

Expresión de KISS1 en embarazo ectópico

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

Valencia, octubre 2021

Marta Gurrea Soterias

Licenciada en Medicina

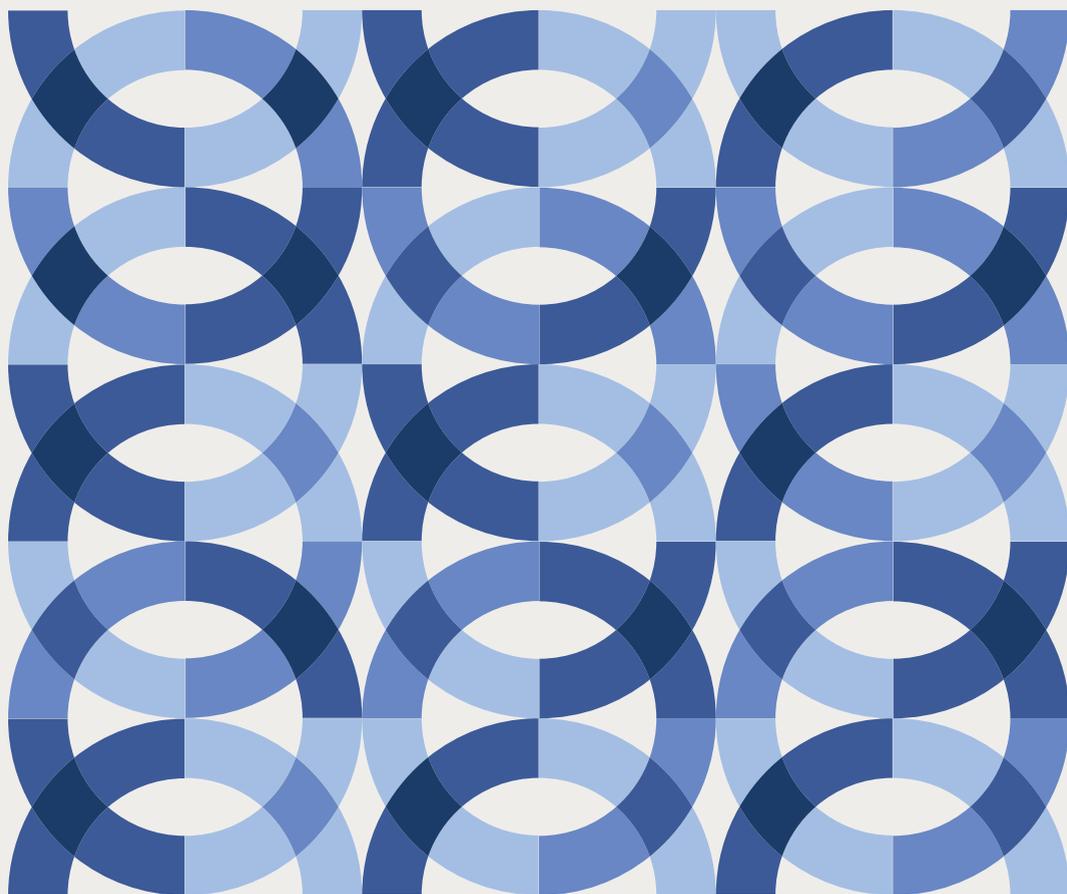
DIRECTORES:

Dr. Santiago Domingo del Pozo

Dr. Pablo Padilla Iserte



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Expresión de KISS1 en embarazo ectópico

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Pediatria, Obstetricia y Ginecologia

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

Marta Gurrea Soteras

Licenciada en Medicina

DIRECTORES:

Dr. Santiago Domingo del Pozo

Dr. Pablo Padilla Iserte

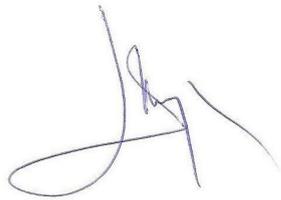
Valencia, octubre 2021

Dr. Santiago Domingo del Pozo, doctor en medicina y profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, jefe de sección de Oncología Ginecológica en HUP La Fe

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Expresión de KISS1 en embarazo ectópico”** ha sido realizado íntegramente por Doña Marta Gurrea Soteras bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 25 de octubre de 2021.



Fdo. Dr. Santiago Domingo del Pozo

Dr. Pablo Padilla Iserte, doctor en medicina, médico especialista en Obstetricia y Ginecología

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Expresión de KISS1 en embarazo ectópico”** ha sido realizado íntegramente por Doña Marta Gurrea Soteras bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL** ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia, a 25 de octubre de 2021.



Fdo. Dr. Pablo Padilla Iserte

El presente proyecto de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la colaboración del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y la Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad (FIVI).

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar mi más sincero agradecimiento al doctor Santiago Domingo y al doctor Pablo Padilla, mis directores de tesis, pues sin ellos este trabajo habría sido completamente imposible.

Gracias al doctor Pellicer, por animarme a cruzar el charco y a salir de mi zona de confort, él fue el impulsor de todo este proyecto.

Al doctor Mor y a su equipo, que me acogieron como una más y me enseñaron las bases del trabajo de laboratorio.

Un reconocimiento a mis compañeros del Hospital La Fe, mi segunda familia. No sé lo que haría sin ellos en el día a día, especialmente mi guardia (gracias Javier y Pepe) y mis compañeros de la sección, los que están y los que estuvieron. Gracias amigos, Luis, Victor, Tere, Pepe, Fernando, Tiermes y Blanca. Sin vosotros esto no habría llegado a buen puerto.

Gracias al doctor Manuel Tena Sempere y su equipo por su trabajo y colaboración inestimable.

Agradecer también a Sebas, a Paco, a Antonio, por estar ahí cuando los he necesitado, ese banco de laboratorio tan necesario y tan desconocido para nosotros los clínicos.

Gracias también a la Fundación IVI por permitir que todo esto haya sido posible.

Agradezco la participación desinteresada de las pacientes en este proyecto, incluso en momentos delicados decidieron participar de forma altruista para el avance de la ciencia.

Gracias a mi familia, no sé que habría sido de mí sin ellos, especialmente en estos últimos cuatro años. Gracias mamá, gracias papá, gracias Nacho. Sois mi gran apoyo y el ejemplo de que la perseverancia y el esfuerzo tienen su recompensa.

Gracias Andrés, por ser mi compañero en esta locura de proyecto de vida que hemos creado.

Índice

0	Resumen	/ 17
1	Introducción	
	/ 1.1. Visión general	/ 19
	/ 1.2. Gestación ectópica	/ 21
	1.2.1. Frecuencia	/ 21
	1.2.2. Localización	/ 21
	1.2.3. Etiología	/ 22
	1.2.4. Mortalidad/morbilidad	/ 24
	1.2.5. Evolución	/ 25
	1.2.6. Tratamiento	/ 26
	/ 1.3. Implantación en gestación ectópica	/ 27
	/ 1.4. Marcadores séricos en gestaciones ectópicas y de localización desconocida	/ 33
	1.4.1. Marcadores de la función trofoblástica	/ 35
	1.4.2. Marcadores de la función de cuerpo lúteo	/ 41
	1.4.3. Marcadores de angiogénesis	/ 42
	1.4.4. Marcadores de la función endometrial	/ 43
	1.4.5. Marcadores de inflamación y daño muscular	/ 44
	1.4.6. Marcadores de alteración del transporte tubárico	/ 45
	1.4.7. Paneles de múltiples marcadores	/ 46
	/ 1.5. Sistema KISS1 – GPR54 – kisspeptinas	/ 49
	1.5.1. Historia	/ 49
	1.5.2. Genómica y estructura	/ 50
	1.5.3. Vías de acción y papel biológico	/ 51
	1.5.3.1. Papel en la pubertad	/ 52
	1.5.3.2. Papel en la supresión tumoral	/ 54
	1.5.3.3. Papel durante la gestación	/ 55
	/ 1.6. Resultados de estudios preliminares	/ 57
2	Hipótesis y objetivos	
	/ 2.1. Hipótesis	/ 63
	/ 2.2. Objetivos	/ 63
	2.2.1. Objetivos primarios	/ 63
	2.2.2. Objetivos secundarios	/ 64

3	Material y métodos	
	/ 3.1. Ámbito del estudio	/ 67
	/ 3.2. Diseño del estudio	/ 67
	/ 3.3. Consideraciones éticas	/ 68
	/ 3.4. Población	/ 69
	/ 3.5. Inclusión de pacientes	/ 69
	3.5.1. Criterios de inclusión	/ 70
	3.5.2. Criterios de exclusión	/ 71
	/ 3.6. Técnicas de obtención de muestras	/ 71
	3.6.1. Extracción de tejido	/ 72
	3.6.2. Extracción de sangre periférica	/ 73
	3.6.3. Determinaciones en tejido trofoblástico	/ 74
	3.6.4. Determinaciones en suero	/ 78
	/ 3.7. Análisis estadístico y presentación de resultados	/ 80
4	Resultados	
	/ 4.1. Inclusión de pacientes	/ 83
	/ 4.2. Análisis descriptivo	/ 85
	/ 4.3. Análisis de variables a estudio	/ 86
	4.3.1. Determinaciones de KISS1 en tejido trofoblástico	/ 86
	4.3.1.1. KISS1 en gestaciones control (IVEs)	/ 88
	4.3.1.2. KISS1 en gestaciones ectópicas (EE)	/ 89
	4.3.1.3. Comparación de expresión de KISS1 en EE vs IVEs	/ 90
	4.3.2. Determinaciones de kisspeptinas en suero	/ 91
	4.3.2.1. Kisspeptinas en gestaciones control (IVEs)	/ 92
	4.3.2.2. Kisspeptinas en gestaciones ectópicas (EE)	/ 94
	4.3.2.3. Comparación niveles de kisspeptinas circulantes en EE vs IVEs	/ 95
	4.3.3. Kisspeptinas como herramienta diagnóstica de gestación ectópica	/ 97
5	Discusión	/ 101
6	Conclusiones	/ 113
7	Bibliografía	/ 115
8	Anexos	/ 127

Listado abreviaturas y acrónimos

ANOVA: análisis de la varianza

AUC: área bajo la curva

BhCG: gonadotropina coriónica humana B

BSA: bovine serum albumine

CEIC: comité ético de investigación científica

Células NK: células NK

Cm: centímetro

CT: ciclo umbral

Curva ROC: receiver operating characteristic

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

cpm: cuentas por minuto

E: especificidad

EE: embarazo ectópico

EEM / SEM: error estándar de la media

GPR54: G-protein coupled receptor 54

HPLC: high performance liquid chromatography

IIS: Instituto de Investigación Sanitaria

IL-1: interleuquina 1

IVE: interrupción voluntaria del embarazo

IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad

KISS1: gen supresor de metástasis KISS1

KP: kisspeptina

M: molar

microL: microlitro

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MUC-1: mucina 1

NPAF: neuropéptido AF

NPFF: neuropéptido FF

PAF: factor activador de plaquetas

PCR: polymerase chain reaction

PIGF: factor de crecimiento plaquetario

pmol/L: picomol / litro

PrIRP: péptido liberador de prolactina

PROKs: prokineticinas

RFRP: RFamide-related peptide

RIA: radio inmuno análisis

RNA: ácido ribonucleico

S: sensibilidad

SST: serum separator tube

TRA: técnicas de reproducción asistida

USA: United States of America

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

Listado de figuras

/ **Figura 1**

Localización de la gestación ectópica.

/ **Figura 2**

Etapas precoces del desarrollo placentario. Diagrama que muestra los primeros pasos en la formación de la placenta tras la implantación del blastocisto. (A,B) Estadio pre-lacunar. (C) Estadio lacunar. (D) Estadio veloso primario.

