



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

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

TESIS DOCTORAL

**“IMPACTO DE LOS MIOMAS
INTRAMURALES EN LA RECEPTIVIDAD
ENDOMETRIAL”**

Autora:

María Angeles Higón Serena

Licenciada en Medicina

Directores:

Prof. Antonio Pellicer Martínez

Prof. José A. Horcajadas Almansa

Prof. Francisco J. Esteban Ruiz

Valencia 2015

Certificado de la dirección de la tesis firmado por los directores/as de la misma.

AGRADECIMIENTOS

A José Antonio Horcajadas por su paciencia y dedicación .Sin su inestimable ayuda habría resultado mucho más difícil la realización de mi Tesis Doctoral.

A mis compañeros del Hospital Dr Peset que me ayudaron con la selección de pacientes y en ocasiones recogida de alguna muestra endometrial.

Al I.V.I. y en especial al Profesor Antonio Pellicer por su colaboración tanto por proporcionarme pacientes para el estudio como en la inestimable ayuda económica.

Al Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología por permitirme presentar mi trabajo.

A mis padres, por ser mi apoyo y estar siempre ahí cuando lo he necesitado.

A mis hijos por ser lo más preciado que tengo.

A Ximo Navarro por su paciencia y comprensión en los últimos momentos de mi Tesis.

Higón

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | pág. 1 |
| 1.1. Mecanismos fisiopatológicos de los miomas relacionados con la fisiología uterina | pág. 10 |
| 1.2. Efectos de los miomas sobre el desarrollo del embarazo | pág. 14 |
| 1.3. Implantación embrionaria | pág. 20 |
| 1.4. Receptividad endometrial | pág. 23 |
| 1.4.1. Evaluación de la receptividad endometrial | pág. 23 |
| 1.4.1.1. Técnicas de imagen | pág. 23 |
| 1.4.1.2. Métodos histológicos | pág. 24 |
| 1.4.1.3. Marcadores bioquímicos | pág. 26 |
| 1.4.1.4. Marcadores moleculares | pág. 27 |
| 1.5. Miomas y reproducción | pág. 30 |
| 2. OBJETIVOS | pág. 33 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | pág. 37 |
| 3.1. Estudio prospectivo: análisis histológicos y transcriptómicos | pág. 39 |
| 3.1.1. Diseño del estudio y recogida de biopsias endometriales | pág. 39 |

| | |
|--|---------|
| 3.2. Estudio del perfil de expresión génica: transcriptómica | pág. 41 |
| 3.2.1. Purificación de ARN total | pág. 41 |
| 3.2.2. Marcaje, hibridación y lectura del microarray | pág. 41 |
| 3.3. Análisis de datos | pág. 42 |

| | |
|---|----------------|
| 3.3.1. Análisis bioinformático | pág. 42 |
| 3.3.2. Preprocesado | pág. 42 |
| 3.3.3. Agrupamiento de muestras | pág. 42 |
| 3.3.4. Expresión génica diferencial | pág. 43 |
| 3.3.5. Análisis funcional | pág. 43 |
| 3.3.6. Validación de microarray: PCR cuantitativa | pág. 44 |
| 3.4. Estudio retrospectivo: impacto de miomas en las tasas de implantación y de embarazo | pág. 44 |
| 3.4.1. Diseño del estudio y recogida de datos | pág. 44 |
| 3.5. Análisis estadístico de datos clínicos | pág. 46 |
| 4. RESULTADOS | pág. 49 |
| 4.1. Estudios histológicos y moleculares | pág. 51 |
| 4.1.1. Dataje histológico endometrial | pág. 51 |
| 4.2. Estudios moleculares | pág. 54 |
| 4.3. Validación por PCR a tiempo real de los datos del microarray | pág. 54 |
| 4.4. Análisis de los grupos de muestras | pág. 56 |
| 4.5. Expresión génica diferencial | pág. 56 |
| 4.6. Ontología génica | pág. 59 |
| 4.7. Marcadores de receptividad endometrial | pág. 64 |
| 4.8. Estudio clínico retrospectivo | pág. 65 |
| 5. DISCUSIÓN | pág. 69 |
| 6. CONCLUSIONES | pág. 81 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | pág. 85 |

Lista de siglas, abreviaturas, acrónimos y anglicismos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ANOVA: Análisis de la varianza (de sus siglas en inglés, *analysis of variance*).

CATT: *Cochran-Armitage trend test* (Test de tendencia Cochran-Armitage).

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

DIU: Dispositivo intrauterino.

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

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

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

EST: *Expressed sequence tag* (Marcador de secuencia expresada).

ET: Transferencia de embriones (de sus siglas en inglés, *embryo transfer*).

E2: Estradiol.

FC: *Fold change* (tasa de cambio, número de veces de cambio de una situación con respecto a otra).

FIV: Fecundación in vitro.

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

GEPAS: *Gene Expression Pattern Array Suit*.

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

HOC: Hiperestimulación ovárica controlada.

H&E: Hematoxilina y eosina.

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

IUGR: Restricción del crecimiento intrauterino (de sus siglas en inglés, *intra-uterine growth restriction*).

IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad.

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

MEC: Matriz extracelular.

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

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

OR: *Odds Ratio* (razón de momios o razón de oportunidades).

P: Progesterona.

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

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena (de sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*).

PF: Proliferativas.

PG: Prostaglandina.

PR: Pre-receptivas.

PROM: Rotura prematura de membranas (de sus siglas en inglés, *premature rupture of membranes*).

PS: Post-receptivas.

Q-PCR: PCR cuantitativa (del inglés, *quantitative PCR*).

R: Receptivas.

RIN: Número de integridad del ARN (de sus siglas en inglés, *RNA integrity number*).

RMN: Resonancia magnética nuclear.

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

RR: Riesgo relativo.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (de sus siglas em inglés, *real time polymerase chain reaction*).

SEM: Microscopía electrónica de barrido (de sus siglas en inglés, *scanning electron microscopy*).

SD: Desviación estándar (de sus siglas en inglés, *standar deviation*).

SOTA: Análisis de tolerancia de segundo orden (de sus siglas en inglés, *second order tolerance analysis*).

TAC: Tomografía axial computerizada.

TUI: Imagen tomográfica por ultrasonidos (de sus siglas en inglés, *tomographic ultrasound imaging*).

TRA: Técnicas de reproducción asistida.

vs.: del latín *versus*

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

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el 10% de las parejas son infértiles, estimándose entre 60 y 80 millones las parejas que tienen problemas reproductivos (Diczfalusy y cols., 1996). En el año 2010, el 1,9% de las mujeres entre 20-44 años a nivel mundial que buscaban un hijo fueron incapaces de conseguirlo en el primer embarazo (infertilidad primaria) y el 10,5% de mujeres con un hijo que buscaban el segundo no lo consiguieron (infertilidad secundaria) (Mascarenhas y cols., 2012). Aunque la infertilidad *per se* no implica necesariamente una dolencia o alteración física, sí produce un detrimento grave de la salud y el bienestar psíquico y social de la pareja (Diczfalusy y cols., 1996). En España, aunque no existen estudios epidemiológicos de infertilidad realizados mediante encuestas directas, se calcula que el 15% de las parejas que desean tener un hijo no pueden satisfacer su deseo reproductivo (Vanrell, 1992). Esto supone unas 600.000 parejas infértiles, presentándose cada año más de 3.000 nuevos casos. Para un 15% de esas parejas no existe un diagnóstico claro denominándose estos casos como infertilidad de origen desconocido (Peinado y Bolúmar, 1996). Muchos de estos casos se relacionan con problemas de compatibilidad de los gametos y fallo de implantación embrionaria de origen endometrial (Domínguez, 2003).

En la especie humana se ha descrito que, en condiciones naturales, alrededor del 30% de los embriones consiguen implantar; es decir, fisiológicamente sólo un tercio de los ciclos considerados fértiles acaban en embarazo (Miller y cols., 1980). Las causas de esta baja tasa de éxito son compartidas entre el embrión (hasta un 30% de los blastocistos *in vivo* es morfológicamente anómalo en el momento de la

implantación (Hertig y cols., 1959)) y un defectuoso diálogo entre embrión y el endometrio materno (el 30% de las pérdidas gestacionales precoces ocurre antes del momento de la menstruación (Wilcox y cols., 1988)). Este porcentaje de éxito es aún menor en pacientes sometidas a tratamientos de fecundación in vitro (Simón y cols., 1999) aunque en los últimos años, los porcentajes de implantación y embarazo se han incrementado enormemente gracias, principalmente, al diagnóstico genético preimplantacional (Munné y cols., 2009) y las nuevas tecnologías. Paradójicamente, en las técnicas de reproducción asistida, con los programas de donación de ovocitos, donde el ciclo menstrual es sustituido hormonalmente, esa barrera natural del 30% de éxito se ha superado, alcanzándose tasas de embarazo acumulado cercanas al 70% en el primer ciclo, del 91% en el segundo y del 97% en el tercero (Cohen y cols., 1999), por encima del 50% obtenido en años anteriores (Remohí y cols., 1995). En los tratamientos de fecundación in vitro (FIV) las tasas de parto a término por ciclo comenzado son de un 29,4%, mientras que el porcentaje de parto a término por transferencia realizada alcanza el 31,6 % (Domínguez, 2003).

Existen una gran cantidad de factores que pueden contribuir a la infertilidad, desde infecciones o factores ambientales a factores genéticos e incluso relacionados con la dieta. Estos factores pueden afectar a la mujer, al hombre o a ambos, resultando en la incapacidad para conseguir un embarazo o para que dicho embarazo llegue a término (Mascarenhas y cols., 2012). El factor masculino contribuye al 30-55% de todos los casos de infertilidad (Lee y Foo, 2014). Las altas tasas de infertilidad masculina

se deben a una gran variedad de factores, incluyendo disruptores medioambientales, defectos genéticos, fallos endocrinos y fisiológicos y patologías testiculares; acompañados normalmente de anormalidades cualitativas (astenospermia, teratozoospermia y necropermia) y cuantitativas (azoospermia, criptozoospermia y oligoastenozoospermia) (Lee y Foo, 2014).

Las causas de la infertilidad de origen femenino, que pueden variar de un área geográfica y social a otra, son muy diversas (tabla 1); siendo las más importantes el factor tubárico (36%), los desórdenes ovulatorios (33%) (entre los que se encuentra el síndrome de ovario poliquístico), la endometriosis (6%) y causas de sospecha de factor femenino de origen desconocido (hasta un 40%) (Healy y cols., 1994).

| Mecanismo | Condición |
|---|---|
| Tejido gonadal ausente | Síndrome de Turner |
| | Disgenesia gonadal |
| | Ovariectomía bilateral |
| Producción y función de los gametos alteradas | Hipogonadismo hipogonadotrópico |
| | Anovulación hipotalámica |
| | Anovulación hiperprolactinemia |
| | Insensibilidad androgénica completa |
| | Síndrome de ovario poliquístico |
| | Fallo ovárico prematuro |
| | Síndrome de resistencia ovárica |
| | Ciclos císticos |
| | Síndrome del folículo luteinizado no roto |
| | Retención de óvulos |
| | Factor ovocitario |
| | Drogas citotóxicas (ciclofosfamida) |
| | Otras drogas (antagonistas dopamina, anti-inflamatorios, esteroides anabólicos) |
| | Irradiación |
| Hábito de fumar | |
| Transporte gamético alterado | Malfuncionamiento en la captura de óvulos y el transporte mediado por cilios |
| | Infertilidad tubal |
| | Endometriosis |
| | Factor cervical |
| | Anticuerpos antiesperma |
| Concepción alterada | Ovarios poliquísticos |
| | Hábito de fumar |
| | Anormalidades en las moléculas de adhesión espermática ZP2 y ZP3 |
| Abortos recurrentes | Aberraciones cromosómicas |
| | Factor ovocitario |
| | Desórdenes en la coagulación |
| | Ovários poliquísticos |
| | Anormalidades en el grosor uterino |

Tabla 1. Causas de infertilidad femenina (Adaptado de Healy y cols., 1994).

Se sospecha que una de las principales causas de la infertilidad de origen desconocido sea de origen endometrial. La compleja fisiología del endometrio se puede ver alterada por multitud de factores, malformaciones anatómicas, patologías diversas y variaciones endocrinas que pueden conducir a una alteración de la función endometrial (Aplin y cols., 2008). Una de las patologías posiblemente relacionadas con la disminución de la implantación embrionaria es la presencia de miomas, tumores benignos que pueden alterar el ambiente molecular y fisiológico del endometrio, afectando a la migración espermática, la implantación embrionaria, y, por supuesto, a la receptividad endometrial (Aghajanova y cols., 2008, 2008b).

En el mundo desarrollado, existe una tendencia a retrasar el momento de la maternidad hasta finales de la tercera década de vida o los cuarenta años, momento en que la fertilidad natural de la mujer cae de forma dramática, principalmente debido al descenso de la calidad y cantidad ovocitaria. A este hecho se le suman otros factores como el aumento de otras patologías ginecológicas, siendo la presencia de miomas una de las más habituales, algo especialmente acusado en mujeres de etnia afroamericana (Somigliana y cols., 2007; Klatsky y cols., 2008).

Los fibromas uterinos, leiomiomas o miomas son tumores benignos en las capas de músculo liso del útero, cuya transformación es extremadamente rara (Gupta y cols., 2008). La gran mayoría de los miomas son asintomáticos y no requieren tratamiento. Cuando presentan síntomas, el más común es la menorragia o hipermenorrea (Somigliana y

cols., 2007; Gupta y cols., 2008; Zorrilla y Yatsenko, 2013; Segars y cols., 2014), la cual puede causar anemia (Gupta y cols., 2008). Con menos frecuencia aparece un bulto o hinchazón en la zona pélvica, generalmente por miomas grandes, y raramente se presenta un dolor agudo por la degeneración o la torsión de un mioma pedunculado (Somigliana y cols., 2007). A menudo aparece una disconformidad o dolor pélvico causado por presión y puede dar lugar a un aumento en la frecuencia urinaria o disfunción urinaria (Gupta y cols., 2008; Segars y cols., 2014). La incidencia y la severidad de los síntomas varían con el tamaño, el número y la localización del mioma (Gupta y cols., 2008). Durante el embarazo, estas lesiones tumorales tienden a crecer en tamaño (Zorrilla y Yatsenko, 2013).

El diagnóstico suele realizarse mediante el palpado de un contorno uterino irregular en un examen pélvico (Somigliana y cols., 2007) y se suele confirmar mediante ultrasonografía, ya que posee una sensibilidad del 90-100% y una especificidad muy alta, del 87-98% (Somigliana y cols., 2007; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society of Reproductive 2008; Makker y Goel 2013). Los parámetros sonográficos incluyen la delgadez endometrial, el patrón endometrial y el flujo sanguíneo endometrial y subendometrial (Makker y Goel 2013). Cuando no está clara la relación entre el mioma y la cavidad uterina, se realiza un sonohisterograma para distinguir entre lesiones submucosas e intramurales. Para diferenciar los miomas de los adenomiomas también se emplea la ultrasonografía, observando que los adenomiomas no

presentan lesión marginal aunque si poseen lagunas histológicas (Somigliana y cols., 2007). La técnica de láser Doppler intrauterina durante la fase lútea temprana permite determinar el flujo sanguíneo microvascular del endometrio, sirviendo como un buen predictor de la receptividad endometrial puesto que un buen aporte sanguíneo es importante para una implantación exitosa (Makker y Goel 2013).

Los miomas se clasifican de acuerdo a su localización anatómica, pudiendo ser submucosos, intramurales o subserosos. Los miomas submucosos son los que distorsionan la cavidad uterina y se pueden subdividir en tres tipos: pedunculados o tipo 0, sésiles con extensión intramural $<50\%$ o tipo I, y sésiles con extensión intramural $\geq 50\%$ o tipo II. Los miomas intramurales no alteran la cavidad uterina y tienen una penetración $<50\%$ en la fase serosa del útero. Por último, los miomas subserosos presentan una proyección $\geq 50\%$ en la fase serosa. Sin embargo, esta clasificación no tiene en cuenta el tamaño del tumor, hecho que seguramente tiene un gran impacto clínico puesto que la pared normal del útero es de 15-20 mm. De hecho, si un tumor no altera la cavidad uterina pero tiene un tamaño mayor de 40 mm, ocupando toda la pared del útero, se clasifica como subseroso, y dando por hecho que a pesar de su tamaño no tiene impacto en la fertilidad (Somigliana y cols., 2007).

Aunque no se conoce bien la etiología de los miomas, se han identificado reordenamientos cromosómicos somáticos o deleciones en las regiones 12q y 7q en pacientes con miomas, con una prevalencia del 20% en el caso de deleciones en 7q (Zorrilla y Yatsenko, 2013). Se han

implicado los genes CUX1, ZNHIT1 y CUL1 como claves en las deleciones en 7q (Zorrilla y Yatsenko 2013). Además, se han identificado mutaciones afectando a oncogenes, metabolismo y señalización de la hormona folículo estimulante (FSH), y cambios en los genes COL4A5, COL4A6, HMGA2 y RAD51B. El 60% de las pacientes con estos miomas presentan mutaciones en el gen MED12 (Zorrilla y Yatsenko 2013). El 20% de las alteraciones cromosómicas se deben a translocaciones 12:14, donde se ha identificado el gen HMGA2, que codifica una proteína de unión a ADN de alta movilidad. Otras mutaciones presentes en pacientes con estos miomas aparecen en los genes SLK, que codifica una quinasa implicada en la diferenciación miogénica; en AKAP13, una proteína de unión a quinasa relacionada con los filamentos del citoesqueleto (Ciavattini y cols., 2013); y fumarato hidratasa (FH), la cual juega un papel en el desarrollo de miomatosis hereditaria (Segars y cols., 2014).

