

Efecto de los análogos de la GnRH sobre la expresión de la aromatasa en células de la granulosa de pacientes con endometriosis.

Ramiro de la Cruz Quiroga

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

2015



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Facultat de Medicina i Odontologia

Efecto de los análogos de la GnRH sobre la expresión de la aromatasa en células de la granulosa de pacientes con endometriosis.

Ramiro de la Cruz Quiroga

Directores de la tesis:

**Dra. Ana Monzó Miralles
Dr. Antonio Pellicer Martínez
Dra. Edurne Novella-Maestre**

Programa de Doctorado 290 F. Obstetricia y Ginecología

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia



Dra. **Dña. ANA MONZÓ MIRALLES**, Profesora asociada del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia

Prof. Dr. **D. ANTONIO PELLICER MARTINEZ**, Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Dra. **Dña. EDURNE NOVELLA-MAESTRE**, **Doctora por la Universidad de Valencia en el** del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN: Que bajo su dirección D. Ramiro de la Cruz Quiroga ha realizado el trabajo de investigación titulado “Efecto de los análogos de la GnRH sobre la expresión de la aromatasa en células de la granulosa de pacientes con endometriosis”. Dicho trabajo está concluído y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal para optar al grado de doctor.

Para que así conste y a los efectos oportunos, expido y firman la presente certificación.

Dña. ANA MONZÓ MIRALLES

Firmado

Dr. D. ANTONIO PELLICER MARTINEZ

Firmado

Dña. EDURNE NOVELLA-MAESTRE

Firmado

En Valencia a 25 de Octubre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Nunca me imaginé lo costoso que podría llegar a ser realizar una tesis doctoral. Una vez concluída, sientes la felicidad del trabajo bien hecho, de aquél que te ha llevado un gran esfuerzo y dedicación.

El análisis objetivo del trabajo realizado te muestra inmediatamente que no hubiese sido posible sin la participación de algunas personas cercanas que me han facilitado las cosas para que esta investigación llegue a buen término. Por ello, para ser justo y consecuente con ellas, quiero dejar sentado mi agradecimiento.

Gracias...

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra Ana Monzó por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y por la paciencia mostrada desde el inicio del proyecto.

Al Prof. Antonio Pellicer, por su apoyo incondicional. Porque sus ganas infinitas de trabajar y su trayectoria son referencia única en este trabajo y en mi profesión.

A la Dra. Edurne Novella por la calma, disponibilidad y ayuda prestada durante este tiempo.

A todas las personas que de alguna manera u otra han estado pendientes y colaborado con el proyecto: Pilar, Mercedes Monterde, Pedro Fernandez, Patri Polo, Mónica Romeu, Trini Garcia, Maria Luisa Martinez y Elisabet Rodriguez.

A mis compañeros y compañeras del Hospital La Fe de Valencia, que día tras día, me han apoyado y me han dado palabras de ánimo. Gracias a todos.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia, para mis hijos, Ignacio y Federica y para mi compañera de vida Ximena.

A Ximena por su apoyo incondicional, por su paciencia sin límites, por darme la tranquilidad y la fuerza necesaria y no permitirme desistir nunca pese a las dificultades. Y por supuesto, por creer en mí.

A mis hijos, por el tiempo que no pude estar con ellos.

A mis papas, Carlos y Martha, por haberme apoyado para estudiar esta apasionante carrera.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS.....	5
1.2. ETIOPATOGENIA DE LA ESTERILIDAD FEMENINA ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS.....	9
1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS	11
1.4. ESTEROIDEOGENESIS OVÁRICA	11
1.4.1. TEORÍA DE LAS DOS CÉLULAS.....	13
1.5. PAPEL DE LA AROMATASA. PARTICULARIDADES EN LA ENDOMETRIOSIS.....	15
1.5.1. ENDOMETRIO NORMAL.....	16
1.5.2. IMPLANTE ENDOMETRIÓICO	17
1.5.3. CÉLULAS DE LA GRANULOSA.....	20
1.6. EVIDENCIAS ACTUALES DEL USO DE ANÁLOGOS DE GnRH EN EL TRATAMIENTO DE LA ESTERILIDAD POR ENDOMETRIOSIS	21
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	29
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	29
4. MATERIAL Y MÉTODOS	33
4.1. DISEÑO DE ESTUDIO.....	33
4.2. ÁMBITO DE REALIZACIÓN.....	33
4.3. DURACIÓN DEL ESTUDIO	33
4.4. PACIENTES	33
4.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	33
4.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	34
4.5. PROCEDIMIENTOS.....	34
4.5.1. TRATAMIENTO PREVIO A LA FIV	35
4.5.2. ESTIMULACIÓN OVARICA.....	36
4.5.3. PROCEDIMIENTO DE ICSI	36
4.5.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA AROMATASA.....	40
4.5.5. DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES EN LÍQUIDO FOLICULAR.....	47
4.6. CLASIFICACIÓN OVOCITARIA Y EMBRIONARIA	52
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57

4.8. VARIABLES.....	59
5. RESULTADOS	65
5.1. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS	65
5.1.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA.....	65
5.1.2. VARIABLES CORRESPONDIENTES AL PROCESO DE FIV/ICSI	67
5.2. VARIABLES RELACIONADAS CON EL OBJETIVO DEL ESTUDIO	69
5.2.1. EXPRESIÓN DEL GEN DE AROMATASA EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA	69
5.2.2. DETERMINACIONES HORMONALES EN EL LÍQUIDO FOLICULAR	72
5.2.3. CALIDAD OVOCITARIA	76
5.2.4. CALIDAD EMBRIONARIA	76
6. DISCUSIÓN.....	85
6.1. EXPRESION DE LA AROMATASA Y DETERMINACIONES HORMONALES	87
6.2. CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA.....	89
6.3. TASA DE FECUNDACIÓN, IMPLANTACIÓN Y GESTACIÓN.....	92
7. CONCLUSIONES	99
8. BIBLIOGRAFÍA	103

LISTADO DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
A: androstenediona
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AMH: hormona antimülleriana
AMPC: adenosín monofosfato cíclico
AREL: agregación de retículo endoplásmico liso
ARN: ácido ribonucleico
ARNasa: ribonucleasa
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosomal
ARNt: ARN de transferencia
ASEBIR: Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción
C18: 18 carbonos
C19: 19 carbonos
CC: Células granulosas
CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica
CGM: células de la granulosa murales
CO₂: dióxido de carbono
COC: complejo cúmulo-ovocito
COX-2: ciclooxigenasa-2
CP: corpúsculo polar
Ct: ciclo umbral
CYP desramificante: citocromo P450 desramificante
CYP11A1: citocromo P450, familia 11, subfamilia A, polipéptido 1
CYP17A1: citocromo P450, familia 17, subfamilia A, polipéptido 1
CYP19A1: citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1
DHEA: dehidroepiandrosterona
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos
dUTP: desoxiuridina trifosfato

E2: estradiol
EOC: estimulación ovárica controlada
EP: receptor de prostaglandina E
FIV: fecundación in vitro
FSH: hormona folículo estimulante
G: G-force
g: gauge
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG: gonadotrofina coriónica humana
HSD17B1: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
HSD17B2: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
IC: intervalo de confianza
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IgA: Inmunoglobulina A
IgG: Inmunoglobulina G
IL-1: interleukina-1
IL-10: interleukina-10
IL-1b: interleukina-1b
IL-6: interleukina-6
IMC: índice de masa corporal
LDL: lipoproteínas de baja densidad
LF: líquido folicular
LH: hormona luteinizante
MGB: Minor Groove binder
MII: metafase II
mmHG: milímetros de mercurio
NFQ: NonFluorescent Quencher
OMIM: online mendelian inheritance in man
OR: Odds Ratio
P: progesterona
PBS: tampón fosfato salino
PDA: protocolo de Dilución Automática
PDM: protocolo de Dilución Manual
PGE2: prostaglandina E2

PGs: prostaglandinas

PN: pronúcleos

Q-RT-PCR: cuantificación fluorescente relativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RQ: cuantificación relativa

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

RT: transcripción reversa

SDS: Sistema de Detección de Secuencia

SF1: factor esteroideogénico 1

StAR: proteína reguladora aguda

T: testosterona

T_m: temperatura de fusión

TNF: factor de necrosis tumoral

total CV: coeficiente de variación total

total SD: desviación estándar total

TRA: técnicas de reproducción asistida

UDG: uracil glicosidasa

UP: ultra pura

URL: Unidad Relativa de Luz

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Teoría de la patogénesis de la endometriosis.	6
Tabla 1 : Clasificación de la endometriosis.	12
Figura 2: Anatomía del folículo ovárico.	14
Figura 3: Teoría de las dos células.	14
Figura 4: Acción de la aromatasa.	15
Figura 5: Endometrio normal y endometriosis.	17
Figura 6: Papel de la aromatasa sobre el endometrio.	18
Figura 7: Papel de la aromatasa en el implante endometroso.	19
Tabla 2: Criterios de inclusión.	34
Tabla 3: Criterios de exclusión.....	34
Figura 8: Esquema de pauta de tratamiento.....	35
Figura 9: Dogma central de la biología molecular.	40
Figura 10: Pasos para la realización de la expresión de la aromatasa.....	41
Figura 11: Retrotranscripción del ARN.....	42
Tabla 4: Componentes de la solución de mezcla.....	43
Tabla 5: Condiciones térmicas de la reacción.....	43
Figura 12: Explicación de la generación de fluorescencia en la reacción PCR cuantitativa a tiempo real por el avance de la enzima polimerasa sobre la sonda marcada con un fluoróforo.	45
Tabla 6: Componentes de la solución de mezcla.....	46
Figura 13: Gráfica amplificación de PCR a tiempo real.....	47
Figura 14 : Componentes del inmunoensayo quimioluminiscente magnético.....	48
Figura 15: Componentes del inmunoensayo por micropartículas.	51
Tabla 7-a: Valoración morfológica del ovocito.	53
Tabla 7-b: Valoración morfológica del ovocito.	54
Tabla 7-c: Valoración morfológica del ovocito.	55
Tabla 8: Clasificación morfológica de los embriones.	56
Tabla 9: Esquema de gradación de la calidad embrionaria.....	57
Tabla 10: Gradación de la calidad embrionaria en transferencias de D+2 y D+3.	58
Tabla 10 (cont): Gradación de la calidad embrionaria en transferencias de D+2 y D+3..	59
Tabla 11 Caracterización clínica.....	65
Tabla 12: Grado de endometriosis.	66

Tabla 13: Número de endometriomas.	66
Tabla 14: Distribución en función de la bilateralidad por grupo.	66
Tabla 15-a: Variables del ciclo de tratamiento.....	67
Tabla 15-b: Variables del ciclo de tratamiento.	68
Tabla 15-c: Variables del ciclo de tratamiento.....	68
Figura 16: Gestaciones según grupo.....	69
Tabla 16-a: Expresión del gen CYP19A1 en CGM.	70
Tabla 16-b: Expresión del gen CYP19A1 en CC.....	70
Figura 17-a: Expresión del gen CYP19A1 en CGM.	71
Figura 17-b: Expresión del gen CYP19A1 en CC.....	71
Tabla 17: Valoración en bilateralidad.....	72
Tabla 18: Determinaciones hormonales en LF, análisis global.....	73
Tabla 19: Determinaciones hormonales en LF, ovarios afectados.....	74
Tabla 20: Determinaciones hormonales en LF, ovarios no afectados.	74
Tabla 21: Determinaciones hormonales en LF, análisis pareado en grupo placebo.....	74
Tabla 22: Determinaciones hormonales en LF, análisis pareado en grupo de agonistas GnRH.....	75
Tabla 23: Determinaciones hormonales en LF, afectación bilateral.	75
Tabla 24: Tipos de ovocito según grupo.....	76
Tabla 25a: Alteraciones del Primer Corpúsculo Polar.	77
Tabla 25b: Forma.	77
Tabla 25c: Grosor Zona Pelúcida.	77
Tabla 25d: Color Zona Pelúcida.....	78
Tabla 25e: Espacio Perivitelino Excesivo.	78
Tabla 25f: Restos EPV.....	78
Tabla 25g: Citoplasma.....	79
Tabla 25h: Presencia de vacuolas.	79
Tabla 26a: Embriones óptimos.	79
Tabla 26-b: Embriones transferidos según grupo.	80
Tabla 27: Gradación embrionaria.	80
Tabla 28: Gradación embrionaria agrupada.	80
Tabla 29: Fecundación según grupo.....	81
Figura 18: Gestación vs No gestación en MII incluidos.....	81

01.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La endometriosis se define como la presencia de tejido endometrial ectópico.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) constituyen el tratamiento de muchas causas de esterilidad, entre otras la endometriosis. Los resultados de la reproducción asistida en mujeres con endometriosis parece que son peores que los obtenidos con mujeres sin endometriosis. Un meta-análisis de 22 estudios publicados ha mostrado que la posibilidad de conseguir una gestación en mujeres con endometriosis era significativamente menor (Odds Ratio (OR) 0.56; 95% intervalo de confianza (IC), 0.44-0.70) que en la esterilidad de causa tubárica (Barnhart, Dunsmoor-Su, & Coutifaris, 2002). El análisis multivariante también demostró una menor tasa de fecundación e implantación, así como un menor número de ovocitos obtenidos en mujeres con endometriosis.

Esta peor tasa de gestación e implantación se cree que está originada en una mala calidad ovocitaria, que puede llevar a una menor tasa de fecundación (Norenstedt, Linderth-Nagy, Bergendal, Sjöblom, & Bergqvist, 2001) o producir embriones de baja calidad morfológica con una reducida capacidad para implantar (Simón et al., 1994).

Sin embargo, son pocos los estudios publicados que evalúan la calidad ovocitaria en mujeres estériles con endometriosis que realizan TRA (I. D. Barcelos et al., 2009).

La calidad ovocitaria depende, entre otros factores, de un microambiente folicular adecuado.

Las células granulosas foliculares obtenidas durante la punción ovárica y captación ovocitaria en los ciclos de fecundación in vitro (FIV) pueden ser divididas en dos subpoblaciones: células del cúmulo (CC) y células de la granulosa murales (CGM). Las CC forman un grupo de células asociadas en íntima relación con el ovocito en el folículo antral y las CGM se alinean en la pared folicular. Las células de la granulosa juegan un papel importante en la diferenciación folicular, logrando condiciones óptimas para el desarrollo ovocitario, la ovulación, la fecundación y la implantación subsiguiente. Más aún, la comunicación entre el ovocito y éstas células ocurre durante el desarrollo folicular y es esencial para la adquisición de la competencia de los ovocitos de mamíferos (Fair, 2003) (Assou, Haouzi, De Vos, & Hamamah, 2010) (Ouandaogo et al., 2012).

El desarrollo y el gran progreso en la biología molecular junto con el advenimiento de la era “ómica” ha expandido el conocimiento de los procesos moleculares de la reproducción asistida y se han convertido en una gran oportunidad para mejorar los conocimientos a nivel genético y molecular de los tratamientos dirigidos de la infertilidad. Específicamente, se han empezado a identificar potenciales biomarcadores indicativos de la calidad embrionaria y del potencial de gestación por medio de enfoques de proteómica, metabolómica y transcriptómica. De particular interés han sido las investigaciones sobre los perfiles transcripcionales de las células del cúmulo. Por tanto, el estudio de la expresión de los genes que intervienen en la competencia del ovocito en las CC de los ovocitos maduros humanos podría ser utilizado como una forma de asesoramiento de la calidad ovocitaria y la predicción de los resultados de la TRA (Hamel et al., 2008) (Tesfaye et al., 2009). El perfil de expresión génica de las células de la granulosa podría reflejar con certeza el potencial fértil de un ovocito de una manera no-invasiva. La identificación de ovocitos que generan embriones de alta calidad con mayor capacidad para la implantación podría reducir el número de embriones transferidos sin reducir la tasa de embarazos.

Algunos estudios han demostrado una correlación entre la expresión del ácido ribonucleico (ARN) mensajero en las CC y la calidad ovocitaria y embrionaria e incluso expresión diferencial de transcritos entre CC y ovocitos que lograron embarazo. En un análisis de expresión génica y su correlación con embarazo, mediante el estudio de CC humanas recogidas inmediatamente tras la punción ovárica se han encontrado 12 genes con capacidad predictiva para resultados de embarazo basados en su nivel de expresión (Iager et al., 2013).

Un gen candidato sería el gen del citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1 (CYP19A1) -OMIM*107910- que codifica a la aromatasa, una enzima limitante en la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, que está involucrada en la conversión de androstenediona y testosterona en estrona y estradiol, respectivamente.

Por otra parte, aunque los datos son controvertidos, la receptividad endometrial no parece que contribuya a la reducción de los resultados de las TRA en estas mujeres. Se ha demostrado que mujeres sanas que donaban ovocitos conseguían altas tasas de gestación en las receptoras con o sin endometriosis. En cambio, cuando las donantes tenían endometriosis, estos resultados eran peores (Sung, Mukherjee, Takeshige, Bustillo, & Copperman, 1997) (Hickman, 2002).

Se han ensayado diversos tratamientos médicos para intentar mejorar los resultados de la TRA en mujeres con endometriosis. Se ha demostrado que el tratamiento prolongado con análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) unos meses antes de la FIV mejora las tasas de implantación y gestación (Dicker et al., 1990) (Curtis, Jackson, Bernard, & Shaw, 1993) (Marcus & Edwards, 1994) (Chedid, Camus, Smitz, Van Steirteghem, & Devroey, 1995). Un meta-análisis ha mostrado que un tratamiento de 3-6 meses con análogos de GnRH previos a una FIV aumenta 4 veces la odds de embarazo clínico en mujeres con endometriosis (Sallam, Garcia-Velasco, Dias, & Arici, 2006). No obstante, estos resultados se concluyeron a partir de 165 pacientes y 78 embarazos, incluidos en 3 ensayos clínicos, en los que no se trataba específicamente a pacientes con endometriomas y en ninguno se utilizó un placebo en el grupo control. Con el fin de dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que corroboren estos resultados fue diseñado el presente trabajo

1.1. FISIOPATOLOGIA DE LA ENDOMETRIOSIS

Ha pasado más de un siglo desde la descripción original de la endometriosis por Rokitansky y, pero aún hoy se desconocen con exactitud los mecanismos mediante los cuales se desarrolla la enfermedad. La fisiopatología de la esterilidad asociada a la endometriosis avanzada parece fácil de explicar por las modificaciones anatómicas que sufre el aparato genital femenino. Sin embargo, la esterilidad asociada a estadios de endometriosis leve-moderada sigue siendo desconocida y son muchas las hipótesis que se han postulado para explicarla. Algunos de los resultados obtenidos con técnicas de reproducción asistida sugieren que otros mecanismos, además del puramente mecánico, están implicados en la esterilidad asociada a endometriosis. No hay hasta la actualidad una teoría única que englobe y unifique el origen de la endometriosis. En cambio, han sido propuestas varias teorías por parte de los investigadores líderes en este campo de las distintas observaciones referentes a su patogénesis (Figura 1). Éstas pueden ser categorizadas en teorías que proponen que los implantes se originan del endometrio uterino y teorías en las que los implantes se originan a partir de otros tejidos diferentes al uterino. Hay factores intrínsecos en estas teorías cuyos roles empiezan a ser delineados, aunque son insuficientes para explicar y confirmar su papel por sí mismos como causa-efecto en el desarrollo de la endometriosis. Estos factores incluyen, la susceptibilidad genética, factores ambientales, endocrinos e inflamatorios, entre otros (Bulun, 2009) (Crain et al., 2008).

Entre las teorías que proponen un origen no-uterino de la enfermedad, se encuentran la teoría de la metaplasia celómica, que implica la transformación del tejido peritoneal normal en tejido

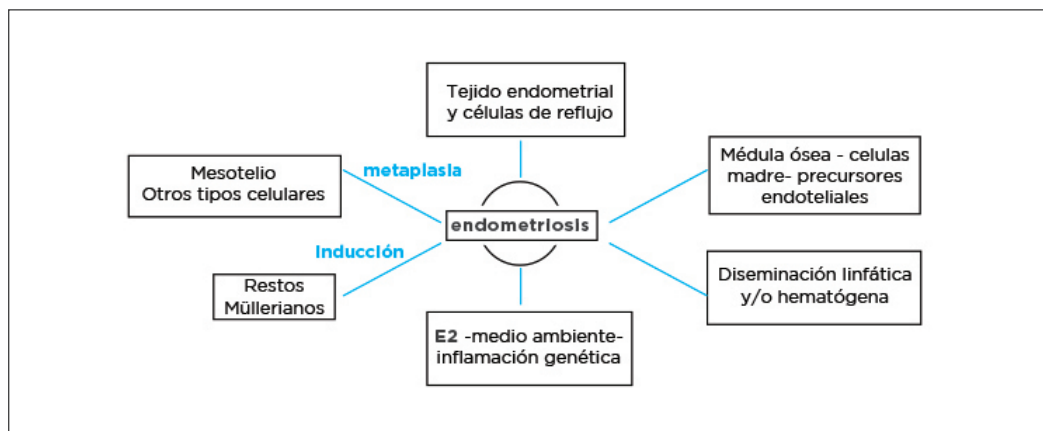


Figura 1: Teoría de la patogénesis de la endometriosis. Adaptada de (Burney & Giudice, 2012).

endometrial ectópico (Iwanoff, 1898). Los agentes responsables de dicha transformación son poco conocidos, aunque serían buenos candidatos algunos disruptores endocrinos químicos; la teoría de la inducción, que está íntimamente relacionada con la anterior, sostiene que los estímulos endógenos como factores hormonales o inmunológicos, podrían favorecer la diferenciación celular del peritoneo a células endometriales (Levander & Normann, 1955). Finalmente, la teoría de los restos embrionarios müllerianos propone que las células residuales de la migración de los conductos müllerianos embrionarios mantienen la capacidad de transformarse en lesiones endometriósicas bajo la influencia estrogénica al inicio de la pubertad (Wood Russell, 1899) o quizá en respuesta a sustancias con acción estrogénica.

1.1.1. TEORÍA DE LA METAPLASIA CELOMICA

Según esta hipótesis, el peritoneo parietal es un tejido pluripotencial que puede sufrir transformaciones metaplásicas para convertirse en un tejido idéntico desde el punto de vista histológico al endometrio normal. Un estudio publicado propuso que algún compuesto irritante presente en el endometrio estimularía la transformación metaplásica del epitelio peritoneal, lo que se seguiría de la formación de tejido endometrial típico tanto a nivel estructural como funcional (J. Sampson, 1927). Puesto que que el ovario y las estructuras de las que deriva el endometrio, los conductos de Müller, provienen del epitelio celómico, la metaplasia podría ser responsable del desarrollo de la endometriosis ovárica. Esta teoría resulta atractiva en los casos de endometriosis en ausencia de menstruación. No obstante, la ausencia de endometriosis en otros tejidos derivados del epitelio celómico contradice esta hipótesis.

1.1.2. TEORÍA DE CÉLULAS PROGENITORAS

Una teoría más reciente sugiere que las células progenitoras o células madre originadas en la médula ósea podrían diferenciarse en tejido endometriósico (Sasson & Taylor, 2008). Se incluyen distintas líneas celulares candidatas como las células madre mesenquimáticas y epiteliales de la médula ósea. Las teorías que sugieren un origen no endometrial se apoyan en casos descritos de tejido endometrial confirmado histológicamente en pacientes sin endometrio menstrual, como las pacientes con síndrome de Rokitanski-Kuster-Hause (Rosenfeld & Lecher, 1981).

Entre las teorías que proponen que los implantes son del endometrio uterino, se pueden mencionar la teoría de las metastasis benignas, que sostiene que el endometrio ectópico es el resultado de diseminación linfática o vascular de las células endometriales (Halban, 1925) (J. A. Sampson, 1927) y la teoría de la menstruación retrógrada propuesta inicialmente por Sampson en el año 1920 (J. Sampson, 1927).

1.1.3. TEORÍA DE LA DISEMINACIÓN LINFÁTICA Y VASCULAR

Desde hace tiempo se sabe que la región retroperitoneal posee una profusa irrigación linfática. La endometriosis puede afectar a casi todos los tejidos y órganos, por lo que el mecanismo de la endometriosis distal podría sustentarse en la diseminación hematógena o linfática (Gong & Tempfer, 2011). Estudios microvasculares demostraron flujo desde los ganglios linfáticos del cuerpo uterino hacia el ovario, sugiriendo un posible rol del sistema linfático en la etiología de la endometriosis ovárica. La evidencia más sólida de esta teoría proviene de publicaciones que describen lesiones endometriósicas confirmadas histológicamente en sitios distales lejanos al útero como el hueso, pulmones y cerebro. Además, la tendencia a la diseminación linfática del adenocarcinoma endometrial pone de relieve la facilidad de transporte del endometrio por esta vía (McMeekin & Tillmanns, 2003). Sin embargo, a pesar de tratarse de una teoría atractiva, se ha investigado poco esta modalidad de diseminación de la endometriosis en estudios experimentales. Un estudio prospectivo llevado a cabo de 26 casos consecutivos de mujeres con endometriosis rectosigmoidea en el que se analizaron la afectación ganglionar por focos endometriósicos, estableció una correlación con parámetros clínicos e histológicos (Noël, Chapron, Fayt, & Anaf, 2008). Se evidenció afectación ganglionar por la endometriosis en el 42,3% de las pacientes y se identificó invasión linfovascular en el 36,3% de los casos. La afectación ganglionar por los focos endometriósicos constituye un hallazgo frecuente en la

endometriosis rectosigmoidea y puede deberse, al menos en parte, a la diseminación linfática de la enfermedad. Por otra parte, la diseminación linfática refuerza en mayor medida la teoría que concibe la endometriosis como un trastorno sistémico crónico agresivo.