/ **Figura 3**

Rutas biológicas en gestación temprana.

/ **Figura 4**

Estructura de las kisspeptinas en humanos, péptidos codificados por el gen KISS1.

/ **Figura 5**

Vías de señalización KISS1/kisspeptinas y sus funciones potenciales.

/ **Figura 6**

Microfotografías mostrando expresión de KISS1 y su receptor en tejido placentario en distintas etapas del embarazo normal mediante inmunohistoquímica, mostrándose las células positivas de color marrón.

/ **Figura 7**

Análisis representativo de la expresión del gen KISS1 en placenta humana en diversas etapas de la gestación. Se emplea como gen control RP-L19.

/ **Figura 8**

Perfil tentativo de los cambios en los niveles relativos de expresión del gen KISS1 en placenta humana en diversas etapas de la gestación.

/ **Figura 9**

Perfil tentativo de los cambios en los niveles de expresión del gen KISS1 en placenta humana por trimestres de gestación.

/ Figura 10

Análisis representativo de la expresión del gen KISS1 en placentas procedentes de gestaciones ectópicas. Con fines comparativos, se ofrecen igualmente datos de expresión del gen KISS1 en muestras de placenta humana normal en la semana 10 de gestación. Se emplea como gen control RP-L19.

/ Figura 11

Perfil tentativo de los cambios en los niveles de expresión del gen KISS1 en placenta humana versus gestaciones ectópicas.

/ Figura 12

Imagen de gestación ectópica tubárica intervenida mediante laparoscopia.

/ Figura 13

Sección longitudinal del saco gestacional de una gestación ectópica tubárica con exposición del tejido trofoblástico.

/ Figura 14

Diagrama de flujo de pacientes diagnosticadas de EE e incluidas en el estudio.

/ Figura 15

Diagrama de flujo de pacientes reclutadas como grupo control.

/ Figura 16

Niveles de Kiss1 mRNA en tejido trofoblástico de gestaciones control (<10 semanas) versus total de embarazos ectópicos (EE).

/ Figura 17

Niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario de gestaciones control.

/ Figura 18

Evolución de la expresión de KISS1 en gestaciones ectópicas. Fig. 18A: Evolución de niveles de Kiss1 mRNA en tejido placentario de gestación ectópica (EE) diferenciado en < 6 semanas y entre 7 - 9 semanas de gestación.

/ Figura 19

Evolución de niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario control versus gestación ectópica (EE) discriminando por semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación.

/ Figura 20

Niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control (<10 semanas) vs. total de embarazos ectópicos (EE).

/ Figura 21

Evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en gestaciones control.

/ Figura 22

Evolución de los niveles plasmáticos por semanas de gestación en gestaciones ectópicas

/ Figura 23

Evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control vs ectópico (EE), discriminando entre semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación.

/ Figura 24

Evolución de los niveles de kisspeptinas circulantes en gestación control vs EE.

/ Figura 25

Representación del valor predictivo de los niveles de kisspeptinas en suero como posible marcador diagnóstico de gestación ectópica.

/ Figura 26

Curva ROC de los niveles plasmáticos de kisspeptinas como prueba diagnóstica para gestación ectópica.

Listado de tablas

/ Tabla 1

Tabla resumen de factores de riesgo asociados a la gestación ectópica.

/ Tabla 2

Predicción de gestación ectópica con marcadores individuales.

/ Tabla 3

Predicción de gestación ectópica en paneles de marcadores múltiples.

/ Tabla 4

Técnicas aplicadas (RT-PCR; señales, primers y condiciones)

/ Tabla 5

Características de las pacientes reclutadas con muestra válida para estudio de tejido.

/ Tabla 6

Características de las pacientes reclutadas con muestra válida para estudio de suero.

/ Tabla 7

Datos de expresión de KISS1 en tejido trofoblástico. EE: embarazo ectópico, EEM: error estándar de la media.

/ Tabla 8

Datos de expresión de KISS1 en tejido trofoblástico de gestaciones sometidas a IVE.

/ Tabla 9

Datos de expresión de KISS1 en tejido trofoblástico de gestaciones ectópicas.

/ Tabla 10

Niveles de kisspeptinas circulantes en ambos grupos de estudio.

/ Tabla 11

Niveles de kisspeptinas circulantes, por semanas de gestación, en gestaciones control (IVEs).

/ Tabla 12

Niveles de kisspeptinas circulantes, por semanas de gestación, en gestaciones ectópicas.

Resumen

La implantación es el proceso por el que el embrión se orienta, adhiere y, finalmente, invade el endometrio materno, siendo un proceso clave para el éxito de la reproducción y desarrollo embrionario. Se requiere una estrecha regulación del proceso para prevenir una invasión patológica o excesiva. Existen grandes similitudes entre el proceso de invasión del citotrofoblasto (implantación) y la invasión de las células cancerígenas. Sin embargo, el proceso de implantación está regulado por una serie de procesos no del todo conocidos, que evitan una invasión celular descontrolada.

Uno de los factores implicados en este proceso regulatorio es el gen KISS-1, que codifica una familia de neuropéptidos denominados kisspéptidos, los cuales actúan a través de un receptor, una proteína G llamada GPR54.

La expresión del sistema KISS1-GPR54 ha sido demostrada en gran variedad de tejidos entre los que se encuentra la placenta, el hipotálamo, los ganglios basales, la medula espinal, el páncreas y el plasma. Las funciones descritas de los kisspéptidos son variadas, desde intervenir en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en el desarrollo puberal a la supresión de metástasis en procesos oncológicos. Respecto a su papel en la regulación de la invasión del trofoblasto, considerando la localización de las células en el sinciotrofoblasto y su aumento progresivo en plasma durante la gestación, es posible que las kisspeptinas se encuentren implicadas en el mecanismo de regulación de la invasión trofoblástica. Parece ser que actuaría como supresora de este proceso, de forma que sus niveles aumentarían progresivamente durante el embarazo, siendo proporcionales al grado de una correcta implantación.

Del mismo modo, gestaciones que cursen con alteraciones de la implantación podrían correlacionarse con una disregulación de este mecanismo, y por tanto con variaciones en los niveles de expresión de estas kisspeptinas, hecho que ya se ha mostrado en la literatura en gestaciones con preeclampsia, retrasos de crecimiento o que acabaron en abortos espontáneos.

Dentro de estas alteraciones de la implantación, es de particular interés la gestación ectópica, embarazo que se desarrolla fuera de la cavidad uterina, con alto riesgo de morbimortalidad materna. Hasta el momento no ha sido estudiada la relación del eje KISS1-GPR54-kisspeptinas en este tipo de gestaciones, de demostrarse una desviación respecto a las gestaciones normoevolutivas podría abrirse un nuevo abanico de posibilidades en el diagnóstico y manejo de esta patología.

1 Introducción

Los fallos precoces en la gestación son la complicación más frecuente del embarazo, y hasta un 1-2% de todas las gestaciones serán de localización ectópica, es decir, fuera de la cavidad uterina. Dado que ésta es una de las causas principales de morbilidad y mortalidad materna en el primer trimestre en los países desarrollados, el diagnóstico de las gestaciones ectópicas y la determinación del posible desarrollo de las gestaciones de localización incierta son de gran interés clínico en nuestro medio. En los últimos años, se han investigado diversas moléculas o antígenos o agentes en plasma y suero, bien independientemente, bien combinados, como potenciales marcadores para este tipo de gestaciones.

El objetivo de este trabajo es presentar un nuevo marcador, las kisspeptinas o proteínas derivadas de la expresión del gen KISS1, como un marcador potencial para diferenciar gestaciones iniciales de localización intrauterina de aquellas gestaciones ectópicas o de localización extrauterina.

1.1. Visión general

Podemos encontrar síntomas como el sangrado vaginal o el dolor abdominal en cerca del 25% al 30% de las gestaciones viables, sin embargo, estos síntomas también pueden sugerir el fracaso del embarazo temprano¹. El fallo precoz de la gestación es su complicación más común, ya que aproximadamente el 25% de las gestaciones conocidas acabarán en aborto, de los cuales el embarazo ectópico representa el 1-2% de todos los casos. Recientes estudios epidemiológicos sugieren que hasta el 6% de las muertes maternas ocurridas en EEUU pueden ser atribuidas a gestaciones ectópicas². En España se estima que el embarazo ectópico constituye aproximadamente el 2.3% del número total de embarazos³. Al ser una de las principales causas de morbi-

lidad y mortalidad materna a nivel mundial, un diagnóstico acertado y precoz de la gestación ectópica resulta de vital importancia.

Cabe remarcar que el diagnóstico y el manejo de las mujeres en riesgo de un fallo precoz del embarazo no ha cambiado significativamente en décadas, y quizás el hallazgo de nuevos marcadores o su combinación podrían cambiar este paradigma.

El manejo habitual actual en estos casos para el diagnóstico de gestación ectópica incluye la determinación seriada de los niveles de la gonadotropina coriónica humana en suero (β hCG) y la ecografía pélvica, generalmente transvaginal ⁴⁻⁹. Desafortunadamente, la ecografía realizada en el momento de primera consulta de la paciente puede ser no concluyente hasta en el 40% de los casos, bien porque la gestación no está lo suficientemente avanzada como para poder ser visualizada por los ultrasonidos, o bien porque se trata de un aborto bioquímico en el cual la gestación se ha detenido incluso antes de llegar a formar la imagen del saco gestacional (o éste se ha colapsado). Por tanto, la ecografía no puede determinar en muchos casos la localización o la viabilidad de la gestación en un número importante de mujeres con gestaciones iniciales.

El diagnóstico de aquellas mujeres que consultan por una gestación de localización incierta (GLI, o sus siglas en inglés, PLU -pregnancy of unknown location-) ¹⁰⁻¹³ implica normalmente múltiples visitas para determinaciones en sangre, ecografía y posibles procedimientos médicos y quirúrgicos hasta que el diagnóstico definitivo se establece. En el tiempo que se precisa para diagnosticar la gestación ectópica, se puede producir la rotura de la misma, conduciendo a una afectación en la fertilidad futura de la mujer y a una hemorragia intraabdominal potencialmente letal. No sólo es importante el diagnóstico precoz de esta patología para evitar la morbilidad añadida que se asocia a un retraso en el diagnóstico, sino que diferenciar esta situación de un sangrado anormal en una gestación viable intrauterina es crucial, ya que las estrategias terapéuticas óptimas difieren en cada caso, y pueden tener un gran impacto en el manejo de futuras gestaciones ¹¹. La validación de un biomarcador podría ser de gran ayuda a la hora de establecer la localización o la viabilidad de una gestación temprana, o incluso podría permitir la toma de decisiones terapéuticas ya que podría determinar qué pacientes se beneficiarían del manejo urgente, quirúrgico, médico o expectante.

Más adelante se comentará los distintos potenciales marcadores que han sido publicados en la literatura en los últimos años y su situación actual en el desarrollo como marcadores biológicos de aplicación clínica probada.

1.2. Gestación ectópica

La gestación eutópica o normalmente implantada tiene lugar dentro de la cavidad uterina, en el triángulo cuyos límites superiores son el fondo y cuernos tubáricos y cuyo límite inferior es el segmento uterino inferior. Toda implantación fuera de esta área se considera ectópica, por tanto, aquella que se implanta fuera de la cavidad endometrial.