Además de los factores genéticos y la edad, existen otros factores de riesgo para los miomas entre los que se encuentran la obesidad, deficiencia de vitamina D, estrés, infecciones en el tracto reproductor y exposición a disruptores endocrinos (ftalatos, bisfenol A, dietilestilbestrol) (Segars y cols., 2014).

1.1. Mecanismos fisiopatológicos de los miomas relacionados con la fisiología uterina

Aunque no se conoce bien el modo por el cual se asocia la presencia de miomas submucosos con infertilidad o subfertilidad, se han propuesto varios mecanismos (Parker 2007). Se cree que los miomas pueden interferir con la migración del espermatozoides y el transporte de óvulos por el bloqueo mecánico de las zonas distales o proximales de los tubos de Falopio (Pritts 2001; Oliveira y cols., 2004; Parker 2007; Somigliana y cols., 2007; Khaund y Lumsden 2008; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society of Reproductive 2008). También pueden afectar al proceso de implantación embrionaria a través de la alteración de la cavidad uterina causando presión mecánica o generando contracciones uterinas anormales, y causando desórdenes vasculares en el endometrio, secreción de sustancias vasoactivas y, en general, una función endometrial alterada (Pritts 2001; Oliveira y cols., 2004; Parker 2007; Somigliana y cols., 2007; Khaund y Lumsden 2008; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society of Reproductive 2008). La expresión aberrante de factores de crecimiento en el endometrio también podría jugar un papel patológico (Benecke y cols., 2005; Brady y cols., 2013), como por ejemplo VEGF, EGF, HB-EGF, PDGF, IGF, aFGF y bFGF (Ciavattini y cols., 2013). Además, la presencia de un mioma submucoso puede crear una respuesta inflamatoria local y generar un ambiente hostil en el endometrio que impida el transporte del espermatozoides y la implantación del embrión (Somigliana y cols., 2007; Khaund y Lumsden 2008; Ciavattini y cols., 2013). La existencia de un flujo sanguíneo inadecuado también explicaría

una reducción en la implantación (Somigliana y cols., 2007; Khaund y Lumsden 2008).

Mientras algunos investigadores han propuesto la alteración de la contractilidad uterina como el mecanismo por el cual los miomas intramurales que alteran la cavidad uterina afectan a la fertilidad, otros han sugerido que los miomas podrían inducir cambios inflamatorios y vasculares en el endometrio dando como resultado un endometrio menos receptivo (Brady y cols., 2013; Makker y Goel 2013).

La peristalsis uterina está activa durante las fases periovulatoria, desde el cérvix hasta el fundus uterino, y menstrual, en dirección opuesta; pero raramente se observa este proceso durante la fase lútea (Yoshino y cols., 2010). Esto apoya la idea de que la peristalsis uterina está relacionada con funciones uterinas como el transporte del espermatozoides, la implantación embrionaria y la descarga del flujo menstrual (Yoshino y cols., 2010; Makker y Goel 2013). El grupo de Yoshino (Yoshino y cols., 2010) ha estudiado este fenómeno durante la ventana de implantación en mujeres con miomas intramurales. La mitad de las pacientes presentaban una peristalsis anormal durante la fase lútea media (ventana de implantación), separándolas en un grupo de baja frecuencia de peristalsis y otro de alta frecuencia. En el grupo de alta frecuencia ninguna paciente consiguió quedarse embarazada, mientras sólo un tercio del grupo de baja frecuencia lo logró. Comparando ambos grupos se encontró que no había diferencia en el número de miomas, el diámetro medio ni en la incidencia de una cavidad uterina deformada; por tanto, una peristalsis uterina anormal en presencia de miomas intramurales podría ser una de las

razones por las que se observa una reducción en las tasas de embarazo de estos pacientes (Yoshino y cols., 2010).

Varios estudios han demostrado también que la progesterona tiene un papel importante en la patogénesis de los miomas ya que los niveles de ARNm y proteína de los subtipos del receptor de progesterona, PR-A y PR-B, se encuentran aumentados en miomas en comparación con el miometrio normal. De la misma forma, se ha visto un aumento en la expresión de los receptores de estrógeno, ER α y ER β , en estos miomas (Makker y Goel 2013). Tanto progesterona como estrógeno regulan la expresión de factores de crecimiento, por lo que pueden ser responsables del crecimiento del mioma (Ciavattini y cols., 2013; Segars y cols., 2014).

La angiogénesis es un proceso clave en la implantación embrionaria, este proceso es débil durante la fase menstrual y aumenta rápidamente durante la fase proliferativa temprana y empieza a descender desde la mitad del ciclo menstrual. Una expresión anómala de factores angiogénicos podría resultar en una implantación defectuosa. Se ha visto que la presencia de miomas aumenta la expresión de los factores angiogénicos adenomedulina y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en el endometrio. Además, la expresión del receptor del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) está alterada en la fase lútea media en mujeres con miomas y sangrado uterino anormal (Makker y Goel, 2013).

La desorganización de la matriz extracelular es otra característica del crecimiento de los miomas, en la que metaloproteinasas (MMPs) y subtipos de colágeno como COL1A1, 4A2, 6A1, 6A2, 7A1 y 16A1, se expresan más en las células del mioma en comparación con las células del miometrio (Ciavattini y cols., 2013).

Otros factores como las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dirigir la activación de quinasas de señales extracelulares como ERK1/2 y aumentar la proliferación de las células de los miomas; siendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) capaces de estimular la formación de ROS a través de la activación de receptores tirosina quinasa y la fosforilación de una subunidad de la enzima NADH oxidasa (Segars y cols., 2014). La señalización de mTOR, que incluye receptores tirosina quinasas de EGF y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), y la señalización de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), se encuentra activada con una gran frecuencia en los miomas humanos (Segars y cols., 2014).

1.2. Efectos de los miomas sobre el desarrollo del embarazo

Hay que tener en cuenta que existen problemas importantes en la investigación en este campo ya que tanto los miomas como la infertilidad aumentan paulatinamente con la edad. Además, la función reproductiva depende de un gran número de factores como ovulación, función de trompas de Falopio, fertilización y nidación; haciendo que sea muy difícil

controlar todas estas variables para estudiar el impacto de un único factor como es la presencia de miomas (Gupta y cols., 2008).

Varios estudios de cohortes basados en la influencia de los miomas sobre el embarazo han permitido obtener un consenso en que los miomas aumentan las tasas de aborto y provocan dolores pélvicos en la mayoría de las mujeres con estas lesiones (Somigliana y cols., 2007; Guo y Segars 2012). Otra complicación muy común, aunque no se sabe por qué ocurre en algunas mujeres y no en otras, es la “degeneración roja” en la que se interrumpe el flujo sanguíneo al mioma y acaba degenerando y causando un dolor agudo durante el embarazo (Gupta y cols., 2008; Guo y Segars 2012). Además, la presencia de miomas aumenta los índices de varias complicaciones del embarazo durante el segundo y el tercer trimestre, entre los que se encuentran: parto prematuro, rotura prematura de membranas (PROM), restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), corioamnionitis, placenta previa, desprendimiento prematuro de la placenta, malposicionamiento del feto, parto por cesárea, hemorragia post-parto (causada por un descenso en la contractilidad uterina), placenta retenida, malformaciones, muerte infantil o perinatal e infección puerpérica (Somigliana y cols., 2007; Khaund y Lumsden, 2008; Guo y Segars, 2012). El riesgo de desarrollar estas complicaciones durante el embarazo aumenta si los miomas superan un tamaño de 3 cm (Guo y Segars, 2012). Otros autores no han encontrado una asociación entre la presencia de miomas y un aumento en PROM, IUGR y placenta retenida (Klatsky y cols., 2008). Además, los estudios a menudo presentan variables confusas como distintos métodos de diagnóstico, forma de

evaluación de la cavidad uterina, tamaño y número distinto de miomas, edad de las pacientes y tipo de tratamiento de fertilidad (Gupta y cols., 2008). Tampoco se conoce el mecanismo por el cual los miomas provocan estas complicaciones obstétricas, aunque parece ser que serían causadas por obstrucción mecánica o por la modificación de la contractilidad uterina (Khaund y Lumsden, 2008).

Aunque los miomas grandes, los miomas de cualquier tamaño que comprimen la cavidad uterina y los miomas submucosos parecen afectar el inicio del embarazo y su desarrollo, el impacto en la infertilidad de los miomas intramurales o subserosos más pequeños que no alteran la cavidad endometrial es controversial (Oliveira y cols., 2004; Khaund y Lumsden, 2008; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society of Reproductive 2008). En cambio, los miomas subserosos no tienen o tienen muy poco impacto en la fertilidad (Khaund y Lumsden, 2008; Brady y cols., 2013).

1.3. Implantación embrionaria

La implantación embrionaria es un paso crítico en el proceso reproductivo (Cakmak y Taylor, 2011; Makker y Goel, 2013), altamente regulado y que requiere de un estrecho diálogo entre el embrión y el endometrio, donde se produce una sincronización de la maduración del embrión hasta la fase de blastocisto con la diferenciación del endometrio para conseguir un estado receptivo del embrión (Wang y Dey, 2005; Achache y Revel, 2006; Kennedy y cols., 2007; Achache y cols., 2010;

Cakmak y Taylor, 2011; Altmäe y cols., 2012; Ramírez, 2013). Se sabe que la interacción entre los factores embrionarios y maternos secretados es crucial para las fases de aposición, adhesión e invasión (Cavagna y Mantese, 2003; Hoozemans y cols., 2004; Achache y Revel, 2006; Cakmak y Taylor, 2011;).

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

En la siguiente fase, las moléculas de adhesión implicadas en la adhesión célula-célula y en la adhesión célula-matriz extracelular son cruciales para la unión del blastocito al endometrio materno (Simón y

cols., 2009). El endometrio gracias a la exposición en la superficie de las células trofoblásticas de receptores de factor inhibidor de leucemia (LIF), factor estimulador de colonias (CSF) y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), L-selectina e integrinas y a la liberación de mensajeros químicos como interleukina 1- β (IL-1 β) permite la unión y la fijación del embrión a la pared uterina (Hoozemans y cols., 2004; Ramírez, 2013).

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

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

El embrión, debido a su naturaleza genética paterna y materna, puede generar una respuesta inmunológica en la madre conocida como “restricción materna”; la cual puede ser causa de un fallo en la implantación o en la placentación (Cavagna y Mantese, 2003; Hoozemans y cols., 2004; Achache y Revel, 2006; Cakmak y Taylor, 2011). El estudio de la relación entre el sistema inmune y el sistema reproductor ha permitido demostrar la función de determinadas citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión en los órganos del tracto reproductor (Domínguez y cols., 2005). De hecho, el proceso de implantación embrionaria presenta muchas similitudes con el proceso de migración leucocitaria (figura 1), ya que el leucocito en su migración a través del endotelio presenta unas fases similares a las del embrión cuando atraviesa el epitelio endometrial e incluso comparte la funcionalidad de determinados grupos de moléculas como integrinas, selectinas y tetraspaninas (Domínguez y cols., 2005; Simón y cols., 2009). Además, es esencial una inmunomodulación para que el embrión se implante adecuadamente; donde la glicodelina A juega un papel importante inhibiendo la actividad de las células NK (natural killer), junto con otras moléculas inmunomoduladoras como la inhibina y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) secretados por el endometrio e IL-1 β liberada por el embrión (Hoozemans y cols., 2004).

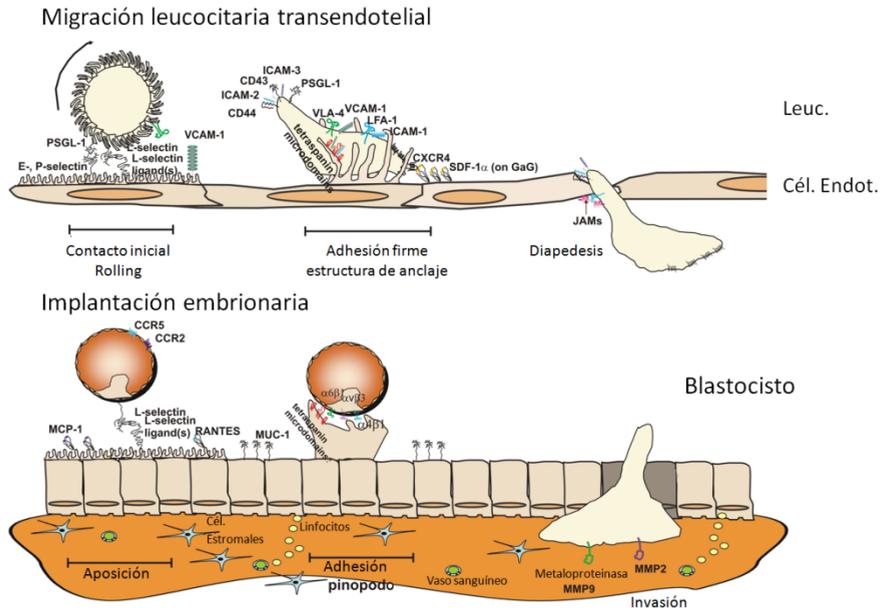


Figura 1. Similitudes de los procesos de migración leucocitaria transendotelial e implantación embrionaria (Domínguez y cols., 2005).

1.4. Receptividad endometrial

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

como integrinas, laminina, fibronectina, mucina 1 (MUC-1), inhibina, LIF, CSF, prostaglandinas (PGs), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), glicodelina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y HB-EGF (Hoozemans y cols., 2004). Este estado receptivo se adquiere entre los días 20 y 21 de un ciclo menstrual regular de 28 días, en el día +7 después del pico de LH endógena que desencadena la ovulación (LH+7). Este día representa el centro de la ventana de implantación, que es como se conoce este periodo, llamado *Window of Implantation* (WOI) en inglés (Wilcox y cols., 1999; Achache y Revel, 2006; Achache y cols., 2010; Bellver y cols., 2011; Ramírez, 2013; Vilella y cols., 2013) (figura 2). De este modo, se denomina día LH 0 al día que se produce el pico, y siguiendo con esta nomenclatura, el endometrio pre-receptivo correspondería al intervalo de LH+1 a LH+5 (días 14 al 18 del ciclo menstrual); el endometrio receptivo, correspondiente a la WOI, al intervalo de LH+6 a LH+8 (días 19 al 21 del ciclo); y el endometrio post-receptivo al intervalo de LH+9 a LH+13 (días 22 al 26 del ciclo) (Díaz-Gimeno, 2011).

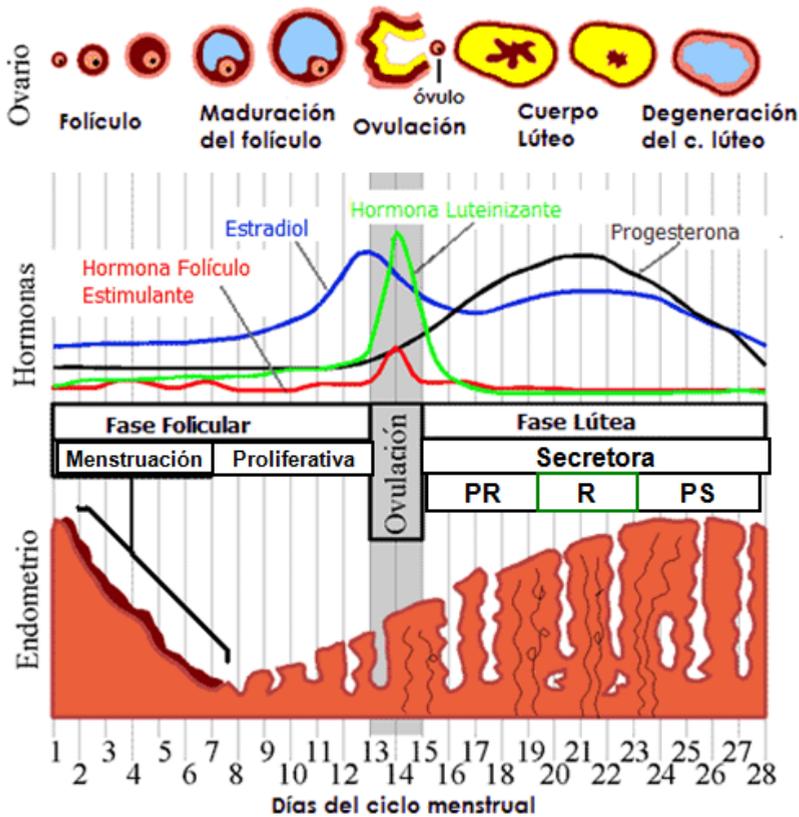


Figura 2. Ciclo menstrual y ovárico. En la parte superior de esta figura se pueden observar los cambios que suceden en el ciclo ovárico en función de los niveles hormonales. En la parte intermedia se muestran los niveles hormonales que acoplan el ciclo ovárico con el ciclo menstrual. En la zona inferior se indican los cambios que acontecen en el endometrio en cuanto al grosor, desarrollo glandular y vascular. Se muestran las fases del ciclo ovárico (folicular y lútea) y las del ciclo menstrual (proliferativa y secretora). Atendiendo a la receptividad del endometrio, podemos distinguir en la fase secretora, un periodo pre-receptivo (PR), el receptivo (R), y el postreceptivo (PS) que culmina con la menstruación. En la parte de debajo del endometrio se marcan los días del ciclo, considerando día 1 el día de comienzo de la regla (Aghajanova y cols., 2008, 2008b; Simón y cols., 2009; Díaz-Gimeno, 2011)

En cuanto a la biología de sistemas, el análisis computacional de la red de interacciones moleculares entre endometrio y embrión durante la implantación, usando los perfiles transcriptómicos de muestras de endometrio y células embrionarias cultivadas in vitro, ha permitido

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

1.4.1. Evaluación de la receptividad endometrial

Denominamos marcadores de receptividad endometrial a todos aquellos parámetros fáciles de detectar que nos permiten caracterizar a un

endometrio como receptivo (Achache y Revel, 2006). Los marcadores pueden ser utilizados para datar el endometrio en fase receptiva y evaluar el estatus de receptividad endometrial y conocer el impacto de los ciclos estimulados sobre la fisiología del endometrio.