1.1.4. TEORÍA DEL TRASPLANTE DIRECTO

El trasplante directo inadvertido de tejido endometrial en el momento de una cesárea, intervención quirúrgica pélvica y reparación de una episiotomía constituyen la causa más probable de la endometriosis observada en cicatrices quirúrgicas y el perineo (Taff & Jones, 2002).

1.1.5. TEORÍA DE LA MENSTRUACION RETRÓGRADA

Esta teoría propuesta por Sampson en 1920 es la más avalada y la apoyan múltiples líneas de evidencia científica (J. Sampson, 1927). Se ha observado menstruación retrógrada hasta en el 90% de las mujeres con trompas de Falopio permeables en la evaluación laparoscópica. Este mecanismo se ve respaldado por la observación de volúmenes mayores de sangre y tejido endometrial transportados retrógradamente en la pelvis de mujeres con endometriosis (D'Hoo- ghe et al., 1995), así como también en los estudios realizados en pacientes con obstrucción al flujo de salida, como es el caso de mujeres adolescentes con obstrucción congénita en el tracto de salida, en las que la prevalencia de endometriosis es mayor (Sanfilippo, Wakim, Schikler, & Yussman, 1986).

De igual modo, el hiperperistaltismo uterino y la disfunción de su contractilidad en mujeres con endometriosis intervienen en el aumento del flujo endometrial (Leyendecker et al., 2004).

Aunque la menstruación retrógrada explica el desplazamiento de los fragmentos endometria- les a la cavidad peritoneal, para el desarrollo de los implantes endometriósicos son necesari- os otros pasos adicionales, como “escapar” del aclarado por parte del sistema inmune, la adherencia e invasión al epitelio peritoneal, el establecimiento de una vascularización local y el crecimiento. Se ha demostrado que las células endometriales viables aisladas del líquido peritoneal crecen en sistemas de cultivo celular y son capaces de atravesar la superficie me- sotelial del peritoneo. Estudios en animales demostraron que los fragmentos de endometrio sometidos a diseminación retrógrada se adhieren al mesotelio peritoneal y lo atraviesan, de modo que se establece una red de irrigación que posibilita la supervivencia y la proliferación de células implantadas (Giudice, 2010).

1.2. ETIOPATOGENIA DE LA ESTERILIDAD FEMENINA ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS

Como ya se mencionó previamente, la endometriosis se define por la presencia de estroma y glándulas endometriales fuera de la cavidad uterina, produciendo una reacción inflamatoria crónica. Las principales manifestaciones clínicas son el dolor pélvico crónico, la dispareunia y la esterilidad/infertilidad.

Las tres formas diferentes de presentación de la endometriosis son los implantes endometriósicos sobre la superficie del peritoneo parietal y ovarios (endometriosis peritoneal), los quistes ováricos rodeados de mucosa endometrial (endometriomas), y las masas sólidas complejas compuestas por tejido endometriósico mezclado con tejido adiposo y fibromuscular, que se ubican entre el recto y la vagina (nódulos endometriósicos rectovaginales). Las tres entidades pueden ser variantes del mismo proceso patológico o pueden ser causados por mecanismos diferentes (Garry, 2004). Estas lesiones pueden aparecer en forma única y aislada o combinadas entre sí y estar asociadas con un mayor riesgo de esterilidad o dolor crónico.

Se han propuesto diversos mecanismos para intentar explicar la asociación entre endometriosis e infertilidad (de Ziegler, Borghese, & Chapron, 2010).

1.2.1. DISTORSIÓN DE LA ANATOMÍA PÉLVICA

La endometriosis puede causar esterilidad por el bloqueo físico-mecánico de las trompas de Falopio. Las adherencias y la fibrosis provocadas por la endometriosis dificultarían la liberación de ovocito por el ovario y su captación y transporte por la trompa.

1.2.2. FUNCIÓN PERITONEAL ALTERADA

Se observa en mujeres con endometriosis un aumento tanto del volumen del líquido peritoneal como de la concentración en él de macrófagos activados, prostaglandinas (PGs), interleukina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF) y proteasas, así como de una sustancia inhibidora de captura ovocitaria. Estas alteraciones podrían tener efectos adversos sobre el ovocito, el espermatozoide, el embrión y la trompa de Falopio.

1.2.3. ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN HORMONAL Y DE LA INMUNIDAD CELULAR

En el endometrio de las mujeres con endometriosis podría darse un aumento de linfocitos, de anticuerpos IgA e IgG y, en algunos casos, de autoanticuerpos contra antígenos endometriales, lo que alteraría la receptividad y la implantación del embrión.

1.2.4. ANOMALÍAS ENDOCRINAS Y OVULATORIAS

Podrían consistir en disfunción de la fase lútea, crecimiento folicular anormal, presencia de picos de hormona luteinizante (LH) prematuros y múltiples y el síndrome de folículo luteinizado no roto.

1.2.5. ALTERACIÓN DE LA CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA

La peor calidad ovocitaria embrionaria puede deberse a influencias del líquido peritoneal en el proceso normal de fecundación. Es conocido que la fecundación ocurre fisiológicamente en la región ampular de la trompa, que se encuentra abierta al ovario y expuesta al medio peritoneal. Se sugirió que el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis produce una inmovilización de los espermatozoides dependiente de la acción de los macrófagos, y de la IL-1 e IL-6 (Aeby, Huang, & Nakayama, 1996). Por otra parte, el TNF α puede causar un daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) del espermatozoide, lo que aumentaría la peroxidación de la membrana y la apoptosis celular, disminuyendo su capacidad fecundante. Además el aumento de citoquinas en el líquido peritoneal, contribuiría a la disminución de la unión del espermatozoide con la zona pelúcida y dificultaría la reacción acrosómica (Barbonetti et al., 2008). Estudios en el líquido folicular evidenciaron anomalías en el ambiente folicular de las pacientes con endometriosis, existiendo un aumento de las concentraciones de IL-6, IL-1 β , IL-10 y TNF α , así como disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Garrido, Navarro, Remohí, Simón, & Pellicer). Esta menor expresión de VEGF en el líquido folicular se identificó como una alteración clave que explicaría la menor calidad embrionaria y de las tasas de embarazo (Pellicer et al., 2000).

1.2.6. ALTERACIONES ENDOMETRIALES

En las mujeres con endometriosis se produciría una disfunción de la función endometrial que contribuiría tanto al desarrollo de la enfermedad como a la alteración de los mecanismos de la implantación embrionaria. En este sentido, se describieron múltiples anomalías en la expresi-

sión de factores tisulares, angiogénicos y proteolíticos en el endometrio de mujeres con endometriosis (Gilbert-Estellés et al., 2007). Un estudio demostró un aumento de la inmunoreactividad de apolipoproteína A-I en el epitelio luminal del endometrio eutópico y en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis, sugiriendo que esta proteína antiinflamatoria sería clave para una menor receptividad endometrial (Ferrero et al., 2007). La expresión de esta apolipoproteína proporcionaría una huella proteómica específica que podría permitir discriminar entre el endometrio receptivo y no receptivo para la implantación embrionaria. Por último, se identificaron autoanticuerpos de tipo IgG e IgA contra antígenos endometriales en mujeres con endometriosis que podrían ser responsables de una anormal receptividad endometrial limitando la implantación embrionaria.

1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ENDOMETRIOSIS

En el año 1979 la Sociedad Americana de Fertilidad propuso por primera vez un sistema de clasificación para la endometriosis. Esta clasificación fue revisada en el año 1985 y publicada en el año 1996 (Tabla 1) (Canis et al., 1997). La nueva clasificación eliminó la estadificación de extensión, quitó la endometriosis tubárica como categoría separada, creó una categoría para enfermedad mínima, diferenció lesiones superficiales y profundas del peritoneo y los ovarios, incorporó más detalles para las adherencias anexiales, cuantificó las adherencias membranosas y densas, consideró la obliteración del fondo de saco posterior como enfermedad severa y duplicó la asignación de la puntuación y tuvo en cuenta patología adicional.

Esta clasificación ha sido muy útil para documentar la enfermedad pero en general no es útil clínicamente en la predicción del pronóstico u opciones de manejo tanto para el dolor como para la infertilidad (Adamson, 2011).

1.4. ESTEROIDEOGENESIS OVÁRICA

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el estradiol y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstenediona, testosterona, 17 α -hidroxiprogestero y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina y la relaxina. Las células principales de producción esteroidea se localizan en el ovario y son la granulosa, la teca y las células del cuerpo lúteo, que poseen el sistema enzimático complementario completo requerido para la síntesis de estas hormonas.

		ENDOMETRIOSIS	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm
PERITONEO		superficial	1	2	4
		profunda	2	4	6
OVARIO	D	superficial	1	2	4
		profunda	4	16	20
	I	superficial	1	2	4
		profunda	4	16	20
		OBLITERACIÓN DE FONDO DE SACO POSTERIOR		parcial	completa
				4	40
		ADHERENCIAS	<1/3	1/3-2/3	> 2/3
OVARIO	D	membranosas	1	2	4
		densas	4	8	16
	I	membranosas	1	2	4
		densas	4	8	16
TROMPAS	D	membranosas	1	2	4
		densas	4*	8*	16
	I	membranosas	1	2	4
			4*	8*	16

ENDOMETRIOSIS ADICIONAL

Para ser usado con
Trompas y Ovarios normales

**PATOLOGÍA ASOCIADA**

Para ser usado con y/o
Trompas y Ovarios anormales



Si la fimbria de la trompa de Falopio está completamente obliterada, cambiar la puntuación a 16.

Tabla 1 : Clasificación de la endometriosis. Adaptada de (Canis et al., 1997).

Los esteroides ováricos derivan del colesterol. La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario deriva de la captación del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El colesterol se transporta después a las membranas mitocondriales, donde comienza la biosíntesis esteroidea. La proteína reguladora aguda (StAR) es la principal transportadora de colesterol

desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria, donde se encuentran la mayoría de las enzimas que intervienen en la esteroideogénesis. Por tanto, hay dos pasos limitantes en este proceso: la entrada del colesterol a la mitocondria de las células tecaes, reguladas por la proteína StAR (Hasegawa et al., 2000); y la conversión de androstenediona a estrona por la aromatasa en las células de la granulosa.

La producción de esteroides durante el ciclo menstrual está en función del contenido de cuatro enzimas clave, que son la CYP desramificante, la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD), la 17-hidroxilasa (CYP17A1) y la aromatasa. Estas enzimas catalizan la conversión de colesterol a pregnenolona, de pregnenolona a progesterona, de pregnenolona a andrógenos y finalmente de andrógenos a estrógenos.

Tanto las células tecaes como las del cuerpo lúteo son capaces de sintetizar elevadas cantidades de andrógenos, mientras que las células granulosas no son capaces de ello. El último paso para la biosíntesis de los estrógenos es la aromatización del anillo A de los andrógenos utilizando la enzima aromatasa, que está presente en grandes cantidades en las células granulosas, por lo que estas células son capaces de transformar los andrógenos en estrógenos.

1.4.1. TEORÍA DE LAS DOS CÉLULAS

La producción de esteroides ováricos es un proceso complejo que incluye diferentes vías de señalización en distintas células. Un folículo típico de mamífero está constituido por al menos cuatro tipos celulares. Cada folículo contiene un ovocito rodeado por células de la granulosa. Éstas células están rodeadas a su vez por una capa externa de células de la granulosa, que a su vez están rodeadas por las células tecaes (Figura 2) (Hawkins & Matzuk, 2008).

La esteroideogénesis parece producirse mediante el modelo de las “dos células/dos gonadotrofinas”, donde los andrógenos son sintetizados a partir del colesterol en las células de la teca estimuladas por LH, seguidos por la conversión a estrógenos en las células de la granulosa expuestas a estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH). Los receptores de LH y la enzima 17-hidroxilasa, que convierten pregnenolona y progesterona a dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente, son expresados principalmente en las células tecaes, mientras que los receptores de FSH y la enzima aromatasa, que convierten andrógenos a estrógenos, son expresados predominantemente en las células de la granulosa (Figura 3) (Hannon & Flaws, 2015).

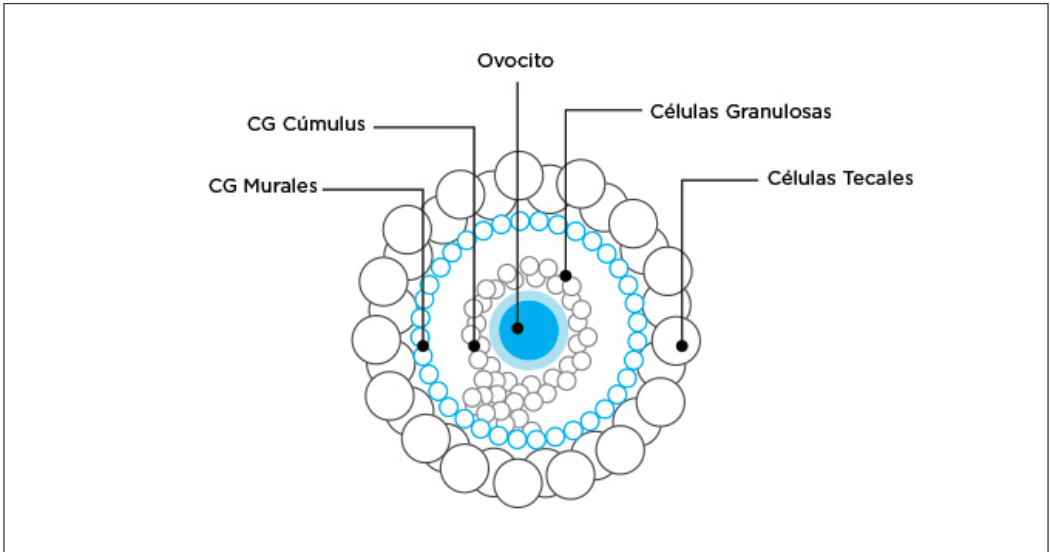


Figura 2: Anatomía del folículo ovárico. Adaptada de (Hawkins & Matzuk, 2008).

Tanto las células de la teca como las células granulosas expresan la proteína StAR, la enzima CYP11A1 y la β -HSD. Por tanto, ambos tipos celulares son capaces de sintetizar pregnenolona y progesterona a partir del colesterol. Sin embargo, en la fase folicular, las células de la granulosa relativamente avascularizadas ven limitada su disponibilidad de oxígeno y de colesterol,

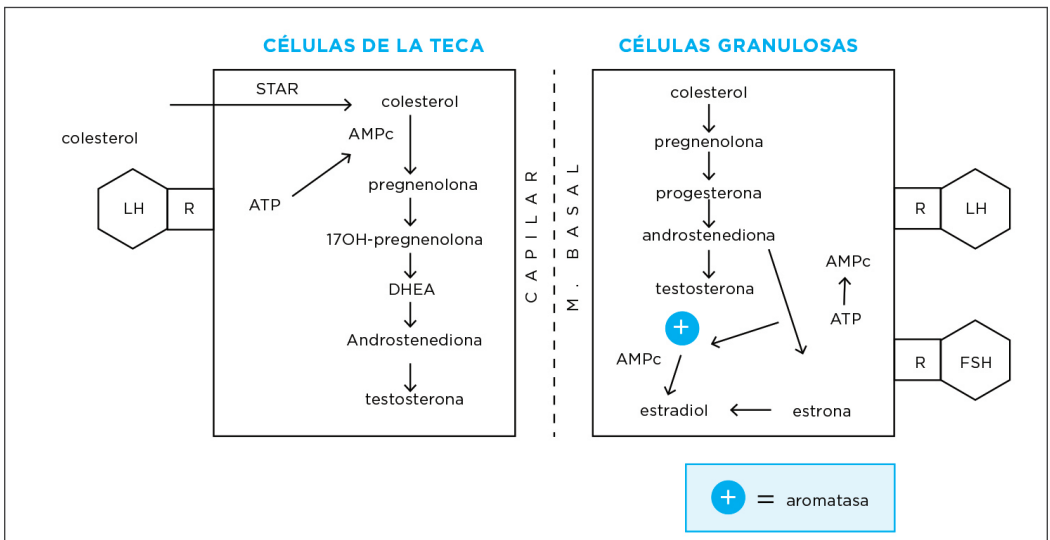


Figura 3: Teoría de las dos células. Adaptada de (Hannon & Flaws, 2015).

por lo que producen bajas cantidades de estos esteroides. En cambio, tras la exposición a gonadotrofinas, las células de la granulosa se luteinizan y adquieren capacidad de sintetizar grandes cantidades de pregnenolona y progesterona (Havelock, Rainey and Carr 2004). Dado que las células de la granulosa carecen de la enzima CYP17A1, no pueden convertir progestágenos a andrógenos, como ocurre en las células tecales, por lo que la mayor producción de progesterona por parte del ovario proviene de la células de la granulosa más que de las células tecales..

1.5. PAPEL DE LA AROMATASA. PARTICULARIDADES EN LA ENDOMETRIOSIS.

La aromatasa, también denominada estrógeno sintetasa, es una enzima del citocromo P450 de 503 aminoácidos que cataliza la formación de estrógenos aromáticos C18 a partir de andrógenos C19 (Figura 4). Se la simboliza como CYP19A1.

La aromatasa se localiza en el ovario y en la placenta y participa en la regulación de distintas funciones reproductivas. La enzima además está ampliamente distribuída en el tejido extragonadal como músculo, hígado, folículos pilosos, tejido adiposo y cerebro.

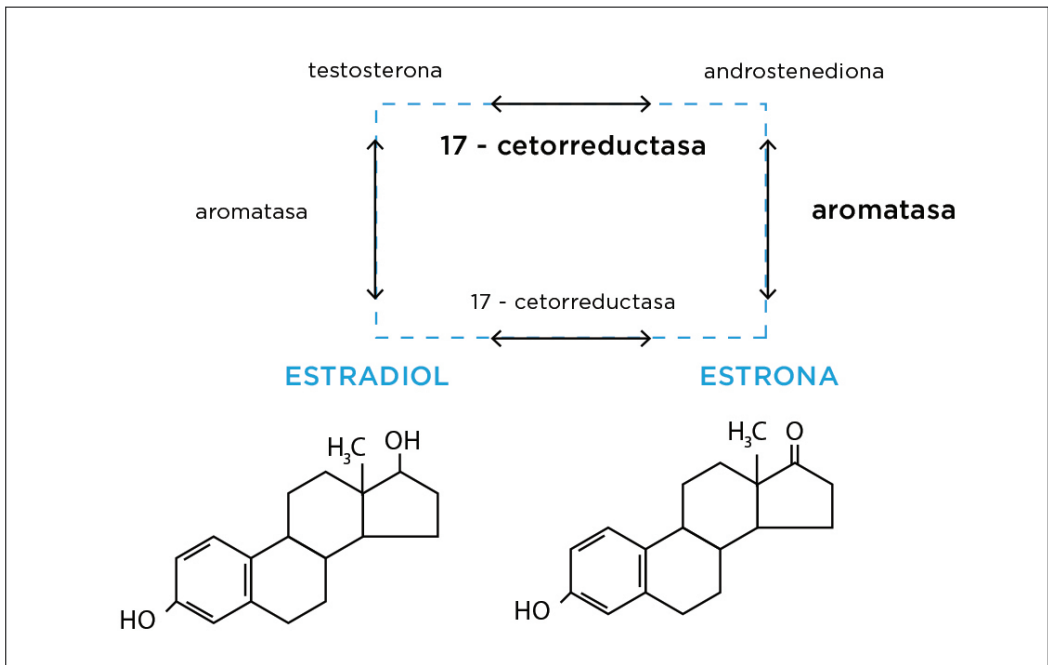


Figura 4: Acción de la aromatasa.

El gen está localizado en el cromosoma 15q21.2, con un tamaño de 130554 pares de bases (pb) y 10 exones que lo conforman y codifican a un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Estas enzimas son monooxigenasas que catalizan varias reacciones involucradas en el metabolismo de fármacos y de la síntesis del colesterol, esteroides y otros lípidos. Estas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico e intervienen en los últimos pasos de la síntesis de estrógenos, tres sucesivas hidroxilaciones del anillo A de los andrógenos. Mutaciones en el gen de la aromatasas pueden resultar tanto en aumento como en disminución de la actividad de la enzima.

El estrógeno constituye un factor determinante para el desarrollo de la endometriosis.

Hay diferencias claras desde el punto de vista molecular entre el tejido endometriótico y el endometrio, como la sobreproducción de estrógenos, prostaglandinas y citoquinas a favor del tejido endometrial (Figura 5). También ocurren diferencias sutiles en el endometrio de una mujer con endometriosis comparado con el endometrio de una mujer sin endometriosis (Noble, Simpson, Johns, & Bulun, 1996).

1.5.1. ENDOMETRIO NORMAL

En el endometrio normal la actividad de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) y por tanto, la producción de la prostaglandina E₂ (PGE₂), es baja. En consecuencia, normalmente, la aromatasas no se expresa en el endometrio. De esta manera no hay una producción local de estrógenos. Este efecto es mantenido por proteínas inhibitoras que se unen al ADN en la región promotora del gen CYP19A1. Estos factores inhibitoras pueden unirse directamente al ADN en la región promotora (inhibidores 1 y 2) o pueden unirse a factores de transcripción y reprimir su actividad a través de interacciones proteína-proteína (correpresores 1 y 2). En la endometriosis, sin embargo, los inhibidores o correpresores están disminuidos o ausentes. En su lugar son sustituidos por proteínas que se unen al promotor del gen CYP19A1 y activan su transcripción. De nuevo, estas proteínas se unen directamente al ADN como factores de transcripción clásicos (estimuladores 1 y 2) o interactúan con proteínas que se unen al ADN y aumentan su actividad transcripcional (coactivadores 1 y 2) (Figura 6) (Bulun et al., 2004).

Durante la fase lútea, la concentración de la enzima dependiente de progesterona 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD17B2) es alta y cataliza la conversión de la molécula biológicamente activa estradiol a estrona, que es menos estrogénica, lo que garantiza la atenuación de los efectos estrogénicos como respuesta a la progesterona (P). Además, la P posee

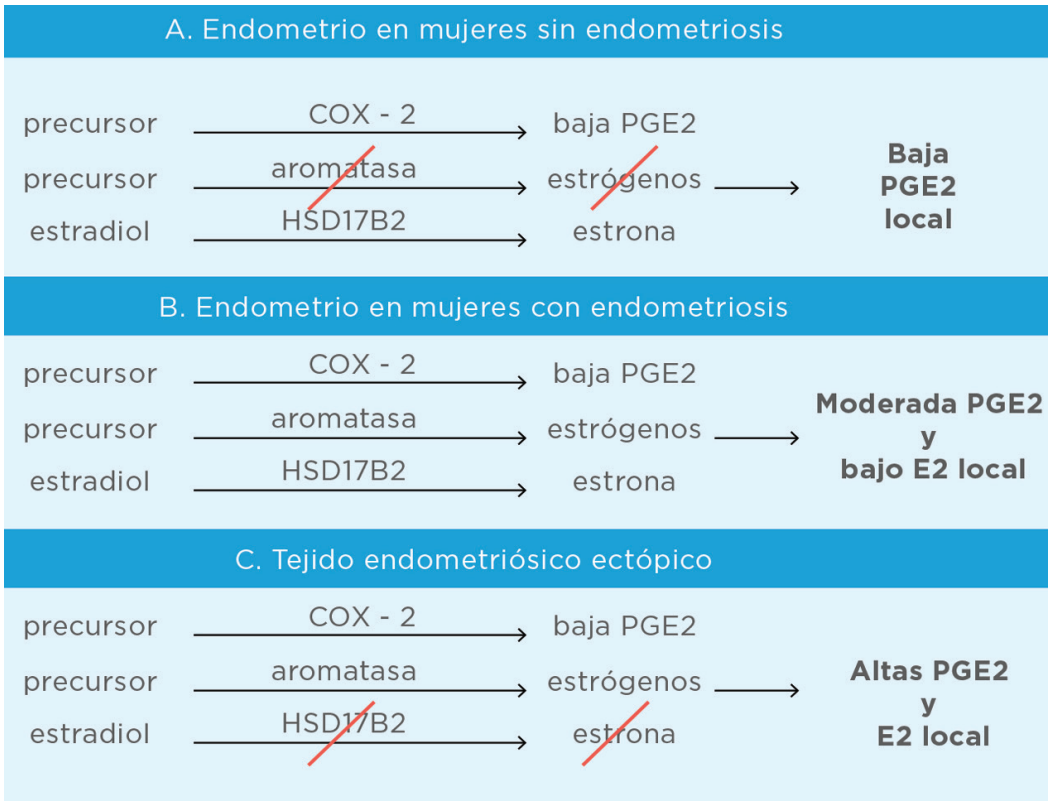


Figura 5: Endometrio normal y endometriosis. Adaptada de (Bulun, 2009). COX-2: ciclooxigenasa-2, PGE2: prostaglandina E2, HSD17B2: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2.

una acción antagonista de los estrógenos en el endometrio normal durante la fase lútea del ciclo. En cambio, en el endometrio de la mujer con endometriosis, hay un leve incremento en la actividad de la enzima COX-2 con una actividad de aromatasa detectable (Figura 5).

1.5.2. IMPLANTE ENDOMETRIÓSICO

Al contrario de lo que pasa en el endometrio normal, se ha demostrado que los implantes endometriósicos expresan aromatasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (HSD17B1), las enzimas implicadas en la conversión de androstenediona en estrona y estrona en estradiol, respectivamente. No obstante, carecen de HSD17B2, la cual inactiva los estrógenos (Bulun, 2009). Esta combinación enzimática garantiza la exposición de los implantes a un ambiente estrogénico.