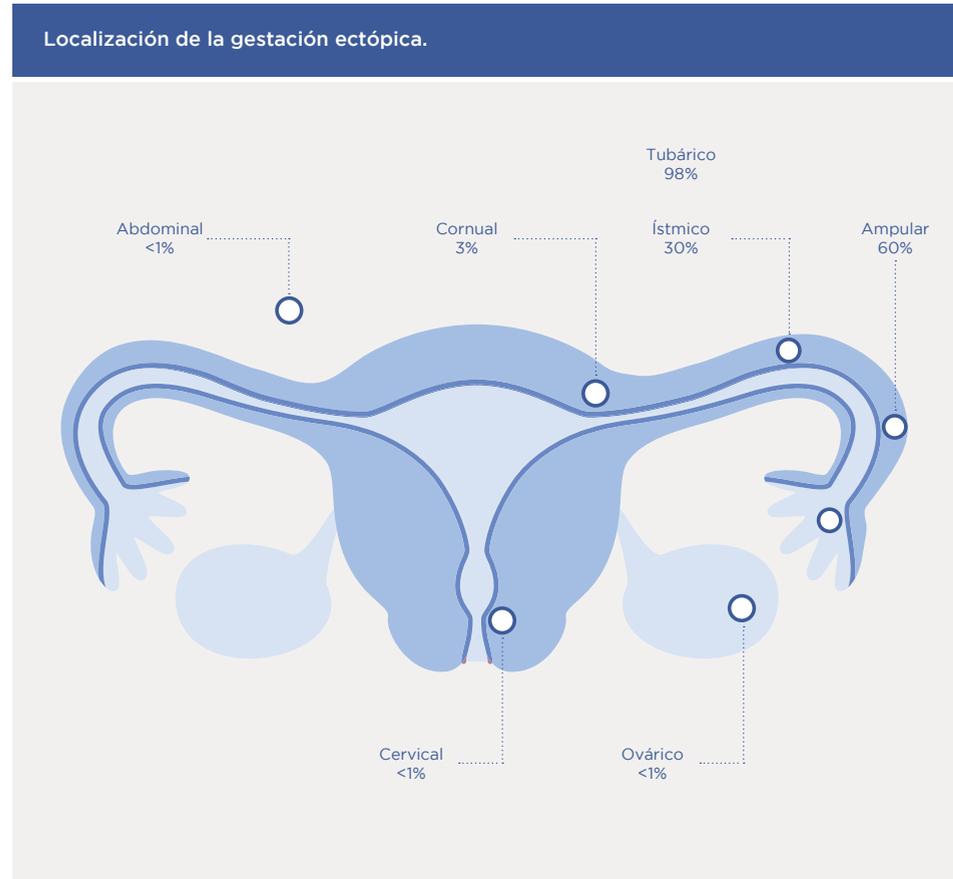
/ 1.2.1. Frecuencia

Esta situación de implantación anómala se observa en el 1-2% de todos los embarazos. La frecuencia ha aumentado en los últimos años asociada a factores como el tratamiento médico de la enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), el aumento de procedimientos quirúrgicos tubáricos como la esterilización mediante salpingectomía, el auge de las técnicas de reproducción asistida y el uso de métodos anticonceptivos como el dispositivo intrauterino (DIU).

/ 1.2.2. Localización

De estos embarazos, aproximadamente el 98% son tubáricos (a su vez, 60% ampulares, 30% ístmicos, 5% fimbricos y 3% intersticiales). El 2% restante corresponde a otras localizaciones menos frecuentes: ováricos, cervicales, intraligamentarios y abdominales.

Figura 1



Adaptado de Sá de Oliveira Aline¹⁴.

Tabla 1

Tabla resumen de factores de riesgo asociados a la gestación ectópica.

Factores de riesgo relativos

Alto	Medio	Bajo
<ul style="list-style-type: none"> Gestación ectópica previa Esterilización tubárica DIU EPI Salpingitis ístmica nodosa 	<ul style="list-style-type: none"> Chlamydia Trachomatis Infertilidad Promiscuidad Tabaquismo 	<ul style="list-style-type: none"> Transferencia intratubárica de gametos Edad <18 años Edad >35 años Duchas vaginales

Otros factores de riesgo

- Anticonceptivos
- Migración transperitoneal
- Endometriosis
- TRA
- Abortos espontáneos previos
- Origen étnico
- Legrado uterino previo

Adaptado de Laural Marion BS¹⁵.

1.2.3. Etiología

Existen diversos factores asociados a la etiología de la gestación ectópica. Recordemos que, tras la fecundación en la ampolla tubárica, el ovocito se implanta entre el 6º y 7º día allí donde se encuentre.

Aquellos factores que dificulten la progresión del ovocito fecundado hacia la cavidad endometrial facilitan la posibilidad de implantación ectópica.

En un 80% de los casos se atribuye a alteraciones mecánicas de las trompas:

- Procesos inflamatorios primarios: las salpingitis pueden dejar en el proceso de curación bridas, obstrucciones totales o parciales, o alteraciones en la motilidad y funcionalismo tubáricos, enlenteciendo o imposibilitando el transporte ovular.
- Procesos inflamatorios en la cavidad abdominal: las apendicitis, por ejemplo, que pueden crear procesos adherenciales a posteriori que pueden afectar el trayecto tubárico.

- Compresiones extrínsecas: uterinas (miomas), tumoraciones ováricas.
- Malformaciones tubáricas: duplicidad tubárica, divertículos de la pared tubárica.
- Alteraciones de la motilidad tubárica: administración de gestágenos a bajas dosis de forma continua o el empleo de contracepción postcoital con estrógenos.
- Empleo de DIUs: asocia un 8-10% de anexitis inaparentes y alteraciones en la motilidad y transporte tubáricos, incrementando la frecuencia de embarazos ectópicos.
- Tratamientos quirúrgicos: cirugía conservadora (mediante salpingostomía) de embarazos ectópicos tubáricos previos o la ligadura tubárica.
- Técnicas de reproducción asistida (transferencia embrionaria intrauterina).
- Endometriosis tubárica: se debe tanto a la existencia de un cierto quimiotactismo en el endometrio ectópico, así como a las estenosis y adherencias que se producen con la evolución de las lesiones, incluyendo la acción extrínseca de órganos vecinos afectos.

En un 15% de casos se atribuye a alteraciones funcionales de la trompa, a considerar, pero de difícil demostración. Por ejemplo, en la microcirugía reparadora tubárica se puede conseguir normalizar la anatomía de la trompa, pero no siempre su funcionalismo. Por ello no es de extrañar que hasta un 25% de las mujeres en que estas intervenciones son exitosas presenten algún episodio de embarazo tubárico.

En el resto de los casos la etiología es desconocida.

/ 1.2.4. **Mortalidad/morbilidad**

Las gestaciones ectópicas tubáricas suponen hasta un 2% del total de embarazos y siguen siendo una de las causas principales de muerte relacionada con el embarazo en el primer trimestre en los países desarrollados¹⁶, alcanzando el 6% del total de muertes relacionadas con el embarazo en Estados Unidos.

La gestación ectópica tubárica es también causa de morbilidad materna: a corto plazo, dolor pélvico, necesidad de transfusión sanguínea y complicaciones derivadas del tratamiento; a largo plazo, efectos sobre la fertilidad que dependen tanto de las características clínicas del embarazo ectópico, como del tratamiento elegido¹⁷.

/ 1.2.5. **Evolución**

La evolución clínica va a depender de la localización de la gestación.

En el caso del embarazo ectópico tubárico, es posible la reabsorción espontánea con escasa sintomatología.

Si se sitúa en la porción ampular puede evolucionar durante más tiempo, al ser la zona más distensible de la trompa. Generalmente el ovocito fecundado es expulsado a cavidad abdominal con una discreta hemorragia en el espacio de Douglas, clasificándose como aborto tubárico.

Si se trata de un embarazo ectópico en el istmo, lo más probable es que exista una rotura tubárica precoz con un cuadro de abdomen agudo y shock hemorrágico.

En el caso de la fimbria, el ovocito fecundado puede progresar hacia la cavidad abdominal, pudiendo evolucionar hacia una gestación ectópica abdominal secundaria.

El embarazo ectópico intersticial suele asociarse a la rotura uterina, ocurriendo más tardíamente que el embarazo ectópico ístmico.

La implantación ovárica suele evolucionar hacia la rotura y hemorragia.

Los casos de gestaciones ectópicas abdominales son muy infrecuentes. Puede ser abdominal primitivo (muy raro), con fecundación e implantación en el peritoneo y órganos pélvico-abdominales, o bien abdominal secundario, como evolución de un ectópico fímbrico u ovárico¹⁸. Es la única forma posible de que una gestación ectópica llegue a término, siendo frecuentes las malformaciones fetales. Es un cuadro grave, ya que la placenta podría insertarse en epiplon, intestino e hígado.

/ 1.2.6.

Tratamiento

Se trata de una de las pocas situaciones clínicas en las que el manejo, en función de las características clínicas, puede ser expectante o activo, a su vez mediante tratamiento médico o mediante cirugía.

Expectante

Aunque no se conoce su número con exactitud, se sabe que algunas gestaciones ectópicas se resuelven espontáneamente, a menudo sin grandes manifestaciones clínicas. Por tanto, el manejo espontáneo es una opción en casos seleccionados: mujeres clínica y hemodinámicamente estables, asintomáticas, con niveles decrecientes de gonadotropina coriónica humana (βhCG).

Médico

El tratamiento médico se basa en el empleo de agentes que farmacológicamente inducen el aborto tubárico. Una dosis única (o un régimen de múltiples dosis) de metotrexato, un antagonista del ácido fólico, ha sido el tratamiento habitual para estos casos, con amplia experiencia durante los últimos 40 años^{17,19}.

Quirúrgico

La salpingectomía laparoscópica de la trompa afecta es el tratamiento quirúrgico de elección, debido al riesgo teórico de recurrencia en una trompa dañada. Se puede plantear la salpingostomía (incisión longitudinal en la trompa afectada y extracción del saco gestacional) en el caso de ausencia o anomalías en la trompa contralateral¹⁷.

1.3.

La implantación en la gestación ectópica

Merece la pena comentar en los siguientes párrafos las características especiales respecto al proceso implantatorio que se han descrito en la literatura en los casos de gestaciones ectópicas.

La invasión de las células trofoblásticas extravellosas no está restringido a la decidua uterina, sino que también tiene lugar en muchos otros órganos, especialmente en la trompa de Falopio, la cual se caracteriza por la falta de decidualización²⁰, la falta de células NK de tipo decidual^{21,22} y, en la ingravidez, a un bajo nivel de vascularización. El desarrollo de gestaciones tubáricas viables parece estar restringido a una implantación en la porción de mesosalpinx de la trompa de Falopio, la cual posee una pared de mayor grosor, mientras que la implantación en otras zonas resulta en reabsorción la mayoría de las veces.

Existen similitudes y diferencias entre la invasión trofoblástica que tiene lugar en el útero y la que se produce en las gestaciones ectópicas tubáricas, respecto a los tipos celulares que intervienen en la misma y la interacción entre ellos.

Durante el proceso de implantación, el trofoblasto deriva de la capa externa de trofoectodermo del blastocisto, y se diferencia tras la fase inicial de anidación en trofoblasto veloso y extraveloso.

El trofoblasto veloso está formado por sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto, que cubre las vellosidades coriónicas y participa en el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto, una vez la circulación sanguínea está establecida.

El trofoblasto que se encuentra fuera de las vellosidades coriónicas (por ello llamado extraveloso) invade la decidua para formar las uniones de anclaje de la placenta, además de estar implicado en la transformación de las arterias espirales uterinas en vasos sanguíneos que no respondan a estímulos vasoactivos.