1.4.1.1. Técnicas de imagen

La ecografía representa una herramienta sencilla y de empleo rutinario en el estudio del endometrio, ya que permite evaluar su tamaño, textura, volumen y vascularización. Todo ello puede aplicarse al estudio del ciclo endometrial fisiológico y estimulado así como a la detección de patología orgánica, benigna o maligna (Simón y cols., 2009). La ecografía en escala de grises 2D constituye en la actualidad la herramienta de uso rutinario en el estudio del endometrio y nos proporciona información sobre su tamaño y textura así como de la existencia de patología endocavitaria. En el estudio del endometrio podemos utilizar la función TUI (*Tomographic ultrasound imaging*), que nos proporciona cortes milimétricos del útero a modo de tomografía axial computerizada (TAC) o resonancia magnética nuclear (RMN), y que nos permite el análisis pormenorizado del endometrio y su patología (pólipos, carcinoma, etc.) (Simón y cols., 2009).

Se han identificado múltiples variables y se han intentado correlacionar con la mayor o menor tasa de gestación en técnicas de reproducción asistida (TRA). Estas variables se relacionan con el espesor y patrón ecográfico del endometrio así como con la perfusión

endometrial estudiada a distintos niveles del árbol vascular: arterias uterinas, arcuatas, radicales y espirales, mapping endometrial y subendometrial con Doppler color y power Doppler y, más recientemente, estudio de la vascularización endometrial en su conjunto mediante ecografía tridimensional power Doppler (Simón y cols., 2009).

1.4.1.2. Métodos histológicos

Durante la fase lútea del ciclo natural pueden observarse cambios morfológicos en el endometrio que, día a día, permiten su dataje, mediante la observación por microscopía óptica de cortes histológicos. Actualmente la anatomía patológica rutinaria data el endometrio según los criterios de Noyes, que fueron obtenidos a partir de 8.000 biopsias de endometrio de pacientes estériles (Noyes y cols., 1950, 1975). Estos criterios consideran ocho características histológicas básicas del endometrio: grado de mitosis glandular, pseudoestratificación de los núcleos, vacuolas basales, secreción, edema del estroma, reacción pseudodecidual, mitosis del estroma e infiltración leucocitaria (figura 3) (Noyes y cols., 1950, 1975).

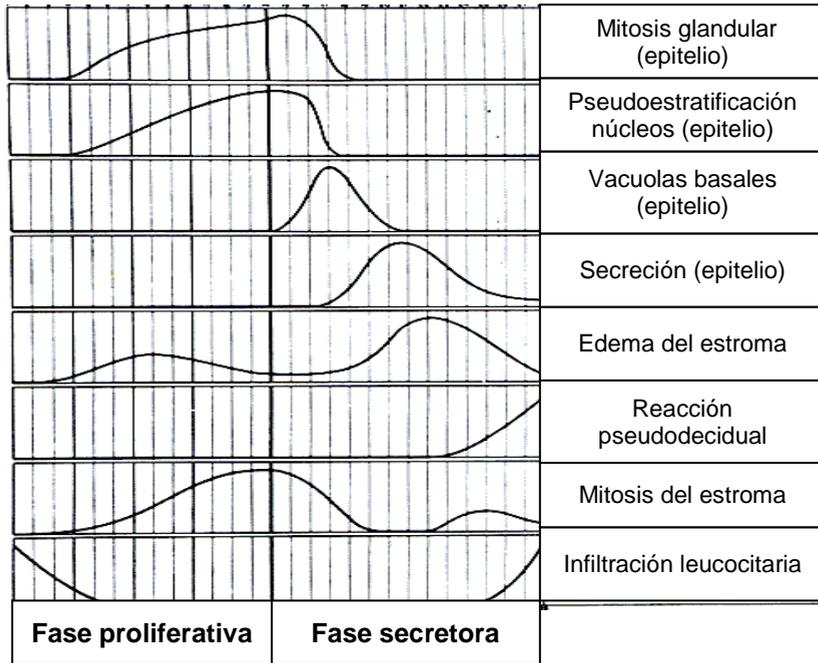


Figura 3. Criterios histológicos de Noyes. Se muestran las ocho características histológicas consideradas por Noyes para datar el endometrio (eje de ordenadas) y su variación en el ciclo menstrual (eje de abscisas). Figura adaptada de Noyes y cols., 1950, 1975.

Aunque el dataje histológico se ha usado durante décadas para las evaluaciones de parejas infértiles, para confirmar la ovulación y evaluar la maduración del endometrio; su eficacia durante la fase lútea, en la ventana de implantación y su relación con la infertilidad sigue generando controversia (Coutifaris y cols., 2004; Murray y cols., 2004).

Se han intentado buscar otros marcadores morfológicos que permitan determinar el estado receptivo, como los pinópodos, cuya aparición coincide con la apertura de la WOI (Nikas, 1999). Se trata de protuberancias del epitelio endometrial, que parecen actuar en la modulación del ambiente uterino para hacer coalescer las paredes endometriales (Bentin-Ley y cols., 1999) y a través de secreciones

(Kabir-Salami y cols., 2005) . Sin embargo, sólo se pueden observar mediante SEM, convirtiéndolo en un marcador poco práctico para su uso rutinario (Bentin-Ley y cols., 1999).

1.4.1.3. Marcadores bioquímicos

No existe una única molécula que sirva como marcador de la receptividad endometrial, sino que se han estudiado distintos factores (figura 4) que podrían ser útiles para este propósito como alternativa a los criterios histológicos de Noyes (Noyes y cols., 1950). Entre estos marcadores se encuentran integrinas ($\beta 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 1$, fundamentalmente), mucina 1 (MUC-1), calcitonina, factor inhibidor de leucemia (LIF), ciclo-oxigenasa 2, homeobox A10 (HOXA10), HB-EGF (*Heparan binding EGF like growth factor*), lactoferrina, IGFBP-1 (*IGF like binding protein 1*), IL-6, IL-10, TNF- α (factor de necrosis tumoral α), glicodelina y osteopontina (Simón y cols., 2009; Ben-Nagi y cols., 2010; Garrido-Gómez y cols., 2013).

Los niveles de MUC1 se incrementan con la presencia de progesterona (P) durante la ventana de implantación y, mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal se ha demostrado que en los sitios de implantación el embrión induce la rotura específica de la MUC1 en la zona del epitelio endometrial al que se va a adherir (Simón y cols., 2009). La osteopontina, el receptor de la integrina $\alpha\beta 3$, ha sido detectada durante la fase receptiva en el epitelio glandular endometrial y en secreciones uterinas. Además, se considera una

molécula consenso puesto que se ha encontrado aumentada durante la fase receptiva en todos los trabajos que investigan la expresión génica del endometrio humano (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003).

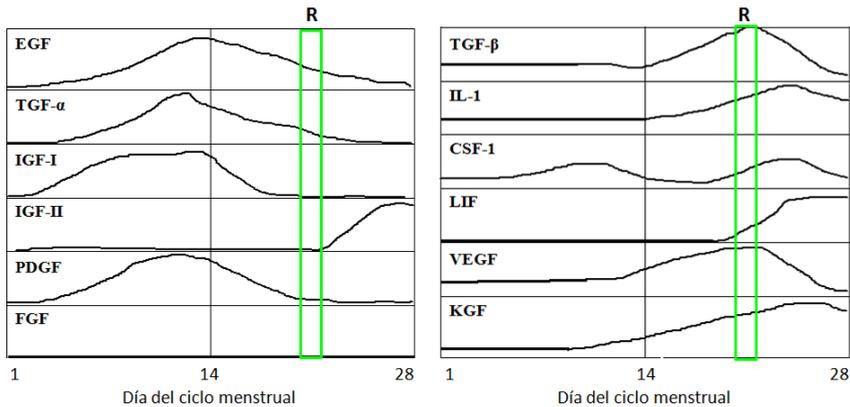


Figura 4. Marcadores bioquímicos de receptividad endometrial y la variación de sus niveles durante el ciclo menstrual (Adaptado de Giudice y Saleh, 1995). R indica el periodo de receptividad endometrial.

1.4.1.4. Marcadores moleculares

Los estudios de expresión génica son una alternativa para la búsqueda de huellas transcriptómicas que sirvan como marcadores moleculares de receptividad endometrial (Ponnampalam y cols., 2004; Talbi y cols., 2006; Horcajadas y cols., 2007) y permiten monitorizar de forma cuantitativa la expresión génica en distintas condiciones (Skena y cols., 1995). Además, los cambios histológicos, biológicos y fisiológicos significantes que ocurren durante las fases proliferativa, secretora y

menstrual del ciclo son consecuencia de los cambios que ocurren a nivel de transcripción y/o expresión génica.

Se han llevado a cabo distintos estudios de expresión génica por microarray en el endometrio humano en distintos puntos del ciclo menstrual para tratar de identificar y/o diagnosticar el estado de receptividad endometrial y la ventana de implantación (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005; Garrido-Gómez y cols., 2013). Aunque todos estos estudios usaron la misma tecnología, hay muchas diferencias en el diseño y el análisis de datos como el día que se toma la biopsia, las fases de ciclo comparadas, el número de biopsias, la unión o la no unión del ARN aislado y los métodos estadísticos empleados para considerar un gen como sobre-expresado o reprimido. Esto se refleja en una gran falta de consenso, puesto que sólo un gen se ha considerado sobre-expresado en los cinco estudios, osteopontina (Horcajadas y cols., 2007; Garrido-Gómez y cols., 2013). A pesar de lo cual se propuso, en 2007 un set de 25 genes (tabla 2) que presentan una expresión alterada en el endometrio durante la ventana de implantación en condiciones normales, en comparación con la hiperestimulación ovárica y condiciones refractorias por la introducción de un dispositivo intra-uterino (Horcajadas y cols., 2007).

Nombre de los genes (en inglés).

Glutathione peroxidase 3
Placental protein 14
FXYD domain containing ion transport regulator 2
Dipeptidylpeptidase 4
Leukaemia inhibitory factor
Insulin-like growth factor-binding protein 3
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
Hyaluronan-binding protein 2
Endothelin receptor type B
Leiomodin 1
Calponin 1, basic, smooth muscle
Clusterin
Transgelin
Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
Inositol-1-monophosphatase 2
Calpain 6
Tissue factor pathway inhibitor 2
Mitogen-activated protein kinase kinase 6
Catenin, alpha
Sorbitol dehydrogenase
Major histocompatibility complex, class II, DO beta
Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2
NDRG family member 2
Folate receptor 1

Tabla 2. Lista de genes marcadores de receptividad endometrial. Adaptado de Horcajadas y cols., 2007.

En la actualidad hay disponibles varios tests moleculares para el dataje endometrial basados en el análisis de una molécula o un grupo de ellas, como es el caso del *E-tegrity Test* que utiliza anticuerpos frente a la integrina $\beta 3$ (Lessey y cols., 1995) o el *EFT Quick Guide* que evalúa la expresión de ciclinas a lo largo del ciclo menstrual (Kliman y cols., 2006). En los últimos 3 años se ha desarrollado, además, un microarray más complejo para el estudio de la receptividad endometrial (ERA, de sus siglas en inglés: *Endometrial Receptivity Array*) basado en la firma transcriptómica en la fase de receptividad endometrial humana, asociado a un predictor computacional que puede identificar la ventana de

implantación de cada paciente sin tener en cuenta su histología endometrial (Díaz-Gimeno y cols., 2011; Díaz-Gimeno y cols., 2013; Garrido-Gómez y cols., 2013; Ruiz-Alonso y cols., 2013).

1.5. Miomas y reproducción

El uso de las técnicas de reproducción asistida, en particular de fecundación in vitro (FIV), permite obtener una información más precisa sobre el impacto de los miomas en la implantación embrionaria que los estudios de cohortes o los casos de estudio (Somigliana y cols., 2007); ya que estas técnicas excluyen otras variables como anatomía pélvica anormal, enfermedad en los tubos de Falopio y alteraciones en la función espermática (Khaund y Lumsden, 2008). Sin embargo no se han obtenido resultados consistentes, puesto que los diseños de los estudios son a menudo diferentes, variando los criterios de inclusión y exclusión, las características de los miomas (tamaño, número o localización), las herramientas de diagnóstico y los controles empleados (Somigliana y cols., 2007; Brady y cols., 2013).

Se ha demostrado en varias revisiones sistemáticas que los miomas submucosos tienen un impacto negativo sobre las tasas de embarazo y de implantación (Pritts 2001; Somigliana y cols., 2007), y que los miomas subserosos no parecen alterar el embarazo (Somigliana y cols., 2007; Pritts y cols., 2009). Sin embargo, el efecto de los miomas intramurales sigue siendo controvertido (Brady y cols., 2013). Algunos autores han encontrado una reducción de la implantación y los embarazos

en curso en presencia de miomas intramurales pequeños (<5cm) (Hart y cols., 2001; Benecke y cols., 2005; Khalaf y cols., 2006; Guven y cols., 2013); pero otros han fallado en encontrar dicha relación (Ng y Ho, 2002), sobre todo si los miomas no comprometen la cavidad uterina (Oliveira y cols., 2004; Klatsky y cols., 2007; Klatsky y cols., 2008; Bozdag y cols., 2009).

También se ha intentado estudiar el impacto de los miomas en la reproducción mediante el análisis de distintos marcadores bioquímicos (Ben-Nagi y cols., 2010) y moleculares (Rackow y Taylor, 2006, 2010; Sinclair y cols., 2011) relacionados con la implantación y la receptividad endometrial. Aunque se han determinado alteraciones de ciertos marcadores como glicodelina, IL-10, TNF- α , HOXA10, HOXA11 y BTEB1 en mujeres con miomas submucosos e intramurales; en pocos casos alcanzan significancia estadística, sobre todo si los miomas intramurales no alteran la cavidad uterina (Rackow y Taylor, 2010).

En cuanto al análisis de expresión génica, se han realizado una gran cantidad de trabajos para estudiar la expresión en condiciones patológicas como el cáncer endometrial y obtener más información sobre las rutas implicadas (Mutter y cols., 2001; Moreno-Bueno y cols., 2003; Risinger y cols., 2003; Cao y cols., 2004; Ferguson y cols., 2004, 2005; Saidi y cols., 2004). Además, diferentes estudios han examinado la expresión génica diferencial entre miomas y miometrio normal usando microarrays (Tsibris y cols., 2002; Ahn y cols., 2003; Catherino y cols., 2003; Chegini y cols., 2003; Skubitz y Skubitz, 2003; Wang y cols., 2003; Weston y cols., 2003; Catherino y cols., 2004; Hoffman y cols.,

2004; Quade y cols., 2004; Arslan y cols., 2005; Horcajadas y cols., 2008).

Aunque existe una gran variabilidad entre el número de genes que se encuentran sobre-expresados o reprimidos en los miomas en comparación con el miometrio normal, se han conseguido elucidar ciertos mecanismos moleculares que podrían ser importantes en la patología estos tumores benignos (Arslan y cols., 2005). Así, se encontraron alteraciones en la expresión de genes relacionados con la síntesis de retinoides (ADH1, ALDH1, RODH), genes que codifican proteínas de unión a IGF (IGBP6, IGBP10), genes implicados en la diferenciación celular (CD24, CD24ST), factores de transcripción (ATF3, FATA2, JUN, FOS), factores implicados en el metabolismo lipídico (APM2, ABCA, APOD), proteínas de integridad celular (KRT19, ABLIM, EFEMP1, FY, EMP1), metabolismo de ácidos nucleicos (GBP2, RNASE4), proteínas del sistema del complemento (CFH, C7) y genes relacionados con la ECM (DPT, TGF- β 3, SMAD-3, SMAD-4 y MMPs) (Arslan y cols., 2005).

Estudios posteriores ayudarán a mejorar el conocimiento sobre los procesos moleculares que gobiernan el inicio y la progresión de los miomas; con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias para su tratamiento y/o su prevención (Arslan y cols., 2005).

2. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar el impacto de la presencia de miomas intramurales que no afectan a la cavidad uterina, en la receptividad endometrial y en la implantación embrionaria, tomando como modelo los resultados de embarazo en un programa de donación de ovocitos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudio prospectivo para el estudio de la genómica funcional o transcriptómica de tejido endometrial durante la ventana de implantación en mujeres con miomas intramurales.
2. Estudio retrospectivo de los resultados clínicos de mujeres con miomas intramurales que han recibido embriones dentro del programa de donación de ovocitos.