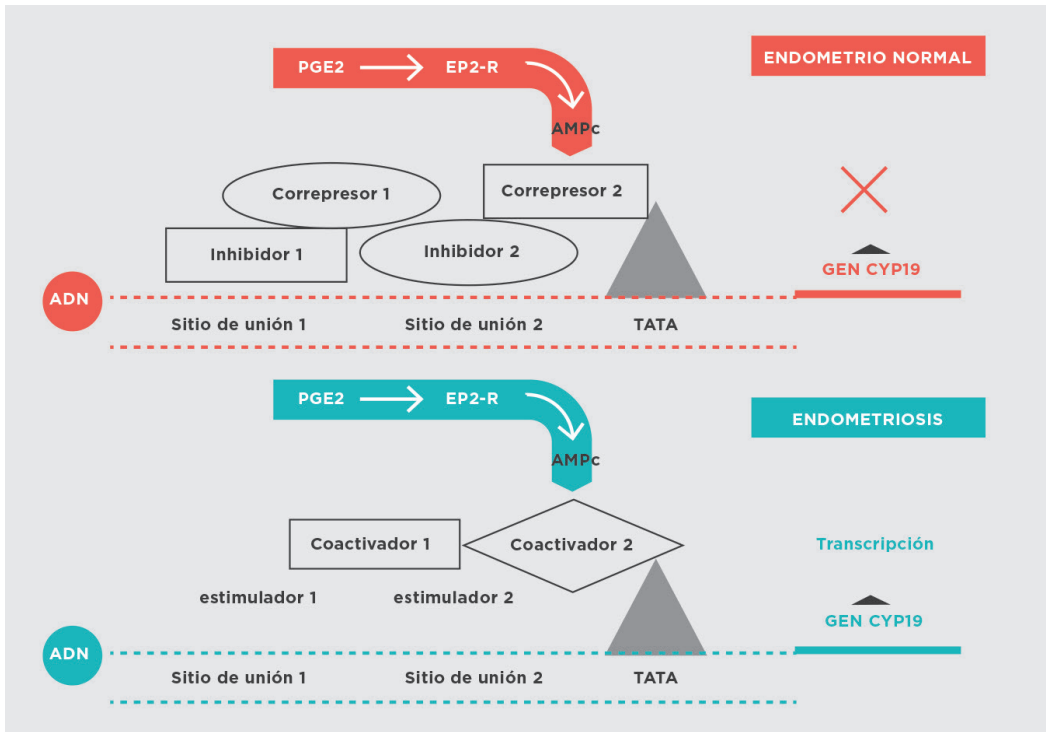


Figura 6: Papel de la aromatasa sobre el endometrio. Adaptada de (Bulun et al., 2004).

La aromatasa es regulada a nivel de la expresión transcripcional, la expresión proteica, y la actividad enzimática en la endometriosis. Está involucrada en un eje de retroalimentación positivo que favorece la expresión de genes clave en la esteroidogénesis. Los estrógenos estimulan la expresión de la enzima COX-2, resultando en niveles elevados de PGE2, que es un potente estimulador de la actividad de la aromatasa en la endometriosis. Esto lleva a una producción continua local de E2 y PGE2 en tejido endometriótico (Figura 7). Sin embargo, la endometriosis representa un estado de resistencia relativa a la P que impide la atenuación de la estimulación estrogénica en este tejido.

Las células endometrióticas y estromales endometriales expresan cada uno de los subtipos de receptores de la PGE2, denominados receptor de prostaglandina E (EP), el EP1, EP2, EP3 y EP4. La activación del receptor EP2 aumenta los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que es el responsable de inducir la expresión de StAR y CYP19A1 por medio de la PGE2 en las células endometrióticas. La PGE2 aumenta los niveles y la actividad de StAR y la aromatasa en células endometrióticas pero no en células estromales endometria-

les (Sun, Hsiao, Hsu, Wu, & Tsai, 2003). Se ha demostrado que el EP2 mantiene el crecimiento en el proceso inflamatorio en el tejido endometriósico. La concentración local de estrógenos de lesiones endometriósicas está altamente correlacionada con los niveles de expresión de la enzima esteroideogénica aromatasa P450. Los niveles elevados de ARN mensajero (ARNm) de la aromatasa han sido descritos en lesiones endometriósicas extraováricas y en endometriomas ováricos. La androstenediona adrenal y ovárica funciona como el sustrato primario para la actividad de la aromatasa en tejido endometriósico, catalizando la reacción que da lugar a la estrona, la cual es convertida en la forma más activa estradiol.

El receptor nuclear factor esteroideogénico 1 (SF1), que está presente en el tejido endometrial ectópico y ausente en el endometrio, es el factor de transcripción clave que media la expresión de StAR, CYP19A1 y posiblemente otros genes esteroideogénicos en las células endometriales. Su ausencia en células endometriales sería la principal causa de la falta de respuesta a la PGE2 de los genes que intervienen en las esteroideogénesis (Bulun et al., 2005).

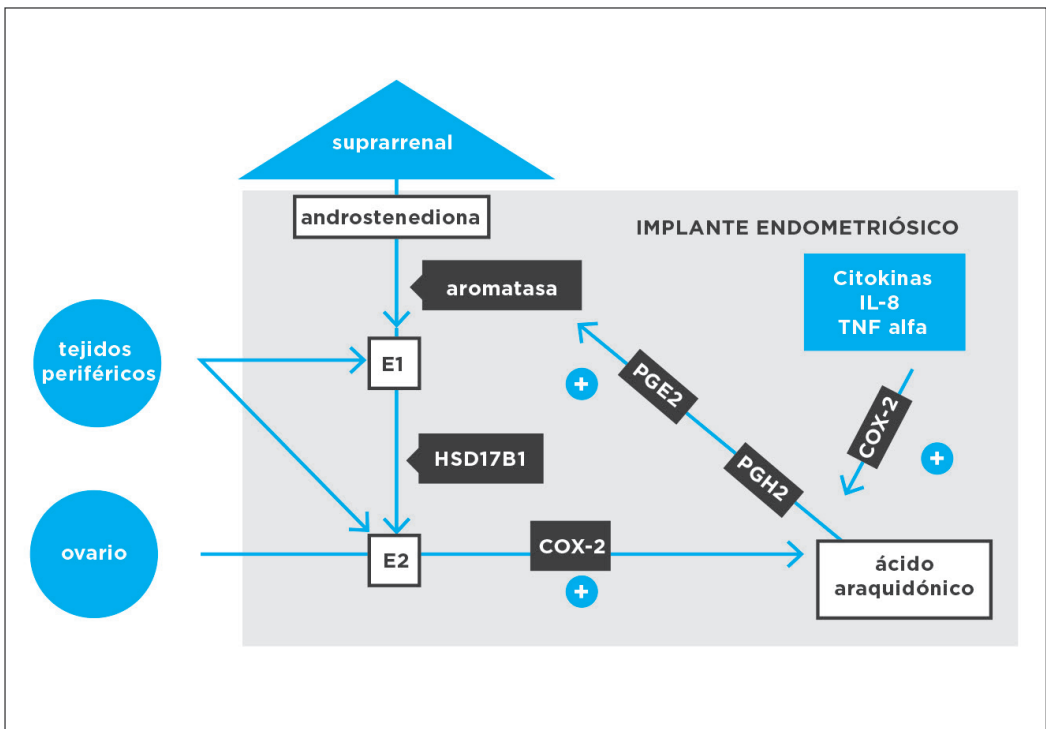


Figura 7: Papel de la aromatasa en el implante endométrico. Adaptada de (Bulun et al., 2004)

1.5.3. CÉLULAS DE LA GRANULOSA

Los niveles más altos de la aromatasa están en las células de la granulosa ovárica en mujeres premenopáusicas, mientras que el tejido adiposo se convierte en el tejido con mayor expresión de la aromatasa en la postmenopausia. El principal producto de las células de la granulosa ovárica durante la fase folicular es el estradiol.

La aromatasa juega un papel fundamental en la maduración folicular y en el establecimiento de la calidad ovocitaria (Hamel et al., 2008). Al contrario de lo observado en tejido endometriósico, donde se produce un aumento en la expresión de aromatasa (Noble et al., 1996) (Šmuc et al., 2009), estudios in vitro en cultivos de células de la granulosa luteinizadas demostraron una disminución en la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa de mujeres con endometriosis comparadas con mujeres sin endometriosis, lo que podría llevar a defectos de la esteroideogénesis en dichas células y un anormal funcionamiento de ovocito (Harlow et al., 1996) (Lauriane Giselle de Abreu et al., 2006). Sin embargo, los datos en relación a la expresión del gen CYP19A1 en CGM son controvertidos (Lu et al., 2012) y ningún estudio ha valorado la expresión de dicho gen en las CC en mujeres infértiles con endometriosis.

En humanos, la transcripción de gen de la aromatasa está ampliamente regulada bajo el control de promotores usados en forma alternativa tejido-específicos. Hay por lo menos 10 promotores distintos en el gen de la aromatasa que regulan su expresión. Hay una activación tejido y hormono-específica de los promotores mediante el empalme alternativo lo que da lugar a distintos tipos de aromatasa con primer exón variable pero idénticas regiones codificantes. Se ha demostrado que el tejido endometriósico, tanto extraovárico así como los endometriomas ováricos, usan casi exclusivamente el promotor II, que es promotor proximal que responde a PGE2 y monofostato de adenosina para expresar la aromatasa. Por tanto el promotor II, probablemente sea el mediador de la expresión anormal de la aromatasa en el tejido endometriósico (Monga, Ghai, Datta, & Singh, 2011); (Sharma, Ghai, & Singh, 2009).

1.6. EVIDENCIAS ACTUALES DEL USO DE ANÁLOGOS DE GnRH EN EL TRATAMIENTO DE LA ESTERILIDAD POR ENDOMETRIOSIS

Aunque los mecanismos involucrados en la infertilidad de las mujeres con endometriosis, aún no están completamente elucidados, dichos mecanismos podrían ejercer un papel importante en la elección de los tratamientos más efectivos para abordar la enfermedad. Puesto que actúan a distintos niveles de la función del tracto reproductor femenino, las técnicas de reproducción disponibles en la actualidad podrían corregir algunos de los factores etiológicos presentes en estas pacientes y ofrecerles un tratamiento adecuado.

En este sentido, se han ensayado distintas pautas de tratamiento, incluida la administración de fármacos previa o concomitante a la realización de TRA en estas mujeres.

Los análogos del GnRH han sido usados con eficacia en el manejo clínico de la endometriosis desde hace algunos años. En los tratamientos de FIV, han demostrado tener claras ventajas, que incluyen reducción en la tasa de cancelación, disminución en la incidencia de luteinización prematura durante la fase de reclutamiento folicular, mejora en la respuesta en algunas baja respondedoras, aumento de las tasas de embarazo, y la facilidad en el manejo de los pacientes ((MacLachlan et al., 1989) (Shaw et al., 1987) (Frydman et al., 1988)

El pretratamiento con agonistas de GnRH fue de particular interés ya que se ha publicado que aumentaba la tasa de fecundación por ovocito (Curtis et al., 1993) y la tasa de embarazo (Surrey, Silverberg, Surrey, & Schoolcraft, 2002) (Chedid et al., 1995) (Rickes, Nickel, Kropf, & Kleinstein, 2002), reducía el número de cancelaciones (Oehninger, Brzyski, Muasher, Acosta, & Jones, 1989), aumentaba el número de ovocitos y embriones obtenidos y permitía que un mayor número de pacientes tuvieran transferencia embrionaria (Chedid et al., 1995) (Oehninger et al., 1989).

Un estudio demostró un aumento significativo en el número de ovocitos recuperados, de embriones transferidos y en la tasa de embarazo clínico por ciclo en las pacientes con endometriosis moderada-severa tras un tratamiento con acetato de buserelina durante 6 meses previo al inicio del ciclo del FIV, por lo que se sugirió que el tratamiento con el análogo podría reducir el estadio de la enfermedad grave a mínima o leve, mejorando la accesibilidad a los ovarios y probablemente la calidad ovocitaria. (Dicker et al., 1990).

Otros estudios demostraron que el tratamiento con agonistas de GnRH dos a siete meses previos a FIV aumentaba significativamente las tasas de gestación comparado con pacientes que no recibían este tratamiento especialmente en endometriosis III-IV (Marcus & Edwards, 1994) (Nakamura et al., 1992) (Curtis et al., 1993) (Chedid et al., 1995).

Un metaanálisis que incluía los 3 estudios anteriores con un total de 88 vs 77 pacientes concluyó que el pretratamiento de mujeres con endometriosis con agonistas de GnRH durante al menos tres meses (y hasta un máximo de seis meses) previo a la FIV o ICSI aumentó la probabilidad de embarazo clínico por lo menos cuatro veces (Odd ratio 4.28; 95% CI 2.00-9.15) (Sallam et al., 2006).

El incremento en las tasas de recién nacido y embarazo clínico tras la administración de agonista de GnRH en mujeres con endometriosis podría ser debido a la mejora en la calidad ovocitaria, y por ende embrionaria, o a la mejora en la receptividad uterina, llevando a una mejor implantación y disminución de la pérdida de gestaciones muy precoces.

02.

**HIPÓTESIS DE
TRABAJO**

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se han documentado menores tasas de implantación y tasas de embarazos en pacientes infértiles con endometriosis cuando son sometidas a técnicas de reproducción asistida. Una de las razones podría deberse en parte, a una alteración de la calidad ovocitaria. El análisis de expresión de los genes involucrados en la esteroideogénesis folicular en las células de la granulosa de folículos que contienen ovocitos maduros podría ser utilizado para la valoración de la competencia ovocitaria y su papel podría resultar crucial en la determinación de la calidad del embrión y su potencial implantatorio. Entre ellos, el gen *CYP19A1* que codifica a la aromatasa P450, una de las enzimas presente en las CC que sintetiza estrógenos a partir de andrógenos, cumple un papel fundamental en la maduración folicular y en la calidad ovocitaria. La actividad de la aromatasa está disminuída en las CC en mujeres con endometriosis, lo que podría alterar el proceso de esteroideogénesis en estas células y, en consecuencia, el normal funcionamiento y competencia ovocitaria. Son pocos los estudios publicados que valoran la expresión de la aromatasa en CC.

Estudios previos concluyeron que la administración durante 3 a 6 meses de un análogo de GnRH previa a la realización de una FIV multiplica por 4,5 veces la posibilidad de que se produzca un embarazo. Este hecho podría estar relacionado con modificaciones en la expresión del gen de la aromatasa que proporcionarían un microambiente folicular que mejorara la competencia de los ovocitos en pacientes con endometriosis y que favoreciera la calidad de los embriones y su implantación.

Por tanto, la administración de un análogo de GnRH durante los 3 meses previos a la realización de una FIV puede alterar la expresión de aromatasa en las células de la granulosa, y este efecto puede estar relacionado con la calidad ovocitaria y embrionaria, las tasas de gestación e implantación.

La hipótesis del presente proyecto de investigación es demostrar que los niveles de expresión de la aromatasa en células de la granulosa de mujeres infértiles con endometriosis que realizan TRA con o sin la administración previa de un análogo de GnRH durante los tres meses previos a la realización de una FIV están relacionados con la calidad ovocitaria y embrionaria y las tasas de implantación.

03.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Comparar los niveles de expresión del gen de la aromatasa (CYP19A1) en células de la granulosa de mujeres infértiles con endometriosis que realizan estimulación ovarica controlada, pre-tratadas con un análogo de GnRH frente a un placebo durante los tres meses previos a la realización de una FIV.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar los niveles de estradiol, testosterona y androstenediona en el líquido folicular de dichas pacientes.
- Evaluar posibles diferencias entre los dos grupos de otras variables clínicas relacionadas con la calidad ovocitaria, calidad embrionaria y tasa de implantación.
- Estudiar si existen diferencias en la expresión génica entre las células del cúmulo (CC) y las células murales (CGM).

04.

**MATERIAL Y
MÉTODOS**

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DE ESTUDIO

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos, se desarrolló un proyecto de investigación realizado en el ámbito de un ensayo clínico. El ensayo clínico que se llevó a cabo fue prospectivo, aleatorizado, doble ciego, controlado de mujeres diagnosticadas con endometriosis que realizaron un tratamiento mediante FIV/ICSI. El estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, fue autorizado por la Agencia Española del Medicamento y producto Sanitario (AEMPS) y registrado en ClinicalTrials.gov con el identificador NCT01581359.

4.2. ÁMBITO DE REALIZACIÓN

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

4.3. DURACIÓN DEL ESTUDIO

El período de inclusión de los pacientes fue de 18 meses a partir del inicio del estudio en octubre 2013 y se dió por finalizado con la inclusión de la última paciente reclutada en marzo de 2015.

4.4. PACIENTES

En el estudio se incluyeron un total de 40 pacientes distribuidas en dos grupos: 20 casos y 20 controles. Las pacientes fueron seleccionadas de entre las que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, aceptaron su participación en el estudio y firmaron el consentimiento informado. A partir de este momento fueron asignadas de manera aleatorizada a un grupo de estudio o placebo, y el ciclo de FIV o ICSI se inició 3 meses después.

4.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los criterios de inclusión para el estudio se muestran en la Tabla 2.

Mujeres infértiles diagnosticadas de endometriosis mediante cirugía en el año previo a su inclusión en el estudio con signos de enfermedad residual y/o por la existencia de un endometrioma ovárico en ecografía vaginal susceptibles de tratamiento mediante FIV o ICSI
IMC <28 Kg/m ²
Edad menor de 40 años
Firma de consentimientos informados para la práctica de una FIV y para la participación en este estudio

Tabla 2: Criterios de inclusión.

Para la determinación de la expresión de la aromatasa y niveles hormonales en líquido folicular se incluyeron a aquellas pacientes en las que se había obtenido al menos 1 complejo ovocito-cumulus aspirado de forma individualizada en cada ovario.

4.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los criterios de exclusión para el estudio (Tabla 3):

FSH día 2 ^o -5 ^o del ciclo >12 UI/L
Hepatopatía (sALAT>80 UI/L)
Patología renal (Creatinina >130 nmol/L)
Otra patología relevante que contraindique una gestación

Tabla 3: Criterios de exclusión.

4.5. PROCEDIMIENTOS

El método de asignación al grupo de estudio fue mediante aleatorización a grupo de intervención o no según bloques permutados con sobre cerrado. La responsable de la randomización fue la investigadora principal y las tres inyecciones subcutáneas mensuales fueron administradas en la consulta por la enfermera asignada al estudio. El grupo de estudio al que pertenecían las pacientes fue ciego para los clínicos que realizaron los procedimientos de estimulación ovárica, punción folicular y transferencia embrionaria y para los embriólogos que realizaron las técnicas de reproducción asistida y también durante el procesamiento de las muestras para el estudio de la expresión génica.

4.5.1. TRATAMIENTO PREVIO A LA FIV

En el estudio se analizaron 2 grupos de pacientes: un grupo de casos (grupo 1), que recibió agonistas de GnRH y un grupo de control (grupo 2) que recibió placebo.

El grupo 1 recibió una inyección subcutánea del agonista de GnRH (*Fármaco experimental: Gonapeptyl Depot 3,75 mg - Acetato de triptorelina, Ferring S.A.U., Alemania*) los días 1, 28 y 56 después de un ciclo menstrual espontáneo o inducido con estroprogestativos orales.

El grupo 2 recibió una la inyección subcutánea con el mismo dispositivo de administración, y con el mismo volumen de suero fisiológico, según el mismo esquema que las pacientes del grupo 1 (*Fármaco control: Placebo - Suero fisiológico*). La estimulación ovárica se inició el día 80 (+/- 3 días) en ambos grupos (Figura 8).

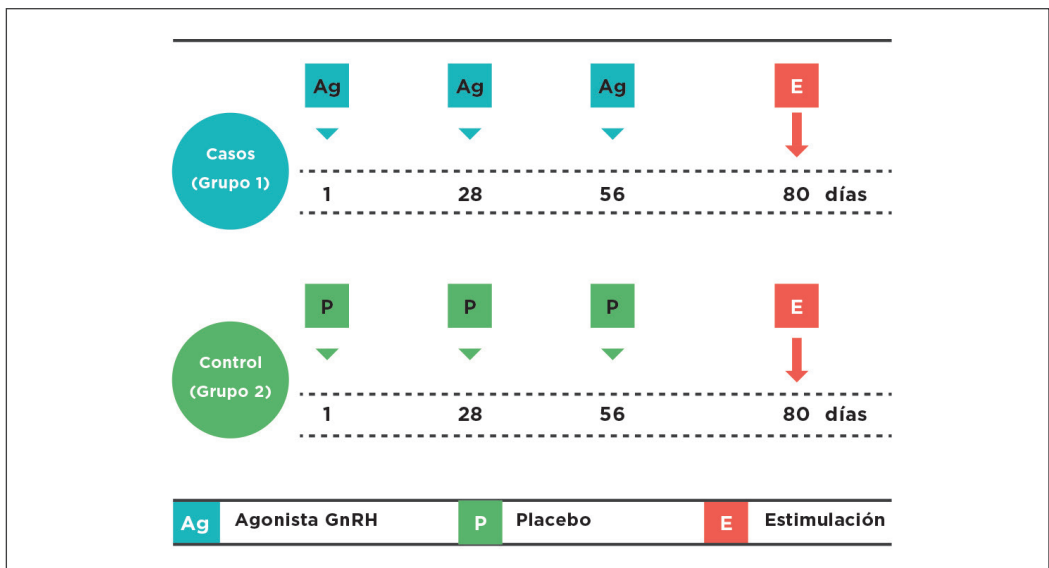


Figura 8: Esquema de pauta de tratamiento.

La medicación del estudio o el placebo, en su caso, fueron proporcionados por el Servicio de Farmacia.

El cumplimiento con la aplicación de los fármacos del estudio se garantizó por el hecho de que los fármacos en investigación fueron administrados por un miembro del equipo investigador en el Hospital.

4.5.2. ESTIMULACIÓN OVARICA

A excepción de la asignación de pacientes a un grupo de estudio, la estimulación ovárica, la punción ovárica, la ICSI, la evaluación de la fecundación y desarrollo embrionario y la transferencia embrionaria se realizaron de acuerdo con los protocolos habituales del centro.

Las pacientes fueron tratadas con gonadotrofinas asociadas a antagonistas de GnRH (0,25 mg de Ganirelix -Orgalutran, MSD, Madrid ó 0,25 mg de Cetorelix -Cetrotide, Merck, Madrid) a partir del 6º día de estimulación o de la visualización de al menos un folículo de diámetro igual o mayor a 14 mm. La dosis inicial de gonadotrofinas se calculó en base al recuento de folículos antrales y a los niveles de FSH o hormona antimülleriana (AMH) y en ningún caso fue superior a 300 UI. La dosis diaria de gonadotrofinas se modificó o ajustó hasta una dosis máxima diaria de 450 UI/día de hMG (Menopur, Ferring S.A.U., Madrid) sola o asociada a FSH (Puregon, Merck, Barcelona o Gonal, Merck, Madrid).

Se realizaron controles de crecimiento folicular con valoración de estradiol en sangre circulante y medición del número y diámetro de los folículos por ecografía vaginal.

La inducción de la ovulación se realizó con una dosis de 250 µg de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Ovitrelle 250 µg, Merck, Madrid) cuando se visualizó ecográficamente al menos tres folículos de diámetro medio de 16 mm, y al menos uno de ellos mayor de 17 mm.

4.5.3. PROCEDIMIENTO DE ICSI

PUNCIÓN FOLICULAR

Treinta y seis horas después de la administración de hCG los ovocitos fueron obtenidos en quirófano mediante punción-aspiración folicular por vía vaginal guiada por ecografía bajo sedación. La punción se realizó a través del fondo de saco vaginal posterior utilizando una aguja de punción de diámetro entre 17 y 18 g conectada a un sistema de aspiración (160-180 mmHg) que termina en un tubo colector del líquido folicular.

Se aspiró de forma aislada el primer folículo de cada ovario para el estudio de expresión del gen CYP19A1 en las células de la granulosa y en las células del cúmulo, y el líquido folicular para la determinación de los niveles de estradiol (E2), testosterona (T) y androstenediona (A).

AISLAMIENTO DE MUESTRAS

En las muestras obtenidas mediante punción ovárica del primer folículo aspirado de cada ovario se aislaron:

- líquido folicular (LF)
- las células Granulosas Murales (CGM)
- las células del Cúmulo Ooforo (CC)

LÍQUIDO FOLICULAR (LF) Y CÉLULAS GRANULOSAS MURALES (CGM)

Se aspiró el contenido del primer folículo con diámetro mayor de 16 mm de cada ovario puncionado. Se excluyeron del análisis los líquidos foliculares hemáticos o aquellos de los que no se recuperó un ovocito maduro metafase II. De forma resumida, cada muestra de líquido folicular fue centrifugada para el aislamiento de las células mononucleares, entre las cuales, cabe suponer que se localizaban las potenciales CGM. El líquido folicular fue almacenado a -80°C en tubos individuales para la determinación posterior de concentración de E2, A y T. Las CGM fueron introducidas en criotubos y almacenadas a -80°C para el posterior estudio de la expresión génica. Todas las muestras fueron etiquetadas para su posterior estudio de forma ciega en cuanto al grupo de estudio.