Respecto al trofoblasto que encontramos en las gestaciones ectópicas, primero se debe diferenciar éstas en viables o no viables, ya que el desarrollo de gestaciones ectópicas viables parece estar restringido a la implantación en la mitad del mesosalpinx en la trompa de Falopio, cuya pared presenta mayor grosor.

En el caso de gestaciones ectópicas viables, las estructuras placentarias están formadas principalmente por las mismas subpoblaciones de células trofoblásticas que en las gestaciones eutópicas. Pero, a diferencia de éstas, presentan mayor número de células pequeñas fusiformes con gran capacidad de invasión y menor proporción de células poligonales. Además, las células gigantes multinucleadas son escasas ²³.

Varios autores han puesto de manifiesto la naturaleza altamente invasora de las células trofoblásticas en gestaciones tubáricas viables ²³⁻²⁵, las cuales en muchas ocasiones penetran todo el espesor de la pared hasta alcanzar la serosa ²⁶ y por tanto provocan la rotura tubárica. Existen pocos datos acerca del trofoblasto endovascular, pero estos estudios muestran que el trofoblasto extraveloso invade los vasos tubáricos de la misma manera en que lo hace con las arterias espirales uterinas ²⁴.

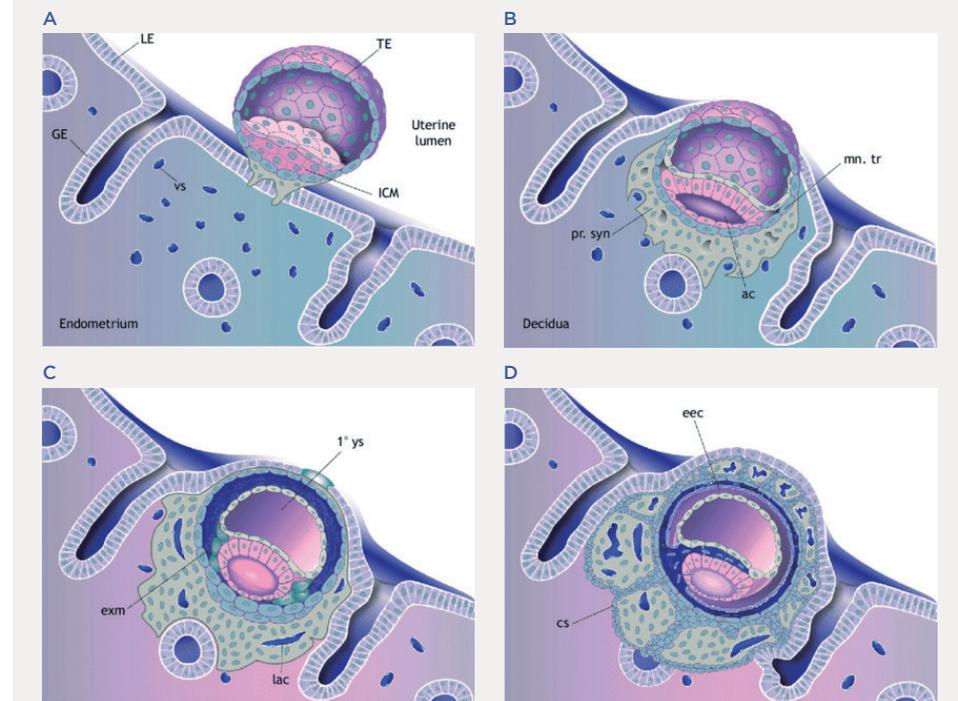
El crecimiento y la diferenciación del trofoblasto se ve afectado por la interacción de las citoquinas. Las citoquinas producidas en el propio trofoblasto y las producidas en el endometrio por las células del estroma decidual diferenciadas y por las células NK deciduales contribuyen de forma significativa a la proliferación y diferenciación del trofoblasto ^{27,28}.

A primera vista existen muchas similitudes entre las gestaciones uterinas y las tubáricas ²⁹ lo que conduce a la conclusión que la gestación ectópica representa una implantación anormal de un blastocisto morfológicamente normal que produce un trofoblasto en principio inmunológicamente normal y hormonalmente activo. Según Goffin, el trofoblasto extraveloso de las gestaciones tubáricas expresa E-cadherina, connexina-40, c-erb-B2, lactógeno placentario humano (hPL), HLA-G e inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (p16 y p57) igual que las gestaciones intrauterinas ²⁰.

Para alcanzar el éxito en la reproducción humana, la trompa de Falopio debe proveer un ambiente adecuado para el desarrollo preimplantatorio del embrión y para un transporte eficiente del embrión hasta el útero para la implantación. Estas funciones están coordinadas por interacciones de tipo paracrino entre el epitelio tubárico, el músculo liso, las células del sistema inmunitario y las células del embrión en desarrollo.

Figura 2

Etapas precoces del desarrollo placentario. Diagrama que muestra los primeros pasos en la formación de la placenta tras la implantación del blastocisto. (A,B) Estadio pre-lacunar. (C) Estadio lacunar. (D) Estadio veloso primario.



1° ys: primary yolk sac; ac, amniotic cavity; cs, cytotrophoblastic shell; eec, extra-embryonic coelom; exm, extra-embryonic mesoderm; GE, glandular epithelium; ICM, inner cell mass; lac, lacunae; LE, luminal epithelium; mn. t.: mononuclear trophoblast; pr. syn: primary syncytium; TE, trophoctoderm; vs, blood vessels.

Extraído de Turco, Margherita & Moffett, Ashley (2019). *Development of the human placenta* ³⁰.

Alteraciones en estas señales pueden conducir a un microambiente tubárico que propicie la implantación embrionaria y una alteración en la motilidad tubárica, resultando en última instancia en una implantación precoz e inapropiada del embrión fuera de la cavidad endometrial.

Hasta el momento, el conocimiento de los mecanismos que subyacen en los mecanismos de implantación extrauterina es escaso, ya que las gestaciones ectópicas raramente ocurren en animales³¹, limitando el desarrollo de un modelo animal para su estudio, y por tanto los datos existentes en la literatura provienen básicamente de estudios *in vitro*.

Estudios recientes propugnan nuevos conceptos en fisiología y patobiología de la trompa, como la existencia de un fenotipo receptivo en la trompa de Falopio favoreciera la gestación ectópica.

El transporte embrionario a través de la trompa se consigue a través de una combinación de la contracción de la pared de músculo liso y del movimiento ciliar de la trompa³².

La motilidad ciliar puede verse afectada por variaciones en los niveles de prostaglandinas y progesterona³², la exposición al humo del tabaco³³ o la exposición a infecciones como la N. gonorrea a través del TNF- α ³⁴.

La contractilidad del músculo liso de la pared tubárica parece estar regulada por las células intersticiales de Cajal (ICC), también responsables del peristaltismo intestinal³⁵, que a su vez expresan receptores de progesterona y ven su número reducido ante la exposición a factores infecciosos como la Chlamydia³⁶. Otra sustancia relacionada con la relajación del músculo liso es el óxido nítrico (ON), cuya enzima óxido nítrico sintasa (NOS) ve alterados sus niveles de expresión en pacientes con evidencia serológica de exposición a Chlamydia trachomatis³⁷.

Respecto al diálogo entre el embrión y el músculo liso, la hCG y el factor activador de plaquetas (PAF) expresados por el embrión han mostrado un efecto relajante sobre las células del músculo liso^{38,39}. Por tanto, una alteración en la señalización embrionaria podría retrasar el transporte a través de la trompa y por tanto propiciar la implantación ectópica.

Cada vez es más evidente que la implantación es un evento inflamatorio y que en la trompa de Falopio un fenotipo proinflamatorio con aumento de expresión de citoquinas podría inducir la receptividad embrionaria, la adhesión y la invasión, conduciendo a la gestación ectópica⁴⁰⁻⁴².

Existen diferencias en la proliferación y diferenciación trofoblástica en el sitio de implantación tubárico, debido al diferente microambiente de citoquinas. Muchos autores concuerdan que existe una mayor tasa de crecimiento e invasión trofoblástica en las gestaciones tubáricas²³⁻²⁵. De hecho, transferencias de blastocistos de ratón a tejidos no decidualizados resultaron en invasión trofoblástica más extensiva que en el útero²⁰.

Esto puede ser el resultado de una desregulación en la diferenciación trofoblástica que puede causar una proliferación más profunda²³ y también una reducción en la tasa de apoptosis en comparación con la implantación uterina²⁵.

Dentro de estas señales, cabe destacar las prokineticinas (PROKs), ligandos para receptores acoplados a proteína G. Estos receptores encuentran un aumento de expresión ante la exposición al tabaco e infecciones como la Chlamydia^{43,44}.

Las PROKs presentan propiedades angiogénicas, a través de la activación del factor inhibidor de leucemia en el endometrio (LIF), el cual ha sido mostrado como factor indispensable para la implantación en estudios en ratones⁴⁵⁻⁴⁷.

Otras proteínas implicadas en el diálogo inflamatorio y que han mostrado diferente expresión en la trompa de Falopio expuesta a infección son la activina A³⁷, la interleuquina 1 (IL-1)⁴⁸ y la mucina 1 (MUC1)⁴⁹. Todas estas moléculas se asocian a procesos de adhesión e invasión en la implantación embrionaria, sugiriendo que alteraciones en la cascada de señales correspondiente podrían incrementar la receptividad de la trompa hacia el embrión.

Otro factor fundamental para el establecimiento de una implantación exitosa es la capacidad para establecer una red de aporte vascular. Esta angiogénesis también ocurre en los sitios de implantación tubárica, principalmente mediada por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (PIGF), ambos factores proangiogénicos. Al contrario que en las gestaciones intrauterinas, los niveles de VEGF en el sitio de implantación tubárico son mayores en las gestaciones ectópicas y los niveles de PIGF menores, sugiriendo una alteración en las señales paracrinas embrionarias en respuesta a un microambiente alterado en la trompa de Falopio, en un esfuerzo por desarrollar una aporte vascular eficiente para el embrión⁵⁰.

Por último, durante el proceso de invasión del trofoblasto, las células inmunitarias presentes en la trompa juegan un importante papel.

Las células natural killer (NK) deciduales parecen ser particularmente importantes para la remodelación de las arterias espirales en el ser humano ⁵¹ así como en el ratón ⁵². Las arterias deciduales en el ratón, en ausencia de células NK, se mantienen sin dilatar y muestran paredes gruesas que conservan su capa de musculatura lisa. Este fenotipo puede normalizarse gracias al trasplante de médula ósea de animales competentes, pero sólo cuando estas células NK son capaces de segregar interferon gamma (IFN γ) ⁵². El trofoblasto endovascular, el cual coagula las arterias espirales en gestaciones intrauterinas hasta el final del primer trimestre, aparece también en el lugar de implantación de la gestación ectópica ^{24,26}. Sin embargo, parece que existe una adaptación inducida por el trofoblasto en gestaciones tubáricas viables respecto al aporte sanguíneo, tal y como describe Kemp en el sitio de implantación: una extensa vascularización materna con múltiples fístulas arterio-venosas en la pared así como una densa red de microvascularización en la submucosa ²⁶.

La falta de células deciduales NK probablemente también conduce a una modificación en la respuesta inmune ya que estas células supuestamente modulan la actividad de las células dendríticas y las células T localmente, favoreciendo que las células dendríticas induzcan una respuesta CD8⁺ protectora ⁵³. La presencia y maduración de CDs es similar en gestaciones intrauterinas y tubáricas ²³.