Higón

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estudio prospectivo: análisis histológicos y moleculares

3.1.1. Diseño del estudio y recogida de biopsias endometriales

Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo a las directrices de la declaración de Helsinki y ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica de la institución donde se obtuvieron las biopsias endometriales (Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia, España) y del lugar donde se procesaron (Fundación IVI, Valencia, España). Se obtuvo el consentimiento escrito informado de todos los pacientes. Se recogieron un total de 22 muestras endometriales usando un catéter *Pipelle* (Genetics, Namont-Achel, Belgium) en mujeres con miomas intramurales simples que no alteran la cavidad endometrial y se dividieron en grupos según tamaños: grupo A: menos de 5 cm ($2,9\pm 1,1$ cm, rango 1,8–4,5 cm, n=7); y grupo B: miomas de 5 cm o más, ($6,7\pm 1,2$ cm, rango 5,5–8,0 cm, n=8). El grupo C, control, se compuso de mujeres sanas y fértiles con ciclos normales (n=7). Todas las biopsias endometriales se realizaron 7 días después del pico de LH endógena (LH+7), en el centro temporal de la ventana de implantación.

El diagnóstico del mioma, la localización, y el tamaño fue llevado a cabo por ultrasonografía transvaginal, resonancia magnética e histeroscopia o histerosonografía. Se excluyeron otras patologías ginecológicas, especialmente la presencia de adenomiosis y/o

endometriomas. Para detectar la ovulación, las pacientes fueron sometidas a ultrasonografías transvaginales sistemáticas, empezando en la fase folicular temprana del ciclo. Una vez que se detectó un folículo de 17-18 mm, se analizó LH en la orina usando un kit comercial disponible para determinar el pico de dicha hormona (Felcontrol; Laboratorios Effik, Madrid, España).

Una vez extraída la biopsia endometrial y después de lavar con PBS1X, alrededor del 80% de la misma fue almacenada a -80°C para el análisis de expresión génica (figura 5). Una pequeña parte de la muestra se fijó con formaldehído al 4% (p/v) y se incluyó en parafina para los estudios histológicos. El dataje endometrial se realizó usando el criterio de Noyes (Noyes y cols., 1950). Fue llevada a cabo por dos patólogos independientes de forma ciega sin conocimiento del día de la toma del tejido ni del historial clínico de las pacientes.

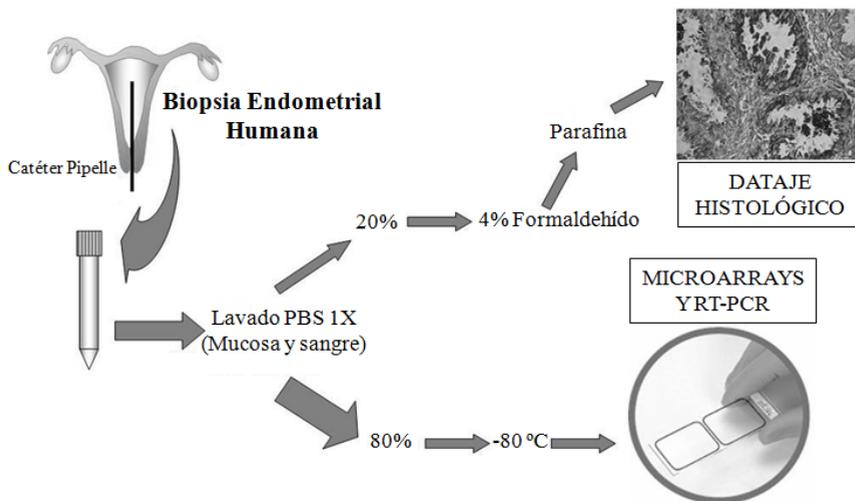


Figura 5. Esquema representativo del procedimiento llevado a cabo sobre las muestras endometriales recogidas para el estudio prospectivo.

3.2. Estudio del perfil de expresión génica: transcriptómica

3.2.1 Purificación de ARN total

El ARN total se extrajo de las biopsias endometriales usando el reactivo Trizol (Life Technologies, Paisley, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Fue tratado con RQ1 ADNasa I (Promega, Southampton, UK) durante 30 min a 37°C y después re-extraído con Trizol. La calidad del ARN se evaluó cargando 300 ng de ARN total en un Labchip de ARN y se analizó en un bioanalizador A2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Sólo se incluyeron para el análisis en microarray las muestras con un número de calidad e integridad del ARN

muy bueno (*RNA Integrity Number* (RIN)>7,5 en el bioanalizador de Agilent). En total, se analizaron 19 muestras por duplicado: seis del grupo A, seis del grupo B y siete del grupo C.

3.2.2 Marcaje, hibridación y lectura del microarray

La generación de las dianas de ADNc marcadas y la hibridación del chip se llevó a cabo siguiendo el método recomendado por el fabricante. La señal de fluorescencia en los microarrays se adquirió usando un escáner de microarray Genepix 4100 (Axon Instrument, Foster City, CA). Las imágenes escaneadas se procesaron usando el software GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments).

Los datos generados por el análisis *CodeLink Operating Software* (Northbrook, IL) de las imágenes escaneadas del microarray fueron importados en la versión 4.0 del Set de Análisis de Patrones de Expresión Génica (GEPAS, Valencia, España) para su análisis. Los archivos que contenían los niveles de intensidad de las sondas fueron procesados usando el algoritmo robusto de análisis de microarrays para el ajuste de la señal de fondo, la normalización y la transformación log₂ de los valores perfectamente emparejados. La intensidad de los puntos de todos los microarrays estaba entre los valores estándar para los bioarrays *Codelink* de todo el genoma. La extracción de datos fue realizada de 0 a 65.535 unidades arbitrarias.

3.3. Análisis de datos

3.3.1. Análisis bioinformático

El análisis de microarray se llevó a cabo usando la versión 3.1 de GEPAS (<http://www.gepas.org>) (Vaquerizas y cols., 2005). La anotación funcional de los resultados de los análisis se hizo usando el sitio Babelomics (<http://www.babelomics.org>).

3.3.2. Preprocesado

Los datos que se extrajeron del proceso de normalización del microarray se preprocesaron antes de llevar a cabo el análisis del microarray. Múltiples sondas que mapean el mismo gen fueron mezcladas usando la media como resumen de los valores de hibridación.

3.3.3. Agrupamiento de muestras

Se usó el método SOTA para agrupar perfiles de expresión diferentes. SOTA se incluye dentro de GEPAS (Vaquerizas y cols., 2005). Para la visualización y la evaluación de la calidad de los *clusters* o grupos, usamos CATT, un módulo de GEPAS. El enriquecimiento funcional de los grupos se estudió con la herramienta FatiGO+ (Al-Shahrour y cols., 2004; Al-Shahrour y cols., 2007).

3.3.4. Expresión génica diferencial

Se aplicó un test-T para encontrar diferencias en la expresión principal en los tres grupos de microarrays (clases). Se analizaron los patrones de expresión génica de las muestras en cada grupo, obteniendo un p-valor para cada gen en el experimento. También aplicamos un test-T a los grupos. Los p-valores se corrigieron usando el índice de falsos

positivos (Benjamini y Hochberg, 1995) para considerar los efectos de múltiples tests.

3.3.5. Análisis funcional

Para detectar activaciones o desactivaciones en funciones biológicas o vías de señalización, empleamos FatiScan (Al-Shahrour y cols., 2007b), una variante del algoritmo de enriquecimiento de set de genes que detecta de manera significativa la regulación positiva o negativa de bloques de genes relacionados funcionalmente en listas de genes ordenados por expresión diferencial. FatiScan es una parte del sitio Babelomics. FatiScan puede buscar bloques de genes que están relacionados funcionalmente por diferentes criterios como términos de ontología génica, vías *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, y otros.

3.3.6. Validación de microarray: PCR cuantitativa

Para verificar los resultados obtenidos del microarray, se llevó a cabo una PCR a tiempo real para seis genes seleccionados: dos regulados positivamente, inhibidor 2 de la vía del factor de tejido (TFPI2) y el miembro 4 de la familia transmembrana 4 L seis (TM4SF4); y cuatro regulados negativamente, glutatión peroxidasa 3 (plasma) (GPx3), claudina 10 (CLDN10), regulador 2 del transporte de iones que contiene el dominio FXYD (FDXY2), y fosfoproteína secretada 1 (osteopontina,

sialoproteína ósea I, activación temprana de linfocitos T 1) (SPP1). El análisis estadístico de los datos de PCR se realizó usando el algoritmo del software de expresión relativa, el cual usa una redistribución por parejas y un test aleatorizado para determinar la significancia.

3.4. Estudio retrospectivo: impacto de miomas en las tasas de implantación y de embarazo

3.4.1. *Diseño del estudio y recogida de datos*

Se diseñó un estudio retrospectivo híbrido entre un caso control y un estudio de cohortes en pacientes que realizaron una donación de ovocitos en IVI-Valencia desde abril de 1994 hasta agosto de 2007. Buscando en nuestra base de datos de 12.108 ciclos de donación de ovocitos. Se identificaron 807 primeros ciclos de donación de ovocitos en pacientes con miomas documentados ultrasonográficamente que no afectaban la cavidad endometrial, como se verificó por histeroscopia o histerosonografía. Los pacientes sospechosos, o diagnosticados, de adenomiosis concomitante y/o endometriosis por ultrasonidos, resonancia magnética y/o cirugía fueron excluidos, así como las parejas con oligozoospermia severa (<5 millones/mL de espermatozoides en el eyaculado). Se dividieron en cuatro grupos, dependiendo del tamaño y el número de miomas. El grupo A se formó con mujeres que presentaban miomas de menos de 5 cm de diámetro. Este grupo se dividió posteriormente en tres subgrupos de acuerdo al número de miomas: grupo A1 [un único mioma] (similar al grupo A en estudios histológicos

y moleculares); grupo A2 [dos miomas] y grupo A3 [tres o más miomas]. El grupo B eran pacientes de donación de óvulos en las que había un mioma de 5 cm o más sin afectación de la cavidad endometrial, en la recolocación del embrión (similar al grupo B en estudios histológicos y moleculares).

Se establecieron dos grupos control. El grupo C1 se hizo con casos en los que se realizó una miomectomía antes de la FIV. La mayoría de los casos eran pacientes con uno o dos miomas de tamaño medio extraídos por laparoscopia, pero sin mioma presente en FIV. Antes de entrar al programa de donación de ovocitos, una histeroscopia confirmó una cavidad endometrial normal. El grupo C2 comprende pacientes que han donado ovocitos en las mismas fechas que los incluidos en el grupo C1. Se tuvo cuidado de incluir mujeres en ambos grupos C en las que se diagnosticaron miomas, adenomiosis y/o endometriosis, y factores masculinos severos. Por tanto, el grupo C2 era similar al grupo C en los estudios histológicos y moleculares.

Las variables analizadas y comparadas entre los grupos incluyeron edad, años de infertilidad, indicación para la donación de ovocitos, número de ovocitos recibidos, tasas de fertilización, calidad de los embriones recolocados y tasas de implantación y de embarazo. De manera similar, se incluyeron también en los análisis los periodos de gestación y su desarrollo durante 26 semanas.

3.5. Análisis estadístico de datos clínicos

Se hizo un cálculo de la potencia de contraste con la hipótesis inicial de que la presencia de miomas podía reducir las tasas de gestación un 20%. Teniendo en mente que los índices de embarazo son de alrededor del 50% en nuestro programa FIV (riesgo=50%) y que el efecto de los miomas puede ser sobre el 20% (diferencia de riesgo=20%), el tamaño estimado de muestreo con riesgo- β del 20% (potencia=80%) y riesgo- α del 5%, debería haber más de 93 pacientes por grupo. Se realizó un ANOVA por comparación entre los seis grupos establecidos, a pesar de que la mayoría de las variables no siguieron una distribución normal. Sin embargo, ninguna de ellas presentó una asimetría importante y seguían el teorema central del límite. Se usaron tests χ^2 , seguidos de corrección de Bonferroni (multiplicando el P-valor por el número de comparaciones realizadas) para comparar los índices de embarazo y de aborto entre los grupos.

También realizamos un análisis de regresión logística en el que se cuantificó el efecto del tamaño de los miomas en las tasas de embarazo y de aborto. Se calculó la significancia del modelo por el test Omnibus (razón de probabilidad) y la incertidumbre explicada por el modelo se evaluó por Nagelkerke R^2 . La razón de momios o de oportunidades (OR) del efecto de un cm más en el tamaño de mioma en el resultado del embarazo se expresa junto con intervalos de confianza (CIs) del 95%, R^2 y significancia. Se asumió una significancia de $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó usando el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales 14 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Higón

4. RESULTADOS

4.1. Estudios histológicos y moleculares.

Para el estudio prospectivo, se recogieron un total de 22 muestras endometriales con un catéter *Pipelle* de mujeres con miomas intramurales simples que no alteran la cavidad endometrial de diferentes tamaños: menos de 5 cm (grupo A, n=7) y miomas de 5 cm o más (grupo B, n=8). Mujeres sanas y fértiles con ciclos normales (n=7) sirvieron como grupo control (grupo C). Las muestras fueron lavadas con PBS 1X. El 80% de cada biopsia se congeló a -80°C para los posteriores estudios moleculares y el 20% de la biopsia se fijó en formaldehído al 4% y se embebió en parafina para realizar el dataje histológico.

4.1.1. Dataje histológico endometrial

Los datos correspondientes a las biopsias de las pacientes con y sin miomas se presentan en la tabla 3, donde se indica el tamaño del mioma, el grupo al que pertenecen (miomas<5cm, miomas>5cm y control) y el dataje histológico de dos patólogos independientes. Éste último se representa también en la figura 6.

| MIO | FM | FUR | FOLICULO | LH | LH+7 | N°HISTORIA | FECHA BIOPSLA | TAMAÑO MIOMA | GRUPO | Patól. 1 | Patól. 2 |
|-----|---------|----------|----------|----------|----------|------------|---------------|--------------|-------|----------|----------|
| 1 | 5-28-30 | 7/10/05 | 18/10/05 | 22/10/05 | 29/10/05 | 612528 | 29/10/04 | 55mm | >5 | OK | 16-17 |
| 2 | | | | | | 29813 | 01/11/04 | 42-44mm | <5 | LH+2 | 16-17 |
| 3 | 6-28-30 | 25/10/04 | 4/11/04 | 9/11/04 | 16/11/04 | 616870 | 16/11/04 | 45mm | <5 | LH+2 | 16-17 |
| 4 | 6-28-30 | 2/11/04 | 12/11/04 | 15/11/04 | 22/11/04 | 613222 | 22/11/04 | 80mm | >5 | LH+2 | 18-19 |
| 5 | 5-30-33 | 13/11/04 | 17/11/04 | 22/11/04 | 29/11/04 | 617124 | 29/11/04 | 58mm | >5 | LH+2 | 18-19 |
| 6 | 7-28 | 23/11/04 | 4/12/04 | 7/12/04 | 14/12/04 | 618512 | 14/12/04 | 18mm | <5 | OK | 18-19 |
| 7 | | | | | | 349846 | 14/05/05 | 55mm | >5 | 19-20 | 18-19 |
| 8 | 4-26-30 | 6/10/05 | 17/10/05 | 18/10/05 | 25/10/05 | 25396260 | 25/10/05 | Control | C | 16-17 | 18-19 |
| 9 | 3-26-30 | 2/10/05 | 16/10/05 | 19/10/05 | 26/10/05 | 632499 | 26/10/05 | 30mm | <5 | OK | 18-19 |
| 10 | 5-28-30 | 5/10/05 | 18/10/05 | 20/10/05 | 27/10/05 | 452912 | 27/10/05 | Control | C | 26-27 | 18-19 |
| 11 | 4-28-30 | 29/10/05 | 10/11/05 | 13/11/05 | 20/11/05 | 492649 | 20/11/05 | Control | C | 23-24 | 25-26 |
| 12 | 4-30 | 31/01/06 | | 12/02/06 | | 579015 | 19/02/06 | 18mm | <5 | LH+9-10 | 23-24 |
| 16 | | | | | | 254605 | 16/02/06 | ControlLH+7 | C | 19-20 | 15-16 |
| 13 | 5-28 | 27/01/06 | | 12/02/06 | | 639035 | 19/02/06 | 18mm | <5 | LH-10-11 | 24-25 |
| 14 | | | | | | | | Control | C | 21-22 | 19-20 |
| 15 | 6-28 | | 6/04/06 | 6/04/06 | | 548596 | 13/04/06 | 80mm | >5 | 21-22 | 20-21 |
| 17 | | | 11/05/06 | | | 643193 | 18/05/06 | 80mm | >5 | 15-16 | 16-17 |
| 18 | | 30/05/06 | | | | 644842 | 20/06/06 | 70mm | >5 | 20-21 | 15-16 |
| 19 | | 20/7/06 | 31/7/06 | 2/8/06 | | | 8/08/06 | 30mm | <5 | 14-16 | 19-20 |
| 20 | 5-7-30 | 7/8/06 | | | | 646790 | 31/8/06 | 60x50mm | >5 | 20-21 | 20-21 |

Tabla 3. Datos de las biopsias endometriales con y sin miomas. Se indica, en su caso, el número de periodos y la regularidad de la fecha (FM) y la fecha de la última regla (FUR), el número de folículos, el pico de hormona luteinizante (LH), el día LH+7 y de realización de la biopsia. Se muestra también el número de historia clínica, el tamaño del mioma, el grupo al que pertenece y el dataje de dos patólogos independientes.