Protocolo de Recogida de LF y CGM

En el laboratorio de FIV, en campana de flujo laminar con superficie calefactada, se visualizó el líquido folicular aspirado del primer folículo puncionado del primer ovario y se recuperó el complejo cúmulo-ovocito (COC) en placa de lavado constituida de medio tamponado. El COC recuperado se mantuvo en placa de cultivo en microgotas individualizadas constituidas por medio IVFTM (Vitrolife) y aceite mineral (Sigma-Aldrich). Se repitió el proceso para el COC del primer folículo puncionado del segundo ovario.

Al finalizar la punción folicular, y una vez recuperados todos los COC visualizados de los folículos totales puncionados, la placa de cultivo se mantuvo en el incubador hasta la decumu-

lación ovocitaria y el líquido folicular aspirado correspondiente al primer folículo puncionado de cada uno de los ovarios se recuperó en el tubo de aspiración para su procesamiento mediante gradiente por centrifugación.

Se repartió el líquido folicular recuperado en tubos estériles de 15 ml Falcon (Falcon), previa adición de Hystopaque-1077 (Sigma-Aldrich) atemperado a temperatura ambiente en cada uno de los tubos estériles. Se añadió el doble de volumen de líquido folicular por cada volumen de Hystopaque-1077. Se centrifugó a 800 G durante 30 minutos.

Pasado ese tiempo de centrifugación, se obtuvieron 3 fases diferenciadas: en la fase intermedia, en la que se visualiza el halo celular, se localizaban las células mononucleares, entre las que estaban potencialmente las células de interés, las CGM.

Con una aguja estéril acoplada a una jeringa de insulina estéril se recuperó el volumen necesario de líquido folicular y se transfirió a un tubo seco BD Vacutainer SST™ Advance (BD) y se almacenaron a -80°C .

Las células de la interfase obtenidas por cada ovario se recuperaron en condiciones de esterilidad y se resuspendieron en PBS y posteriormente se lavaron mediante centrifugación a 600 G durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las CGM fueron introducidas en criotubos y almacenadas a -80° .

CÉLULAS DEL CÚMULO OOFORO (CC)

En forma resumida, los dos cúmulos aislados (el del primer folículo aspirado de cada ovario), fueron cultivados en medio de cultivo IVFTM (Vitrolife), cubierto con aceite mineral (Sigma-Aldrich) e incubado a 37°C en 5% de CO_2 y 95% de humedad durante 2-3 horas. Al cabo de este tiempo, el ovocito fue decumulado cuidadosamente de forma mecánica inicialmente y posteriormente de forma enzimática. Las CC obtenidas fueron introducidas en un criotubo y almacenadas a -80°C hasta la extracción de ARN. El ovocito correspondiente fue microinyectado para su fecundación.

Protocolo de Recuperación de las Células del Cúmulo circundantes a los COC recuperados

A las 3 horas de finalizar la punción folicular se procedió a la decumulación ovocitaria en condiciones de esterilidad y en campana de flujo laminar.

Con ayuda de dos agujas estériles acopladas a dos jeringas de insulina estéril se realizó, de forma individual, en primer lugar la decumulación mecánica de cada uno de los dos COC de interés en placa de cultivo en dos gotas individualizadas. Posteriormente el COC decumulado mecánicamente se transfirió y se disgregó enzimáticamente en hialuronidasa en la placa de decumulación.

Una vez finalizado el proceso de decumulación, y conocido el estadio madurativo del ovocito en cada uno de los COC, se recuperaron las células disgregadas en cada microgota de la placa de cultivo y se introdujeron en un criotubo.

Las células recuperadas tras la disgregación enzimática, se lavaron 3 veces en condiciones de esterilidad mediante resuspensión en PBS y centrifugación a 600 G durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las CC obtenidas fueron introducidas en un criotubo.

Finalizadas las centrifugaciones, los tubos con las suspensiones celulares recuperadas se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

ICSI

Todos los ovocitos obtenidos fueron decumulados a las 3 horas tras la captación. Los maduros o metafase II (MII), caracterizados por la extrusión del primer cuerpo polar, fueron utilizados para la ICSI mediante la introducción, de manera artificial, de un espermatozoide en el citoplasma del ovocito con un micromanipulador Olympus IX70 (Olympus America Inc, Melville, NY). La valoración morfológica de los embriones se realizó siguiendo los criterios propuestos por ASEBIR (“Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir,” n.d.). Se determinó el número total de ovocitos maduros, ovocitos microinyectados y fecundados, y embriones obtenidos.

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria se realizó dos o tres días después de la microinyección. El número de embriones transferidos se consensuó con el laboratorio de forma individual en cada paciente teniendo en cuenta las circunstancias personales, clínicas y reproductivas de cada una de ellas. En ningún caso se transfirió más de 2 embriones. La transferencia embrionaria se realizó en quirófano adyacente al laboratorio, vía vaginal, previa visualización y antisepsia de vagina y cérvix y evitando su manipulación excesiva. El movimiento del catéter a través del cérvix se controló mediante ecografía transabdominal.

El soporte de la fase lútea se realizó con 200 mg de progesterona natural micronizada (Progeffik caps 200 mg, Laboratorios Effik, Madrid o Utrogestan caps 200 mg, de SEID, Barcelona) cada 12 horas via vaginal desde el día de la transferencia embrionaria.

4.5.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA AROMATASA

Los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN) son polímeros de nucleótidos formados por un azúcar de cinco carbonos, una base nitrogenada y una molécula de fosfato. El ADN es la molécula que contiene la información genética de las células. El ARN está involucrado en la síntesis de proteínas siendo un producto intermedio de la expresión génica en el citoplasma y en el núcleo. La expresión de los genes es la base del metabolismo celular, y por ésta se entiende que el ADN se transcribe en ARN, que a su vez se traducen en proteínas. Esta secuencia constituye el dogma central de la biología molecular (Figura 9).



Figura 9: Dogma central de la biología molecular.

Hay tres tipos de ARN: el ARN mensajero (ARNm), el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosomal (ARNr). Este último, que constituye la mayor parte de ARN en las células, forma a los ribosomas junto con las proteínas que facilitan el acoplamiento específico entre el ARNm y los ARNt para la traducción a proteínas.

En los últimos años los estudios de biología molecular se han esforzado en entender las funciones metabólicas de los diferentes componentes biológicos mediante el uso y la aplicación de técnicas moleculares basadas en la amplificación del ADN y el ARN. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o ARN de una muestra. Utilizando cebadores específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARNm. Cuando la RT-PCR se combina con una reacción de retro-transcripción puede determinarse la cantidad de moléculas de ARNm de una muestra permitiendo así el análisis de la expresión génica.

El siguiente diagrama esquematiza la metodología empleada en el estudio de expresión génica de la aromatasa (Figura 10).

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

El primer paso para la determinación de la expresión de la aromatasa fue la extracción del ARN de las CGM y las CC obtenidas. Para tal fin, se trabajó según el protocolo *Quick-RNA™ MicroPrep* Zymo Research de la casa comercial Zymo Research Corp. No se ha hecho ninguna modificación, salvo en el último paso, en el que se utilizó un volumen final de 15 µl para la elución final del ARN.

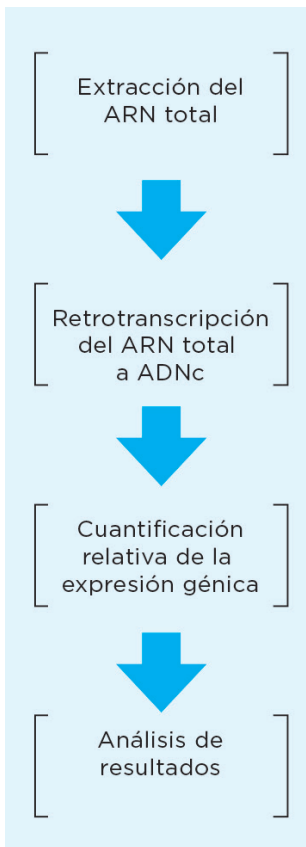


Figura 10: Pasos para la realización de la expresión de la aromatasa.

La concentración del ARN total extraído se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-2000 (Thermo Scientific).

Protocolo de extracción de ARN (Quick-RNA™ MicroPrep Zymo Research)

El aislamiento de ARN consistió en un primer paso de lisis/homogenización de las muestras, un segundo paso de tratamiento con ARNasa de la muestra, y por último la purificación del ARN. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente.

Para la lisis/homogenización, debido a la baja celularidad recuperada de cada líquido folicular obtenido, se procedió a realizar la extracción de ARN, mediante un primer paso de lisis celular mediante adición de 100 µl de solución de lisis y posterior centrifugación a 15000 G, se eliminó completamente el sobrenadante y luego se resuspendió el botón celular con la solución de lisis de ARN.

El segundo paso consistió en un tratamiento con ARNasa con una centrifugación a 16000 G durante un minuto. Luego, se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de ARNasa.

El último paso fue la purificación del ARN. Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 16000 G. Se añadió 1 volumen de etanol (95-100%) a la muestra en solución de lisis de ARN

(1:1) mezclándolo bien. Luego se transfirió la mezcla a la columna Zymo-Spin™ IC Column en un tubo de recogida y se centrifugó durante 30 segundos tras lo cual se desechó el líquido fluído. Se añadieron 400 µl de la solución Prep ARN a la columna y se centrifugó durante 30 segundos. Se desechó el remanente. Se dispensaron 700 µl de la solución de lavado de ARN a la columna y se centrifugó 30 segundos. Se desechó el remanente. Se añadieron 400 µl de la solución de lavado de ARN y se centrifugó la columna durante 2 minutos para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Se pusieron las columnas en un tubo libre de ARNasa. Se añadieron 15µl agua libre de ADNasa/ARNasa directamente a la columna, y se centrifugaron a 16000g durante 30 segundos.

El ARN elucionado se guardó congelado a -80°C.

RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN TOTAL A ADNc

La transcripción reversa (RT) es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN (Figura 11).

Para la RT se trabajó según el protocolo *RT-PCR-High Capacity cDNA Reverse Transcription* de la casa comercial Applied Biosystem (Warrington, UK).

Protocolo de Transcripción Reversa (RT-PCR-High Capacity cDNA Reverse Transcription):

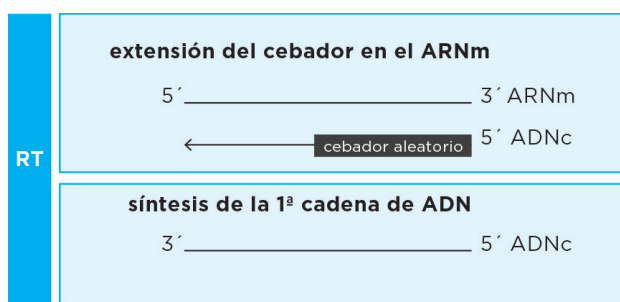


Figura 11: Retrotranscripción del ARN.

Se trabajó a partir del ARN extraído, a una concentración de 500 ng para todas las muestras. El volumen final de reacción fue de 40 µl constituidos por 20 µl de la solución de mezcla (Tabla 4) y 20 µl del ARN a la concentración indicada. Las condiciones térmicas utilizadas según proto-

colo (Tabla 5). Se realizó en el termociclador T3000 Thermocycler Biometra. El producto final se diluyó con agua libre de ARNasa hasta una concentración del ADNc a 200 ng.

CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Componentes	Volumen (μ l)
10X RT buffer	4,0
25X dNTP Mix (100 mM)	1,6
10X RT Random Primers	4,0
Multiscribe Reverse Transcriptase	2,0
ARNasa Inhibidor	2,0
Agua libre de ribonucleasa	6,4
Volumen total	20

Tabla 4: Componentes de la solución de mezcla.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura ($^{\circ}$ C)	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 seg	∞

Tabla 5: Condiciones térmicas de la reacción.

La amplificación de la secuencia diana, utilizando ADNc como molde, es el siguiente paso en el proceso de RT. En este paso, la ADN polimerasa amplifica el ADNc diana sintetizado a partir de la muestra de ARN, usando cebadores específicos de secuencia y sondas marcadas con fluoróforos.

Este paso se realizó mediante cuantificación fluorescente relativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-RT-PCR).

La PCR cuantitativa a tiempo real es una técnica muy sensible que permite conocer de forma cuantitativa el número de copias de un determinado gen, siempre normalizado respecto a un gen endógeno de expresión constitutiva, para tener en cuenta la variabilidad en la concentración inicial y la calidad del ARN total y la eficacia de la conversión de la reacción de la transcripción reversa.

Brevemente, la técnica emplea una serie de primers o cebadores específicos para el gen objeto de estudio, así como una sonda TaqMan MBG probe, también específica. La particularidad de esta sonda consiste en que posee en el extremo 5´ un agente fluoróforo (6-FAM). En el extremo 3´ consta de un agente amortiguador no fluoróforo, NFQ (NonFluorescent Quencher). La sonda cuenta además con el MGB (Minor Groove binder) que permite aumentar la Tm de la sonda sin incrementar su longitud. La técnica aprovecha la capacidad 5-3´ exonucleasa de la ADN polimerasa. De este modo, mientras la sonda está íntegra, el extremo 3´ amortigua la fluorescencia del fluoróforo. Sin embargo, la ADN polimerasa en su avance, al ir sintetizando la hebra complementaria, rompe la sonda, liberando el extremo 5´ con el fluoróforo que deja de estar bajo la influencia del amortiguador o quencher, emitiendo fluorescencia (Figura 12).

Para tal fin, se trabajó según el protocolo *TaqMan® Gene Expression Master Mix* proporcionado por la casa comercial Applied Biosystems (Warrington, UK). Cada muestra ha sido remitida para Q-RT-PCR por triplicado.

En cuanto al resto de la técnica, simplemente consiste en la síntesis exponencial de copias de unos 100-600 pares de bases a partir de una molécula mayor de ADN de doble cadena (en este caso ADNc sintetizado a partir del ARN en la reacción de RT).

Protocolo de Amplificación y Cuantificación Relativa de la expresión (TaqMan® Gene Expression Master Mix):

La TaqMan® Gene Expression Master Mix es una mezcla de componentes necesario para realizar una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. Dicha mezcla contiene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP (Ultra Pure), Glicosidasa Uracil-ADN (UDG), trifosfatos desoxirribonucleótidos (dNTPs) con trifosfato desoxiuridina (dUTP), ROXTM Passive Reference (referencia interna para la normalización, para corregir las fluctuaciones de fluorescencia) y tampones.

El estudio de expresión del gen codificante de aromatasas en las células foliculares fue analizado bajo las siguientes condiciones: se trabajó a partir del ADNc a concentración de 200 ng. El volumen final utilizado fue de 10 µl por muestra, constituido por 1 µl de ADNc y 9 µl de la solución de mezcla para cada uno de los dos genes analizados (el gen de estudio: CYP19A1 y el gen endógeno 18S) (Tabla 6). La solución de mezcla para la reacción de PCR estaba constituida por TaqMan Universal PCR Master Mix, Taq Man Gene Expression Assay (para cada uno de los genes de estudio), más agua libre de RNAsas.

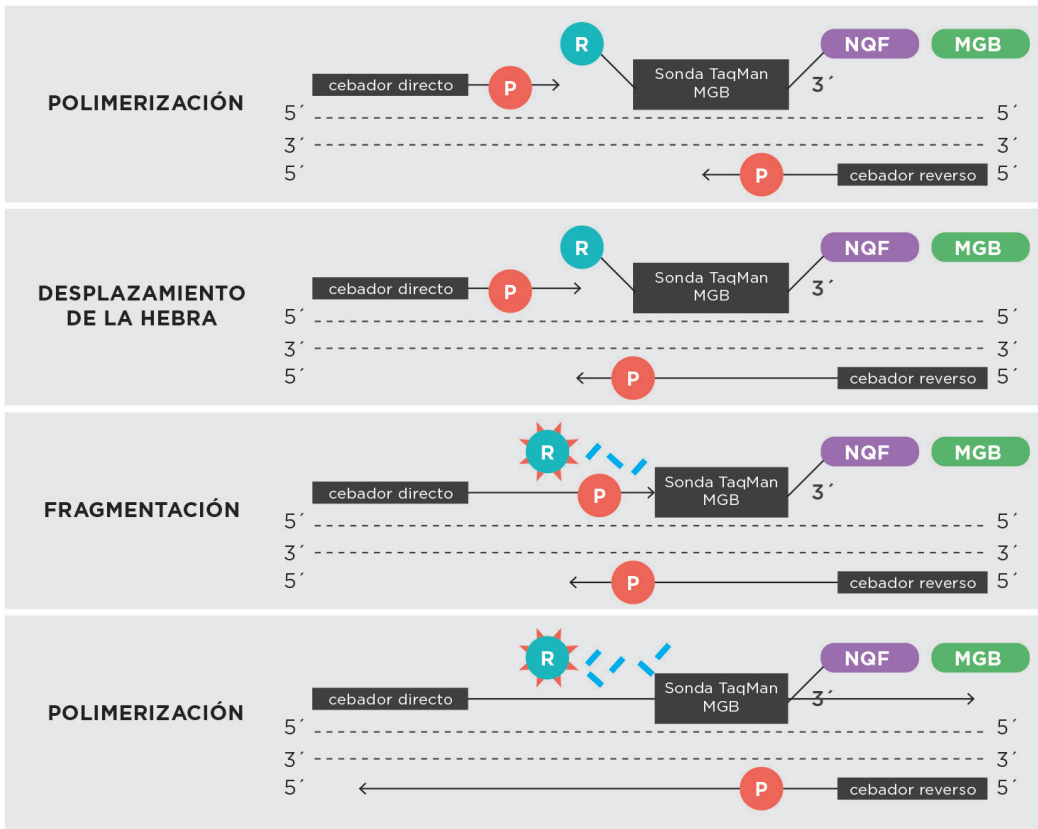


Figura 12: Explicación de la generación de fluorescencia en la reacción PCR cuantitativa a tiempo real por el avance de la enzima polimerasa sobre la sonda marcada con un fluoróforo. Adaptada de TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol (Applied Biosystems). NQF: Nonfluorescent quencher, MGB: Minor Groove binder, R: Reporter, P: AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP

El estudio de expresión del gen codificante de aromatasa en las células foliculares fue analizado bajo las siguientes condiciones: se trabajó a partir del ADNc a concentración de 200 ng. El volumen final utilizado fue de 10 μ l por muestra, constituido por 1 μ l de ADNc y 9 μ l de la solución de mezcla para cada uno de los dos genes analizados (el gen de estudio: CYP19A1 y el gen endógeno 18S) (Tabla 6). La solución de mezcla para la reacción de PCR estaba constituida por TaqMan Universal PCR Master Mix, Taq Man Gene Expression Assay (para cada uno de los genes de estudio), más agua libre de RNAasas.

Las condiciones de reacción incluyen un paso inicial a 50 °C durante 2 minutos (incubación UDG), seguido por 95 °C durante 10 minutos (activación enzimática AmpliTaq Gold, UP), 95

Componente	Master Mix CYP19A1 ($\mu\text{l}/\text{muestra}$)	Master Mix 18S ($\mu\text{l}/\text{muestra}$)
Taq Man Gene Expression Master Mix 2X	5,0	5,0
Taq Man Gene Expression Assay 20X	0,5	0,5
Agua libre de ribonucleasa	3,5	3,5
Volumen total	9,0	9,0

Tabla 6: Componentes de la solución de mezcla.

$^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos (desnaturalización) y 60°C durante 1 minuto (anillamiento y extensión) ($\times 40$ ciclos). El paso de 2 minutos a 50°C es necesario para una óptima actividad enzimática UDG. El paso de 10 minutos a 95°C es necesario para activar la enzima AmpliTaq Gold.

Las sondas empleadas fueron las correspondientes al gen de estudio es CYP19A1 y al gen endógeno es 18 S de Applied Biosystems. La cuantificación se realizó en el equipo ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos de luminiscencia que cada muestra proporcionó para cada gen, se designan como ciclo umbral (Ct) (Figura 13). Ct es el ciclo en el cual se observa por primera vez un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia. El análisis de expresión se hizo mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se calculó la media del Ct para cada muestra, y a éste se le restó el Ct del control endógeno 18S. Mediante este cálculo, se obtuvo el dato ΔCt . A su vez, a este valor se le restó el ΔCt de la muestra que se tomó como referencia de expresión normal, que en nuestro caso fue un pool de muestra control (CGM y CC de mujeres sanas). El valor final se conoce como $\Delta\Delta\text{Ct}$ y a su valor negativo en potencia de base 2 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$), RQ (Relative Quantification). El dato de RQ se calcula debido a que supone una ayuda visual a la hora de entender el resultado, pero no constituye una escala lineal. Los valores de RQ al no cumplir una escala lineal no son aptos para su uso en cálculos estadísticos.

En la gráfica el eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La línea de base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y sólo se detecta la fluorescencia basal. El umbral es donde se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y el corte entre el umbral y la curva de amplificación determina el Ct o ciclo umbral que

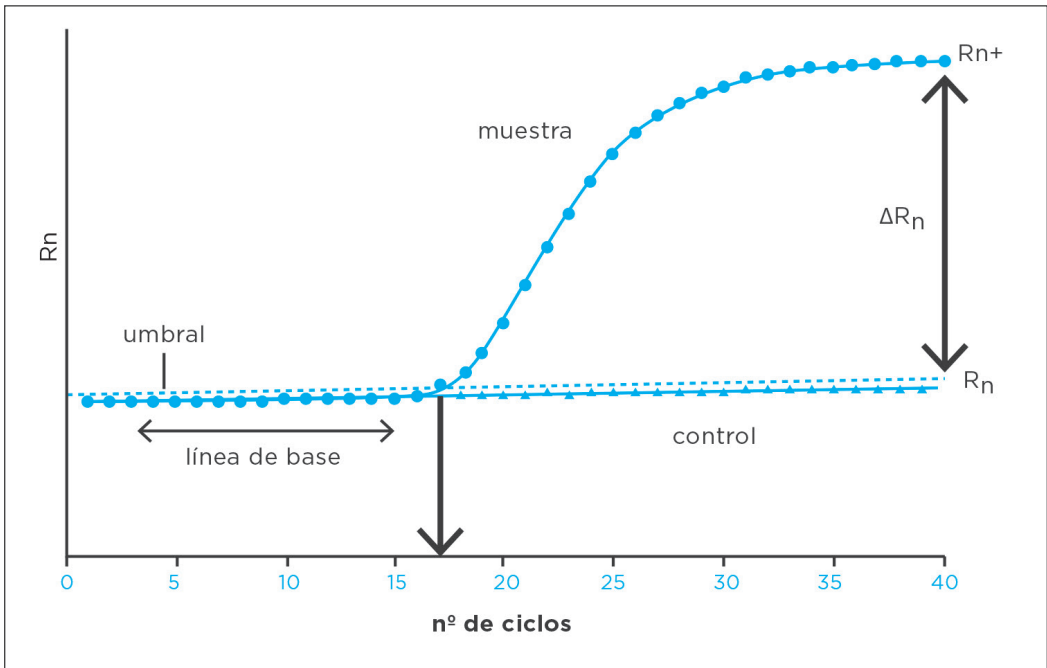


Figura 13: Gráfica amplificación de PCR a tiempo real.

se emplea para la cuantificación. Ciclo Umbral (C_t) es el ciclo en el cual se observa por primera vez un aumento estadísticamente significativo del ΔR_n . El cálculo de C_t siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.

En el presente trabajo, los datos se analizaron con el programa RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems) y el software Sistema de Detección de Secuencia (SDS) tanto para el cálculo automático como manual para fijar el valor basal y umbral de las curvas de amplificación.

4.5.5. DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES EN LÍQUIDO FOLICULAR

Las determinaciones hormonales se ha realizado mediante quimioluminiscencia. La quimioluminiscencia es una técnica muy sensible de inmunoanálisis que se define como la emisión de luz que se asocia con la disipación de la energía de una sustancia electrónicamente excitada. Cuando los electrones de un compuesto luminiscente son estimulados con una luz emiten energía, también en forma de luz, al regresar a su estado inicial de no excitación. Esta emisión de luz se produce debido a los compuestos químicos con propiedad de emitir luz cuando se oxidan con peróxidos en presencia de algunos catalizadores.

DETERMINACIÓN DEL ESTRADIOL Y TESTOSTERONA

Para las determinaciones de estradiol y testosterona se utilizó un inmunoensayo magnético quimioluminiscente (Architect de Abbott Diagnostics).

Este ensayo usa micropartículas paramagnéticas recubiertas de moléculas de captura específica para el analito que se quiere medir, un conjugado marcado con acridinio y solución de preactivadora y activadora (Figura 14).



Figura 14 : Componentes del inmunoensayo quimioluminiscente magnético.

Brevemente, en una cubeta de reacción se pipetea primero las micropartículas que se unen con la muestra. Se incuba y se forma el inmunocomplejo. Un imán atrae a las micropartículas paramagnéticas y se produce el lavado que arrastra lo que no se ha unido. Se dispensa luego el conjugado marcado con acridinio quimioluminiscente y se vuelve a incubar, tras lo cual se lava. Se dispensa la solución preactivadora (peróxido de hidrógeno) que evita que se pierda luz, evita aglutinaciones y separa el colorante acridinio del complejo. Posteriormente se dispensa la solución activadora (hidróxido de sodio) que oxida el acridinio y provoca la reacción quimioluminiscente. La reacción quimioluminiscente resultante es medida como una medida de Unidad Relativa de Luz (URL).

Determinación de Estradiol

Para la determinación del E2 se utilizó el ensayo de *Architect Estradiol* (Architect Estradiol System-Abbott).

Para su determinación analítica, se ha trabajado según el protocolo proporcionado por la casa comercial Abbott Diagnostics siguiendo la metodología arriba mencionada. En concreto, en este ensayo las micropartículas paramagnéticas estaban cubiertas con anticuerpos monoclonales antiestradiol. Existe una relación inversa entre la cantidad de estradiol en la muestra y la URL detectada por el sistema óptico del sistema.