En el endometrio, principalmente controlan la invasión trofoblástica las células NKCD56^{bright}CD16^{neg}, que interactúan con el trofoblasto a través de receptores específicos, y que migran hacia el endometrio en la segunda mitad del ciclo bajo la influencia de la progesterona. Este tipo de células natural killers no se encuentran en las trompas de Falopio, si no con otro patrón de expresión en superficie (CD56^{dim}CD16^{neg}), las cuales no producen muchos de los factores responsables de la apoptosis del trofoblasto y por tanto su consecuente control en la invasión del tejido ²².

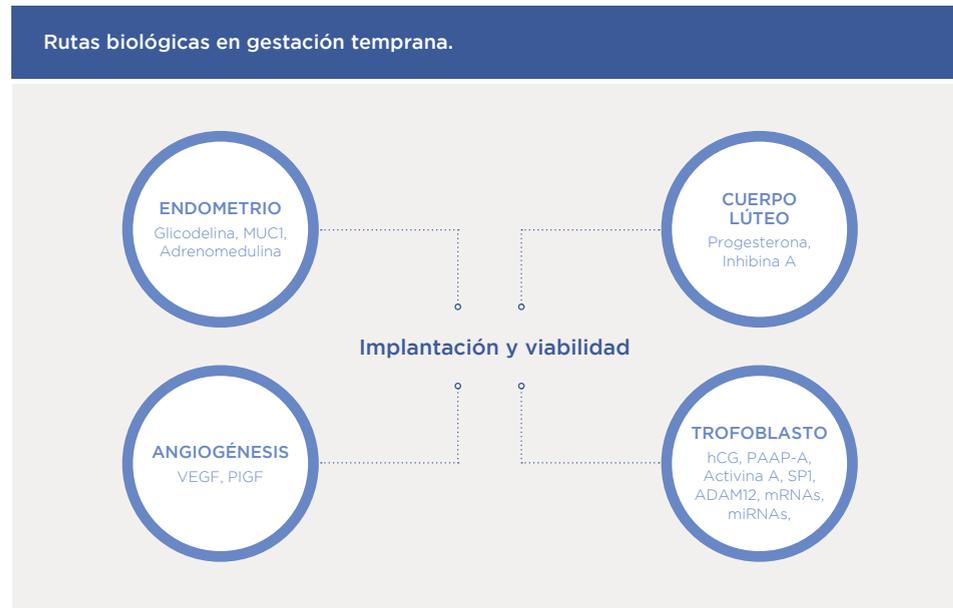
En cambio, la trompa de Falopio de la paciente con gestación ectópica contiene un número significativamente aumentado de subtipos de células inmunes (linfocitos CD8^{pos}, macrófagos CD68^{pos}, células dendríticas CD11c^{pos}) que sugieren, también en la vertiente inmunológica, un microambiente propicio para la implantación embrionaria ^{54,55}.

1.4. Marcadores séricos en gestaciones ectópicas y de localización desconocida

Ya sea expectante, médico o quirúrgico, es importante que el tratamiento de la gestación ectópica se instaure lo antes posible para reducir la morbilidad y mortalidad asociada. Sin embargo, el diagnóstico de la gestación ectópica tubárica (actualmente mediante la combinación de la imagen ecográfica y la determinación de hCG sérica) sigue siendo un problema, resultando a menudo en un retraso del inicio del tratamiento. Menos del 50% de los casos se diagnostican en la primera consulta ⁵⁶.

Existen numerosos factores implicados en la evolución de la gestación de primer trimestre, pero debido a la escasez de modelos animales para el estudio de la gestación ectópica, la relación de estos factores no se alcanza a comprender en su totalidad ⁵⁷. En el desarrollo de modelos predictivos del resultado en la gestación inicial, es importante considerar no sólo el medio ambiente implantatorio sino también el embrión en sí. Los distintos factores implicados pueden ser clasificados en subgrupos basándose en la fisiología e incluyen factores inherentes al embrión (los cuales se reflejan en los marcadores de función trofoblástica), factores asociados a la función del cuerpo lúteo, factores asociados a la función endometrial y factores asociados a la angiogénesis.

Figura 3



Adaptado de Senapati y Barnhart, 2013⁵⁸.

Además de estos, en el caso de gestaciones ectópicas tubáricas entran en consideración también marcadores de inflamación, de daño muscular y de alteraciones del transporte a través de las trompas, cómo hemos comentado previamente.

A la hora de considerar marcadores para las gestaciones ectópicas y para aquellas de localización incierta, se debe tener en cuenta las características necesarias que debe cumplir de forma ideal un marcador, así como los pasos necesarios para llevar esta herramienta desde el banco del laboratorio hasta la práctica clínica habitual. En este caso, el marcador ideal debería estar presente de forma precoz en el primer trimestre, potencialmente antes que la gestación se desarrolle hasta los niveles discriminatorios de β hCG junto con la ecografía. Además, el marcador ideal debería ser consistente, preciso, asequible y fácilmente obtenible en los puntos de atención al paciente. Por todo esto, los marcadores séricos resultan de gran interés en este tema.

Por otro lado, el desarrollo de marcadores para su uso clínico generalmente se divide en cuatro fases: investigación preclínica (I), desarrollo de ensayos clínicos (II), asesoramiento de valor pre-

dictivo aplicado a una serie de casos - controles o a una cohorte retrospectiva (III) y, finalmente, la validación en un entorno prospectivo (IV)⁵⁹⁻⁶³.

La utilidad clínica de estos marcadores es limitada debido a la variedad de resultados, sobre todo por limitaciones en el diseño de los estudios. En muchos de ellos, la cohorte examinada era demasiado pequeña y la prevalencia de gestación ectópica en la población de estudio no era constante. En otros, los pacientes no fueron correctamente emparejados por edad gestacional, lo que refleja la dificultad de calcular ésta en los embarazos ectópicos. Algunos de los marcadores incluso limitaron su propio uso, al no seguir un patrón identificable durante la gestación normal (incrementando o disminuyendo).

A continuación repasaremos los marcadores más prometedores que se han publicado en la literatura basándonos en su papel en la patofisiología de la gestación anómala y su estado actual en el desarrollo como marcadores biológicos.

/ 1.4.1.

Marcadores de la función trofoblástica

1. *Gonadotropina coriónica humana:*

La gonadotropina coriónica humana, o hCG, es el marcador biológico más ampliamente estudiado en relación a la gestación temprana y se trata del único marcador utilizado de rutina en la práctica clínica. Su determinación única no tiene valor diagnóstico, pero su determinación seriada en suero permite identificar a aquellas pacientes que requieren un seguimiento más estrecho por un posible fallo precoz del embarazo. El aumento esperado de los niveles de este marcador en sangre en un embarazo intrauterino viable es de al menos un 53% cada 48 hr⁶⁴, a pesar que recientes estudios sugieren que para identificar correctamente una gestación de estas características sea recomendable un umbral más conservador, con un aumento al menos del 35% en 48 hr⁶⁵. Se han propuesto modelos incorporando cocientes de β hCG (β hCG a las 48 hr / β hCG a las 0 hr), sugiriendo que un cociente <0.21 po-

dría predecir la gestación ectópica con un 91.7% de sensibilidad y un 84.2% de especificidad en una cohorte de pacientes con gestaciones de localización desconocida ⁶⁶. Un intento de extrapolar estos resultados a la población general no resultó en una validación del mismo, con una menor sensibilidad para el diagnóstico de la gestación ectópica ^{67,68}. Por tanto, a pesar de no ser un marcador sensible en la detección de la gestación ectópica en sí, el uso de la β hCG ha alcanzado una fase IV en el desarrollo como marcador seriado para el triaje diagnóstico de la gestación de localización incierta.

2. hCG hiperglicosilada:

Por lo menos existen 5 variantes en suero de la gonadotropina coriónica humana: la hiperglicosilada, la nicked, la variante con la porción amino faltante, la libre o free B y combinaciones de estas. La importancia de discriminar entre estas variantes radica en que cada una de ellas predomina en diferentes neoplasias. La hCG hiperglicosilada es la forma predominante de hCG durante las primeras 3 semanas del embarazo siendo luego reemplazada por hCG regular. Esto significa que la hCG hiperglicosilada es producida por el citotrofoblasto extraveloso, tejido invasor al inicio del embarazo, desde el momento de la implantación ⁶⁹. Es por ello que predomina en aquellas neoplasias que remedan esa estructura tisular, como la mola invasora y el coriocarcinoma. La hCG hiperglicosilada, medida de forma aislada y como parte del cociente hCG-H/hCG, se ha propuesto como un marcador en la detección del fallo gestacional temprano. Un estudio identificó un umbral de corte de 13 ug/L, por debajo del cual el embarazo sería no viable, con una tasa de detección del 73% y una tasa de falsos positivos del 2.9%, lo que se corresponde con una sensibilidad del 73% y una especificidad del 98.1% ⁷⁰. Sin embargo, este estudio no demostró que el empleo de este marcador fuera capaz de discriminar entre gestaciones ectópicas y gestaciones intrauterinas anormales. Otro estudio del mismo grupo propuso emplear un cociente de hCG-H/hCG >50% para diferenciar gestaciones viables de gestaciones no viables ⁷¹. Mientras que estos valores umbral fueron capaces de detectar a todas las pacientes con gestaciones no viables, niveles por debajo del 50% no discriminaron en 35% de los casos. Como marcador aislado, la hCG-H no muestra la suficiente precisión en el diagnóstico, pero quizás con la validación de otros puntos de corte, este marcador podría moverse hacia la fase III del desarrollo de marcadores.

3. Activina A:

La activina A es una glicoproteína dimérica incluida en la superfamilia de TGF-beta, y un producto placentario que promueve la invasión del citotrofoblasto ⁷²; por tanto, anomalías en la activina A podrían ser un indicador de una implantación anormal y de la no viabilidad de la gestación. Un estudio realizado en pacientes diagnosticadas de gestación de localización incierta encontró que niveles de activina A menores o igual a 0.37 ng/mL mostraban un 100% de sensibilidad y un 99.6% de especificidad en el diagnóstico de gestación ectópica ⁷³. En otro estudio, la activina A mostró una sensibilidad del 80% y una especificidad del 72% como marcador único para discriminar en una cohorte de pacientes con gestación ectópica y gestación intrauterina evolutiva ⁷⁴. Sin embargo, estos dos grupos no encontraron diferencias en los niveles de activina A al incluir en el análisis pacientes con gestaciones intrauterinas anormales ^{75,76}. Por tanto, aunque los estudios iniciales eran prometedores respecto a la activina A como marcador sérico único en el diagnóstico de gestaciones ectópicas, los estudios con casos-contrroles consiguientes han fallado a la hora de reproducir dichos resultados y la activina A permanece en fase III de desarrollo.

4. Proteína A plasmática asociada al embarazo:

La proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) también es producida por el trofoblasto y ha sido ampliamente estudiada como marcador de fallo gestacional precoz y aneuploidías ⁷⁷, de hecho a día de hoy forma parte del cribado del primer trimestre gestacional en la práctica clínica habitual. Un serie de casos de gestaciones precoces intrauterinas, ectópicas y la determinación en mujeres no gestantes de PAPP-A y hCG sugirió que los niveles de PAPP-A eran inferiores en gestaciones ectópicas comparadas con gestaciones intraútero viables ⁷⁸. Desde entonces, la PAPP-A ha sido evaluada con otros muchos marcadores candidatos para la detección de gestaciones anormales. La PAPP-A se ha propuesto, junto con VEGF y la progesterona, dentro de un test múltiple ⁷⁹. Sin embargo, otros estudios han mostrado que la PAPP-A presenta una precisión del 67% como marcador único, pero que presenta una utilidad limitada en tests múltiples ⁷⁴. Ninguno de estos estudios incluía gestaciones intrauterinas anormales. Un estudio que incluía pacientes con gestaciones intrauterinas

anormales mostró que niveles de PAPP-A <14.3 ng/mL tenían un 64.5% de sensibilidad y un 99% de especificidad en la detección de fallos gestacionales precoces, pero no encontraron diferencias en los niveles entre gestaciones ectópicas y gestaciones intrauterinas anormales⁸⁰. Dos grupos más han mostrado resultados que confirman que la PAPP-A podría identificar gestaciones anormales^{81,82}. Por tanto, los datos que se extraen del desarrollo de este marcador en fase III sugieren que podría tener un papel como marcador de viabilidad pero no de localización extrauterina.