El dataje del endometrio a día LH+7 en el grupo B mostró un retraso significativo ($p < 0,05$) ($d 18,1 \pm 1,9$, media \pm SD), comparado con el grupo C ($d 19,9 \pm 2,2$, media \pm SD). Sin embargo, los miomas del grupo A no muestran diferencias significativas con el control en el dataje histológico ($d 19,4 \pm 3,1$, media \pm SD).

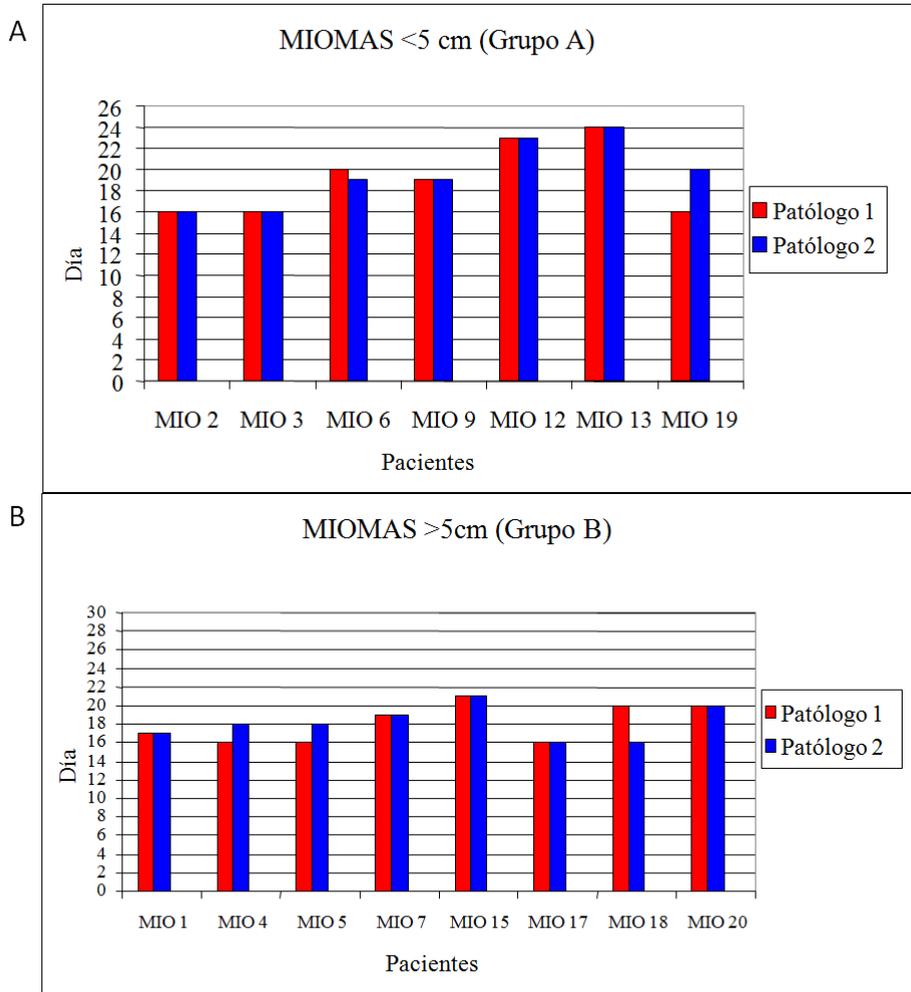


Figura 6. Dataje histológico de las biopsias de pacientes con miomas <5 cm (A) y pacientes con miomas >5 cm (B) realizado por dos patólogos independientes.

4.2. Estudios moleculares

En total, el análisis comparativo de los perfiles de expresión génica se realizó en 19 muestras por duplicado: siete en el grupo C, seis en el grupo B y seis en el grupo A. Todos los experimentos realizados mostraron buenos niveles de marcado e hibridación en los biochips de Agilent.

4.3. Validación por PCR a tiempo real de los datos del microarray

Antes de entrar en profundidad en los análisis de datos del microarray, se eligieron seis genes de entre los diferencialmente expresados para su validación por Q-PCR. La figura 7 muestra el cambio de expresión (*fold change*) obtenido para cuatro genes reprimidos (GPx3, CLDN10, FDXY2 y SPP1). No hubo diferencias estadísticas entre los datos de Q-PCR y de microarray. También se observó un *fold change* similar para los dos genes sobre-expresados en los grupos A y B, TFPI2 y TM4SF4 (figura 8). Por lo tanto, todos los resultados obtenidos por PCR a tiempo real de los genes seleccionados con una expresión génica alterada en el endometrio de mujeres con miomas demostraron una regulación acorde a los resultados obtenidos por medio de los microarrays de expresión génica.

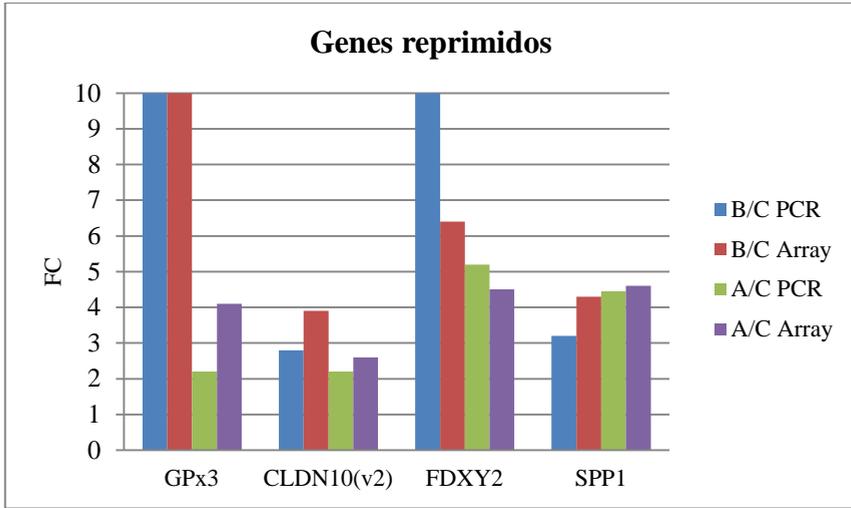


Figura 7. Expresión de genes seleccionados reprimidos en el endometrio de mujeres con miomas pequeños y grandes en relación con mujeres sanas sin desórdenes uterinos usando RT-PCR: GPx3 (plasma), CLDN10, FDXY2, y SPP1. B/C, Grupo B dividido entre Grupo C; A/C, Grupo A dividido entre Grupo C. Los valores expresados indican *Fold Change* (FC) en valores negativos.

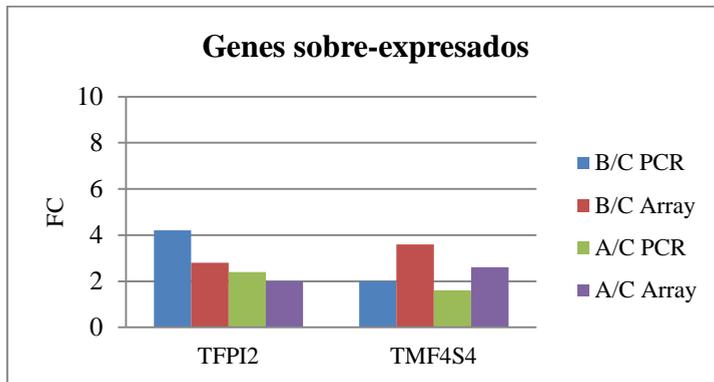


Figura 8. Expresión de genes seleccionados sobre-expresados en el endometrio de mujeres con miomas pequeños y grandes en relación con mujeres sanas sin desórdenes uterinos usando RT-PCR: TFPI2 y TMF4S4. B/C, Grupo B dividido entre Grupo C; A/C, Grupo A dividido entre Grupo C. Los valores expresados indican *Fold Change* (FC) en valores positivos.

4.4. Análisis de los grupos de muestras

Se usó el método SOTA para el análisis por agrupación jerárquica no supervisado de las 19 biopsias de endometrio. Este análisis reveló que las muestras de endometrio de los sujetos con miomas intramurales, independientemente de sus tamaños, o las muestras de los controles se agrupaban sin importar su origen (figura 9). No se encontraron diferencias en los perfiles de expresión génica global entre los especímenes.

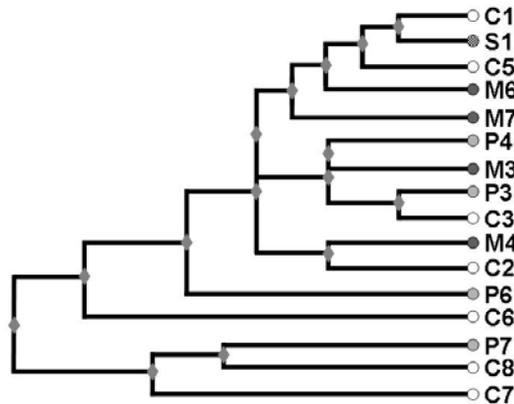


Figura 9. Árbol jerárquico de las biopsias endometriales realizado mediante SOTA. C = biopsia control; S = biopsia post-miomectomía; M = biopsia mioma >5 cm; P = biopsia mioma <5 cm.

4.5. Expresión génica diferencial

La expresión génica diferencial de las muestras en cada grupo se obtuvo con el p-valor para cada gen en el experimento y con el cambio de intensidad de fluorescencia. Se encontró una correlación fuerte (positiva y negativa) entre el perfil de expresión génica endometrial de

algunos genes y el tamaño del mioma. Veintiséis genes mostraron una correlación positiva mayor de 70, y 43 presentaron una correlación negativa por debajo de -0,70. Más de 100 genes mostraron una correlación positiva y negativa débil (0,30 a 0,70 y de -0,70 a -0,30, respectivamente). La figura 10 muestra la intensidad de la expresión génica (de color azul a rojo), los valores de correlación y los códigos de los 100 genes más correlacionados (positiva y negativamente). El número de acceso genes más correlacionados positivamente ($>0,70$) y negativamente ($<-0,70$) se presentan en la fig. 10.

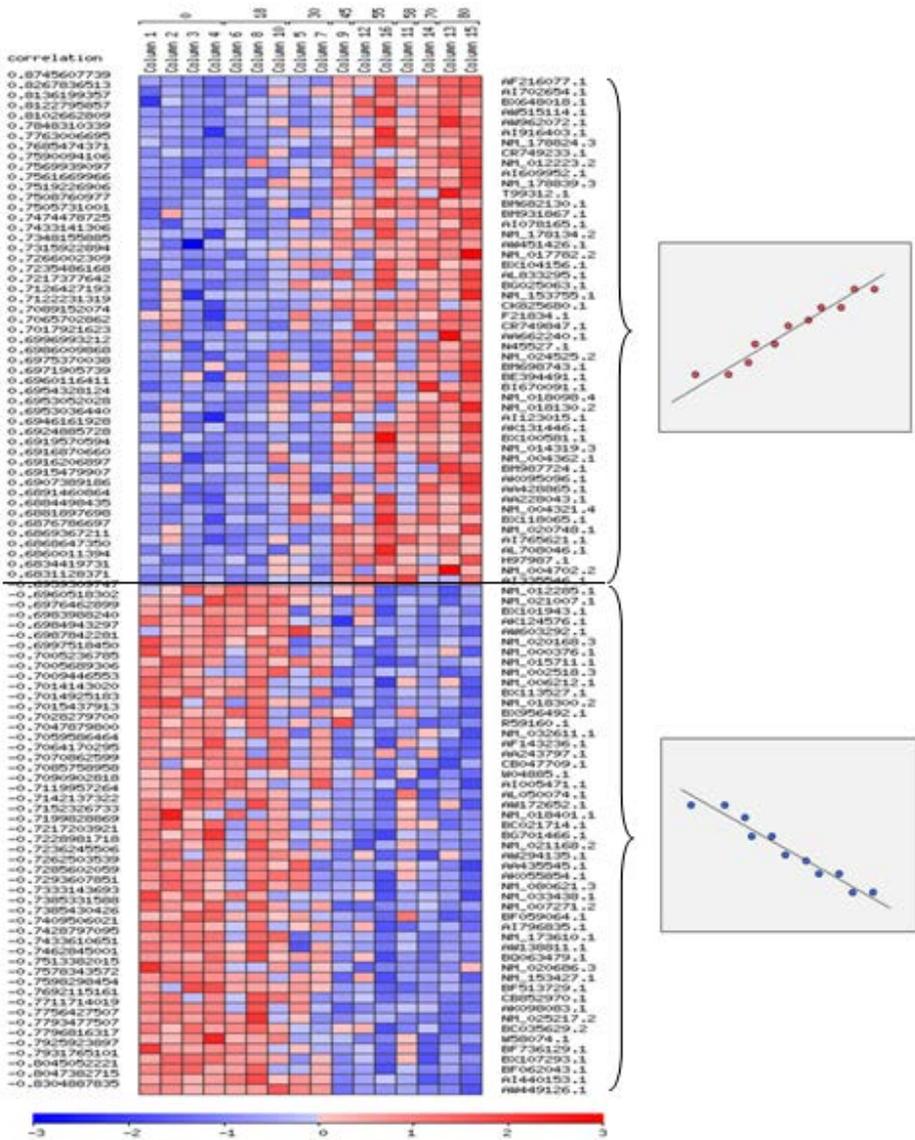


Figura 10. Los 100 genes con la correlación más positiva y más negativa con el tamaño del mioma. La correlación se indica a la izquierda del gráfico. El código genético se indica en el lado derecho. Los colores rojos indican mayor expresión y los azules menor expresión variando según la intensidad del color.

4.6. Ontología génica

Se analizaron las activaciones o desactivaciones en funciones biológicas o vías de señalización empleando el FatiScan de los genes con una correlación positiva o negativa con el tamaño del mioma mejor de 0,50 o menor de -0,50, respectivamente. Entre los genes que se correlacionan positivamente con el tamaño del mioma intramural, encontramos que los siguientes procesos biológicos estaban sobre-representados a nivel 4 de ontología génica: regulación del tamaño de vasos sanguíneos, ciclo celular mitótico, respuesta a daño en el ADN, ensamblaje de complejos macromoleculares, biogénesis y organización de orgánulos, biosíntesis de ácidos nucleicos y procesos metabólicos de biopolímeros. De manera similar, aquellos que estaban infra-representados eran procesos biológicos como desarrollo de sistemas, señalización célula-célula, respuesta inmune y respuesta a daños. Entre los genes negativamente correlacionados, los principales procesos sobre-representados eran la transducción de señales y la percepción sensorial. Todos estos términos biológicos se resumen en la fig. 11.

En las figuras 12, 13 y 14 se muestran los procesos biológicos sobre-representados e infra-representados a nivel 5 de ontología génica en las comparativas miomas>5cm (grupo B) vs control (grupo C), miomas<5cm (grupo A) vs control (grupo C) y miomas>5cm (grupo B) vs miomas<5cm (grupo A), respectivamente.

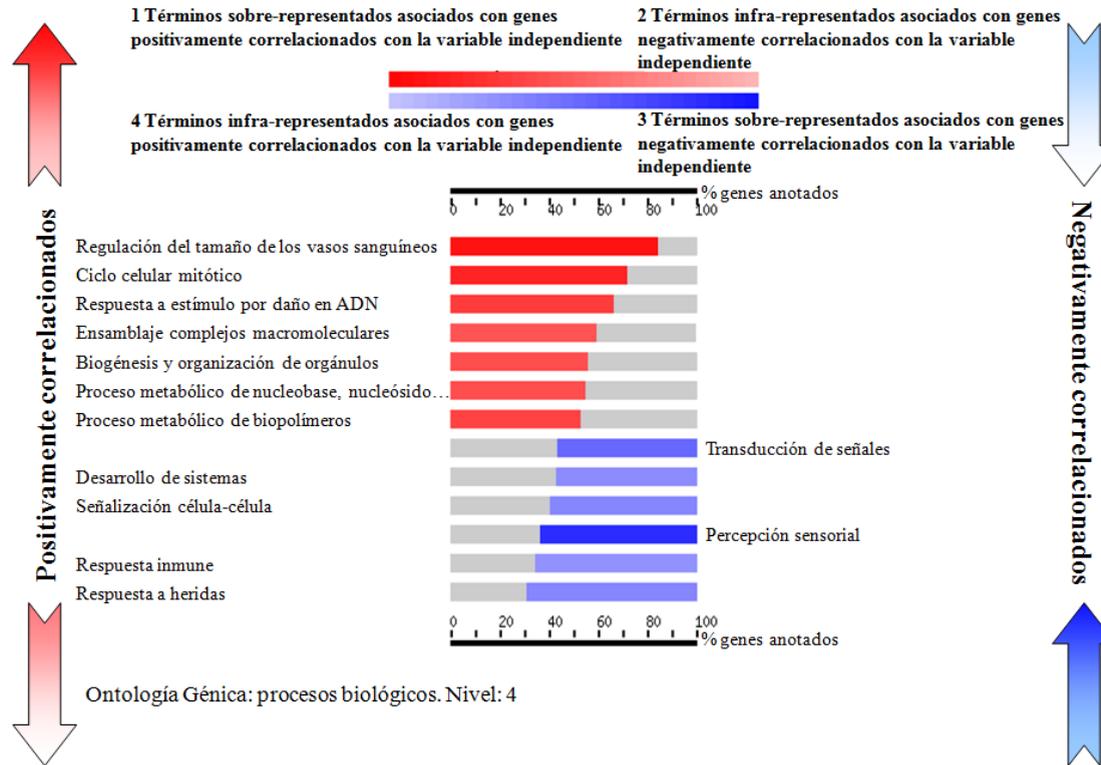


Figura 11. Análisis de ontología génica (procesos biológicos, nivel 4) de los genes con una correlación positiva mejor de 0,50 o una correlación negativa menor de -0,50.