Las muestras con valores por encima de 1000 pg/mL fueron diluídas

Protocolo de dilución de Estradiol

Las muestras con valores por encima de 1000 pg/ml fueron identificadas con el código “>1000” y fueron diluídas mediante el Protocolo de Dilución Automática (PDA): el sistema realizó una dilución 1:5 de la muestra y automáticamente calculó la concentración de la muestra no diluída e informó el resultado. Las muestras con concentraciones de estradiol mayores a 5000 pg/ml fueron identificadas con el código “>5000” cuando se procesan con el PDA. Estas muestras fueron diluídas con el Protocolo de Dilución Manual (PDM) con una dilución sugerida es 1:10. El operador introdujo el factor de dilución. El sistema utilizó el factor de dilución para calcular automáticamente la concentración de la muestra previo a la dilución, siendo éste el resultado informado. La concentración de la muestra diluída (antes que se corrija con el factor de dilución) debía ser mayor que 100 pg/ml.

Características analíticas específicas

La precisión del ensayo fue < 5 pg/ml (total SD) para concentraciones en el rango del control bajo (45 pg/ml) y $\leq 7\%$ (total CV) para concentraciones en el rango del control medio (190 pg/ml) y control alto (600 pg/ml). La sensibilidad analítica fue ≤ 10 pg/ml. La sensibilidad funcional del ensayo fue ≤ 25 pg/ml y la interferencia potencial de la hemoglobina (a 500 mg/dl), bilirrubina (a 20mg/dl), triglicéridos (a 1000 mg/dl), proteínas (a 4 y 12 g/dl) y colesterol (a 240 mg/dl) en los niveles indicados fue $\leq 10\%$.

El anticuerpo es altamente específico para estradiol, con reactividad cruzada extremadamente baja a otros esteroides naturales o drogas terapéuticas que puedan estar presentes en las muestras.

Determinación de Testosterona

Para la determinación de T se utilizó el ensayo de *Architect 2nd Generation Testosterone* (Architect 2nd Generation Testosterone System-Abbott).

Para su determinación analítica, se ha trabajado según el protocolo proporcionado por la casa comercial Abbott Diagnostics siguiendo la metodología arriba mencionada. En concreto, en este ensayo las micropartículas paramagnéticas estaban cubiertas con anticuerpos monoclonales antitestosterona.

La concentración de testosterona fue interpolada a partir de una curva de calibración establecida con calibradores de concentración conocida de testosterona.

Las muestras con valores de testosterona por encima de 35 nmol/L fueron diluídas.

Protocolo de dilución de Testosterona

Las muestras con valores de testosterona por encima de 35 nmol/L fueron identificadas con el código “>35” y diluídas mediante el PDA por el cual el sistema realizó una dilución 1:4 de la muestra y automáticamente calculó la concentración de la muestra no diluída e informó el resultado.

Características analíticas específicas

El ensayo fue diseñado para tener una imprecisión intra-laboratorio (total) de $\leq 10\%$ CV para muestras con concentraciones ≥ 0.5 nmol/l a 35 nmol/l.

La sensibilidad (el límite de cuantificación) fue de 0.08 nmol/l (2.30 ng/dl).

La interferencia potencial del ensayo de hemoglobina, bilirrubina, triglicéridos, proteínas, y biotina fue $\leq 10\%$.

El anticuerpo es altamente específico para T, con reactividad cruzada extremadamente baja a otros esteroides naturales o drogas terapéuticas que puedan estar presentes en las muestras.

DETERMINACIÓN DE LA ANDROSTENEDIONA

Para la determinación de A se utilizó un inmunoensayo por micropartícula, que se basa en el aislamiento de inmunocomplejos en una superficie de fase sólida de pequeñas esferas

denominadas micropartículas de látex. El inmunoensayo por micropartículas emplea los siguientes componentes: fase sólida micropartícula-anticuerpo, conjugado anticuerpo-enzima (la enzima fosfatasa alcalina unida al anticuerpo) y un sustrato de enzima quimioluminiscente (Figura 15).



Figura 15: Componentes del inmunoensayo por micropartículas.

El ensayo utilizado para tal fin fue IMMULITE 2000 Androstenediona (Inmulite 2000-Siemens) que es un inmunonálisis enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.

Para la determinación analítica, se ha trabajado según el protocolo proporcionado por la casa comercial Siemens que incluye un ciclo de incubación de 60 minutos.

Los pasos de la reacción son muy similares en los descrito anteriormente.

Características analíticas específicas (los resultados se expresan en ng/ml):

El factor de conversión $\text{ng/ml} \times 3,4916 = \text{nmol/l}$. El intervalo de calibración en el ensayo fue 0,3-10 ng/ml (1,04-35 nmol/l) y la sensibilidad analítica de 0,3 ng/ml (1,0 nmol/l)

En cuanto a la especificidad, el anticuerpo es altamente específico para androstenediona, con reactividad cruzada extremadamente baja a otros esteroides naturales o drogas terapéuticas que puedan estar presentes en las muestras.

Las muestras con valores por encima de 10 ng/ml fueron identificadas con el código ">10" y diluídas mediante el PDA

4.6. CLASIFICACIÓN OVOCITARIA Y EMBRIONARIA

Todos los ovocitos obtenidos en este estudio fueron clasificados según su estadio de maduración nuclear y según los parámetros morfológicos utilizando los criterios de ASEBIR (“Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir,” n.d.) (Tabla 7 y 8).

Los parámetros evaluados en el estadio de ovocitos incluidos en la clasificación son:

- a). Alteraciones morfológicas citoplasmáticas, que incluyen la agrupación de organelas / granulosidad localizada en el centro del ovocito, la agregación del retículo endoplásmico liso, la presencia vacuolas y las inclusiones intracitoplasmáticas (Tabla 7-a).
- b). Alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas, que incluyen los exudados en el espacio perivitelino, las anomalías de la zona pelúcida, el espacio perivitelino aumentado y las alteraciones del primer corpúsculo polar (Tabla 7-b y Tabla 7-c).
- c). Complejo cúmulo-corona radiada-ovocito: el grado de madurez del complejo fue utilizado como indicador de la madurez ovocitaria, aunque la sincronía entre ambos es cuestionable, sobre todo en ciclos estimulados.

Los parámetros evaluados en la valoración morfológica embrionaria incluidos en la clasificación se muestran en la Tabla 8.

En el estadio D+1:

- a). Alteraciones morfológicas, que incluyen el número y la apariencia de los corpúsculos polares, número pronuclear, la apariencia de los pronúcleos, el halo citoplasmático
- b). La división temprana.

En el estadio D+2 y en D+3

- a). El número celular y el ritmo de división
- b). El porcentaje y tipo de fragmentación celular
- c). La desigualdad en el tamaño de los blastómeros
- d). El contorno del blastómero

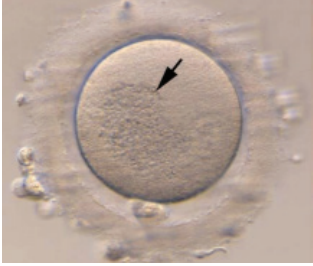


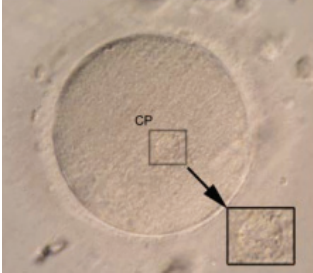
Parámetros evaluados	Descripción (M.O.)	Imagen
Agrupación de organelas/granulosidad en el centro del ovocito	Masa individual y oscura con un contenido excesivo de gránulos. Normalmente situada en la porción central.	
Agregación del retículo endoplásmico liso (AREL)	Inclusión citoplasmática individual elíptica y de tamaño semejante a un pronúcleo.	
Vacuolas	Inclusiones citoplasmáticas rodeadas de membrana y llenas de fluido. Número y tamaño variable.	
Inclusiones citoplasmáticas	Incluyen diversos tipo de características citoplasmáticas: cuerpos necróticos, cuerpos refringentes (aislados o agrupados), cuerpos picnóticos no refringentes (en forma de herradura)	

Tabla 7-a: Valoración morfológica del ovocito. Según (“Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir,” n.d.). MO: microscopio óptico.

Parámetros evaluados	Descripción (M.O.)	Imagen
Exudados del espacio perivitelino	Presencia de granulosidad o detritus extracitoplasmáticos	
Anomalías de la zona pelúcida	Contorno no circular, cambios del grosor (gruesa), abultamientos y presencia de septos	
Espacio perivitelino aumentado	Incremento del espacio perivitelino que hace que el ovocito quede flotando en el interior de la zona pelúcida	

Tabla 7-b: Valoración morfológica del ovocito. Según ("Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir," n.d.). MO: microscopio óptico.

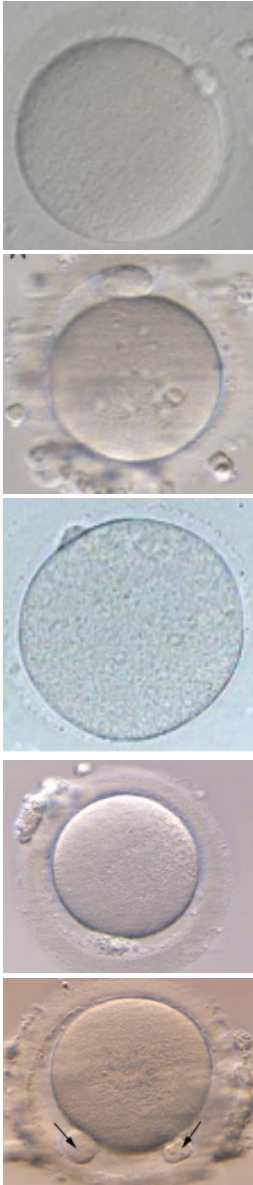
Parámetros evaluados	Descripción (M.O)	Imagen
<p>Alteraciones del primer corpúsculo polar (1°CP)</p>	<p>La morfología cambia después de unas horas en cultivo. Se describen corpúsculos de diferentes tamaños (grande, normal o pequeño), dobles, fragmentados</p>	 <p>The image column contains five vertically stacked micrographs of oocytes. The top image shows a normal oocyte with a single, well-defined polar body. The second image shows a large oocyte with a large polar body. The third image shows a small oocyte with a small polar body. The fourth image shows a double oocyte with two polar bodies. The bottom image shows a fragmented oocyte with multiple polar bodies, indicated by two black arrows.</p>

Tabla 7-c: Valoración morfológica del ovocito. Según (“Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir,” n.d.). MO: microscopio óptico

Día	Intervalo de observación	Parámetros evaluados
D+1	16 a 19 hs postmicroinyección (recomendado)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alteraciones morfológicas 2. Corpúsculos polares (CP): número y apariencia <ul style="list-style-type: none"> • Número pronuclear • Apariencia de los pronúcleos (PN): <ul style="list-style-type: none"> - Simetría, sincronía y localización - Precusores nucleolares (número, simetría y polarización) • Halo citoplasmático (presencia y aspecto) 3. División temprana
D+2	44 a 47 hs postmicroinyección (recomendado)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Número celular y ritmo de división 2. Porcentaje y tipo de fragmentación celular 3. Desigualdad en el tamaño de los blastómeros 4. Contorno del blastómero
D+3	67 a 71 hs postmicroinyección (recomendado)	<ol style="list-style-type: none"> 5. Visualización de núcleos y grado de multinucleación 6. Anillo citoplasmático 7. Presencia de vacuolas 8. Zona pelúcida 9. Grado de compactación/adhesión temprana 10. Moteado

Tabla 8: Clasificación morfológica de los embriones. Según ("Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir," n.d.).

- e). La visualización de núcleos y el grado de multinucleación
- f). El anillo acitoplasmático
- g). La presencia de vacuolas
- h). La zona pelúcida
- i). El grado de compactación/adhesión temprana

j). El moteado

En cuanto a la gradación de la calidad embrionaria, la categorización debe realizarse tras las múltiples observaciones realizadas a lo largo del desarrollo preimplantacional. Para el sistema de gradación se ha empleado la opción de 4 categorías divididas en función del potencial implantatorio esperado (Tabla 9). La asignación de un preembrión a una categoría dependerá de las variables morfológicas mencionadas.

La clasificación embrionaria se basa en la observación de los embriones en D+2 y D+3 (Tabla 10)

Categoría	Descripción
A	Preembrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación
B	Preembrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación
C	Preembrión regular con una probabilidad de implantación media
D	Preembrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja

Tabla 9: Esquema de gradación de la calidad embrionaria.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Considerando que cada paciente proporcionaba 2 folículos para el estudio, se calculó que un tamaño muestral de 20 pacientes por grupo detectaría una diferencia de 30% en la expresión de aromatasa, basado en trabajos previos (I. D. E. S. Barcelos et al., 2015) con un 80% de probabilidad y un 5% de significación estadística. Fueron descartados para el análisis estadístico aquellos folículos de los que no se obtuvo ovocito o este no era metafase II. De un total de 40 pacientes seleccionadas, 2 fueron excluidas del estudio debido al incumplimiento del tratamiento. Los resultados del análisis estadístico incluyeron un total de 38 folículos en el grupo control y 36 en el grupo de estudio, a partir de los cuales se obtuvieron 60 folículos maduros o MII. En dos muestras no se pudo determinar los niveles de aromatasa en CGM. En 3 muestras no se obtuvieron CC para el análisis.

Sólo en tres muestras se descartó el LF de uno de los folículos para el estudio hormonal debido a la ausencia de ovocitos.

Se calculó la frecuencia de cada una de las variables investigadas expresando el resultado en media aritmética y desviación estándar para las variables de carácter continuo y frecuencias absolutas y relativas para las categóricas.

Las comparaciones de variables de carácter continuo se realizaron mediante la prueba paramétrica de la t de Student, y en el caso de no cumplirse la hipótesis de normalidad mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney Wilcoxon. Para el estudio de asociación entre variables de carácter categórico se calculó la significación de diferencia mediante la prueba de la Chi-Cuadrado, y en el caso de no cumplirse las condiciones de aplicabilidad de la anterior mediante la prueba exacta de Fisher. Las pruebas de hipótesis se consideraron estadísticamente significativas si la $p < 0.05$.

Calidad	Día Transfer	Nº de células (indica paso de D+2 a D+3)	% Fragmentación	Semejanza de tamaño*	Multinucleación	Citoplasma	Z. Pelúcida
A	D+2	4	≤10%	Iguales o semejantes	No	No vacuolas	Normal
	D+3	4 → 7-8	No tipo IV				
B	D+2	2 ó 5** 4 si frag 11%-25%)	≤ 25%				
	D+3	4 → 7-8 (si frag 11%-25%) 4 → ≥ 9 2 ó 5 → ≥ 7	No tipo IV				

(*) El patrón de semejanza o igualdad entre blastómeros sólo es valorable en estadios 2, 4 y 8 y 16 células.

(**) Con preferencia a 5 células.

Tabla 10: Gradación de la calidad embrionaria en transferencias de D+2 y D+3.

Calidad	Día Transfer	Nº de células (indica paso de D+2 a D+3)	% Fragmentación	Multinucleación	Citoplasma	Siempre que exista
C	D+2	2,4 ó 5 (si frag 26%-35%) 3* ó 6 **	≤35% No tipo IV	No	No o escasas vacuolas	Desigualdad en el tamaño cel. Vacuolas escasas Z. pelúcida anormal sin eclosión asistida ***
	D+3	2 ó 4 ó 5 → ≥7 (si frag 26%-35%) 6 → ≥8 2 ó 4 → 6 3* → ≥ 6				
D	D+2	1 ó > 6 → 3 (células semejantes)				Multinucleación Vacuolas abundantes Fragmentación > 35 Fragmentación tipo IV Anillo acitoplasmático D+3
	D+3	1 ó > 6 → cualquier valor cualquier valor → < 6 de D+2 a D+3 sólo ha aumentado 1 célula				

(*) 1 célula grande y 2 pequeñas.

(**) Con preferencia a 6 células.

(***) Si la única alteración es la ZP anormal se considerará preembrión de calidad C. Si se realiza eclosión asistida pasa a calidad B.

Tabla 10 (cont): Gradación de la calidad embrionaria en transferencias de D+2 y D+3.

Se empleó el programa IBM SPSS Statistics versión 17 para Windows.

4.8. VARIABLES

Se seleccionaron de acuerdo con el marco teórico del estudio y se clasificaron en variables principales relativas al objeto del estudio que se agruparon en aquellas que caracterizan la

expresión del gen *CYP19A1*, las variables para las determinaciones hormonales del líquido folicular y las variables de calidad ovocitaria y de la calidad embrionaria; y las variables secundarias que incluyeron las características clínicas de las pacientes y del proceso de la FIV/ICSI.

Variables Principales

- I. La expresión del gen *CYP19A1* incluyó las siguientes variables cuantitativas:
 - a) Ct CGM: hace referencia al número de copias de gen en las CGM
 - b) Δ Ct CGM: representa el delta Ct, que es el Ct CGM normalizado con un gen endógeno.
 - c) $\Delta\Delta$ Ct CGM: representa el delta del Δ Ct, que es el Δ Ct CGM normalizado con una muestra control.
 - d) Ct CC: hace referencia al número de copias de gen en las CC
 - e) Δ Ct CGC: representa el delta Ct, que es el Ct CGM normalizado con un gen endógeno
 - f) $\Delta\Delta$ Ct CC: representa el delta del Δ Ct, que es el Δ Ct CC normalizado con una muestra control
 - II. Las variables cuantitativas de determinaciones hormonales en el líquido folicular incluidas fueron:
 - a) Estradiol
 - b) Testosterona
 - c) Androstenediona
 - III. Calidad ovocitaria: se incluyeron en este apartado los parámetros de calidad ovocitaria propuestos por ASEBIR. Todas fueron tratadas como variables categóricas.
 - a) Agrupación de organelas/granulosidad en el centro del ovocito
 - b) Agregación del retículo endoplásmico liso
 - c) Presencia vacuolas
 - d) Inclusiones intracitoplasmáticas
 - e) Exudados en el espacio perivitelino
 - f) Anomalías de la zona pelúcida
 - g) Espacio perivitelino aumentado
-

- h) Alteraciones del primer corpúsculo polar
 - i) Complejo cúmulo-corona radiada-ovocito
- IV. Calidad embrionaria: la categorización de esta variable se realizó mediante el sistema de gradación de 4 categorías divididas en función del potencial implantatorio esperado propuestos por ASEBIR. .

Variables Secundarias

- a. Características de las pacientes y datos clínicos
 - Edad de la mujer: se tuvo en cuenta la edad de la mujer, expresada en años cumplidos
 - Edad de la pareja
 - IMC: de la paciente calculado a partir del peso en kg y el cuadrado de la estatura
 - Años de esterilidad: años de esterilidad en la primera consulta
 - Grado de endometriosis
 - Número de endometriomas
 - Bilateralidad
- b. Variables del proceso de FIV/ICSI
 - FSH basal
 - Días de estimulación
 - Niveles de estradiol en día de la HCG
 - Grosor endometrial
 - Diámetro folicular
 - Recuento espermatozoides móviles (REM)
 - Dosis total de gonadotrofinas
 - Número de folículos totales
 - Número de folículos puncionados
 - Número de ovocitos MI recuperados
 - Número de ovocitos MII recuperados

- Tasa de fecundación por ICSI: número de ovocitos fecundados / número de ovocitos microinyectados
 - Tasa de implantación: número de sacos gestacionales visibles por ecografía en semana 5-6/ número total de embriones transferidos
 - Tasa de gestación clínica: número de embarazos diagnosticados ecográficamente/ número de ratamientos iniciados
-

05.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS

5.1.1. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA

Se incluyeron en el estudio un total de 38 pacientes. La edad media en años de las mujeres incluidas fue de $33,72 \pm 2,42$ en el grupo control (edad máxima de 38 años y una edad mínima de 29 años) y de $33,94 \pm 3,67$ en el grupo de estudio (edad máxima 39 y edad mínima de 28 años). En cuanto a la edad de sus parejas, la media de edad fue de $34,88 \pm 3,64$ en los controles y de $36,18 \pm 3,71$ en el grupo de tratamiento, diferencias ambas no significativas (Tabla 11).

En ambos grupos, la diferencia de medias de los años de esterilidad al momento de ser incluidos en el ensayo, tampoco fue significativa, siendo $2,67 \pm 1,19$ en los controles y $2,11 \pm 0,76$ en los casos.

Ambos grupos demostraron no tener diferencias significativas respecto al índice de masa corporal (IMC) ni en los valores de la FSH basal.

Variable	Grupo control media (DE)	Grupo de estudio media (DE)	P
Edad mujer (años)	33,72 (2,42)	33,94 (3,67)	0,83
Edad varón (años)	34,88 (3,64)	36,18 (3,71)	0,31
Años esterilidad	2,67 (1,19)	2,11 (0,76)	0,11
IMC (kg/m ²)	23,32 (3,06)	21,70 (3,60)	0,16
FSH basal (UI/l)	7,58 (1,54)	6,79 (1,36)	0,11

Tabla 11 Caracterización clínica.

En cuanto a las variables grado de endometriosis, número de endometriomas y bilateralidad, ambos grupos no mostraron diferencias significativas.

En cuanto a la distribución según el grado de endometriosis el 72% de las pacientes incluidas presentaron endometriosis mínimo-leve, y el 27,8% correspondieron a endometriosis moderado-severa (Tabla 12). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,46$).

Grado Endometriosis	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
Mínima-leve	12 (67%)	14 (78%)	26 (72,2%)
Moderada-severa	6 (33%)	4 (22%)	10 (27,8%)
Total	18 (100%)	18 (100%)	36 (100%)

Tabla 12: Grado de endometriosis. Test χ^2 . $P=0,46$

En referencia a la distribución en cuanto al número de endometriomas en la muestra, poco más de la mitad de las pacientes (52,7%) tenían 2 o más endometriomas (Tabla 13), no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,23$).

Nº Endometriomas	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
0-1	8 (44%)	9 (50%)	17 (47,3%)
2-4	10 (56%)	9 (50%)	19 (52,7%)
Total	18 (100%)	18 (100%)	36 (100%)

Tabla 13: Número de endometriomas. Test χ^2 . $P=0,46$

El análisis de la bilateralidad de la enfermedad entre ambos grupos tampoco evidenció diferencia estadística significativa ($p=0,55$) (Tabla 14).

Bilateralidad	Grupo Control (n)	Grupo de estudio (n)	Total n (%)
no	5	11	16 (47%)
si	12	6	18 (53%)
Total	17	17	34 (100%)

Tabla 14: Distribución en función de la bilateralidad por grupo. Test χ^2 . $P=0,55$

En resumen, ambos grupos fueron comparables en cuanto a sus características clínicas.

5.1.2. VARIABLES CORRESPONDIENTES AL PROCESO DE FIV/ICSI

En cuanto a las variables que hacen referencia al ciclo de tratamiento, la variable dosis total de FSH fue la única significativamente superior en el grupo de estudio en comparación con el grupo placebo ($2923,53 \pm 862,11$ UI vs $2325,00 \pm 764,39$ UI, respectivamente) ($p=0,04$) (Tabla 15-a).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las demás variables estudiadas (Tabla 15-a): días de estimulación, niveles de estradiol el día de la HCG, grosor endometrial, diámetro folicular ni en el REM.

Variable	Grupo control media (DE)	Grupo de estudio media (DE)	p
Días estimulación	9,41 (1,46)	10,06 (1,56)	0,22
E2 día HCG (pg/ml)	2669,67 (896,87)	2125,07 (558,84)	0,06
Grosor endometrial (mm)	11,50 (2,57)	11,33 (2,02)	0,85
Diámetro folicular (mm)	21,93 (2,09)	21,20 (2,04)	0,35
REM (millones)	38,93 (26,25)	33,29 (22, 19)	0,50
Dosis total FSH (UI)	2325,00 (764,39)	2923,53 (862,11)	0,04

Tabla 15-a: Variables del ciclo de tratamiento.

Como se observa en la Tabla 15-b, el número de folículos totales fue similar y no significativo en términos estadísticos en ambos grupos con una media de $13,84 \pm 7,73$ en el grupo control (con un recuento mínimo de 4 y máximo de 32 folículos) y de $13,00 \pm 5,16$ en el grupo de estudio (con un mínimo de 5 y máximo de 23 folículos). La media del número de folículos puncionados fue de $10,26 \pm 4,84$ y de $9,11 \pm 3,09$ en ambos grupos respectivamente.

El número de ovocitos obtenidos fue de $8,37 \pm 5,09$ para el grupo placebo y de $8,17 \pm 3,54$ en el grupo de tratamiento. La media de los MII obtenidos fue de $6,84 \pm 4,35$ en el grupo control y $5,28 \pm 2,56$ en el grupo de estudio. En cambio, la media de los MI fue $0,26 \pm 0,56$ y $0,61 \pm 0,92$ para ambos grupos respectivamente. En cuanto al número de ovocitos microinyectados, la me-

Variable	Grupo control media (DE)	Grupo de estudio media (DE)	P
n° folículos totales	13,84 (7,73)	13,00 (5,16)	0,70
n° folículos puncionados	10,26 (4,84)	9,11 (3,09)	0,40

Tabla 15-b: Variables del ciclo de tratamiento.