5. Glicoproteína beta 1 específica del embarazo:

La glicoproteína beta 1 específica del embarazo (SP-1) es una de las primeras proteínas que se identificaron en los cultivos de trofoblasto y a través de las técnicas de inmunohistoquímica para el descubrimiento de biomarcadores⁸³, y su papel potencial como marcador en el diagnóstico de la gestación ectópica fue posteriormente respaldado por el descubrimiento de la proteómica. Se cree que esta proteína está implicada en procesos de inmunomodulación, y bajos niveles se relacionarían con la gestación ectópica⁸⁴. La SP-1 fue incapaz de discriminar entre gestaciones ectópicas e intrauterinas en el estudio de Rausch⁷⁴, mientras que otros estudios muestran una modesta capacidad discriminatoria con un 65% de sensibilidad y 74% de especificidad al tomar como punto de corte valores de 103.3 ug/mL^{74,85}. Son necesarios más estudios en fase III para establecer su capacidad de diagnóstico de la gestación ectópica.

6. Lactógeno placentario humano:

El lactógeno placentario humano (hPL), también conocido como somatotropina humana, también es producido por el trofoblasto y se ha estudiado como posible marcador de la gestación anormal. Sin embargo, dos estudios independientes no han encontrado diferencias en los niveles de este marcador al comparar gestaciones ectópicas frente a gestaciones intrauterinas anormales o gestaciones intrauterinas viables, respectivamente^{74,82}. Los niveles de hPL fueron menores en gestaciones ectópicas pero mostraron una fuerte correlación con los niveles de hCG, sugiriendo una utilidad limitada de esta molécula como marcador independiente de gestación ectópica⁷⁹.

7. Desintegrina A y metaloproteinasa 12:

La desintegrina A y la metaloproteinasa 12 (ADAM-12) pertenecen a un grupo de glicoproteínas halladas en el veneno de serpiente, que funcionan como inhibidores de la agregación plaquetaria y la adhesión celular dependiente de integrinas^{86,87}. Estas sustancias, además, además son producidas en el sincitiotrofoblasto placentario, jugando un papel en la fusión del sincitio⁸⁸. En un estudio casos - controles con gestaciones ectópicas y gestaciones intrauterinas viables, se mostró que niveles ≤ 48.49 ml/mL se asociaban a un 97% de sensibilidad y un 37% de especificidad para el diagnóstico de gestación ectópica, sugiriendo una prometedora utilidad como marcador de localización extrauterina. No obstante, ADAM-12 se ha estudiado también como marcador de aneuploidías y, por tanto, debe considerarse su papel entre una cohorte que incluya gestaciones intrauterinas anormales^{89,90}. Otros grupos han intentado validar ADAM-12, encontrando que no es un marcador capaz de discriminar gestación ectópica de otras situaciones clínicas cuando se incluyen gestaciones de localización incierta persistentes y tratadas, o en resolución espontánea, o probables ectópicos (AUC 0.65, $p > 0.05$), sin embargo al restringir el análisis a gestaciones de localización incierta con resultados bien definidos, parece mostrar una discreta mejoría en su potencial diagnóstico (AUC 0.66, $p < 0.05$)⁹¹. Son necesarios más estudios para progresar a una fase IV del desarrollo de marcadores, ya sea como marcador único o en combinación con otros.

8. Ácidos nucleicos:

Los micro-RNAs placentarios son RNAs de cadena única con 19-25 nucleótidos no codificantes que regulan la expresión génica, y al menos existen 31 mRNAs descritos en la literatura asociados con la gestación^{92,93}. Los mRNAs placentarios presentan patrones diversos de secreción por el trofoblasto extraveloso en gestaciones anormales, y por tanto se han considerado como marcadores por su potencial diagnóstico.

Un estudio casos - controles relativamente reciente que incluye a 12 mujeres con gestación ectópica y a 13 mujeres con gestaciones intrauterinas viables mostró que las pacientes con gestación ectópica presentaban niveles significativamente menores de hVG y hPL de sus copias de mRNAs circulantes en plasma respecto a las gestaciones intrauterinas viables⁹⁴.

Varios estudios sugieren que los niveles de mRNAs placentarios son menores en gestaciones con aneuploidías, por tanto hay que tener en cuenta este dato y las gestaciones que, aunque intraútero, desembocan en aborto^{95,96}. Por tanto, los mRNAs placentarios podrían estar listos para un nivel III de desarrollo de biomarcadores, sobretodo como marcadores de viabilidad.

Un estudio que recogía mujeres con gestación de localización incierta sintomática mostró que el mRNA miR-323-3p placentario en suero estaba aumentado significativamente en aquellas pacientes en las que finalmente se diagnosticó una gestación ectópica en comparación con gestaciones intrauterina, ya fueran viables o anormales; como marcador único mostró una sensibilidad del 30% y una especificidad del 90% para la detección de gestaciones ectópicas⁹⁷. A pesar que las características a nivel diagnóstico de este marcador a solas no son aceptables para su uso en la clínica, en combinación con otros marcadores podría servir como marcador de gestación ectópica. Se necesitan más estudios para reproducir estos resultados y hacer progresar este marcador de la fase III a la fase IV de su desarrollo.

Nuestro grupo de trabajo publicó en 2014 un perfil de miRNA comparando tejido de gestaciones ectópicas con tejido embrionario de interrupciones voluntarias del embarazo (IVE). Se recogieron muestras de 23 y 29 pacientes respectivamente. Los resultados mostraron diferente expresión en 7 de los miRNAs estudiados (hsa-mir-196b, hsa-mir-30a, hsa-mir-873, and hsa-mir-337-3p, hsa-mir-1288, hsa-mir-451, and hsa-mir-223), algunos de ellos implicados en importantes vías de implantación embrionaria, como son la biosíntesis de O-glicanos y la interacción con el receptor de la matriz extracelular⁹⁸, hallazgos que abren nuevos caminos para una mejor comprensión de la fisiopatología del embarazo ectópico. Previamente ya habíamos publicado cambios en los perfiles de expresión del gen que codifica la proteína de unión del ARN, LIN28B, y sus microRNAs asociados Let-7a, mir-132 y mir-145, en estadios precoces del proceso de implantación humana; esta vez en una serie de 19 gestaciones ectópicas en comparación con 43 IVEs⁹⁹.

En esta línea de trabajo, publicamos recientemente parte de los hallazgos de este proyecto de tesis doctoral, mostrando evidencia de una novedosa vía reguladora de la implantación en gestación inicial, miR-324-3p/KISS1, cuya alteración podría tener implicaciones patofisiológicas en el desarrollo de la gestación ectópica¹⁰⁰.

/ 1.4.2.

Marcadores de la función del cuerpo lúteo

1. Progesterona:

La progesterona ha sido ampliamente estudiada como marcador precoz de aborto y de gestación evolutiva, sola o en combinación con otras sustancias^{74,75,106,107,79,82,85,101-105}. Un metanálisis de 26 estudios estableció que la determinación de progesterona (P<5 ng/mL) presentaba una buena correlación con gestaciones viables, pero no diferenciaba gestaciones evolutivas intraútero de ectópicas¹⁰⁸. Por tanto, su utilidad óptima como marcador de gestación ectópica será, probablemente, en combinación con otros marcadores.

2. Inhibina A:

La inhibina A es un péptido heterodimérico que es secretado de forma predominante por el cuerpo lúteo¹⁰⁹. Un pequeño estudio de casos - controles sugirió que los niveles séricos de inhibina A estarían disminuidos en las pacientes con gestación ectópica, sin especificar las características de las pruebas realizadas¹¹⁰. Otro grupo caracterizó niveles de inhibina A en una población que incluía gestaciones ectópicas, gestaciones intrauterinas viables y varios estadios de gestaciones uterinas no viables, estableciendo 50 pg/mL como punto de corte para discriminar con un 100% de sensibilidad y especificidad gestaciones intrauterinas de ectópicas¹¹¹. Sin embargo, estos datos de S y E no se mantuvieron al comparar las gestaciones ectópicas con gestaciones no viables (S 41%, E 86%)¹¹¹. La inhibina A ha sido evaluada a lo largo de un periodo de 48 horas con una precisión al diagnóstico de gestación ectópica de un 60%⁷⁶. Otro grupo estudió la inhibina A junto con otros marcadores, llegando a la misma conclusión: niveles más bajos en gestaciones ectópicas, pero sin ser capaz de discriminar estas de gestaciones no viables. Por otro lado, Rausch et al publicaron una sensibilidad del 83% y una especificidad del 79% para predecir gestación ectópica con un punto de corte de 28.67 pg/mL, mostrando la mayor precisión como marcador estudiado en solitario¹¹². Con estos resultados, la inhibina A parece un marcador prometedor, actualmente en estudios fase III, pero los resultados contradictorios en los estudios publicados sugieren que debe ser mejor estudiado antes de su uso clínico.

/ 1.4.3.

Marcadores de angiogénesis

1. Factor de crecimiento endotelial vascular:

VEGF, según sus siglas inglesas, es un importante contribuyente al desarrollo vascular de la unión feto-placentaria, y se puede ver influenciado por la hipoxia y el medio inflamatorio embrionario¹¹³. Apareció por primera vez publicado como marcador de gestación ectópica en un estudio de casos - controles que incluyó gestaciones ectópicas, gestaciones intrauterinas viables y gestaciones intrauterinas no viables, sugiriendo que niveles ≥ 200 pg/mL tendrían un 60% de sensibilidad y un 90% de especificidad para predecir gestaciones ectópicas¹¹³, resultados corroborados posteriormente¹¹⁴. También se ha evaluado como parte de un panel de marcadores, mostrando que niveles ≥ 174.5 pg/mL tendrían un 78% de sensibilidad y un 100% de especificidad para gestaciones ectópicas⁸². Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias, a pesar de un tercer estudio que muestra valores de VEGF ≥ 28.24 pg/mL con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 50% como marcador único^{74,81}.

2. Factor de crecimiento placentario:

El PlGF (según sus siglas inglesas) es un factor de crecimiento proangiogénico, producido fundamentalmente por las células del trofoblasto, y que ha sido identificado en el sitio de implantación¹¹⁵. Una pequeña serie de casos mostró que el mRNA de PlGF es menor en trofoblastos de gestaciones ectópicas comparado con el de gestaciones intrauterinas⁵⁰. Un test de cribado basado en niveles de PlGF y sflt-1 sugirió que niveles de PlGF > 15.73 pl/mL podría diferenciar gestaciones viables de no viables, con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 67%, pero no fue capaz de discriminar entre gestaciones intrauterinas no viables y gestaciones ectópicas con la suficiente precisión¹¹⁶.

/ 1.4.4.