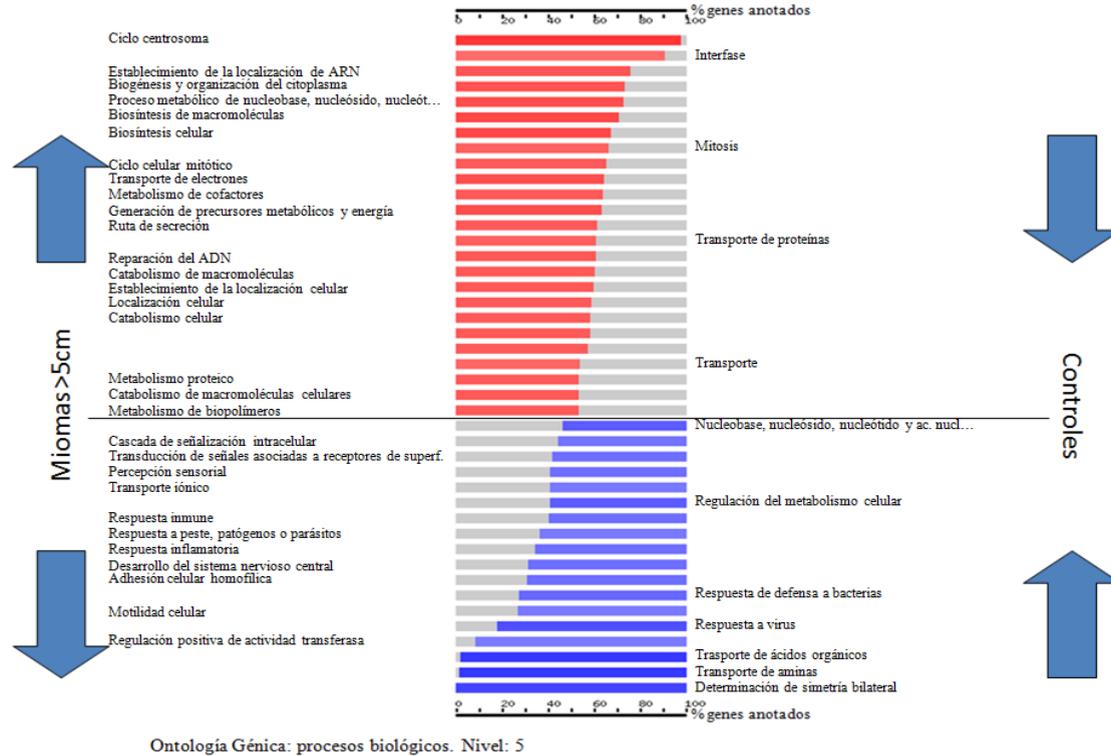


Figura 12. Análisis de ontología génica (procesos biológicos, nivel 5) de los genes con expresión alterada en los miomas >5cm (grupo B) en comparación con los controles (grupo C).

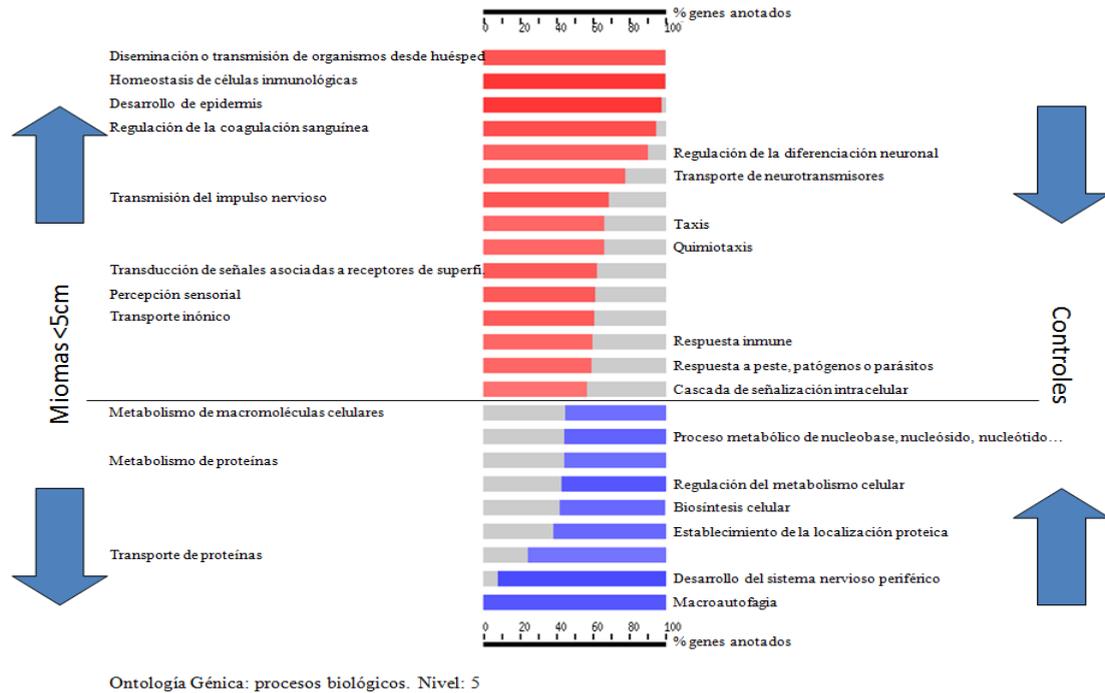


Figura 13. Análisis de ontología génica (procesos biológicos, nivel 5) de los genes con expresión alterada en los miomas <5cm (grupo A) en comparación con los controles (grupo C).

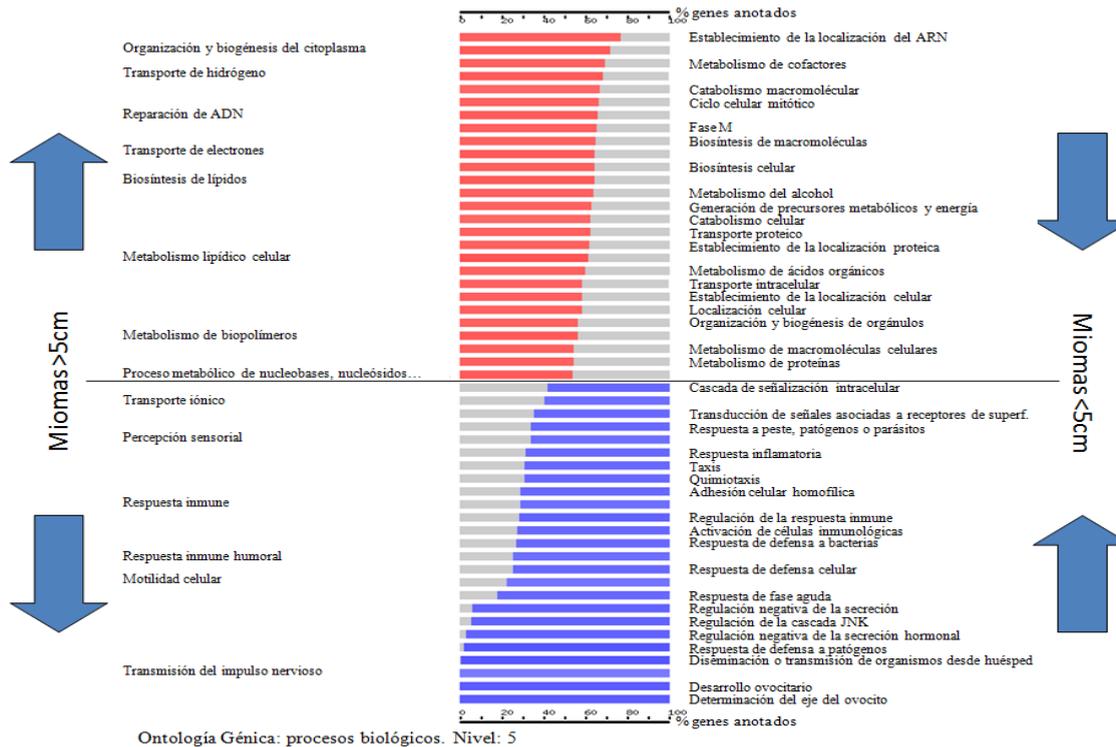


Figura 14. Análisis de ontología génica (procesos biológicos, nivel 5) de los genes con expresión alterada en los miomas >5cm (grupo B) en comparación con los miomas <5cm (grupo A).

4.7. Marcadores de receptividad endometrial

Los 25 genes que previamente fueron publicados como relevantes para la ventana de implantación (Horcajadas y cols., 2007) fueron cuidadosamente analizados de forma separada. Sólo tres, GPx3 (-9,0 de *fold change*), *placental protein 14* (también llamada glicodelina) (*fold change* de -12,0) y el miembro B2 de la familia 3 de aldehído dehidrogenasa (*fold change* de -3,0), presentaban una alteración significativa en su expresión en el grupo B (tabla 4) y uno de ellos (GPx3, *fold change* de -4,1) en el grupo A (datos no mostrados). Los genes EDNRB y NDRG2 presentaron una expresión génica alterada (*fold change* de -2,11 y -2,68, respectivamente), sin significancia estadística.

| Nombre del gen (en inglés) | Grupo B |
|--|----------------|
| Glutathione peroxidase 3 | -9,00 |
| Placental protein 14 | -12,05 |
| <i>FXFD domain containing ion transport regulator 2</i> | -1,15 |
| <i>Dipeptidylpeptidase 4</i> | -1,54 |
| <i>Leukaemia inhibitory factor</i> | -1,24 |
| <i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i> | -1,14 |
| <i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i> | -1,54 |
| <i>Hyaluronan-binding protein 2</i> | -1,11 |
| <i>Endothelin receptor type B</i> | -2,11 |
| <i>Leiomodin 1</i> | -1,16 |
| <i>Calponin 1, basic, smooth muscle</i> | -1,20 |
| <i>Clusterin</i> | -1,01 |
| <i>Transgelin</i> | -1,68 |
| <i>Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9</i> | -1,14 |
| <i>Inositol-1-monophosphatase 2</i> | -1,59 |
| <i>Calpain 6</i> | -1,85 |
| <i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i> | -1,47 |
| <i>Mitogen-activated protein kinase kinase 6</i> | -1,01 |
| <i>Catenin, alpha</i> | -1,05 |
| <i>Sorbitol dehydrogenase</i> | -1,14 |
| <i>Major histocompatibility complex, class II, DO beta</i> | -1,15 |
| <i>Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide</i> | -1,03 |
| Aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2 | -3,05 |
| <i>NDRG family member 2</i> | -2,68 |
| <i>Folate receptor 1</i> | -1,07 |

Tabla 4. Perfil de expresión génica de los 25 genes relevantes para la receptividad endometrial en el grupo B (Horcajadas y cols., 2007). Se indica el nombre del gen y su tasa de cambio (FC, *fold change*). Los genes con una regulación mayor de 3 veces en miomas grandes se indican en negrita.

4.8. Estudio clínico retrospectivo

Se analizaron todos los datos epidemiológicos referentes a los diferentes grupos en estudio (tabla 5). No hubo diferencias entre los grupos en la edad, los años de infertilidad, el índice de masa corporal o la

indicación para la donación de ovocitos. El resultado general del primer ciclo de donación de ovocitos analizado en los pacientes del estudio se presenta en la tabla 6. Los datos no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio y los controles para la tasa de embarazo ($p=0,735$), tasa de implantación ($p=0,371$), gestaciones múltiples ($p=0,658$), tasa de aborto ($p=0,752$) y los embarazos desarrollados/embarazos a término ($p=0,769$). Además, el análisis de regresión logística reveló que ni el tamaño del mioma más grande ni el número de miomas tenía una influencia significativa en los cambios de gestación [odds ratio (OR)=1,083 (95% CI=0,938–1,250) y OR=0,951 (95% CI=0,775–1,157), respectivamente] o en el aborto [OR=0,979 (95% CI=0,856–1,120) y OR=1,065 (95% CI=0,885–1,281), respectivamente].

| | Grupo A ^a | | Grupo B ^b | | Grupo C ^c | | P valor |
|--------------------------------------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|---------|
| | A1 | A2 | A3 | B | C1 | C2 | |
| Ciclos | 532 | 128 | 125 | 22 | 93 | 135 | |
| Tamaño del mioma ^d | 1,8±0,9 | 1,9±0,9 | 1,9±0,9 | 5,7±0,9 | | | |
| Edad ^e | 41,8±4,7 | 41,9±3,1 | 46,6±4,0 | 43,1±3,6 | 42,2±4,2 | 41,5±4,3 | 0,193 |
| Años de infertilidad ^e | 4,8±3,8 | 5,9±5,0 | 5,6±4,3 | 5,1±4,3 | 5,09±4,8 | 5,2±4,8 | 0,131 |
| Índice de masa corporal ^e | 24,2±4,0 | 22,3±5,1 | 21,8±2,7 | 26,1±4,8 | 24,2±3,7 | 23,2±2,0 | 0,097 |
| Signos para la donación ovocitaria | | | | | | | 0,358 |
| Edad avanzada | 319 | 83 | 45 | 15 | 61 | 71 | |
| Baja respuesta | 71 | 13 | 21 | 3 | 7 | 21 | |
| Menopausia | 25 | 6 | 5 | 2 | 7 | 10 | |
| Insuficiencia ovárica | 27 | 6 | 7 | 0 | 2 | 11 | |
| Fallo ovárico oculto | 27 | 5 | 6 | 0 | 13 | 2 | |
| Aborto espontáneo repetido | 10 | 5 | 2 | 0 | 0 | 2 | |
| Fallo en la implantación | 26 | 5 | 5 | 0 | 0 | 10 | |
| Baja calidad del ovocito | 14 | 3 | 3 | 0 | 0 | 5 | |
| Genética | 13 | 2 | 1 | 2 | 3 | 3 | |

Tabla 5. Características de los pacientes e indicadores de la donación de ovocitos.

^a Mioma menor de 5 cm (A1, un único mioma; A2, dos miomas; A3, tres o más miomas). ^b Mioma de 5 cm o más. ^c Controles (C1, miomectomía previa; C2, sin historial fibrótico). ^d Promedio del diámetro principal de cada mioma en centímetros. ^e Media±DS.

| | Grupo A | | | Grupo B | Grupo C | | P valor |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| | A1 | A2 | A3 | B | C1 | C2 | |
| Ovocitos donados ^a | 11,5±3,6 | 9,1±6,6 | 12,2±4,0 | 10,9±2,3 | 11,9±3,1 | 12,3±3,4 | 0,129 |
| Tasa de fertilización ^a | 64,2±32,8 | 60,5±36,2 | 65,1±32,1 | 65,1±32,1 | 57,7±35,5 | 60,8±33,9 | 0,306 |
| Blastómeros día 3 ^a | 6,5±1,6 | 6,5±1,3 | 6,7±1,5 | 6,7±1,5 | 6,8±1,1 | 6,6±1,2 | 0,551 |
| Tasa fragmentación embriogénica | 9,1±6,6 | 10,1±6,1 | 9,0±5,3 | 9,0±5,3 | 9,2±4,5 | 10,9±6,2 | 0,217 |
| Embriones reemplazados ^a | 2,1±0,7 | 2,1±0,6 | 2,1±0,6 | 2,1±0,6 | 2,1±0,6 | 2,0±0,8 | 0,217 |
| Implantación (95% CI) | 38,2% | 33,3% | 32,4% | 29,3% | 31,9% | 30,4% | 0,371 |
| | (31,4–44,9) | (24,8–66,4) | (29,2–35,8) | (23,1–35,5) | (24,2–39,8) | (24,0–36,9) | |
| Embrioreducción espontánea | 13,7% | 15,2% | 10,6% | 35,7% | 19,6% | 15,0% | 0,109 |
| Embarazo clínico | 52,6% | 55,1% | 54,3% | 50,0% | 54,1% | 59,1% | 0,735 |
| Gemelos | 21,4% | 17,7% | 13,1% | 18,2% | 12,3% | 16,8% | 0,658 |
| Aborto espontáneo | 14% | 18,4% | 15,5% | 13,8% | 13,3% | 15,4% | 0,752 |
| En curso/Fin de embarazos ^b | 36,9% | 34,1% | 39,0% | 36,4% | 39,2% | 42,6% | 0,769 |

Tabla 6. Características de los pacientes y resultados clínicos.

^a Media ± DS. ^b Por encima de 26 semanas.