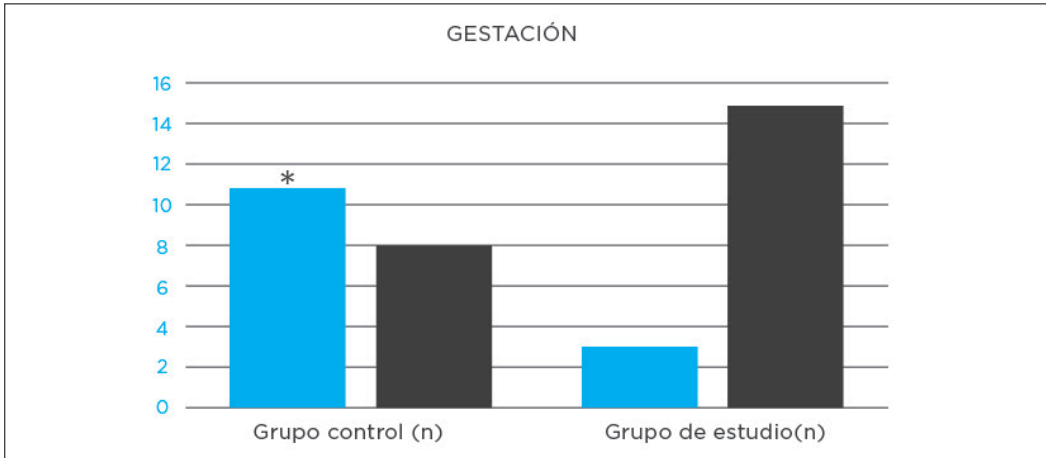
dia calculada fue de $6,84 \pm 4,35$ y de $5,12 \pm 2,23$ en ambos grupos respectivamente. En ninguna de las variables descritas se objetivó una diferencia significativa en ambos grupos (Tabla 15-c).

Donde sí se detectaron diferencias significativas fue en el número de ovocitos fecundados por ICSI, que fue superior en el grupo control con respecto al grupo que recibió el fármaco ($5,21 \pm 3,60$ vs $3,22 \pm 1,99$) ($p=0,04$); y en la tasa de fecundación, que fue mayor en el grupo control ($77,23 \pm 20,44$) con respecto al grupo de estudio $58,92 \pm 28,25$ (Tabla 15-c).

Variable	Grupo control media (DE)	Grupo estudio media (DE)	P
n° de ovocitos	8,37 (5,09)	8,17 (3,54)	0,89
n° ovocitos microinyect.	6,84 (4,35)	5,12 (2,23)	0,14
n° ovocitos fec. por ICSI	5,21 (3,60)	3,22 (1,99)	0,04
Ovocitos MII	6,84 (4,35)	5,28 (2,56)	0,19
Ovocitos MI	0,26 (0,56)	0,61 (0,92)	0,18
Tasa de fecundación	77,23 (20,44)	58,92 (28,25)	0,03

Tabla 15-c: Variables del ciclo de tratamiento.

La tasa de gestación observada fue de 57,9 % en el grupo control y 16,7 % en el grupo de estudio, con un valor de **p=0,01**. En la figura 16 se observa la distribución de número de gestaciones por grupos.



* p=0,01

Figura 16: Gestaciones según grupo.

La tasa de implantación fue significativamente superior en el grupo de placebo comparado con el grupo de estudio (TI= 40,6% vs TI= 14,8%. respectivamente) p=0,02.

5.2. VARIABLES RELACIONADAS CON EL OBJETIVO DEL ESTUDIO

5.2.1. EXPRESIÓN DEL GEN DE AROMATASA EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA

La determinación y comparación de los niveles de expresión del gen de la aromatasa en ambos grupos del ensayo fue el principal objetivo planteado. Concretamente, se analizó su expresión en las Células Murales de la Granulosa y en las Células del Cúmulo de los folículos obtenidos. Para su análisis, el Ct calculado, que representa el número de copias, fue normalizado en todos los casos con el Ct del gen considerado como normalizador o control endógeno, que en nuestro caso fue el gen 18S. Además, cada dato de expresión del gen problema, normalizado con 18S, fue a su vez comparado con el dato de expresión del pool de muestras control que, como corresponde, estaba previamente normalizado por el endógeno ($\Delta\Delta$ Ct).

El análisis estadístico de los resultados procedentes de la PCR cuantitativa fue llevado a cabo comprobando previamente la normalidad o no de la población. Posteriormente se compararon las medias para cada variable en cada grupo.

En cuanto a las variables de estudio de las CGM (Tabla 16-a), los resultados obtenidos para la variable Δ Ct CGM, indicaron niveles de $13,29 \pm 3,52$ en los controles y $14,44 \pm 2,26$ para el grupo de tratamiento, diferencia no significativa. Una tendencia similar siguió la variable $\Delta\Delta$ Ct CGM, que mostró una media con un valor ligeramente inferior en el grupo control con respecto al grupo de estudio ($1,23 \pm 3,19$ vs $1,44 \pm 1,85$). Los intervalos de confianza al 95% calculados aparecen solapados en ambos grupos.

Variable	Grupo control		Grupo de estudio		p
	media (DE)	IC 95%	media (DE)	IC 95%	
Δ Ct CGM	13,29 (3,52)	11,92-14,65	14,44 (2,26)	13,62-15,25	0,13
$\Delta\Delta$ Ct CGM	1,23 (3,19)	-0,01-2,46	1,44 (1,85)	0,77-2,11	0,74

Tabla 16-a: Expresión del gen CYP19A1 en CGM.

Los resultados de las variables CC, Δ Ct CC y $\Delta\Delta$ Ct CC no evidenciaron diferencias significativas (Tabla 16-b).

Variable	Grupo control		Grupo casos		p
	media (DE)	IC 95%	media (DE)	IC 95%	
Δ Ct CC	13,87 (2,70)	12,78-14,96	13,05 (2,73)	12,07-14,03	0,26
$\Delta\Delta$ Ct CC	2,61 (3,96)	1,01-4,21	2,15 (2,99)	1,07-3,23	0,62

Tabla 16-b: Expresión del gen CYP19A1 en CC.

En cada grupo se ha comparado la expresión de aromatasa entre las CGM y del CC sin observarse diferencias significativas entre estos dos grupos celulares.

En los diagramas de caja que ayudan a comprender la distribución de cada una de las poblaciones, se muestran las distribuciones del $\Delta\Delta$ Ct CGM (Figura 17-a) y del $\Delta\Delta$ Ct CC (Figura 17-b) de la aromatasa para ambos grupos. En el diagrama de caja correspondiente al $\Delta\Delta$ Ct CGM, se observó en el grupo control una mediana de 1,58, con valores de $p_{25} = -0,33$ (1º cuartil) y de $p_{75} = 2,65$ (3º cuartil) con un valor máximo de 6,34 y un valor mínimo de -9,24. En el grupo de casos, 1,45 fue la mediana calculada con valores de $p_{25} = 0,45$ y $p_{75} = 2,83$ y valor máximo de 5,05 y mínimo de -3,27.

En el diagrama de caja de $\Delta\Delta$ Ct CC se observó en el grupo control una mediana de 2,92, con valores de $p_{25} = 0,95$ (1º cuartil) y de $p_{75} = 3,47$ (3º cuartil) con un valor máximo de 16 y un

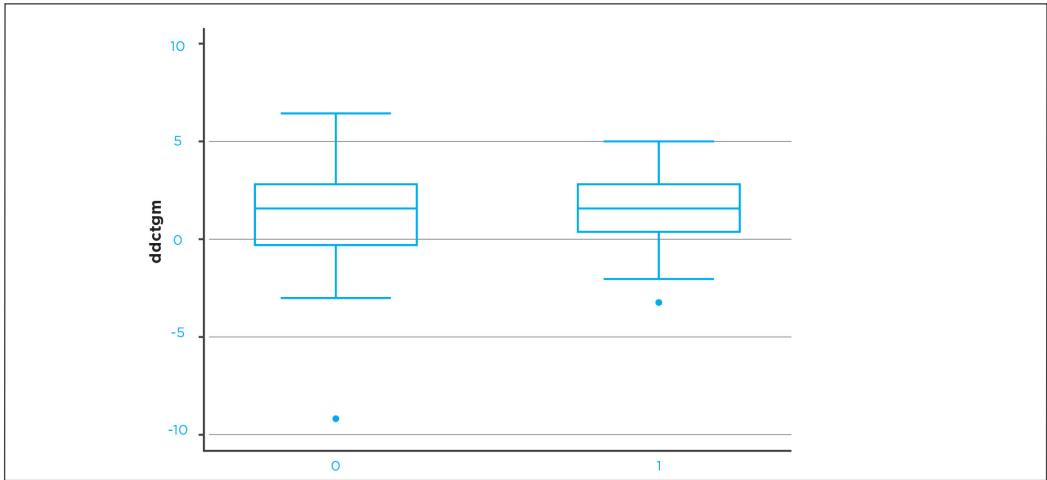


Figura 17-a: Expresión del gen CYP19A1 en CGM.

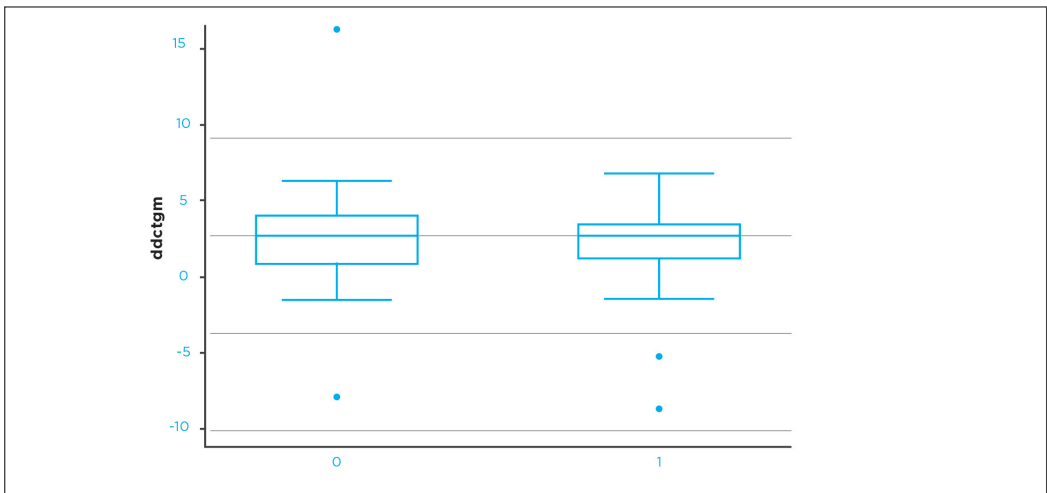


Figura 17-b: Expresión del gen CYP19A1 en CC.

valor mínimo de -8,02. En el grupo de casos, 2,71 fue la mediana calculada con valores de p25 = 1,19 y p75 = 3,47 y valor máximo de 6,8 y mínimo de -8,73.

Para evaluar la posible influencia del endometrioma sobre la expresión de la aromatasa en el folículo ipsilateral al ovario afectado, se realizó un análisis estadístico diferenciando los folículos obtenidos de ovarios afectados de endometriosis y el posible efecto de la administración de GnRH.

Por una parte, se analizaron los resultados teniendo en cuenta el ovario afectado en ambos grupos. Los resultados de las medias para $\Delta\Delta$ Ct CGM 0,10 (DE= 4,62) vs de 1,13 (DE= 1,70) y de $\Delta\Delta$ Ct CC 2,30 (DE=1,95) vs 2,43 (DE=2,32) en los controles y en las pacientes tratadas respectivamente, no demostraron diferencias significativas ($p=0,51$ para las CGM y $p=1,00$ para las CC).

Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias significativas al hacer el mismo análisis pero en el ovario no afectado según grupo, con valores de media para $\Delta\Delta$ Ct CGM 0,14 (DE=2,44) y 1,69 (DE=1,68) ($p=0,27$) y $\Delta\Delta$ Ct CC 2,15 (DE= 2,75) y 2,44 (DE=3,00) ($p=0,49$).

Se valoró si existían diferencias por muestras pareadas, teniendo en cuenta las medias de las variables en ovario afecto frente a ovario no afecto en las pacientes sin tratamiento y con tratamiento. En ningún caso se encontraron diferencias entre las pacientes.

Se analizó si existían diferencias entre las variables sólo en los casos de bilateralidad. Para ambos grupos, ambas variables carecían de diferencias estadísticas (Tabla 17).

Variable	Grupo Control		Grupo de estudio		P
	n	media (DE)	n	media (DE)	
$\Delta\Delta$ Ct CGM	12	2,38 (1,88)	6	1,56 (1,66)	0,39
$\Delta\Delta$ Ct CC	12	3,35 (5,24)	6	-0,30 (4,69)	0,07

Tabla 17: Valoración en bilateralidad.

Por último, se estimó si hubieron diferencias en las medias según el grado de endometriosis: ni en las **leves** con valores de $\Delta\Delta$ Ct CGM (placebo = 0,48 \pm 3,08 vs agonista = 1,47 \pm 1,42 con valor $p=0,19$) y en las $\Delta\Delta$ Ct CC (placebo = 2,17 \pm 2,76 vs agonista = 1,71 \pm 3,64 con valor $p=0,63$) ni en las **severas** con valores $\Delta\Delta$ Ct CGM (placebo = 3,15 \pm 2,76 vs agonista = 1,37 \pm 2,12 con valor $p=0,13$) y en las $\Delta\Delta$ Ct CC (placebo = 4,68 \pm 6,07 vs agonista = 2,24 \pm 2,37 con valor $p=0,44$) se encontraron diferencias estadísticas significativas.

5.2.2. DETERMINACIONES HORMONALES EN EL LÍQUIDO FOLICULAR

Las determinaciones hormonales en el líquido folicular presentaron los siguientes resultados: los niveles de estradiol fueron superiores aunque sin alcanzar significancia estadística

en el grupo placebo con respecto al grupo de estudio ($400520 \pm 284829,9$ pg/ml vs $293495,4 \pm 154806,6$ pg/ml) $p = 0,07$.

Los niveles de testosterona fueron mayores en el primer grupo y esta diferencia fue significativa estadísticamente, con una media de $9,38 \pm 7,94$ ng/ml en el grupo control y de $3,10 \pm 2,44$ ng/ml en el grupo que recibió tratamiento con agonistas ($p=0,00$). Además, el intervalo de confianza carece de solapamiento alguno, dato que aporta solidez a la diferencia entre ambas poblaciones.

Por último, los valores de la androstenediona también fueron superiores en el grupo control, pero sin alcanzar significancia estadística (Tabla 18).

Variable	Grupo control		Grupo de estudio		p
	media (DE)	IC 95%	media (DE)	IC 95%	
Estradiol (pg/ml)	400520 (284829,9)	285474,7- 515565,3	293495,4 (154806,6)	237681,6- 349309,1	0,07
Testosterona (ng/ml)	9,38 (7,94)	6,17-12,59	3,10 (2,44)	2,22-3,98	0,00
Androstenediona (ng/ml)	10,90 (11,67)	6,19-15,61	6,86 (4,66)	5,17-8,54	0,08

Tabla 18: Determinaciones hormonales en LF, análisis global.

Se analizó por separado los valores de las determinaciones hormonales en ovarios afectados por un lado (Tabla 19) y en ovarios no afectados por otro (Tabla 20) en grupo control frente al grupo con agonistas. En sendos análisis, tanto en los ovarios afectados como en los no afectados, la testosterona mostró diferencias significativas, con valores inferiores en el grupo que recibió el agonista de GnRH. Los niveles de estradiol y androstenediona también fueron inferiores, sin alcanzar diferencias significativas para ambos grupos.

Se hizo un análisis pareado (ovario afectado frente ovario no afectado) en el grupo de pacientes con placebo (Tabla 21) y en el grupo que recibió el agonista de GnRH (Tabla 22), sin encontrar diferencias significativas entre grupos.

Variable	Grupo control		Grupo de estudio		p
	n	media (DE)	n	media (DE)	
Estradiol (pg/ml)	9	339488,9 (235154,3)	12	315141,7 (141693,5)	0,94
Testosterona (ng/ml)	9	7,46(4,15)	12	3,36(2,98)	0,01
Androstenediona (ng/ml)	9	13,84(17,51)	12	5,62(3,29)	0,22

Tabla 19: Determinaciones hormonales en LF, ovarios afectados.

Variable	Grupo control		Grupo de estudio		p
	n	media (DE)	n	media (DE)	
Estradiol (pg/ml)	11	435863,6 (269819)	12	355450,00 (146232)	0,67
Testosterona (ng/ml)	11	9,65(8,85)	12	3,52(2,07)	0,01
Androstenediona (ng/ml)	11	22,15(45,16)	12	6,87(2,65)	0,46

Tabla 20: Determinaciones hormonales en LF, ovarios no afectados.

Variable	Grupo Afectado		Grupo No Afectado		p
	n	media (DE)	n	media (DE)	
Estradiol (pg/ml)	9	339488,9 (235154,3)	9	397144,4 (184372,5)	0,40
Testosterona (ng/ml)	9	7,46 (4,15)	9	6,39 (2,96)	0,46
Androstenediona (ng/ml)	9	13,83 (17,51)	9	25,64 (49,69)	0,33

Tabla 21: Determinaciones hormonales en LF, análisis pareado en grupo placebo.

Variable	Grupo Afectado		Grupo No Afectado		p
	n	media (DE)	n	media (DE)	
Estradiol (pg/ml)	12	315141,7 (141693,5)	12	355450 (146232,1)	0,44
Testosterona (ng/ml)	12	3,36 (2,98)	12	3,52 (2,07)	0,84
Androstenediona (ng/ml)	12	5,63 (3,29)	12	6,87 (2,65)	0,11

Tabla 22: Determinaciones hormonales en LF, análisis pareado en grupo de agonistas GnRH.

Se estudiaron las diferencias de las variables de determinaciones hormonales en los casos de bilateralidad para ambos grupos (Tabla 23). En consonancia con los resultados presentados previamente, destaca en este apartado, sobre todo, los bajos niveles de testosterona en el grupo de pacientes que recibieron el tratamiento con agonistas, con una diferencia significativa estadísticamente ($1,94 \pm 1,40$ ng/ml en el grupo de estudio frente a $8,17 \pm 5,99$ ng/ml en los controles) ($p=0,00$).

Variable	Grupo control		Grupo de estudio		p
	n	media (DE)	n	media (DE)	
Estradiol (pg/ml)	11	368520,1 (241276,3)	7	276267 (378249)	0,25
Testosterona (ng/ml)	11	8,17 (5,99)	7	1,94 (1,40)	0,00
Androstenediona (ng/ml)	11	10,67 (9,03)	7	6,7 (3,12)	0,41

Tabla 23: Determinaciones hormonales en LF, afectación bilateral.

Por último se valoró si existieron diferencias para ambos grupos en cuanto a los niveles hormonales según el grado de endometriosis. En ambas comparativas, en las endometriosis mínimas o leves y en las moderadas o severas, la tendencia fue en la misma línea que hasta ahora, con niveles inferiores de las tres hormonas en el grupo pde estudio frente al control. Tanto para el estradiol como para la androestenediona no se observaron diferencias significativas.

Como dato interesante, en la única determinación que hubo un comportamiento distinto fue en la testosterona, que en las endometriosis mínimas o leves la diferencia fue significativa estadísticamente ($9,49 \pm 6,66$ ng/ml en grupo placebo vs $3,59 \pm 2,56$ ng/ml en grupo de agonistas, $p=0,00$), pero en cambio, en las moderadas o severas, la diferencia no alcanzó significancia estadística ($3,53 \pm 1,42$ ng/ml vs $2,08 \pm 1,56$ ng/ml para grupo control y grupo de estudio, respectivamente).

5.2.3. CALIDAD OVOCITARIA

La variable tipo de ovocito incluyó un total de 71 ovocitos, de los cuales prácticamente el 85% correspondieron a ovocitos MII (Tabla 24).

Tipo Ovocito	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
MII	28 (80%)	32 (88,8)	60 (84,50%)
MI	5 (14,3)	2 (5,6%)	7 (9,86%)
Otros	2 (5,7)	2 (5,6%)	4 (5,63%)
Total	35 (100%)	36 (100%)	71 (100%)

Tabla 24: Tipos de ovocito según grupo.

El tratamiento de los datos obtenidos de las variables tipo de ovocito y de calidad ovocitaria basados en los parámetros morfológicos citoplasmáticos y extracitoplasmáticos incluidos en el estudio no mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de estudio (Tablas 25a a 25h). No se pudo comparar las variables agregación del REL, cuerpos refringentes y estructuras dispersas debido que todas fueron negativas en ambos grupos.

5.2.4. CALIDAD EMBRIONARIA

Las variables referidas a calidad embrionaria se muestran en la siguiente tabla (Tabla 26-a):

Como se refleja en la tabla 26-b, hubo un mayor porcentaje de embriones transferidos en el grupo de estudio frente al control, pero sin alcanzar diferencia significativa ($p=0,08$).

Las tablas 27 y 28 muestran las distribuciones de calidad embrionaria en ambos grupos. En forma individual, el porcentaje mayor en ambos grupos corresponde a embriones de grado B

1º CP	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
normal	26 (84%)	25 (86%)	51 (85%)
anormal	5 (16%)	4 (14%)	9 (15%)
	31 (100%)	29 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,90

Tabla 25a: Alteraciones del Primer Corpúsculo Polar. Test χ^2 . p=0,90.

Forma	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
normal	28 (93%)	29 (97%)	57 (95%)
anormal	2 (7%)	1 (3%)	3 (5%)
	30 (100%)	30 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,52

Tabla 25b: Forma. Test χ^2 . p=0,52.

Grosor ZP	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
normal	29 (3,4%)	30 (100%)	59 (98,4%)
anormal	1 (96,6%)	0 (0%)	1 (1,6%)
	30 (100%)	30 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,13

Tabla 25c: Grosor Zona Pelúcida. Test χ^2 . p=0,13

Color ZP	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
normal	30 (96,8%)	29 (100%)	59 (98,4%)
anormal	1 (3,2%)	0 (0%)	1 (1,6)
	31 (100%)	29 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,33

Tabla 25d: Color Zona Pelúcida. Test χ^2 . p=0,33.

EPV excesivo	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
no	31 (96,9%)	28 (100%)	59 (98,3)
si	1 (3,1%)	0 (0%)	1 (1,7%)
	32 (100%)	28 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,30

Tabla 25e: Espacio Perivitelino Excesivo. Test χ^2 . p=0,30.

Restos EPV	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
no	29 (96,7%)	30 (100%)	59 (98,3%)
si	1 (3,3%)	0 (0%)	1 (1,7%)
	30 (100%)	30 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,30

Tabla 25f: Restos EPV. Test χ^2 . p=0,30

Citoplasma	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
normal	30 (96,8%)	27 (93,1%)	57 (5%)
anormal	1 (3,2%)	2 (6,9%)	3 (5%)
	31 (100%)	29 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,09

Tabla 25g: Citoplasma. Test χ^2 . p=0,09.

Vacuolas	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
no	30 (96,8)	29 (100%)	59 (98,3)
si	1 (3,2%)	0 (100%)	1 (1,7%)
	31 (100%)	29 (100%)	60 (100%)

Test χ^2 . p=0,14

Tabla 25h: Presencia de vacuolas. Test χ^2 . p=0,14.

Embriones óptimos	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
1 embrión	1 (6,6%)	2 (14,3)	3 (10,3%)
2 embriones	14 (93,3%)	12 (85,7%)	26 (89,7%)
	15(100%)	14 (100%)	29 (100%)

Test χ^2 . p=0,70

Tabla 26a: Embriones óptimos. Test χ^2 . p=0,70.

Embriones Transferidos	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
si	11 (33,3%)	17 (54,8%)	28 (43,8)
no	22 (66,6%)	14 (45,2%)	36 (56,3%)
total	33 (100%)	31 (100%)	64 (100%)

Tabla 26-b: Embriones transferidos según grupo. Test χ^2 . p=0,08.

Clasificación ASEBIR	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
A	13 (36,1%)	4 (13,8%)	17 (26,1%)
B	16 (44,4%)	16 (55,2%)	32 (49,2%)
C	7 (19,4%)	7 (24,1%)	14 (21,5%)
D	0 (0%)	2 (6,9%)	2 (3,2%)
	36 (100%)	29 (100%)	65 (100%)

Test χ^2 . p=0,11

Tabla 27: Gradación embrionaria. Test χ^2 . p=0,11.

Clasificación ASEBIR	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
A + B	29 (80,6%)	20 (69%)	49 (75,4%)
C + D	7 (19,4%)	9 (31%)	16 (24,6%)
	36 (100%)	29 (100%)	65 (100%)

Test χ^2 . p=0,215

Tabla 28: Gradación embrionaria agrupada. Test χ^2 . p=0,215.

(44,4 % en el grupo control frente a 55,2% en el grupo de estudio). Si se agrupan, los embriones de buena calidad representan el mayor porcentaje en ambos grupos (el 80,6% en los controles vs 69% en el grupo de estudio). No se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos.

Si se analiza la fecundación de los ovocitos incluidos en el estudio, en el grupo de tratamiento fue menor con respecto al grupo placebo (n=23 vs n=24), diferencia no significativa ($p=0,38$) (Tabla 29).

Fecundación	Grupo control n (%)	Grupo de estudio n (%)	Total n (%)
si	24 (85,7%)	23 (76,7%)	47 (81%)
no	4 (14,3%)	7 (23,3%)	11 (19%)
total	28 (100%)	30 (100%)	58(100%)

Tabla 29: Fecundación según grupo.

Por último al analizar la gestación según grupo teniendo en cuenta solo los MII del estudio, la mayor tasa de gestación correspondió al grupo control con respecto al grupo de estudio (63% vs 37%) con una diferencia significativa estadísticamente ($p=0,00$) (Figura 18).