Marcadores de la función endometrial

1. Factor inhibidor leucémico:

El LIF es una citoquina de la familia de la interleuquina 6 que juega un papel en la inflamación y la implantación. Estudios de mRNA de LIF muestran que los niveles de expresión y secreción varían en las gestaciones ectópicas tubáricas¹¹⁷. En un estudio de 40 pacientes con diagnóstico de gestación ectópica, gestación intrauterina, aborto espontáneo y amenaza de aborto, niveles de LIF < 6.2 pg/mL mostraron un 73% de sensibilidad y un 89% de especificidad para gestación ectópica¹¹⁸. Sin embargo, intentos posteriores para validar este marcador han mostrado resultados contradictorios: 2 grupos no han mostrado variaciones de los niveles de LIF en función del sitio de implantación, sin embargo otro grupo mostró mayores niveles de LIF en pacientes con gestaciones ectópicas^{82,119,120}. Además, los niveles séricos de LIF fueron indetectables⁷⁹.

2. Glicodelina:

La glicodelina es una proteína que se encuentra en el endometrio y en la trompa de Falopio y que se asocia a la inmunomodulación durante la implantación¹²¹. En un estudio en 169 mujeres gestantes en primer trimestre, los niveles de glicodelina fueron significativamente más bajos en pacientes con gestación ectópica en comparación con abortos incompletos y gestaciones viables intrauterinas¹²². Tres grupos han estudiado el comportamiento de la glicodelina, junto con otros marcadores: dos de ellos han encontrado que los niveles de glicodelina fueron significativamente menores en pacientes con gestación ectópica, pero con menor precisión que los otros marcadores, mientras que uno de ellos no encontró diferencias en los niveles de gestaciones ectópicas versus gestaciones viables intraútero^{74,79,82}. Ninguno de estos estudios comparó gestaciones ectópicas con ambos, gestaciones intrauterinas viables y no viables.

3. Mucina-1:

La mucina-1 es una glicoproteína de la superficie apical que se expresa en el endometrio humano y en el epitelio de las trompas de Falopio, y se relaciona con las interacciones entre blastocisto y endometrio durante la implantación ¹²³. La expresión de mucina-1 en el tejido tubárico se encuentra reducida en gestaciones ectópicas en comparación con la gestación intraútero, sugiriendo un aumento en la receptividad tubárica para la implantación extrauterina, aunque su uso como marcador sérico no ha sido explorado (fase 1-2) ^{49,124,125}.

4. Adrenomedulina:

La adrenomedulina es una hormona peptídica que promueve la angiogénesis endometrial, dentro de la familia de las amilinas. Los estudios de expresión de adrenomedulina en tejido tubárico sugieren que los niveles plasmáticos de esta sustancia son menores en mujeres con gestación ectópica ¹²⁶, actualmente se trata de estudios en fase 1.

/ 1.4.5.

Marcadores de inflamación y daño muscular

Dentro de este apartado, se han propuesto múltiples marcadores incluyendo IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, Ca125 y TNF α . Un estudio en 72 mujeres sugirió que las concentraciones de IL-6, IL-8 y TNF α eran significativamente mayores en mujeres con gestación ectópica comparadas con gestaciones intrauterinas, tanto viables como no, mostrando un valor de IL-8 >40 pg/mL con sensibilidad del 82.4% y especificidad del 81.8% para detectar embarazo ectópico ¹²⁷. En otro estudio, los niveles de IL-6 no mostraron diferencias entre gestaciones ectópicas e intrauterinas, sin embargo los niveles de IL-8 y TNF α fueron significativamente más bajos en gestaciones ectópicas respecto a gestaciones intraútero, aunque su precisión para detectar embarazo ectópico fue menor del 60% ⁷⁴. IL-10 y IL-11 no mostraron diferencias significativas en una cohorte de mujeres con gestación ectópica y gestación intrauterina viable ¹¹⁹.

Los estudios del Ca 125 presentan datos conflictivos, algunos sugieren valores incrementados en gestación ectópica ¹²⁸, mientras que otros sugieren valores disminuidos ^{85,129}, y algunos no muestran diferencias, tanto de forma retrospectiva como prospectiva ¹³⁰⁻¹³². Por tanto, aunque los marcadores inflamatorios parecían prometedores en la teoría, la variabilidad inherente a la respuesta inflamatoria limita la precisión y la consistencia que se precisa para la práctica clínica.

Los marcadores del daño muscular estudiados en estas pacientes incluyen la creatinquinasa, la miosina del músculo liso y la mioglobina. Aunque algunos estudios sugirieron valores elevados de creatinquinasa en estas pacientes ¹³³⁻¹³⁵, estudios posteriores no lo han confirmado ¹³⁶⁻¹³⁹. La combinación de mioglobina y miosina no han dado buenos resultados en el estudio de la gestación ectópica frente a gestaciones viables ¹³³. Probablemente, los marcadores mencionados del daño muscular podrían indicar más una rotura tubárica inminente, por tanto teniendo poco valor en la detección de gestaciones de localización desconocida ya establecidas.

/ 1.4.6.

Marcadores de alteración del transporte tubárico

Los antecedentes de patología tubárica son factores de riesgo conocidos para la gestación ectópica, pero los mecanismos exactos de esta predisposición no son totalmente entendidos a nivel molecular. Alteraciones en la señalización paracrina, la anormalidad en la contractilidad muscular de la pared tubárica, la atenuación de señales inflamatorias y la angiogénesis patológica son factores que se relacionan con el embarazo ectópico ¹⁴⁰, sin existir muchas publicaciones sobre posibles marcadores asociados al transporte tubárico.

Dos estudios de la expresión proteica en mujeres con gestación ectópica proponen que los niveles elevados de anandamida y la disminución de la expresión de su receptor (CB1) se asocian a gestación ectópica ^{141,142}.

No obstante, ninguno de estos se encuentra en fase III y son precisos más estudios para comprender la patofisiología del embarazo ectópico para encontrar posibles candidatos.

Más adelante se muestra una tabla resumen con los principales marcadores estudiados en la detección del embarazo ectópico.

/ 1.4.7.

Paneles de múltiples marcadores

Dada la complejidad del proceso implicado en el establecimiento y el mantenimiento de la gestación inicial viable, no es sorprendente que ningún marcador a nivel individual haya sido capaz de detectar los casos de implantación extrauterina con la suficiente consistencia y precisión. Por tanto, los modelos de predicción se han extendido hasta incorporar diversas vías a través de paneles con múltiples marcadores ^{75,79,80,97,143}.

A pesar de que el concepto de evaluar varios marcadores simultáneamente no es novedoso, los estudios estadísticos que permiten modelos complejos de regresión han facilitado a los investigadores el estudio de las interacciones, o sinergias, que se establecen entre estos. Siguiendo esta metodología, un estudio de casos control con 200 pacientes con gestaciones ectópicas e intrauterinas viables mostró que un test combinado con cuatro marcadores (progesterona, VEGF, Inhibin A y Activina A) podría detectar las gestaciones ectópicas en un 100% de los casos, con niveles de βhCG <1500 mUI/mL ⁷⁴. A pesar de los buenos resultados, deben realizarse más estudios incorporando pacientes con gestaciones no viables intrauterinas para validar estos resultados.

A continuación, se muestra una tabla resumen con los distintos estudios publicados combinando diversos marcadores precoces de gestación ectópica.

Tabla 2

Predicción de gestación ectópica con marcadores individuales ⁵⁸ .					
Marcador	Estudio	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Fase de desarrollo / comentarios
Función trofoblástica					
hCG Incremento hCG en 48 hr.	Barnhart 2004	<53% incremento	91.1%	66.6%	III: especificidad insuficiente para gestaciones de localización extrauterina.
	Morse 2012				
Modelo M1	Condous 2004	ND	91.7%	84.2%	IV (para gestaciones fallidas de localización desconocida), no es precisa en el diagnóstico de gestación ectópica.
Modelo M4	Condous 2007	ND	80.8%	88.9%	III: no validado en población de E.E.U.U.
	Barnhart 2011		49%	87.4%	

Activina A	Florio 2007	0.37 ng/ml	100%	99.6%	III: resultados dispares como marcador de localización, se necesitan estudios adicionales.
	Kirk 2009	0.37 ng/ml	93%	13%	
	Rausch 2011	0.38 ng/ml	80%	72%	
	Warrick 2012	0.26 ng/ml	59.6%	69%	
	Rausch 2011	0.53 ng/ml	81%	54%	
PAPP-P	Rausch 2011	0.53 ng/ml	81%	54%	III: marcador de viabilidad prometedor, no de localización.
	Dumps 2002 Mueller 2004, Daponte 2005, Ugurlu 2009	Muestran PAPP-A como marcador de viabilidad, características como marcador único de EE ND			
SP1	Rausch 2011	103.3 ug/ml	65%	79%	III: Posible marcador de localización, necesita estudios adicionales.
ADAM-12	Rausch 2011	48.49 ng/ml	97%	37%	III: precisa estudios adicionales incluyendo gestaciones intrauterinas anormales.
	Horne 2012	AUC 0.65-0.66	ND	ND	
ARNm placentario	Takacs 2012	ND	ND	ND	III: necesita de evaluación en gestaciones intrauterinas anormales.
miRNA-323-3p	Zhao 2012	0.2 (concentraciones relativas a 18s ARNr)	37%	90%	III: prometedor marcador de localización, pero con escasa sensibilidad solo, necesita validación

Función del cuerpo lúteo

Progesterona	Mol 1998	20 ng/ml	95%	<40%	IV: buenos resultados discriminando viabilidad, pero no localización, considerar en combinación con otros marcadores.
	Buckley 2000	22 ng/ml	100%	27%	
	Dart 2000	5 ng/ml	88%	40%	
	Katsikis 2006	10.75 ng/ml	85%	85%	
	El Bishry 2008	16 ng/ml	44%	60%	
	Rausch 2011	13.5 ng/ml	82%	70%	
	Warrick 2012	10 ng/ml	63%	61%	
	Zhao 2012	23 ng/ml	90%	44%	
Inhibina A	Segal 2008	50 pg/ml EE vs EIU	100%	100%	III: prometedor para viabilidad, datos controvertidos respecto localización, necesita estudios adicionales.
		50 pg/ml EE vs A	41%	86%	
	Kirk 2009	AUC 0.55	ND	ND	
	Rausch 2011	28.67 pg/ml	95%	50%	

Angiogénesis					
VEGF	Daniel 1999	200 pg/ml	60%	90%	III: marcador prometedor para localización y viabilidad, necesita ser validado en una cohorte con todos los resultados de gestación precoz clínicamente relevantes.
	Felemban 2002	200 pg/ml EIUv vs EE	88%	100%	
		200 pg/ml EIUa vs EE	87.5%	75%	
	Daponte 2005	174.5 pg/ml	78%	100%	
	Rausch 2011	28.24 pg/ml	95%	50%	
PIGF	Daponte 2011	15.7 pg/ml EIUv vs EE	86%	73%	III: posible marcador de viabilidad, se necesitan más datos como predictor de EE.
		19.9 pg/ml A vs EE	30%	90%	
Función endometrial					
Glicodelina	Rausch 2011	AUC 0.57	ND	ND	III: posible marcador de localización, necesita ser validado en una cohorte con todos los resultados de gestación precoz clínicamente relevantes.
	Mueller 2004, Daponte 2005	ND	ND	ND	
LIF	Wegner 2001	6.2 ng/ml	73%	89%	III: resultados controvertidos en otros estudios sugieren que no es un marcador apropiado de EE.
	Mueller 2004, Daponte 2005	No diferencias significativas en EE comparado con otros resultados de gestación temprana			
MUC1 Adrenomedulina	No hay características clínicas publicadas				

Tabla 3

Predicción de gestación ectópica en paneles de marcadores múltiples ⁵⁸ .				
Marcadores	Estudio	Sensibilidad	Especificidad	Conclusión / Fase de desarrollo
Estradiol, progesterona, Ca-125	Witt 1990	ND	ND	III: Necesita ser reproducible para evaluar las características del test y valoración prospectiva.
VEGF, PAPP-A, progesterona	Mueller 2004	97.7%	92.4%	III: Necesita de ser validado con gestaciones intrauterinas anormales.
Progesterona, activina A, inhibina A, VEGF	Rausch 2011	90-98%	100%	III: Test diagnóstico en el 42% de las pacientes, necesita ser validado con gestaciones intrauterinas anormales.
Activina A, progesterona, hCG	Warrick 2012	70%	69%	III: No mostró beneficio sobre hCG sola.
hCG, progesterona, miR-323-3p	Zhao 2012	96.3%	72.6%	III: Necesita validación en otras cohortes y evaluación prospectiva.

