretomics: a window on the maternal-embryo interface. *Fertil Steril* 2013: **99**; 1093-1099.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, y cols., LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010: **50**; 157-186.
- Díaz-Gimeno P. Desarrollo de una herramienta molecular diagnóstica de la receptividad endometrial Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. 2011. Universidad de Valencia, Valencia.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, y Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011: **95**; 50-60, 60 e51-15.
- Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alama P, Garrido N, Pellicer A, y Simón C. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013: **99**; 508-517.
- Domínguez F, Yanez-Mo M, Sánchez-Madrid F, y Simón C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J* 2005: **19**; 1056-1060.
- Downie J, Poyser NL, y Wunderlich M. Levels of prostaglandins in human endometrium during the normal menstrual cycle. *J Physiol* 1974: **236**; 465-472.
- Fahy E, Cotter D, Sud M, y Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta* 2011: **1811**; 637-647.

- Farias-Eisner G, Su F, Robbins T, Kotlerman J, Reddy S, y Farias-Eisner R. Validation of serum biomarkers for detection of early- and late-stage endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010; **202**; 73 e71-75.
- Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, y Evain-Brion D. Involvement of PPARgamma in human trophoblast invasion. *Placenta* 2007; **28 Suppl A**; S76-81.
- Fowler CJ. The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. *Br J Pharmacol* 2007; **152**; 594-601.
- Fowler PA, Tattum J, Bhattacharya S, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Gazvani R, Lea RG, Miller I, Simpson WG, y Cash P. An investigation of the effects of endometriosis on the proteome of human eutopic endometrium: a heterogeneous tissue with a complex disease. *Proteomics* 2007; **7**; 130-142
- Fujimoto VY, Kane JP, Ishida BY, Bloom MS, y Browne RW. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. *Hum Reprod Update* 2010; **16**; 20-38.
- Galliano D y Bellver J. Female obesity: short- and long-term consequences on the offspring. *Gynecol Endocrinol* 2013; **29**; 626-631.
- Gautier T, Becker S, Drouineaud V, Menetrier F, Sagot P, Nofer JR, von Otte S, Lagrost L, Masson D, y Tietge UJ. Human luteinized granulosa cells secrete apoB100-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2010; **51**; 2245-2252.
- Germeyer A, Capp E, Schlicksupp F, Jauckus J, von Rango U, von Wolff M, y Strowitzki T. Cell-type specific expression and regulation of apolipoprotein D and E in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; **170**; 487-491.
- Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999a; **14 Suppl 2**; 3-16.
- Giudice LC. Genes associated with embryonic attachment and implantation and the role of progesterone. *J Reprod Med* 1999b; **44**; 165-171.
- Green BB, Weiss NS, y Daling JR. Risk of ovulatory infertility in relation to body weight. *Fertil Steril* 1988; **50**; 721-726.
- Gupta S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J, y Agarwal A. Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. *Biomed Res Int* 2014; **2014**; 916212.
- Haslam DW y James WP. Obesity. *Lancet* 2005; **366**; 1197-1209.
- Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, y Hompes PG. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004; **9**; 692-715.

- Horcajadas JA, Pellicer A, y Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007: **13**; 77-86.
- Horcajadas JA, Riesewijk A, Martin J, Cervero A, Mosselman S, Pellicer A, y Simón C. Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol* 2004: **63**; 41-49.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, y Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002: **143**; 2119-2138.
- Kennedy TG, Gillio-Meina C, y Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction* 2007: **134**; 635-643.
- Lipina C, Rastedt W, Irving AJ, y Hundal HS. New vistas for treatment of obesity and diabetes? Endocannabinoid signalling and metabolism in the modulation of energy balance. *Bioessays* 2012: **34**; 681-691.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, y cols., Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 2008: **54**; 1-7.
- Maccarrone M. Endocannabinoids y reproductive endocrinology. *Curr Opin Investig Drugs* 2009a: **10**; 305-310.
- Maccarrone M. Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Prog Lipid Res* 2009b: **48**; 344-354.
- Mains LM, Christenson L, Yang B, Sparks AE, Mathur S, y Van Voorhis BJ. Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertil Steril* 2011: **96**; 422-427 e422.
- Makker A y Goel MM. Uterine leiomyomas: effects on architectural, cellular, and molecular determinants of endometrial receptivity. *Reprod Sci* 2013: **20**; 631-638.
- Manohar M, Khan H, Sirohi VK, Das V, Agarwal A, Pandey A, Siddiqui WA, y Dwivedi A. Alteration in endometrial proteins during early- and mid-secretory phases of the cycle in women with unexplained infertility. *PLoS One* 2014: **9**; e111687.
- Matsumoto H, Ma W, Smalley W, Trzaskos J, Breyer RM, y Dey SK. Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. *Biol Reprod* 2001: **64**; 1557-1565.
- McPherson NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, y Lane M. Improving metabolic health in obese male mice via diet and exercise restores embryonic development and fetal growth. *PLoS One* 2013: **8**; e71459.