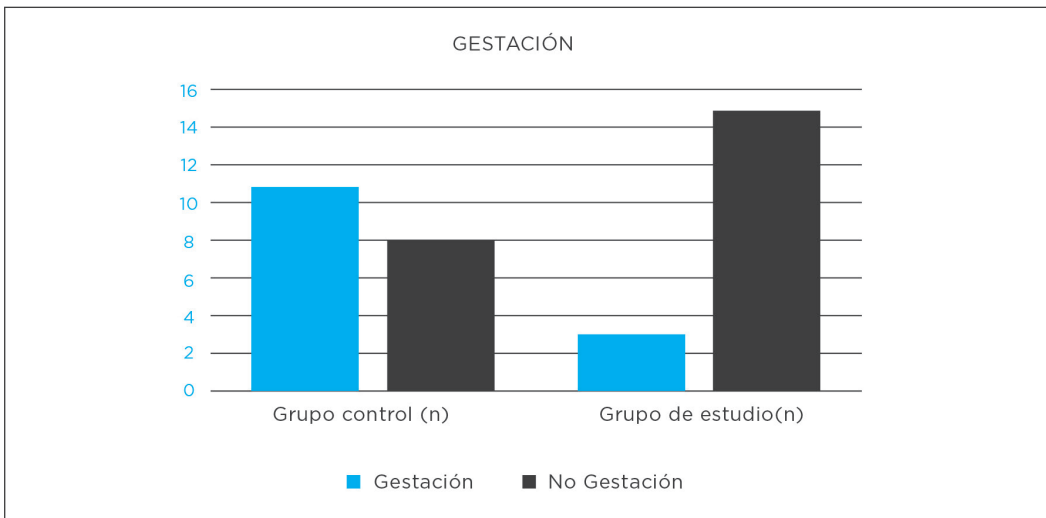


Figura 18: Gestación vs No gestación en MII incluidos.

06.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio ha sido determinar el efecto de los análogos de la GnRH en la fertilidad de pacientes con endometriosis ovárica a través del estudio de la expresión de la aromatasa en células de la granulosa de estas pacientes y los niveles hormonales a nivel folicular.

Los hallazgos derivados de este trabajo demuestran, a pesar de la bibliografía reportada en los últimos años, que el tratamiento previo a una FIV con análogos de la GnRH en pacientes con endometriosis ovárica no suponen un beneficio evidente en cuanto a calidad ovocitaria, embrionaria o tasas de gestación.

Hasta la fecha, numerosas publicaciones concluyeron que la supresión hipofisaria prolongada con análogos de GnRH realizada inmediatamente antes de la realización de una FIV en pacientes con endometriosis conseguía tasas de gestación e implantación significativamente mayores a las observadas en pacientes que no recibían este tratamiento. Sin embargo, para otros autores este beneficio no fue tan evidente.

La obtención de una conclusión sólida mediante la comparación de los resultados de los estudios publicados se hace extremadamente complicada ya que existe gran variabilidad en el diseño de los estudios, en los criterios de inclusión establecidos en cada uno así como en la duración del tratamiento previo con análogos de GnRH. A esto se suma que estos ensayos clínicos han sido publicados a lo largo de un periodo de 24 años, en el cual, los resultados de las técnicas de reproducción asistida y los procedimientos clínicos y de laboratorio han cambiado sustancialmente debido al constante desarrollo de los mismos.

El mecanismo de acción mediante el cual la administración prolongada de un análogo de GnRH podría incidir sobre el resultado de la FIV no ha sido demostrado de forma definitiva. Estudios previos comprobaron que los análogos de GnRH por una parte producen la disminución de proteínas inflamatorias y del inhibidor de metaloproteasas en líquido peritoneal y, por otra, un aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas. También se postularon efectos de los análogos de GnRH sobre el endometrio, tales como una disminución de la síntesis de óxido nítrico (Wang, Zhou, Dong, Wu, & Qian, 2006) o una modificación de la expresión endometrial aberrante de integrina b3 (Bruce A Lessey et al., 2000), que sería la responsable del fallo de implantación en pacientes con endometriosis a pesar de la transferencia de embriones de buena calidad (Eric S Surrey, Lietz, Gustofson, Minjarez, & Schoolcraft, 2010).

Como se ha descrito al inicio de este trabajo, la endometriosis es una patología multifactorial que en relación con la esterilidad se ha demostrado que influye negativamente a nivel de endometrio y calidad embrionaria, factores determinantes para conseguir una gestación. Por ello, a la hora de analizar el efecto de los análogos de GnRH es importante diferenciar muy bien sus efectos a nivel uterino y a nivel ovárico y valorar que dichos efectos pueden actuar de forma diferente a nivel del líquido folicular, líquido peritoneal o endometrio.

Los análogos de la GnRH han demostrado su eficacia en el tratamiento de la endometriosis ya que administrados de forma continua producen un bloqueo de la liberación de LH y FSH a nivel hipofisario inhibiendo así la esteroideogénesis ovarica, lo que se traduce en la supresión de la ovulación y un estado de hipogonadismo reversible al dejar la medicación (Bulun, 2009).

La aromatasa es una enzima clave en la síntesis de andrógenos y estrógenos. Varios estudios sugieren que la aromatasa se expresa de manera inapropiada en endometrio de pacientes endometriósicas y en los implantes endometriósicos, pero hasta la fecha, ningún estudio ha establecido el efecto de los análogos de GnRH sobre la expresión de aromatasa en células de la granulosa y los niveles de esteroides en líquido folicular de pacientes afectas de endometriosis.

Los estudios de investigación básica aplicada a ensayos clínicos controlados y aleatorizados, como el trabajo aquí presentado, son los que mayor evidencia aportan a la investigación y desarrollo científico. Este estudio fue diseñado con el propósito de valorar el efecto de los análogos de la GnRH sobre la expresión de la aromatasa en células de la granulosa de pacientes con endometriosis. Para su desarrollo se han seguido unos criterios de inclusión estrictos, asegurando así en cierta medida una muestra suficientemente homogénea en cuanto a sus características basales tal y como se ha demostrado. Esta homogeneidad, generó como consecuencia un grupo de estudio con unas características similares de las cuales puedan extraerse conclusiones sólidas y no sesgadas por las variaciones interpersonales.

Por otro lado, los protocolos utilizados para los ciclos FIV/ICSI de Reproducción Asistida del Hospital la Fe, a excepción del fármaco de intervención motivo del presente ensayo, están basados en los procedimientos diagnósticos y de tratamiento recomendados por la mayoría de autores lo que permite garantizar la reproducibilidad de los resultados del presente estudio.

6.1. EXPRESION DE LA AROMATASA Y DETERMINACIONES HORMONALES

Basados en trabajos previos, el presente estudio partió de la hipótesis de que si la actividad de la aromatasa está disminuída en las células de la granulosa de mujeres con endometriosis, este hecho podría alterar el proceso de esteroideogénesis y, en consecuencia, parámetros fundamentales para conseguir una gestación como son la maduración folicular y la calidad ovocitaria. Por tanto, se diseñó este estudio cuyo objetivo principal fue analizar la expresión del gen CYP19A1, que codifica a la enzima aromatasa en las células de la granulosa, tanto murales como del cúmulo, en pacientes con endometriosis que recibieron agonistas de GnRH previamente al tratamiento de FIV frente a un grupo con placebo.

El análisis de expresión del gen de aromatasa realizado no ha demostrado diferencias significativas entre los dos grupos considerados. De la misma manera, tampoco se han evidenciado diferencias en función de la presencia de endometrioma ovárico o de la severidad de la endometriosis. Teniendo en cuenta que la testosterona fue significativamente menor en el grupo de estudio, y que el estradiol y androstenediona no mostraron diferencias significativas, parece claro que los análogos de la GnRH no ejercen una acción determinante sobre la expresión de la aromatasa. Este estudio ha demostrado por primera vez que la expresión de aromatasa no muestra diferencias entre las células granulosas murales y las del cúmulo.

Se determinaron los niveles hormonales en líquido folicular de estradiol, testosterona y androstenediona para determinar si el tratamiento con agonistas en la endometriosis estaba asociado con cambios en la producción hormonal en el microambiente folicular y también se analizaron los parámetros de calidad ovocitaria y embrionaria.

La relevancia de este estudio radica en que los datos existentes sobre la expresión de aromatasa en pacientes con endometriosis son controvertidos y escasos, y sólo hasta la fecha, un estudio ha valorado la expresión del gen CYP19A1 en CC en mujeres infértiles con endometriosis frente a placebo.

Por tanto, este es el primer trabajo donde se analiza la expresión del gen CYP19A1 en pacientes con endometriosis a los que se les ha administrado un tratamiento previo a la FIV con agonistas de GnRH. Es importante destacar también que es la primera vez que se

estudia la expresión de dicho gen en ambas poblaciones celulares de la granulosa en este tipo de pacientes.

En cuanto a las determinaciones hormonales, los resultados obtenidos en líquido folicular en nuestro estudio mostraron niveles inferiores de las tres hormonas analizadas en las pacientes que habían recibido agonistas de GnRH siendo la testosterona la única que presentó diferencias significativas. Al comparar en pacientes con endometriosis unilateral los resultados obtenidos del ovario afectado por un lado y del no afectado por otro, en el grupo de tratamiento frente al control, obtuvimos unos resultados similares a los observados en el análisis global de los dos grupos (placebo y estudio). Se obtuvo el mismo patrón cuando se analizaron las pacientes con endometriosis bilateral. Estos resultados por lo tanto, demuestran que el fármaco de intervención actuó suprimiendo los niveles hormonales foliculares independientemente de la afectación ovárica de la propia patología.

El primer estudio publicado que analizó los niveles de expresión del gen *CYP19A1* en células de la granulosa mural luteinizadas, no encontró diferencias significativas entre 11 casos de pacientes con endometriosis (todos los grados) y 11 sin endometriosis, con esterilidad por factor tubárico o factor masculino, y que no habían recibido el tratamiento previo con análogos (Lauriane G. De Abreu et al., 2012).

Por otra parte, un estudio reciente, prospectivo de casos y controles, en el que se determinaron los niveles de transcritos del gen de la aromatasa en células del cúmulo y estradiol en líquido folicular provenientes de 81 pacientes que realizaron FIV con endometriosis frente a un control sin endometriosis, demostró que la expresión del gen estaba disminuida significativamente en el grupo con endometriosis, pero sin embargo no hubo diferencias en los niveles de estradiol entre ambos grupos (I. D. E. S. Barcelos et al., 2015). Este resultado junto con la falta de relación entre los resultados observados y esperados, es decir, los bajos niveles de transcripto de aromatasa en CC y niveles normales de estradiol folicular, fue atribuido a que podría deberse a la no reducción de expresión del *CYP19A1* en las CGM, siendo éstas las células responsables primarias de la producción del estradiol, a diferencia de las CC que tienen un papel menos importante en la esteroideogénesis.

Otro trabajo que estudió los niveles de estradiol y los niveles de expresión de la aromatasa en células de la granulosa luteinizadas cultivadas y expuestas a diferentes concentraciones de letrozol en 23 pacientes con endometriosis y 19 controles sin endometriosis que realizaron

tratamiento de FIV, obtuvo concentraciones inferiores de estradiol y menor expresión de aromatasa en mujeres con endometriosis (Lu et al., 2012).

Las diferencias en los resultados de los trabajos presentados podrían atribuirse, en parte, a que algunos autores cuantificaron directamente los transcritos del gen (I. D. E. S. Barcelos et al., 2015) (Lu et al., 2012) (Lauriane G. De Abreu et al., 2012) y otros sin embargo, midieron actividad enzimática (Lauriane Giselle de Abreu et al., 2006) (C R Harlow et al., 1996), por lo que no se puede asegurar que los niveles de transcritos representen fielmente los niveles de la proteína o su actividad.

Los resultados por lo tanto, sugieren que la enzima aromatasa podría tener un control complejo y refinado de su expresión génica en la población de células de la granulosa. Entre ellos, probablemente su principal mecanismo de regulación sea mediante la acción de la FSH, que estimula la aromatasa y consecuentemente aumenta la síntesis de estradiol de una manera cíclica. Su expresión es mediada primariamente por la acción sobre los receptores de FSH presentes en las células de la granulosa, la producción de AMPc y la activación del promotor proximal II (Simpson et al., 1994).

Además, la evidencia muestra que la aromatasa es estimulada por la FSH y se expresa en niveles altos en folículos dominantes (Sisco, Hagemann, Shelling, & Pfeffer, 2003). Por tanto, la expresión aumentada de esta enzima podría estar asociada con la inducción (FSH y LH) de la producción de hormonas esteroideas (estrogeno y progesterona) y los mecanismos de dominancia celular (Tesfaye et al., 2009).

Por otro lado, los agonistas de GnRH administrados de forma prolongada, actúan inhibiendo la liberación de gonadotrofinas, por lo que reducirían la acción que tiene la FSH sobre la aromatasa.

6.2. CALIDAD OVOCITARIA Y EMBRIONARIA

En cuanto a la calidad ovocitaria, existen numerosos estudios en donde se demuestra que los ovocitos de mujeres con endometriosis son de peor calidad (Garrido, Navarro, Remohí, et al.) (Pellicer et al., 2000) (Navarro, Garrido, Remohí, & Pellicer, 2003). La apoptosis en las células ováricas se ha descrito como un buen indicador de calidad ovocitaria (Nakahara et al., 1997) y se ha observado que las pacientes con endometriosis presentan un aumento de la apoptosis de las células del cúmulo que rodea al ovocito (Díaz-Fontdevila, Pommer, & Smith, 2009). Este pro-

ceso de muerte celular a nivel de dichas células genera una pérdida del soporte esencial que las CC le confieren al ovocito influyendo negativamente en la calidad ovocitaria de pacientes con endometriosis (Russell & Robker, 2007).

La morfología es considerada como un indicador del potencial que tiene cada ovocito para dar lugar a un embrión. Como se mencionó previamente, las características morfológicas del ovocito incluyen defectos extracitoplasmáticos y citoplasmáticos. En el presente trabajo, no se encontraron diferencias en los parámetros morfológicos de calidad de ovocitaria entre ambos grupos. Sin embargo, hay que tener presente que el estudio de los patrones morfológicos representan una estimación subjetiva, y que podría no correlacionarse completamente con la funcionalidad del ovocito ni con los resultados clínicos.

El menor número de ovocitos fecundados en el grupo de estudio apoyaría la evidencia de la peor calidad ovocitaria asociada al empleo de los agonistas de GnRH en nuestro trabajo.

Hay que recordar que el adecuado desarrollo folicular y la calidad ovocitaria resulta de un proceso complejo y sincronizado, que dura varios meses, desde el folículo primordial hasta la fase preovulatoria. Las células de la granulosa juegan un papel importante en la diferenciación folicular, logrando condiciones óptimas para el desarrollo del ovocito, la ovulación y la fecundación.

Es sabido que un ambiente intrafolicular predominantemente estrogénico se asocia con un buen desarrollo folicular y tiene efecto anti-atrésico.

Algunos autores demostraron niveles superiores de estradiol y progesterona en folículos cuyos ovocitos tuvieron mayores tasas de fecundación (Lamb et al., 2010) (Carpintero, Suárez, Mangas, Varea, & Rioja, 2014). Sin embargo, estas observaciones no fueron confirmadas por otros grupos (Asimakopoulos et al., 2008) (Wen, Li, Tozer, Docherty, & Iles, 2010). Por otra parte, se encontraron niveles de testosterona bajos, en folículos cuyos ovocitos degeneraban (Lamb et al., 2010).

En pacientes con endometriosis, contrariamente, los niveles de estradiol fueron inferiores en líquido folicular, con diferencias significativas al compararlos con los controles (Wunder, Mueller, Birkhäuser, & Bersinger, 2005).

Los resultados de este estudio mostraron niveles de estradiol inferiores, aunque sin alcanzar significación estadística en las pacientes que recibieron agonista en comparación con los controles. De la misma manera, los niveles de testosterona fueron significativamente menores, lo cual puede estar en relación con una mala calidad ovocitaria, no detectada mediante parámetros morfológicos, pero que podría justificar en parte las reducidas tasas de fecundación e implantación obtenidas, como se discute más adelante.

La endometriosis afecta negativamente el desarrollo de los embriones a varios niveles. La presencia de alteraciones nucleares y citoplasmáticas en embriones de mujeres con endometriosis son seis veces más frecuentes frente a embriones de mujeres sin endometriosis (Brizek, Schlaff, Pellegrini, Frank, & Worrihow, 1995) Estas alteraciones incluyen fragmentación citoplasmática, (Brizek et al., 1995), y disminución en el número de células (Garrido, Navarro, García-Velasco, et al., 2002) (Pellicer, Oliveira, Ruiz, Remohí, & Simón, 1995) y aumento en la frecuencia de embriones detenidos (Garrido, Navarro, Remohí, et al., 2000) dando lugar a menor número de embriones transferibles (Garrido, Navarro, García-Velasco, et al., 2002) (Pellicer et al., 1995). Además, la calidad de los embriones de las pacientes con endometriosis es menor (Brizek et al., 1995) (Garrido, Navarro, García-Velasco, et al., 2002) (Pellicer et al., 1995).

En este estudio no se observaron **diferencias en relación a la calidad embrionaria según los criterios de ASEBIR** al comparar las pacientes con endometriosis que habían recibido agonistas frente a las pacientes con endometriosis con placebo. Si bien no alcanzaron diferencias significativas, el porcentaje de embriones con alteraciones citoplasmáticas en sus blastómeras y de categoría C o D fue mayor en las pacientes tratadas con agonistas de la GnRH.

Este resultado es contrario a lo publicado previamente, donde el tratamiento con agonistas de GnRH, ayudó a mejorar la calidad embrionaria en pacientes con endometriosis (Takahashi, Mukaida, Tomiyama, Goto, & Oka, 2004), al producir temporalmente regresión de las lesiones endometriósicas y el cese de la ciclicidad hormonal. Chedid y colaboradores compararon diferentes protocolos en pacientes con endometriosis: el mayor porcentaje de embriones de buena calidad fue en el grupo tratado durante 3 semanas con agonistas (frente a 3 meses y frente a clomifeno) en pacientes con endometriosis leves, en cambio no encontraron diferencias en cuanto a porcentajes de embriones de buena calidad en ninguno de los tres protocolos de tratamiento en las pacientes con endometriosis severas (Chedid et al., 1995).

El conocimiento de los cambios específicos y temporales en la expresión del gen CYP19A1 durante el crecimiento folicular dista mucho de ser conocido en su totalidad. Asimismo la calidad embrionaria no pudo relacionarse con los niveles de estradiol y progesterona foliculares (Asimakopoulos et al., 2008).

Por tanto, los resultados obtenidos no permiten establecer una relación entre la calidad ovocitaria y embrionaria y los mejores resultados descritos en la literatura, atribuidos a la administración de agonistas de GnRH en pacientes con endometriosis previo a la fecundación in vitro.

6.3. TASA DE FECUNDACIÓN, IMPLANTACIÓN Y GESTACIÓN

En este estudio encontramos de forma global que los parámetros clínicos del grupo que recibió los agonistas de GnRH fueron peores y contrarios a los esperados según la bibliografía publicada hasta el momento, que concluyen que los agonistas aumentan la probabilidad de embarazo clínico cerca de 4 veces. No obstante esta conclusión está basada en los resultados de algunos trabajos previos no todos ellos prospectivos y del único meta-análisis publicado hasta el momento sobre acción de agonistas previos a la FIV en mujeres con endometriosis (Sallam et al., 2006) basado a su vez en 3 estudios publicados no muy recientes (Dicker, Goldman, Levy, Feldberg, & Ashkenazi, 1992)(Rickes et al., 2002)(Eric S Surrey et al., 2002)

Si hacemos un análisis minucioso de nuestros resultados, y los comparamos con los trabajos publicados, probablemente sea cuestionable tal conclusión.

La **dosis total de FSH** en nuestro estudio fue mayor con respecto al grupo placebo con significancia estadística, similar al trabajo de (Dicker et al., 1992) en cuyo caso tal diferencia no fue estadística y contrario a estudio de (Eric S Surrey et al., 2002), en que las dosis recibidas fueron inferiores. Parece coherente que la dosis de FSH requerida en las pacientes tratadas con agonista sea mayor como consecuencia de una supresión hipofisaria prolongada.

El **tasa de fecundación** en nuestro estudio fue significativamente menor en el grupo de análogos con respecto a los controles. Estos resultados son concordantes con los resultados de otro trabajo publicado, en el que la tasa de fecundación fue significativamente menor en el grupo con análogos en pacientes con endometriosis modera-severa (Curtis et al., 1993). En cambio en el estudio publicado por (Eric S Surrey et al., 2002), no se encontraron diferencias en cuanto a la tasa de fecundación. A su vez, este resultado es contrario al observado por (Chedid et al.,

1995), en que los análogos mostraron mayores tasas de fecundación en el grupo de endometriosis mínima-leve tratada con agonistas los 3 meses previos. En este trabajo se comparaba agonistas de GnRH durante 3 semanas con Clomifeno. Del mismo modo, en endometriosis moderada-severas fue significativo el aumento en el grupo de agonistas, tanto los que recibieron 3 meses como 3 semanas previas, comparado con las pacientes con clomifeno.

En nuestro trabajo **las tasas de implantación y gestación** fueron menores en el grupo de estudio que había recibido el protocolo de agonista comparado con el grupo que recibió placebo. No obstante, debe tenerse en consideración la limitación de este estudio, ya que el diseño y el tamaño de la muestra no son adecuados para establecer conclusiones relevantes en cuanto a tasa de gestación.

Contrario a estos resultados, en el trabajo publicado por (Eric S Surrey et al., 2002) la administración de agonistas de GnRH durante tres meses anteriores a una estimulación ovárica controlada (EOC) en pacientes infértiles con endometriosis **augmentaba** significativamente la tasa de gestación. Sin embargo, al analizar en detalle los resultados, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la tasa de implantación, el número de ovocitos ni en la tasa de fecundación. Además, al valorar la distribución de las pacientes incluídas según severidad, la misma era heterogénea ya que el 84% de las pacientes del grupo tratado tenían endometriosis severa mientras que en grupo control la forma severa representaba sólo el 57,7% y el resto correspondía a endometriosis leve. En este sentido, varios estudios defienden que el estadio de endometriosis no afecta a la tasa de implantación si se compara con controles con factor tubárico sin endometriosis (Geber, Paraschos, Atkinson, Margara, & Winston, 1995) (Olivennes et al., 1995) (Díaz et al., 2000). Sin embargo, otros han demostrado que pacientes con estadios III-IV de endometriosis tienen una respuesta pobre tras tratamientos de RA en comparación con los controles (Azem et al., 1999) (Guzick et al., 1994). Por tanto, los datos presentados por Surrey sugieren que aún en el supuesto de que el grado de endometriosis influya en los resultados, podría no suponer un factor que contribuya a las altas tasas de gestación encontradas en este grupo. No pudieron evaluar si la terapia prolongada con análogos era beneficiosa en pacientes con un grado de endometriosis mayor porque el número de pacientes por grupo de severidad era pequeño y todas las tasas de gestación del grupo tratado eran altas.

Otras investigaciones, utilizando diversos diseños de estudios y protocolos mostraron resultados beneficiosos similares con el uso prolongado de agonistas en pacientes con endometriosis

(Dicker et al., 1990) (Nakamura et al., 1992)(Marcus & Edwards, 1994) (Curtis et al., 1993)(Remorgida et al., 1990) (Dicker et al., 1992).

En un estudio no randomizado, se comparó la tasa de gestación de pacientes tratadas con agonista durante al menos 60 días antes de la EOC. Los investigadores ponen de manifiesto la necesidad de altas dosis de gonadotrofinas pero las tasas de gestación eran significativamente más **elevadas** que en las pacientes que se les administraba un protocolo de desensibilización estándar con agonistas a mitad de fase lútea. (Nakamura et al., 1992) .

En otro trabajo, sin embargo, **no se observó variabilidad** en las tasas de gestación de pacientes endometriosis tratadas con agonista al menos durante 6 semanas en comparación con las de factor tubárico (Curtis et al., 1993). Aunque este estudio no incluyó un grupo control de pacientes con endometriosis sin tratamiento.

El estudio aleatorizado de Marcus y Edwards **aumentaba la tasa de gestación** de 15 pacientes con endometriosis tratadas con agonista entre 2-7 meses comparado con 69 controles (Marcus & Edwards, 1994). Para estos autores, parece que el éxito del tratamiento aumenta con al menos **4 meses de pretratamiento con el agonista.**

Un trabajo prospectivo aleatorizado incluyó 60 pacientes con estadio I-II de endometriosis a las que se les realizó una transferencia intratubárica de gametos . Veinte de estas pacientes fueron tratadas previamente con agonista **durante 6 meses** demostrando que no existían **diferencias en la tasa de gestación** al compararlas con los grupos controles: endometriosis que llevaron una down-regulation standard o no recibieron agonista (Remorgida et al., 1990).

En otro estudio que estudió a 31 pacientes con estadios severos de endometriosis con ciclos de RA anteriores fallidos se produjo un incremento en el número de ovocitos recuperados y un **aumento** del 30% de la tasa de gestación por ciclo tras la administración de análogo durante **6 meses** (Dicker et al., 1990). Argumentan que la diferencia podría estar relacionada directamente con el efecto beneficioso del análogo en la endometriosis pélvica. El mismo autor llevó a cabo un estudio similar dos años más tarde en el que se estudiaron 67 pacientes con estadio II de endometriosis que fueron sometidas a FIV-TE (Dicker et al., 1992). Treinta y cinco de estas pacientes recibieron el análogo durante 6 meses obteniendo una tasa de gestación significativamente **mayor** en comparación con los controles. Sin embargo, la extraordinaria

baja tasa de gestación de los controles (3.9%) hace que la **interpretación de estos resultados pueda estar sesgada.**

En un estudio retrospectivo, las tasas de gestación tras FIV-TE fueron **similares** en pacientes con endometriosis pretratadas con agonista durante 10-90 días o más de 90 días. Sin embargo, las tasas eran significativamente mayores en las pacientes tratadas durante menos de 10 días previos a la EOC. Este hecho sugiere que el pretratamiento durante más de 90 días podría no ser ventajoso (Caruso, Rawlins, & Radwanska, 1997).