5. DISCUSIÓN

Los fibromas uterinos son tumores benignos en las capas de músculo liso del útero y generalmente asintomáticos y cuya incidencia y severidad varían con el tamaño, el número y la localización del mioma (Gupta y cols., 2008). El hecho de encontrar miomas frecuentemente en mujeres en edad reproductiva ha derivado en una serie de estudios para intentar aclarar su efecto en reproducción, siendo el resultado controvertido en estudios de FIV comparando pacientes con y sin miomas (Hart y cols., 2001; Ng y Ho, 2002; Oliveira y cols., 2004; Khalaf y cols., 2006; Klatsky y cols., 2007; Parker, 2007). Pocos estudios han intentado analizar cómo pueden afectar los miomas intramurales que no penetran en la cavidad endometrial a la función del endometrio y, como, en consecuencia, pudieran perjudicar la implantación embrionaria (Oliveira y cols., 2004; Klatsky y cols., 2007; Klatsky y cols., 2008; Bozdag y cols., 2009). Hasta el presente estudio, no ha habido una definición de trabajo completa del endometrio receptivo en mujeres con miomas. En este estudio se han usado técnicas transcriptómicas o de genómica funcional para el análisis del endometrio durante la ventana de la implantación con el objetivo de buscar diferencias en la expresión génica entre mujeres con y sin miomas, siendo este el método más eficaz y objetivo para describir la receptividad endometrial usada actualmente (Díaz-Gimeno y cols., 2011).

Haciendo uso de una base de datos sustancial de más de 12.000 ciclos en nuestro programa de donación ovocitaria (Remohí y cols., 1995; Soares y cols., 2005; Budak y cols., 2007), también hemos podido analizar los datos clínicos referidos a la implantación y el embarazo, para

apoyar los datos proporcionados por los estudios funcionales y así correlacionar datos clínicos y moleculares en relación con la función reproductiva endometrial. Para ello, los criterios de inclusión en el estudio clínico han sido muy selectivos, y hemos analizado ciclos de donación ovocitaria y excluido otras patologías concomitantes que podían afectar potencialmente a nuestra meta por diferentes motivos.

El primer análisis que se llevó a cabo fue el dataje histológico, una herramienta clásica para la evaluación endometrial, realizado biopsias endometriales obtenidas de mujeres con y sin miomas intramurales. El análisis histológico reveló que la presencia de grandes miomas intramurales induce un retraso en el desarrollo del endometrio durante la ventana de implantación a nivel histológico, algo que no ocurre con los miomas pequeños. La relevancia de estos resultados es probablemente insignificante ya que según la descripción inicial de Noyes y cols. (Noyes y cols., 1950) se requiere un retraso de más de 2 días en la maduración del endometrio para considerarlo un endometrio fuera de fase. Además, este retraso también ha sido demostrado en ciclos de FIV con estimulación ovárica controlada sin que este retraso suponga descensos significativos en implantación embrionaria, más aún cuando los embriones transferidos llegan a la cavidad endometrial 24-48 h antes que en la concepción normal (García y cols., 1984). Cuando el retraso excede de 3 días, se observa una implantación perjudicial (Kolibianakis y cols., 2002), aunque en presencia de miomas esto no ha sido demostrado.

Además, el dataje endometrial y los exámenes histológicos tienen variaciones interobservadas, intraobservadas e intercíclicas inherentes,

las cuales podrían explicar su falta de utilidad (Coutifarís y cols., 2004; Murray y cols., 2004). Además, otros estudios han mostrado implantaciones exitosas durante ciclos en los que el endometrio había exhibido retraso en la maduración medido por criterios histológicos (Scott y cols., 1988). Este fue uno de los puntos de partida para la aplicación de los estudios de genómica funcional que permiten obtener datos objetivos sobre los procesos biológicos globales que tienen lugar en un órgano, tejido, o grupo de células, ya demostrado en el endometrio (Díaz-Gimeno y cols., 2011).

El efecto de miomas en el endometrio usando marcadores moleculares de receptividad endometrial, como *homeo box A* (HOXA)-10, HOXA 11, factor inhibidor de leucemia (LIF), y proteína 1 de unión al elemento básico de transcripción (BTEB1), había demostrado que la expresión de ARNm de HOXA10 y HOXA11 disminuye en úteros con miomas submucosos. Sin embargo, no se habían observado diferencias con los controles cuando se estudiaron los miomas intramurales (Rackow y Taylor, 2006). Pero, hasta nuestro estudio, no se había publicado ningún análisis sobre la expresión de todo el genoma en el endometrio centrado en la presencia de miomas y durante la ventana de implantación. Otras estrategias moleculares estaban centradas en los efectos de miomas en el útero están vinculadas con el entendimiento de su patogénesis o con el efecto de diferentes tratamientos. En este contexto, se habían descrito alteraciones en genes que regulan la síntesis de retinoides y el metabolismo de IGF en tejido de miomas (Arslan y cols., 2005). De manera similar, se habían publicado también la expresión de leptina y

receptor de leptina en meiometro y miomas uterinos de mujeres tratadas con análogos de GnRH (Markowska y cols., 2006).

En el presente estudio, demostramos que el perfil de expresión génica del endometrio durante la ventana de implantación (LH+7) en las muestras obtenidas de mujeres con miomas intramurales pequeños difieren de los obtenidos de mujeres sanas en ese mismo momento del ciclo menstrual. Además, el agrupamiento jerárquico de las muestras no reflejó ninguna diferencia demostrando que los perfiles de expresión génica global de las muestras son muy similares sin diferencia estadística entre ellos. Sin embargo, se encontró que la expresión de 69 genes se correlacionaba fuertemente con el tamaño del mioma. De ellos, 26 genes lo hicieron de forma positiva, mientras 43 lo hicieron de forma negativa. Más de 100 genes se correlacionaron también con un nivel de correlación débil. Esto refleja claramente que algunos genes están afectados por la presencia de miomas intramurales endometriales de alguna manera, aunque los procesos biológicos relacionados con la expresión de estos genes no afectan a los procesos de receptividad endometrial o implantación embrionaria.

Entre los genes que estaban sobre-regulados con el tamaño del mioma intramural, encontramos una regulación sobre-representada del tamaño de los vasos sanguíneos, una característica que se correlaciona bien con la angiogénesis implicada en el aporte vascular del mioma y en su crecimiento (Walocha y cols., 2003). De forma similar, la respuesta inmune y la respuesta a daño estaban infra-representadas cuando hay un mioma presente. Interesantemente, se ha demostrado que un desajuste de

la maduración y una diferenciación de linfocitos en mujeres con miomas grandes dio lugar a un descenso en la respuesta inmune local directamente conectado con el crecimiento del mioma (Malyskina y cols., 2002). Otros procesos biológicos sobre-representados e infra-representados en los genes correlacionados regulados positiva y negativamente en este estudio parecen no estar relacionados con la función endometrial a nivel reproductivo.

Dada la definición incompleta actual de un endometrio receptivo (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005), nuestro laboratorio elaboró en 2007 una lista de 25 genes candidatos clave y relevantes para la receptividad endometrial después de comparar el perfil de expresión génica del ciclo natural, el ciclo con estimulación ovárica controlada, y el endometrio con un dispositivo intrauterino (Horcajadas y cols., 2007). Encontramos que sólo tres genes de esta lista estaban infra-regulados en el endometrio con miomas grandes [GPx3, *placental protein 14* (también llamada glicodelina), y miembro B2 de la familia 3 de aldehído deshidrogenasas] y sólo un gen en presencia de miomas pequeños (GPx3). Estos genes también estaban reprimidos durante la implantación en otras condiciones no óptimas como la estimulación ovárica controlada con antagonistas de GnRH (Horcajadas y cols., 2005) y en presencia de un dispositivo intrauterino (Horcajadas y cols., 2006). En el caso de GPx3, su expresión permaneció alterada después de un año de la retirada del dispositivo intrauterino cuando las tasas de implantación eran normales mostrando que esta molécula no es vital para la implantación

(Horcajadas y cols., 2006). Los otros 22 genes de la lista mostraban valores de expresión génica normal en presencia de miomas, sugiriendo que la receptividad endometrial, como un proceso biológico, no parece estar afectada.

La otra parte de este estudio estaba basada en los datos clínicos obtenidos en el Instituto Valenciano de Infertilidad de Valencia. Dado el retraso en la maternidad el número de mujeres infértiles con miomas ha aumentado, ya que estos tumores benignos son más frecuentes con edad avanzada (Somigliana y cols., 2007). El estudio clínico confirmó estas observaciones. Fue cuidadosamente diseñado para analizar el impacto de miomas intramurales que no afectan la cavidad endometrial en la implantación de manera tan precisa como fuera posible, probando que una implantación con éxito es el mejor test no cuestionado de una buena función endometrial. Por tanto, se seleccionó el modelo de donación de ovocitos porque la preparación endometrial con esteroides exógenos permite estudiar una población más homogénea en la que se descartó la influencia potencial de la estimulación ovárica controlada en la función endometrial observada en otros estudios (Horcajadas y cols., 2005; Simón y cols., 2005). También se excluyeron los casos con adenomiosis documentada o sospechada y pacientes con endometriosis concomitante. Sabemos que la endometriosis no afecta el resultado en la donación de ovocitos (Díaz y cols., 2000), pero está asociada con adenomiosis más frecuentemente de lo esperado (Kunz y cols., 2005). Además, la calidad del embrión fue otro parámetro cuidadosamente puntuado. Por esta razón, se excluyeron los casos con infertilidad masculina severa.

Como resultado, presentamos aquí las mayores series de casos retrospectivos con miomas intramurales que se han publicado en un único centro. Además, fuimos capaces de dividir los miomas por tamaño y número para buscar efectos específicos en la implantación. Los datos mostraron similitudes entre los diferentes grupos comparados en diferentes datos epidemiológicos analizados en la tabla 5. El análisis no reveló ningún efecto de la presencia de miomas, independientemente del tamaño o del número, en la implantación exitosa, como se verificó por las tasas de embarazos en proceso/terminados. Unas conclusiones similares se alcanzaron por Klatsky y cols. (Klatsky y cols., 2007), quienes desarrollaron un análisis retrospectivo de ciclos de donación de primeras receptoras de óvulos. El presente estudio tiene la originalidad de ser el primero en el que se usó un modelo de donación de ovocitos, permitiendo descartar un efecto de la estimulación ovárica en la receptividad endometrial así como un efecto nocivo de la edad en la calidad ovocitaria. Sin embargo, el tamaño y el número de miomas y el efecto de la miomectomía no se habían analizado con detalle.

Sunkara y cols. (Sunkara y cols., 2010) llevaron a cabo una revisión sistemática y varios meta-análisis sobre el efecto de los miomas intramurales que no alteran la cavidad uterina en 6.097 ciclos de FIV entre los cuales usaron los datos publicados en nuestro artículo (Horcajadas y cols., 2008). Encontraron que la presencia de este tipo de miomas reduce la tasa de nacimientos vivos un 21% y la tasa de embarazo clínico un 15% en comparación con la ausencia de miomas. El meta-análisis de los estudios con mujeres de edad media inferior a 37

años mostró un efecto adverso de los miomas intramurales que no alteran la cavidad uterina en el desarrollo del embarazo. El meta-análisis de los estudios en los que las mujeres se someten a su primer ciclo de FIV también mostró un impacto negativo; así como el meta-análisis de los estudios prospectivos, con una reducción significativa del 40% en las tasas de nacimientos vivos (Sunkara y cols., 2010). Sin embargo, las tasas de implantación se reducen un 13% y sin significancia estadística en este tipo de miomas (Sunkara y cols., 2010). Estos resultados eran contradictorios con los resultados del presente trabajo por lo que decidimos ahondar en los datos de los mismos en busca de una explicación plausible. Encontramos, que en este meta-análisis no se separaron los datos de los estudios en los que se llevó a cabo una donación de ovocitos del resto de trabajos. Cuando realizamos dicha separación con los cuatro estudios con donación de ovocitos (Dietterich y cols., 2000; Wang y Check 2004; Klatsky y cols., 2007; Horcajadas y cols., 2008) encontramos que las tasas de nacidos vivos en mujeres en el programa de ovodonación bajaba del 43,8% al 37,1% en mujeres sin y con miomas y de 54,7% a 51,9% en embarazo clínico, variaciones sin significancia estadística, con p-valores de 0,068 para nacidos vivos y de 0,322 para embarazo clínico (tabla 7). En esta separación de datos, los resultados de FIV fueron aún más claros que los publicados por Sunkara y cols., con una bajada de 35,6% a 29,3% (p-valor 0,0026) en nacido vivo y de 35,9% a 31,3% en embarazos clínicos (p-valor=0,0026) (tabla 7).

| NACIDOS VIVOS | | | | |
|--------------------|-----------|-------------------|------------|-----------------------------|
| Tratamiento | Grupo | Nacido/transfer | Porcentaje | p-valor (IC) |
| OVODONACION | Miomas | 321/865 | 37,1% | 0,068 (0,76: 0,56-1,02) |
| | No miomas | 96/219 | 43,8% | |
| FIV | Miomas | 195/666 | 29,3% | 0,0026 (0,75: 0,62-0,90) |
| | No miomas | 761/2.137 | 35,6% | |
| EMBARAZOS CLÍNICOS | | | | |
| Tratamiento | Grupo | Embarazo/transfer | Porcentaje | p-valor (IC) |
| OVODONACION | Miomas | 485/934 | 51,9% | 0,322 (0,95: 0,86-1,05) |
| | No miomas | 270/494 | 54,7% | |
| FIV | Miomas | 321/1.024 | 31,3% | 0,009 (0,87: 0,79-0,97) |
| | No miomas | 1.130/3.145 | 35,9% | |

Tabla 7. Análisis de datos del meta-análisis de Sunkara en 2010 teniendo en cuenta las publicaciones en los que se obtuvieron los datos clínicos en programas de donación de ovocitos. Dietterich y cols., 2000; Wang y Check, 2004; Klatsky y cols., 2007; Horcajadas y cols., 2008. FIV: Fecundación in vitro; IC: Intervalo de confianza.

Estos datos confirman que si bien existe una disminución en los resultados clínicos en las mujeres con miomas, esa variación no es significativa. De esta manera, el trabajo publicado en nuestro laboratorio llega a las mismas conclusiones que los otros trabajos a pesar de ser el que más peso en número de pacientes presenta:

- *“Small fibroids not distorting the uterine cavity do not seem to negatively affect conception outcome even in older women” (Dietterich y cols., 2000).*

- *“There was no difference in pregnancy rates in those with or without fibroids”* (Wang y Check, 2004).
- *“Clinical pregnancy rate and implantation rate are not affected by the presence on non-cavity-distorting leiomyomata”* (Klatsky y cols., 2007).

Las diferencias entre ciclos de ovodonación y ciclos FIV normales se pueden achacar al efecto de las hormonas utilizadas para la estimulación ovárica. Se sabe desde hace muchos años que estas hormonas tienen un efecto deletéreo en el endometrio (revisado en Martínez-Conejero y cols., 2007) y pudiera ser que el efecto de dichas hormonas sea aún más perjudicial en mujeres que presentan este tipo de desórdenes ginecológicos, bien por las diferencias que pudieran existir en la vascularización del endometrio o en los cambios moleculares que los propios miomas inducen.

Finalmente estos resultados clínicos también se correlacionan con los resultados moleculares del estudio prospectivo, a pesar de haberse realizado estos últimos en ciclos naturales mientras que para el programa de donación de ovocitos se requiere la administración exógena de esteroides. Por tanto, es posible que esta medicación pudiera cambiar el patrón histológico y el perfil de expresión génica, y corregir un defecto de implantación que estaría presente en ciclos naturales con miomas.

6. CONCLUSIONES

1. Los miomas intramurales que no alteran la cavidad uterina modifican el perfil de expresión génica del endometrio durante la ventana de implantación.
2. La alteración del perfil de expresión génica del endometrio durante la ventana de implantación no es significativa a nivel de receptividad endometrial.
3. La presencia de miomas intramurales que no alteran la cavidad uterina no afecta negativamente las tasas de implantación, de embarazo ni de niño en casa en programa de donación de ovocitos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Achache H y Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; **12**; 731-746.
- Achache H, Tsafirir A, Prus D, Reich R, y Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010; **94**; 1271-1278.
- Aghajanova L, Hamilton AE, y Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* 2008; **19**; 204-211.
- Aghajanova L, Simón C, y Horcajadas JA. Are favorite molecules of endometrial receptivity still in favor? *Exp Rev Obst & Gynecol* 2008b; **3**; 487-501.
- Ahn WS, Kim KW, Bae SM, Yoon JH, Lee JM, Namkoong SE, Kim JH, Kim CK, Lee YJ, y Kim YW. Targeted cellular process profiling approach for uterine leiomyoma using cDNA microarray, proteomics and gene ontology analysis. *Int J Exp Pathol* 2003; **84**; 267-279.
- Al-Shahrour F, Arbiza L, Dopazo H, Huerta-Cepas J, Mínguez P, Montaner D, y Dopazo J. From genes to functional classes in the study of biological systems. *BMC Bioinformatics* 2007b; **8**; 114.
- Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, y Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 2004; **20**; 578-580.
- Al-Shahrour F, Mínguez P, Tarraga J, Medina I, Alloza E, Montaner D, y Dopazo J. FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**; W91-96.
- Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, Saare M, Peters M, Vilo J, Stavreus-Evers A, y cols., Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol* 2012; **26**; 203-217.
- Aplin JS, Fazleabas ST, Glasser SR, y Giudice LC. The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives. Second Edition 2008. Informa Healthcare, United Kingdom.
- Arslan AA, Gold LI, Mittal K, Suen TC, Belitskaya-Levy I, Tang MS, y Toniolo P. Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. *Hum Reprod* 2005; **20**; 852-863.
- Bellver J, Martínez-Conejero JA, Labarta E, Alama P, Melo MA, Remohí J, Pellicer A, y Horcajadas JA. Endometrial gene expression in the

- window of implantation is altered in obese women especially in association with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2011; **95**; 2335-2341, 2341 e2331-2338.
- Ben-Nagi J, Miell J, Mavrelou D, Naftalin J, Lee C, y Jurkovic D. Endometrial implantation factors in women with submucous uterine fibroids. *Reprod Biomed Online* 2010; **21**; 610-615.
- Benecke C, Kruger TF, Siebert TI, Van der Merwe JP, y Steyn DW. Effect of fibroids on fertility in patients undergoing assisted reproduction. A structured literature review. *Gynecol Obstet Invest* 2005; **59**; 225-230.
- Benjamini Y y Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical y powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 1995; **57**; 289-300.
- Bentin-Ley U, Sjögren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, y Horn T. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum Reprod* 1999; **14**; 515-520.
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, y Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**; 19-33.
- Bozdag G, Esinler I, Boynukalin K, Aksu T, Gunalp S, y Gurgan T. Single intramural leiomyoma with normal hysteroscopic findings does not affect ICSI-embryo transfer outcome. *Reprod Biomed Online* 2009; **19**; 276-280.
- Brady PC, Stanic AK, y Styer AK. Uterine fibroids and subfertility: an update on the role of myomectomy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013; **25**; 255-259.
- Budak E, Garrido N, Soares SR, Melo MA, Meseguer M, Pellicer A, y Remohí J. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertil Steril* 2007; **88**; 342-349.
- Cakmak H y Taylor HS. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update* 2011; **17**; 242-253.
- Cao QJ, Belbin T, Socci N, Balan R, Prystowsky MB, Childs G, y Jones JG. Distinctive gene expression profiles by cDNA microarrays in endometrioid and serous carcinomas of the endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2004; **23**; 321-329.
- Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, y Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**; 871-879.