- Miettinen HE, Rayburn H, y Krieger M. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice. *J Clin Invest* 2001: **108**; 1717-1722.
- Minge CE, Bennett BD, Norman RJ, y Robker RL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology* 2008: **149**; 2646-2656.
- Nichols JE, Crane MM, Higdon HL, Miller PB, y Boone WR. Extremes of body mass index reduce in vitro fertilization pregnancy rates. *Fertil Steril* 2003: **79**; 645-647.
- Norman RJ, Noakes M, Wu R, Davies MJ, Moran L, y Wang JX. Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. *Hum Reprod Update* 2004: **10**; 267-280.
- Noyes RW, Hertig AT, y Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950: **1**; 3-25.
- Noyes RW, Hertig AT, y Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975: **122**; 262-263.
- Pakrasi PL. Prostaglandins and ovum implantation in mice. *J Exp Zool* 1997: **278**; 53-57.
- Paria BC, Song H, Wang X, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Bonner TI, Zimmer A, y Dey SK. Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *J Biol Chem* 2001: **276**; 20523-20528.
- Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, Therond P, Sawamura T, Evain-Brion D, y Fournier T. Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: Involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology* 2004a: **145**; 4583-4591.
- Pavan L, Tsatsaris V, Hermouet A, Therond P, Evain-Brion D, y Fournier T. Oxidized low-density lipoproteins inhibit trophoblastic cell invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2004b: **89**; 1969-1972.
- Ramírez L. Prostaglandin E2 and prostaglandin F2 alpha as endometrial receptivity biomarkers in successful embryo implantation. 2013. Universidad de Valencia, Valencia, pp 194.
- Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, y Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003: **9**; 253-264.
- Robker RL, Wu LL, y Yang X. Inflammatory pathways linking obesity and ovarian dysfunction. *J Reprod Immunol* 2011: **88**; 142-148.

- Ruan YC, Guo JH, Liu X, Zhang R, Tsang LL, Dong JD, Chen H, Yu MK, Jiang X, Zhang XH, y cols., Activation of the epithelial Na⁺ channel triggers prostaglandin E(2) release and production required for embryo implantation. *Nat Med* 2012: **18**; 1112-1117.
- Scalici E, Astruc K, Jiménez C, Duvillard L, Gautier T, Huot MN, Girod S, Schmutz E, Lagrost L, Sagot P, y Drouineaud V. Apolipoprotein B in follicular fluid, a new predictive factor of success parameters in assisted reproductive technology. Oral communication ESHRE 2013.
- Scherle PA, Ma W, Lim H, Dey SK, y Trzaskos JM. Regulation of cyclooxygenase-2 induction in the mouse uterus during decidualization. An event of early pregnancy. *J Biol Chem* 2000: **275**; 37086-37092.
- Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G, y Horvath TL. Minireview: Metabolism of Female Reproduction: Regulatory Mechanisms and Clinical Implications. *Mol Endocrinol* 2014; me20131413.
- Simón C, Horcajadas JA, García-Velasco J, y Pellicer A. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica 2009. Médica Panamericana, Buenos Aires y Madrid.
- Sordelli MS, Beltrame JS, Cella M, Gervasi MG, Perez Martínez S, Burdet J, Zotta E, Franchi AM, y Ribeiro ML. Interaction between lysophosphatidic acid, prostaglandins and the endocannabinoid system during the window of implantation in the rat uterus. *PLoS One* 2012: **7**; e46059.
- Sun X y Dey SK. Aspects of endocannabinoid signaling in periimplantation biology. *Mol Cell Endocrinol* 2008: **286**; S3-11.
- Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, y Lalitkumar PG. Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis. *Hum Reprod* 2012: **27**; 2737-2746.
- Taylor AH, Ang C, Bell SC, y Konje JC. The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 2007: **13**; 501-513.
- Trigatti B, Rayburn H, Vinals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, Hertz M, Schrenzel M, Amigo L, Rigotti A, y cols., Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999: **96**; 9322-9327.
- Valckx SD, De Pauw I, De Neubourg D, Inion I, Berth M, Franssen E, Bols PE, y Leroy JL. BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Hum Reprod* 2012: **27**; 3531-3539.

- Vilella F, Ramírez L, Berlanga O, Martínez S, Alama P, Meseguer M, Pellicer A, y Simón C. PGE2 and PGF2alpha concentrations in human endometrial fluid as biomarkers for embryonic implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013a: **98**; 4123-4132.
- Vilella F, Ramírez LB, y Simón C. Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013b: **99**; 1100-1106.
- Wang H y Dey SK. Lipid signaling in embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005: **77**; 84-102.
- Wang JX, Davies M, y Norman RJ. Body mass and probability of pregnancy during assisted reproduction treatment: retrospective study. *BMJ* 2000: **321**; 1320-1321.
- Wilcox AJ, Baird DD, y Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999: **340**; 1796-1799.
- Wise LA, Rothman KJ, Mikkelsen EM, Sorensen HT, Riis A, y Hatch EE. An internet-based prospective study of body size and time-to-pregnancy. *Hum Reprod* 2010: **25**; 253-264.
- Yang ST, Koong CW, y Chen HI. Role of prostaglandins in regulation of cerebral blood flow during acute hypertension. *Chin J Physiol* 1997: **40**; 137-142.
- Ye X, Diao H, y Chun J. 11-deoxy prostaglandin F(2alpha), a thromboxane A2 receptor agonist, partially alleviates embryo crowding in Lpar3((-/-)) females. *Fertil Steril* 2012: **97**; 757-763.
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, y cols., LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005: **435**; 104-108.