Los mecanismos de acción de los agonistas GnRH en el estudio de Surrey pueden generar una hipótesis. Aunque los análogos no parecen tener un efecto directo sobre el tejido endometrial (E S Surrey & Halme, 1992), varios estudios demostraron otros efectos beneficiosos que pueden incrementar la fertilidad en pacientes con endometriosis (Taketani, Kuo, & Mizuno, 1992) (B A Lessey, 2000) (Garzetti et al., 1996). Taketani y colaboradores demostraron que las concentraciones en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, de IL-1 y TNF disminuían en comparación con las no tratadas (Taketani et al., 1992). También se publicó un efecto beneficioso de los agonistas sobre las células NK (Garzetti et al., 1996).

Sharpe-Timms y cols demostraron que las concentraciones de MMP-1 en suero atenuadas en pacientes con endometriosis eran restauradas tras la administración de el agonista (Sharpe-Timms, Keisler, McIntush, & Keisler, 1998). Imai y cols. Demostraron la disminución de la apoptosis en endometrio de pacientes con endometriosis tras el tratamiento con agonistas (Imai, Takagi, & Tamaya, 2000). En un ensayo, Lessey y cols demostraron que la administración del agonista tenía unos efectos mas que beneficiosos en la restauración de la expresión endometrial de avb3 integrina, un marcador de receptividad endometrial, en pacientes con endometriosis comparadas con las no tratadas o tratadas con ablación por laser (B A Lessey, 2000) Esto explicaría probablemente el incremento de las tasas de gestación en los estudios de Surrey.

El estudio de Surrey no deja claro qué pacientes endometriósicas pueden obtener un beneficio consistente de la administración de los agonistas ya que además de que el grupo de tratamiento había unas diferencias significativas en cuanto a pacientes con endo severa respecto al grupo control, en el grupo control las tasas de gestación también fueron elevadas.

Por último, basándonos en los estudios sobre el mecanismo de acción de los agonistas, son coherentes los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ya que:

A nivel de OVARIO: A nivel de calidad ovocitaria y embrionaria podría verse afectada negativamente por la disminución de los niveles hormonales que reflejan estos datos en el líquido folicular, hecho que podría atribuirse a la administración del agonistas prolongada (al menos los 3 meses) previa a la EOC.

07.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos se concluye:

1. En las poblaciones estudiadas, la expresión del gen de aromatasa en células de la granulosa de mujeres con endometriosis no se afecta por la administración de un análogo de GnRH los tres meses previos a la realización de una FIV.
2. Los niveles de esteroides intrafoliculares son menores en los casos en que se administra un análogo de GnRH durante un periodo de 3 meses antes de iniciarse una estimulación ovárica controlada para la realización de una FIV respecto a pacientes que no reciben este tratamiento.
3. La expresión del gen de aromatasa es similar en células de la granulosa del cúmulo y en las células granulosas murales y no se afecta por el tratamiento con análogo de GnRH.
4. En pacientes tratadas con un análogo de GnRH los tres meses previos a la realización de una FIV la dosis total de gonadotrofinas requerida para la maduración folicular es significativamente mayor que en pacientes no tratadas con este fármaco.
5. Las características morfológicas de los ovocitos y embriones de mujeres con endometriosis no se afectan por la administración de un análogo de GnRH durante tres meses antes de realizar una FIV. No obstante, la tasas de implantación y gestación son menores en estas pacientes comparadas con las que no son pre-tratadas con análogos de GnRH, lo cual puede estar en relación con características distintas a las morfológicas o a factores extraováricos.

08.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, G. D. (2011). Endometriosis classification: an update. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 23(4), 213-220. <http://doi.org/10.1097/GCO.ob013e328348a3ba>
- Aeby, T. C., Huang, T., & Nakayama, R. T. (1996). The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on human sperm function in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(6), 1779-83; discussion 1783-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8678140>
- Asimakopoulos, B., Abu-Hassan, D., Metzen, E., Al-Hasani, S., Diedrich, K., & Nikolettos, N. (2008). The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 90(1), 60-4. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.054>
- Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J., & Hamamah, S. (2010). Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular Human Reproduction*, 16(8), 531-8. <http://doi.org/10.1093/molehr/gaq032>
- Azem, F., Lessing, J. B., Geva, E., Shahar, A., Lerner-Geva, L., Yovel, I., & Amit, A. (1999). Patients with stages III and IV endometriosis have a poorer outcome of in vitro fertilization-embryo transfer than patients with tubal infertility. *Fertility and Sterility*, 72(6), 1107-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593389>
- Barbonetti, A., Vassallo, M. R. C., Antonangelo, C., Nuccetelli, V., D'Angeli, A., Pelliccione, F., ... Francavilla, S. (2008). RANTES and human sperm fertilizing ability: effect on acrosome reaction and sperm/oocyte fusion. *Molecular Human Reproduction*, 14(7), 387-91. <http://doi.org/10.1093/molehr/gan031>
- Barcelos, I. D. E. S., Donabella, F. C., Ribas, C. P., Meola, J., Ferriani, R. A., de Paz, C. C. P., & Navarro, P. A. (2015). Down-regulation of the CYP19A1 gene in cumulus cells of infertile women with endometriosis. *Reproductive Biomedicine Online*, 30(5), 532-41. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.01.012>

- Barcelos, I. D., Vieira, R. C., Ferreira, E. M., Martins, W. P., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. (2009). Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1749-52. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.006>
- Barnhart, K., Dunsmoor-Su, R., & Coutifaris, C. (2002). Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 77(6), 1148-55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057720>
- Brizek, C. L., Schlaff, S., Pellegrini, V. A., Frank, J. B., & WorriLOW, K. C. (1995). Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12(2), 106-12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670267>
- Bulun, S. E. (2009). Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(3), 268-279. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0804690>
- Bulun, S. E., Fang, Z., Imir, G., Gurates, B., Tamura, M., Yilmaz, B., ... Deb, S. (2004). Aromatase and endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(1), 45-50. <http://doi.org/10.1055/s-2004-823026>
- Bulun, S. E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B., ... Deb, S. (2005). Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacological Reviews*, 57(3), 359-383.
- Burney, R. O., & Giudice, L. C. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3), 511-519. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>
- Canis, M., Donnez, J. G., Guzick, D. S., Halme, J. K., Rock, J. a., Schenken, R. S., & Vernon, M. W. (1997). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and Sterility*, 67(5), 817-821. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81391-X](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81391-X)
- Carpintero, N. L., Suárez, O. A., Mangas, C. C., Varea, C. G., & Rioja, R. G. (2014). Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(3), 187-93. <http://doi.org/10.4103/0974-1208.142479>

- Caruso, A., Rawlins, R. , & Radwanska, E. (1997). P-166 The effect of GnRH agonist suppression on infertility treatment outcome in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 68, S172-S173. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)90981-X](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)90981-X)
- Chedid, S., Camus, M., Smitz, J., Van Steirteghem, A. C., & Devroey, P. (1995). Comparison among different ovarian stimulation regimens for assisted procreation procedures in patients with endometriosis. *Human Reproduction* (Oxford, England), 10(9), 2406-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530675>
- Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir. (n.d.). Retrieved September 19, 2015, from <http://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/>
- Curtis, P., Jackson, A., Bernard, A., & Shaw, R. W. (1993). Pretreatment with gonadotrophin releasing hormone (GnRH) analogue prior to in vitro fertilisation for patients with endometriosis. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 52(3), 211-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8163038>
- D'Hooghe, T. M., Bambra, C. S., Raeymaekers, B. M., De Jonge, I., Lauweryns, J. M., & Koninckx, P. R. (1995). Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(1), 125-134.
- de Abreu, L. G., Romão, G. S., Dos Reis, R. M., Ferriani, R. A., De Sá, M. F. S., & De Moura, M. D. (2006). Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 22(8), 432-436.
- De Abreu, L. G., Silveira, V. S., Scrideli, C. A., Ramos, E. S., Dos Reis, R. M., Ferriani, R. A., & Silva De Sá, M. F. (2012). Endometriosis does not alter aromatase gene expression (CYP19A1) in mural lutein-granulosa cells of women undergoing assisted reproduction techniques – a pilot study. *Journal of Endometriosis*, 3(4), 177-182. <http://doi.org/10.5301/JE.2012.9070>

- de Ziegler, D., Borghese, B., & Chapron, C. (2010). Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet (London, England)*, 376(9742), 730-8. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60490-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60490-4)
- Díaz, I., Navarro, J., Blasco, L., Simón, C., Pellicer, A., & Remohí, J. (2000). Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertility and Sterility*, 74(1), 31-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899493>
- Díaz-Fontdevila, M., Pommer, R., & Smith, R. (2009). Cumulus cell apoptosis changes with exposure to spermatozoa and pathologies involved in infertility. *Fertility and Sterility*, 91(5 Suppl), 2061-8. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.073>
- Dicker, D., Goldman, G. A., Ashkenazi, J., Feldberg, D., Voliovitz, I., & Goldman, J. A. (1990). The value of pre-treatment with gonadotrophin releasing hormone (GnRH) analogue in IVF-ET therapy of severe endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 5(4), 418-20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113929>
- Dicker, D., Goldman, J. A., Levy, T., Feldberg, D., & Ashkenazi, J. (1992). The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertility and Sterility*, 57(3), 597-600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740204>
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 78(3-4), 203-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818645>
- Ferrero, S., Gillott, D. J., Remorgida, V., Anserini, P., Leung, K.-Y., Ragni, N., & Grudzinskas, J. G. (2007). Proteomic Analysis of Peritoneal Fluid in Women with Endometriosis. *Journal of Proteome Research*, 6(9), 3402-3411. <http://doi.org/10.1021/pr060680q>
- Frydman, R., Parneix, I., Belaisch-Allart, J., Forman, R., Hazout, A., Fernandez, H., & Testart, J. (1988). LHRH agonists in IVF: different methods of utilization and comparison with previous ovulation stimulation treatments. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 3(4), 559-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2969005>

- Garrido, N., Navarro, J., García-Velasco, J., Remoh, J., Pellice, A., & Simón, C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Human Reproduction Update*, 8(1), 95-103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11866246>
- Garrido, N., Navarro, J., Remohí, J., Simón, C., & Pellicer, A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Human Reproduction Update*, 6(1), 67-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711831>
- Garry, R. (2004). The endometriosis syndromes: A clinical classification in the presence of aetiological confusion and therapeutic anarchy. *Human Reproduction*.
- Garzetti, G. G., Ciavattini, A., Provinciali, M., Muzzioli, M., Di Stefano, G., & Fabris, N. (1996). Natural cytotoxicity and GnRH agonist administration in advanced endometriosis: positive modulation on natural killer activity. *Obstetrics and Gynecology*, 88(2), 234-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692508>
- Geber, S., Paraschos, T., Atkinson, G., Margara, R., & Winston, R. M. (1995). Results of IVF in patients with endometriosis: the severity of the disease does not affect outcome, or the incidence of miscarriage. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(6), 1507-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593525>
- Gilabert-Estellés, J., Ramón, L. A., España, F., Gilabert, J., Vila, V., Réganon, E., ... Estellés, A. (2007). Expression of angiogenic factors in endometriosis: relationship to fibrinolytic and metalloproteinase systems. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(8), 2120-7. <http://doi.org/10.1093/humrep/dem149>
- Giudice, L. C. (2010). Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 362(25), 2389-2398. <http://doi.org/10.1056/NEJMcp1000274>
- Gong, Y., & Tempfer, C. B. (2011). Regional lymphatic spread in women with pelvic endometriosis. *Medical Hypotheses*, 76(4), 560-563.
- Guzick, D. S., Yao, Y. A., Berga, S. L., Krasnow, J. S., Stovall, D. W., Kubik, C. J., & Zeleznik, A. J. (1994). Endometriosis impairs the efficacy of gamete intrafallopian transfer: results of a case-control study. *Fertility and Sterility*, 62(6), 1186-91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957982>

- Halban, J. (1925). Hysteroadenosis metastatica Die lymphogene Genese der sog. Adenofibromatosis heterotopica. *Archiv für Gynaekologie*, 124(2), 457-482. <http://doi.org/10.1007/BF01693592>
- Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M.-C., Leader, A., & Sirard, M.-A. (2008). Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(5), 1118-27. <http://doi.org/10.1093/humrep/den048>
- Hannon, P. R., & Flaws, J. A. (2015). The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 8. <http://doi.org/10.3389/fendo.2015.00008>
- Harlow, C. R., Cahill, D. J., Maile, L. A., Talbot, W. M., Mears, J., Wardle, P. G., & Hull, M. G. (1996). Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(1), 426-9. <http://doi.org/10.1210/jcem.81.1.8550788>
- Harlow, C. R., Cahill, D. J., Maile, L. A., Talbot, W. M., Mears, J., Wardle, P. G., & Hull, M. G. R. (1996). Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(1), 426-429.
- Hasegawa, T., Zhao, L., Caron, K. M., Majdic, G., Suzuki, T., Shizawa, S., ... Parker, K. L. (2000). Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(9), 1462-1471.
- Hawkins, S. M., & Matzuk, M. M. (2008). The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10-8. <http://doi.org/10.1196/annals.1429.018>
- Hendershot, G. E., Mosher, W. D., & Pratt, W. F. Infertility and age: an unresolved issue. *Family Planning Perspectives*, 14(5), 287-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6926975>
- Hickman, T. N. (2002). Impact of endometriosis on implantation. Data from the Wilford Hall Medical Center IVF-ET Program. *The Journal of Reproductive Medicine*, 47(10), 801-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12418061>

- Holoch, K. J., & Lessey, B. A. (2010). Endometriosis and infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 53(2), 429-38. <http://doi.org/10.1097/GRF.obo13e3181db7d71>
- Iager, A. E., Kocabas, A. M., Otu, H. H., Ruppel, P., Langerveld, A., Schnarr, P., ... Crosby, J. A. (2013). Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. *Fertility and Sterility*, 99(3), 745-752.e6. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.041>
- Imai, A., Takagi, A., & Tamaya, T. (2000). Gonadotropin-releasing hormone analog repairs reduced endometrial cell apoptosis in endometriosis in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 182(5), 1142-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819849>
- Iwanoff, N. S. (1898). IV. Drüsiges cystenhaltiges Uterusfibromyom complicirt durch Sarcom und Carcinom. (Adenofibromyoma cysticum sarcomatoses carcinomatosum). *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 7(3), 295-300. <http://doi.org/10.1159/000280422>
- Lamb, J. D., Zamah, A. M., Shen, S., McCulloch, C., Cedars, M. I., & Rosen, M. P. (2010). Follicular fluid steroid hormone levels are associated with fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 94(3), 952-7. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.010>
- Lessey, B. A. (2000). Medical management of endometriosis and infertility. *Fertility and Sterility*, 73(6), 1089-96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856462>
- Lessey, B. A., Castelbaum, A. J., Wolf, L., Greene, W., Paulson, M., Meyer, W. R., & Fritz, M. A. (2000). Use of integrins to date the endometrium. *Fertility and Sterility*, 73(4), 779-787. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00604-4](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00604-4)
- Levander, G., & Normann, P. (1955). The Pathogenesis of Endometriosis an Experimental Study. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 34(4), 366-398. <http://doi.org/10.3109/00016345509158287>
- Leyendecker, G., Kunz, G., Herbertz, M., Beil, D., Huppert, P., Mall, G., ... Wildt, L. (2004). Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1034, pp. 338-355).

- Liu, K., & Case, A. (2011). Advanced reproductive age and fertility. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal D'obstétrique et Gynécologie Du Canada : JOGC*, 33(11), 1165-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082792>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-8. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, X., Wu, Y., Gao, X.-H., Wang, Y.-W., Wang, L., & Sun, X.-X. (2012). Effect of letrozole on estradiol production and P450 aromatase messenger RNA expression of cultured luteinized granulosa cells from women with and without endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(1), 131-5. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.055>
- MacLachlan, V., Besanko, M., O'Shea, F., Wade, H., Wood, C., Trounson, A., & Healy, D. L. (1989). A controlled study of luteinizing hormone-releasing hormone agonist (buserelin) for the induction of folliculogenesis before in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine*, 320(19), 1233-7. <http://doi.org/10.1056/NEJM198905113201902>
- Marcus, S. F., & Edwards, R. G. (1994). High rates of pregnancy after long-term down-regulation of women with severe endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 171(3), 812-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8092234>
- McMeekin, D. S., & Tillmanns, T. (2003). Endometrial cancer: treatment of nodal metastases. *Curr Treat Options Oncol*, 4(2), 121-130. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12594938
- Menken, J., Trussell, J., & Larsen, U. (1986). Age and infertility. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4771), 1389-94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3755843>
- Monga, R., Ghai, S., Datta, T. K., & Singh, D. (2011). Tissue-specific promoter methylation and histone modification regulate CYP19 gene expression during folliculogenesis and luteinization in buffalo ovary. *General and Comparative Endocrinology*, 173(1), 205-215.
- Nakahara, K., Saito, H., Saito, T., Ito, M., Ohta, N., Takahashi, T., & Hiroi, M. (1997). The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients

- participating in in vitro fertilization programs. *Fertility and Sterility*, 68(2), 312-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9240262>
- Nakamura, K., Oosawa, M., Kondou, I., Inagaki, S., Shibata, H., Narita, O., ... Tomoda, Y. (1992). Menotropin stimulation after prolonged gonadotropin releasing hormone agonist pre-treatment for in vitro fertilization in patients with endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9(2), 113-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1627925>
- Navarro, J., Garrido, N., Remohí, J., & Pellicer, A. (2003). How does endometriosis affect infertility? *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 30(1), 181-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699265>
- Noble, L. S., Simpson, E. R., Johns, A., & Bulun, S. E. (1996). Aromatase expression in endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(1), 174-179.
- Noël, J. C., Chapron, C., Fayt, I., & Anaf, V. (2008). Lymph node involvement and lymphovascular invasion in deep infiltrating rectosigmoid endometriosis. *Fertility and Sterility*, 89(5), 1069-1072.
- Norenstedt, S. N., Linderöth-Nagy, C., Bergendal, A., Sjöblom, P., & Bergqvist, A. (2001). Reduced developmental potential in oocytes from women with endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(12), 644-9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3455250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Oehninger, S., Brzyski, R. G., Muasher, S. J., Acosta, A. A., & Jones, G. S. (1989). In-vitro fertilization and embryo transfer in patients with endometriosis: impact of a gonadotrophin releasing hormone agonist. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 4(5), 541-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2507576>
- Olivennes, F., Feldberg, D., Liu, H. C., Cohen, J., Moy, F., & Rosenwaks, Z. (1995). Endometriosis: a stage by stage analysis--the role of in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 64(2), 392-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615119>
- Ouandaogo, Z. G., Frydman, N., Hesters, L., Assou, S., Haouzi, D., Dechaud, H., ... Hamamah, S. (2012). Differences in transcriptomic profiles of human cumulus cells isolated from

- oocytes at GV, MI and MII stages after in vivo and in vitro oocyte maturation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(8), 2438-47. <http://doi.org/10.1093/humrep/des172>
- Pellicer, A., Albert, C., Garrido, N., Navarro, J., Remohí, J., & Simón, C. (2000). The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 55, 109-19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889840>
- Pellicer, A., Oliveira, N., Ruiz, A., Remohí, J., & Simón, C. (1995). Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10 Suppl 2, 91-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745306>
- Remorgida, V., Anserini, P., Croce, S., Costa, M., Ferraiolo, A., & Capitanio, G. L. (1990). Comparison of different ovarian stimulation protocols for gamete intrafallopian transfer in patients with minimal and mild endometriosis. *Fertility and Sterility*, 53(6), 1060-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2112491>
- Rickes, D., Nickel, I., Kropf, S., & Kleinstein, J. (2002). Increased pregnancy rates after ultralong postoperative therapy with gonadotropin-releasing hormone analogs in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 78(4), 757-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372452>
- Rosenfeld, D. L., & Lecher, B. D. (1981). Endometriosis in a patient with Rokitansky-Kuster-Hausser syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 139(1), 105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7457509>
- Russell, D. L., & Robker, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 13(3), 289-312. <http://doi.org/10.1093/humupd/dml062>
- Sallam, H. N., Garcia-Velasco, J. A., Dias, S., & Arici, A. (2006). Long-term pituitary down-regulation before in vitro fertilization (IVF) for women with endometriosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD004635. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD004635.pub2>
-

- Sampson, J. (1927). Peritoneal Endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 14, 93-94. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/262098297_Peritoneal_Endometriosis_due_to_the_menstrual_dissemination_of_endometrial_tissue_into_the_peritoneal_cavity
- Sampson, J. A. (1927). Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American Journal of Pathology*, 3(2), 93-110.43. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1931779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sanfilippo, J. S., Wakim, N. G., Schikler, K. N., & Yussman, M. A. Endometriosis in association with uterine anomaly., 154 *American journal of obstetrics and gynecology* 39-43 (1986).
- Sasson, I. E., & Taylor, H. S. (2008). Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127, 106-15. <http://doi.org/10.1196/annals.1434.014>
- Sharma, D., Ghai, S., & Singh, D. (2009). Different promoter usage for CYP19 gene expression in buffalo ovary and placenta. *General and Comparative Endocrinology*, 162(3), 319-28. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.009>
- Sharpe-Timms, K. L., Keisler, L. W., McIntush, E. W., & Keisler, D. H. (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Fertility and Sterility*, 69(6), 1128-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9627304>
- Shaw, R. W., Ndukwe, G., Imoedemhe, D. A., Bernard, A., Burford, G., & Bentick, B. (1987). Endocrine changes following pituitary desensitization with LHRH agonist and administration of purified FSH to induce follicular maturation. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 94(7), 682-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3113476>
- Simón, C., Gutiérrez, A., Vidal, A., de los Santos, M. J., Tarín, J. J., Remohí, J., & Pellicer, A. (1994). Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 9(4), 725-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046030>

- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., ... Michael, M. D. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15(3), 342-55. <http://doi.org/10.1210/edrv-15-3-342>
- Sisco, B., Hagemann, L. J., Shelling, A. N., & Pfeffer, P. L. (2003). Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology*, 144(9), 3904-13. <http://doi.org/10.1210/en.2003-0485>
- Šmuc, T., Hevir, N., Ribič-Pucelj, M., Husen, B., Thole, H., & Rižner, T. L. (2009). Disturbed estrogen and progesterone action in ovarian endometriosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301(1-2), 59-64.
- Sun, H. S., Hsiao, K.-Y., Hsu, C.-C., Wu, M.-H., & Tsai, S.-J. (2003). Transactivation of steroidogenic acute regulatory protein in human endometriotic stromal cells is mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *Endocrinology*, 144(9), 3934-3942. <http://doi.org/10.1210/en.2003-0289>
- Sung, L., Mukherjee, T., Takeshige, T., Bustillo, M., & Copperman, A. B. (1997). Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 14(3), 152-6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3454677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Surrey, E. S., & Halme, J. (1992). Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Fertility and Sterility*, 58(2), 273-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1386030>
- Surrey, E. S., Lietz, A. K., Gustofson, R. L., Minjarez, D. A., & Schoolcraft, W. B. (2010). Does endometrial integrin expression in endometriosis patients predict enhanced in vitro fertilization cycle outcomes after prolonged GnRH agonist therapy? *Fertility and Sterility*, 93(2), 646-51. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.023>
- Surrey, E. S., Silverberg, K. M., Surrey, M. W., & Schoolcraft, W. B. (2002). Effect of prolonged gonadotropin-releasing hormone agonist therapy on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer in patients with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 78(4), 699-704. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372443>

- Taff, L., & Jones, S. Cesarean scar endometriosis. A report of two cases., 47 *The Journal of reproductive medicine* 50-52 (2002).
- Takahashi, K., Mukaida, T., Tomiyama, T., Goto, T., & Oka, C. (2004). GnRH antagonist improved blastocyst quality and pregnancy outcome after multiple failures of IVF/ICSI-ET with a GnRH agonist protocol. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 21(9), 317-22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3468267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Taketani, Y., Kuo, T. M., & Mizuno, M. (1992). Comparison of cytokine levels and embryo toxicity in peritoneal fluid in infertile women with untreated or treated endometriosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167(1), 265-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1442940>
- Tesfaye, D., Ghanem, N., Carter, F., Fair, T., Sirard, M.-A., Hoelker, M., ... Lonergan, P. (2009). Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reproduction, Fertility, and Development*, 21(3), 451-61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261222>
- Wang, J., Zhou, F., Dong, M., Wu, R., & Qian, Y. (2006). Prolonged gonadotropin-releasing hormone agonist therapy reduced expression of nitric oxide synthase in the endometrium of women with endometriosis and infertility. *Fertility and Sterility*, 85(4), 1037-44. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.028>
- Wen, X., Li, D., Tozer, A. J., Docherty, S. M., & Iles, R. K. (2010). Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 8, 117. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-8-117>
- Wood Russell, W. (1899). Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 134(2), .225 226.
- Wunder, D. M., Mueller, M. D., Birkhäuser, M. H., & Bersinger, N. A. (2005). Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 22(6), 257-64. Retrieved

from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3455727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