- Catherino W, Salama A, Potlog-Nahari C, Leppert P, Tsibris J, y Segars J. Gene expression studies in leiomyomata: new directions for research. *Semin Reprod Med* 2004; **22**; 83-90.
- Catherino WH, Prupas C, Tsibris JC, Leppert PC, Payson M, Nieman LK, y Segars JH. Strategy for elucidating differentially expressed genes in leiomyomata identified by microarray technology. *Fertil Steril* 2003; **80**; 282-290.
- Cavagna M y Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta* 2003; **24 Suppl B**; S39-47.
- Ciavattini A, Di Giuseppe J, Stortoni P, Montik N, Giannubilo SR, Litta P, Islam MS, Tranquilli AL, Reis FM, y Ciarmela P. Uterine Fibroids: Pathogenesis and Interactions with Endometrium and Endomyometrial Junction. *Obstet Gynecol Int* 2013; **2013**; 173184.
- Cohen MA, Lindheim SR, y Sauer MV. Donor age is paramount to success in oocyte donation. *Hum Reprod* 1999; **14**; 2755-2758.
- Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, McGovern PG, Schlaff WD, Carr BR, Steinkampf MP, y cols., Histological dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertil Steril* 2004; **82**; 1264-1272.
- Chegini N, Verala J, Luo X, Xu J, y Williams RS. Gene expression profile of leiomyoma and myometrium and the effect of gonadotropin releasing hormone analogue therapy. *J Soc Gynecol Investig* 2003; **10**; 161-171.
- Díaz-Gimeno P. Desarrollo de una herramienta molecular diagnóstica de la receptividad endometrial Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. 2011. Universidad de Valencia, Valencia.
- Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, y Simón C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril* 2011; **95**; 50-60, 60 e51-15.
- Díaz-Gimeno P, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Bosch N, Martínez-Conejero JA, Alama P, Garrido N, Pellicer A, y Simón C. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013; **99**; 508-517.
- Díaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, y Remohí J. Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril* 2000; **74**; 31-34.
- Diczfalusy E y Crosignani PG. Introduction: from reproductive endocrinology to reproductive health. The short history of a new departure by ESHRE. European Society for Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 1996; **11**; 1776-1777.

- Dietterich C, Check JH, Choe JK, Nazari A, y Fox F. The presence of small uterine fibroids not distorting the endometrial cavity does not adversely affect conception outcome following embryo transfer in older recipients. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2000; **27**; 168-170.
- Domínguez F. Implicación de las quimoquinas IL-8, MCP-1, RANTES, los receptores CXCR1, CXCR4, CCR2, CCR5 y el factor IGFBP-rP1 en la interfase maternoembrionaria. 2003. Universidad de Valencia, Valencia, pp 134.
- Domínguez F, Yanez-Mo M, Sánchez-Madrid F, y Simón C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *FASEB J* 2005; **19**; 1056-1060.
- Ferguson SE, Olshen AB, Viale A, Awtrey CS, Barakat RR, y Boyd J. Gene expression profiling of tamoxifen-associated uterine cancers: evidence for two molecular classes of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; **92**; 719-725.
- Ferguson SE, Olshen AB, Viale A, Barakat RR, y Boyd J. Stratification of intermediate-risk endometrial cancer patients into groups at high risk or low risk for recurrence based on tumor gene expression profiles. *Clin Cancer Res* 2005; **11**; 2252-2257.
- García JE, Acosta AA, Hsiu JG, y Jones HW, Jr. Advanced endometrial maturation after ovulation induction with human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; **41**; 31-35.
- Garrido-Gómez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Vilella F, y Simón C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertil Steril* 2013; **99**; 1078-1085.
- Giudice LC y Saleh W. Growth factors in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 1995; **6**; 60-69.
- Guo XC y Segars JH. The impact and management of fibroids for fertility: an evidence-based approach. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2012; **39**; 521-533.
- Gupta S, José J, y Manyonda I. Clinical presentation of fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008; **22**; 615-626.
- Güven S, Kart C, Unsal MA, y Odaci E. Intramural leiomyoma without endometrial cavity distortion may negatively affect the ICSI - ET outcome. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; **11**; 102.
- Hart R, Khalaf Y, Yeong CT, Seed P, Taylor A, y Braude P. A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 2001; **16**; 2411-2417.
- Healy DL, Trounson AO, y Andersen AN. Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 1994; **343**; 1539-1544.

- Hertig AT, Rock J, Adams EC, y Menkin MC. Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 1959: **23**; 202-211.
- Hoffman PJ, Milliken DB, Gregg LC, Davis RR, y Gregg JP. Molecular characterization of uterine fibroids and its implication for underlying mechanisms of pathogenesis. *Fertil Steril* 2004: **82**; 639-649.
- Hoozemans DA, Schats R, Lambalk CB, Homburg R, y Hompes PG. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online* 2004: **9**; 692-715.
- Horcajadas JA, Goyri E, Higon MA, Martínez-Conejero JA, Gambadauro P, García G, Meseguer M, Simón C, y Pellicer A. Endometrial receptivity and implantation are not affected by the presence of uterine intramural leiomyomas: a clinical and functional genomics analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008: **93**; 3490-3498.
- Horcajadas JA, Pellicer A, y Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007: **13**; 77-86.
- Horcajadas JA, Riewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, y Simón C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005: **11**; 195-205.
- Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JR, Domínguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, y Simón C. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006: **91**; 3199-3207.
- Kabir-Salmani M, Nikzad H, Shiokawa S, Akimoto Y, y Iwashita M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol Hum Reprod* 2005: **11**; 553-559.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, y Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002: **143**; 2119-2138.
- Kennedy TG, Gillio-Meina C, y Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction* 2007: **134**; 635-643.
- Khalaf Y, Ross C, El-Toukhy T, Hart R, Seed P, y Braude P. The effect of small intramural uterine fibroids on the cumulative outcome of assisted conception. *Hum Reprod* 2006: **21**; 2640-2644.
- Khaund A y Lumsden MA. Impact of fibroids on reproductive function. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008: **22**; 749-760.

- Klatsky PC, Lane DE, Ryan IP, y Fujimoto VY. The effect of fibroids without cavity involvement on ART outcomes independent of ovarian age. *Hum Reprod* 2007; **22**; 521-526.
- Klatsky PC, Tran ND, Caughey AB, y Fujimoto VY. Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2008; **198**; 357-366.
- Kliman HJ, Honig S, Walls D, Luna M, McSweet JC, y Copperman AB. Optimization of endometrial preparation results in a normal endometrial function test (EFT) and good reproductive outcome in donor ovum recipients. *J Assist Reprod Genet* 2006; **23**; 299-303.
- Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, y Devroey P. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002; **78**; 1025-1029.
- Kunz G, Beil D, Huppert P, Noe M, Kissler S, y Leyendecker G. Adenomyosis in endometriosis--prevalence and impact on fertility. Evidence from magnetic resonance imaging. *Hum Reprod* 2005; **20**; 2309-2316.
- Lee LK y Foo KY. Recent insights on the significance of transcriptomic and metabolomic analysis of male factor infertility. *Clin Biochem* 2014.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, y Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995; **63**; 535-542.
- Makker A y Goel MM. Uterine leiomyomas: effects on architectural, cellular, and molecular determinants of endometrial receptivity. *Reprod Sci* 2013; **20**; 631-638.
- Malyshkina AI, Posiseeva LV, Sotnikova NY, Antsiferova JS, Suvorkina EE, y Arevadze IE. Local immunological markers of different rate of growth of uterine myoma. *Russ J Immunol* 2002; **7**; 58-62.
- Markowska A, Rucinski M, Drews K, y Malendowicz LK. Studies on leptin and leptin receptor gene expression in myometrium and uterine myomas of GnRH analogue-treated women. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006; **27**; 379-384.
- Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Horcajadas JA. Is ovarian stimulation detrimental to the endometrium? *Reprod Biomed Online*. 2007 **15**;45-50.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, y Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* 2012; **9**; e1001356.

- Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, y Sykes A. Fetal loss after implantation. A prospective study. *Lancet* 1980; **2**; 554-556.
- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Díaz JI, Williams S, Bocca S, y Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* 2005; **20**; 2104-2117.
- Moreno-Bueno G, Sánchez-Estevez C, Cassia R, Rodríguez-Perales S, Díaz-Uriarte R, Domínguez O, Hardisson D, Andujar M, Prat J, Matias-Guiu X, y cols., Differential gene expression profile in endometrioid y nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003; **63**; 5697-5702.
- Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, Zeng D, y Fritz MA. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004; **81**; 1333-1343.
- Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, Gray R, Neuberger D, Kust GA, Gentleman R, Gullans SR, Wei LJ, y Wilcox M. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol Oncol* 2001; **83**; 177-185.
- Ng EH y Ho PC. Doppler ultrasound examination of uterine arteries on the day of oocyte retrieval in patients with uterine fibroids undergoing IVF. *Hum Reprod* 2002; **17**; 765-770.
- Nikas G. Cell-surface morphological events relevant to human implantation. *Hum Reprod* 1999; **14 Suppl 2**; 37-44.
- Noyes RW, Hertig AT, y Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; **1**; 3-17.
- Noyes RW, Hertig AT, y Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975; **122**; 262-263.
- Oliveira FG, Abdelmassih VG, Diamond MP, Dozortsev D, Melo NR, y Abdelmassih R. Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2004; **81**; 582-587.
- Parker WH. Uterine myomas: management. *Fertil Steril* 2007; **88**; 255-271.
- Peinado JA y Bolúmar F. Esterilidad e infertilidad: aproximación a su incidencia y a la demanda previsible de servicios. In Remohí, J, Simón, C, Pellicer, A, y Bonilla-Musoles, F (eds) Reproducción humana. 1996. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 235-245.
- Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, y Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**; 879-893.

- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society of Reproductive S. Myomas and reproductive function. *Fertil Steril* 2008: **90**; S125-130.
- Pritts EA. Fibroids and infertility: a systematic review of the evidence. *Obstet Gynecol Surv* 2001: **56**; 483-491.
- Pritts EA, Parker WH, y Olive DL. Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertil Steril* 2009: **91**; 1215-1223.
- Quade BJ, Wang TY, Somberger K, Dal Cin P, Mutter GL, y Morton CC. Molecular pathogenesis of uterine smooth muscle tumors from transcriptional profiling. *Genes Chromosomes Cancer* 2004: **40**; 97-108.
- Rackow BW y Taylor HS. Uterine leiomyomas affect molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2006: **86**.
- Rackow BW y Taylor HS. Submucosal uterine leiomyomas have a global effect on molecular determinants of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2010: **93**; 2027-2034.
- Ramírez L. Prostaglandin E2 and prostaglandin F2 alpha as endometrial receptivity biomarkers in successful embryo implantation. 2013. Universidad de Valencia, Valencia, pp 194.
- Remohí J, Gutiérrez A, Cano F, Ruiz A, Simón C, y Pellicer A. Long oestradiol replacement in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 1995: **10**; 1387-1391.
- Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, y Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003: **9**; 253-264.
- Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, Berchuck A, y Barrett JC. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003: **63**; 6-11.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, y Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2013: **100**; 818-824.
- Saidi SA, Holland CM, Kreil DP, MacKay DJ, Charnock-Jones DS, Print CG, y Smith SK. Independent component analysis of microarray data in the study of endometrial cancer. *Oncogene* 2004: **23**; 6677-6683.
- Scott RT, Snyder RR, Strickland DM, Tyburski CC, Bagnall JA, Reed KR, Adair CA, y Hensley SB. The effect of interobserver variation in dating endometrial histology on the diagnosis of luteal phase defects. *Fertil Steril* 1988: **50**; 888-892.

- Schena M, Shalon D, Davis RW, y Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; **270**; 467-470.
- Segars JH, Parrott EC, Nagel JD, Guo XC, Gao X, Birnbaum LS, Pinn VW, y Dixon D. Proceedings from the Third National Institutes of Health International Congress on Advances in Uterine Leiomyoma Research: comprehensive review, conference summary and future recommendations. *Hum Reprod Update* 2014.
- Simón C, Horcajadas JA, García-Velasco J, y Pellicer A. El endometrio humano: desde la investigación a la clínica 2009. Médica Panamericana, Buenos Aires y Madrid.
- Simón C, Mercader A, García-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, y Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**; 2638-2646.
- Simón C, Oberye J, Bellver J, Vidal C, Bosch E, Horcajadas JA, Murphy C, Adams S, Riesewijk A, Mannaerts B, y cols., Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Hum Reprod* 2005; **20**; 3318-3327.
- Sinclair DC, Mastroyannis A, y Taylor HS. Leiomyoma simultaneously impair endometrial BMP-2-mediated decidualization and anticoagulant expression through secretion of TGF-beta3. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**; 412-421.
- Skubitz KM y Skubitz AP. Differential gene expression in uterine leiomyoma. *J Lab Clin Med* 2003; **141**; 297-308.
- Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simón C, Remohí J, y Pellicer A. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**; 4399-4404.
- Somigliana E, Vercellini P, Daguati R, Pasin R, De Giorgi O, y Crosignani PG. Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. *Hum Reprod Update* 2007; **13**; 465-476.
- Sunkara SK, Khairy M, El-Toukhy T, Khalaf Y, y Coomarasamy A. The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2010; **25**; 418-429.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, y cols., Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; **147**; 1097-1121.

- Tsibris JC, Segars J, Coppola D, Mane S, Wilbanks GD, O'Brien WF, y Spellacy WN. Insights from gene arrays on the development and growth regulation of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2002; **78**; 114-121.
- Vanrell JA. Esterilidad, subfertilidad e infertilidad: definición frecuencia y etiología. In JA, V, J, C, J, B, and P, V (eds) Fertilidad y esterilidad humanas. 1992. Ed Masson-Salvat, Barcelona.
- Vaquerizas JM, Conde L, Yankilevich P, Cabezón A, Mínguez P, Díaz-Uriarte R, Al-Shahrour F, Herrero J, y Dopazo J. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**; W616-620.
- Vilella F, Ramírez LB, y Simón C. Lipidomics as an emerging tool to predict endometrial receptivity. *Fertil Steril* 2013; **99**; 1100-1106.
- Walocha JA, Litwin JA, y Miodonski AJ. Vascular system of intramural leiomyomata revealed by corrosion casting and scanning electron microscopy. *Hum Reprod* 2003; **18**; 1088-1093.
- Wang H y Dey SK. Lipid signaling in embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; **77**; 84-102.
- Wang H, Mahadevappa M, Yamamoto K, Wen Y, Chen B, Warrington JA, y Polan ML. Distinctive proliferative phase differences in gene expression in human myometrium and leiomyomata. *Fertil Steril* 2003; **80**; 266-276.
- Wang W y Check JH. Effect of corporal fibroids on outcome following embryo transfer in donor-oocyte recipients. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004; **31**; 263-264.
- Weston G, Trajstman AC, Gargett CE, Manuelpillai U, Vollenhoven BJ, y Rogers PA. Fibroids display an anti-angiogenic gene expression profile when compared with adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**; 541-549.
- Wilcox AJ, Baird DD, y Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; **340**; 1796-1799.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, y Nisula BC. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; **319**; 189-194.
- Yoshino O, Hayashi T, Osuga Y, Orisaka M, Asada H, Okuda S, Hori M, Furuya M, Onuki H, Sadoshima Y, y cols., Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. *Hum Reprod* 2010; **25**; 2475-2479.
- Zorrilla M y Yatsenko AN. The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Curr Genet Med Rep* 2013; **1**.