1.5. Sistema KISS1 - GPR54 - Kisspeptinas

Cómo ya hemos comentado previamente, la implantación es el proceso por el que el embrión se orienta, adhiere y, finalmente, invade el endometrio materno, siendo un proceso clave para el éxito de la reproducción y desarrollo embrionario. Se requiere una estrecha regulación del proceso para prevenir una invasión patológica o excesiva.

Existen grandes similitudes entre el proceso de invasión del citotrofoblasto (implantación) y la invasión de las células cancerígenas. Sin embargo, el proceso de implantación está regulado por una serie de procesos no del todo conocidos, que evitan una invasión celular descontrolada.

Dentro de este proceso de control y regulación implantatorio, se ha propuesto un papel para las kisspeptinas, proteínas codificadas por el gen KISS1 en humanos ^{144,145}.

/ 1.5.1. Historia

En 1996, el laboratorio del doctor Daniel Welch en Hershey, Pensilvania, aisló un cDNA de una célula cancerosa incapaz de generar metástasis una vez el cromosoma humano 6 fue añadido a la misma. Este gen se llamó KISS1 debido a dónde fue descubierto, hogar de la fábrica de chocolates Hershey y de su famoso Hershey's Kiss.

El hecho de que KISS1 era responsable de esta supresión de la capacidad de diseminación fue de nuevo comprobado al ser transferido a células de melanoma, en las cuales se inhibió también su capacidad de metastatizar.

Tres años más tarde, en 1999, un receptor ligado a proteína G fue descubierto en la rata, clonado y llamado GPR54. 2 años más tarde, el mismo receptor se aisló en humanos. Una vez identificados los receptores, diferentes ligandos endógenos fueron aislados a partir de distintas líneas celulares in vitro (HEK293, B16-BL6 y células CHO-K1) que expresaban estos receptores. El ligando natural de este receptor resultó ser la kisspeptina, una proteína codificada por el gen KISS1.

Los siguientes pasos consistieron en hallar los diferentes mecanismos con los que se relaciona la kisspeptina.

Esta proteína está implicada, entre otros, en los procesos del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal, cómo han demostrado varios grupos de trabajo desde 2003, asociándose mutaciones en su receptor a problemas de desarrollo gonadal durante la pubertad, menores niveles circulantes en sangre de esteroides sexuales y gonadotropinas e incluso esterilidad.

A continuación, se muestra una tabla resumen con los distintos estudios publicados combinando diversos marcadores precoces de gestación ectópica.

/ 1.5.2.

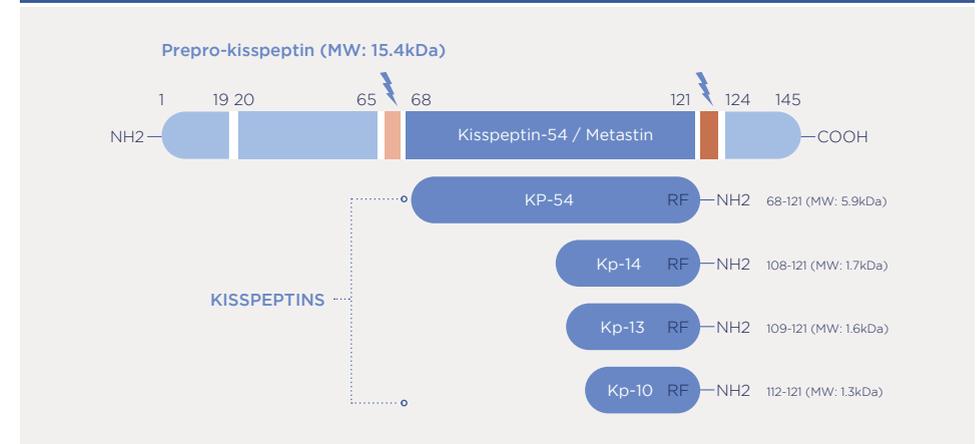
Genómica y estructura

El gen KISS1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32) y presenta cuatro exones. Su traducción genera inicialmente un péptido de 145 aminoácidos que posteriormente deriva en una proteína de 54 aminoácidos, conocida formalmente como kisspeptina o metastina, que es el ligando natural del receptor GPR54.

Existen más miembros en esta familia de neuropéptidos denominados kisspéptidos o kisspeptinas. Mediante acción proteolítica genera péptidos de menor tamaño como son kp10, kp13 o kp14^{146,147}. Estas proteínas pertenecen a su vez a la familia de la RFamidas, que conservan una estructura idéntica de arginina-fenilalanina-NH2 en su extremo C terminal.

/ Figura 4

Estructura de las kisspeptinas en humanos, péptidos codificados por el gen KISS1.



Extraído de Hu et al, 2019¹⁴⁴.

Los kisspéptidos actúan como ligando a través de un receptor acoplado a proteína G llamado GPR54, que fue aislada inicialmente en la rata y que presenta un 45% de similitud con los receptores de la galanina¹⁴⁸. Este receptor también ha sido llamado AXOR12 o hOT7T175¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. La estructura de este receptor está conservada en muchos vertebrados, presentando 398 aminoácidos en 7 dominios transmembrana, siendo las secuencias presentes en las regiones uno, cuatro y siete altamente conservadas transespecies.

/ 1.5.3.

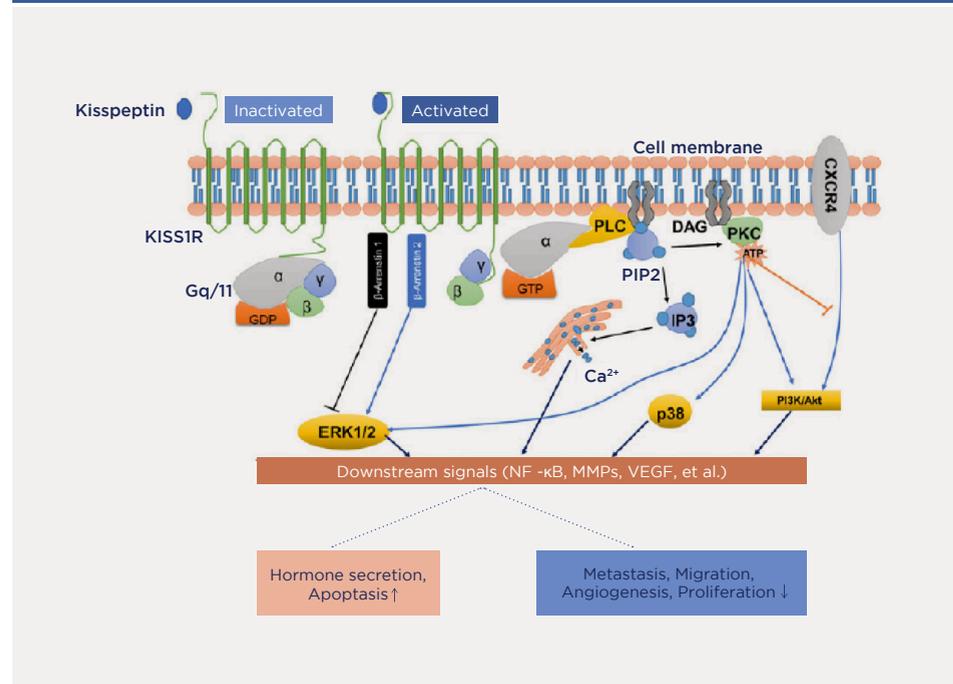
Vías de acción y papel biológico

La expresión del sistema KISS1-GPR54 ha sido demostrada en gran variedad de tejidos entre los que se encuentra la placenta (sincitiotrofoblasto), el hipotálamo, los ganglios basales, la medula espinal, el páncreas y el plasma^{147,148,150,151}.

Las funciones descritas de los kisspéptidos son variadas. Por ejemplo, el kp10 se ha visto relacionado con un aumento del calcio intracelular, con la hidrólisis del fosfoinositol, con la liberación de ácido araquidónico y con la regulación de algunas citocinas. Estos efectos han sido encontrados en células que sobreexpresan el KISS1-R¹⁴⁹.

Figura 5

Vías de señalización KISS1/kisspeptinas y sus funciones potenciales.



Extraído de Hu et al, 2019¹⁴⁴.

1.5.3.1. Papel en la pubertad

Parece ser que mutaciones a nivel del gen que codifica este receptor se han visto asociadas con síndromes que cursan con hipogonadismo hipogonadotropo^{152,153}.

Dentro de su papel en el proceso de regulación neuroendocrina, se ha propuesto que el KISS actúa sobre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a nivel hipotalámico, y secundariamente influye en la producción de hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

Respecto a la FSH, la inyección intracerebral en ratas prepuberales aumenta la producción FSH a nivel hipofisario con un máximo a los 15 minutos y hasta los 60 minutos, en cambio en ratas adultas existe un retraso en la liberación máxima con respecto a los prepúberes¹⁵⁴.

La administración periférica (intraperitoneal -ip- o intravenosa -iv-) de KISS-1 produce exactamente los mismos efectos que la intracerebral, lo que supone que la regulación de la GnRH se produce a través de la eminencia media y el núcleo arcuato¹⁵⁴.

La dosis necesaria de KISS-1 para el estímulo de la FSH es muy superior a la necesaria para el estímulo de la LH, 400 pmol frente a 4 pmol, lo que hace hipotetizar que niveles bajos de KISS-1 generan pulsos rápidos en la GnRH liberadores de LH y dosis mayores generan pulsos lentos liberadores de FSH^{151,154}.

La regulación de la GnRH es totalmente independiente de otros neuropéptidos como son ON y glutamato, así como la leptina, que es un activador del eje gonadotrópico, los cuales no presentan interacción con el KISS-1, siendo éste suficiente para la activación de GnRH.

In vitro la respuesta del tejido hipofisario no es tan elevada, por lo que el efecto directo del KISS-1 sobre la FSH no es tan importante.

En cuanto a la LH, actúa de forma similar que con la FSH, aunque es mucho más sensible ya que aumenta con menor dosis de KISS-1. El KISS actúa a través de la GnRH estimulando la liberación a nivel hipofisario. La respuesta tras estímulo periférico es menor en este caso, aunque importante, participando igualmente el núcleo arcuato y la eminencia media. Los efectos centrales y periféricos inducidos por los kisspeptidos sobre la LH y la FSH parecen ser bloqueados por antagonistas de la GnRH¹⁵⁵.

Se ha sugerido que la administración central crónica de kisspeptidos puede inducir una pubertad precoz en ratones hembra^{151,154}.

En los últimos años, la caracterización de la faceta reproductiva del sistema kisspeptina/GPR54 ha permitido la definición de su papel fundamental en la regulación de la secreción de gonadotropinas. Las kisspeptinas se han postulado como el activador más importante del eje GnRH-LH. Además, el sistema KISS1 hipotalámico parece poseer funciones fisiológicas esenciales, ya que actúa como conducto central para sustancias periféricas claves en el eje gonadotropo, como los esteroides gonadales, los cuales regulan la expresión hipotalámica del gen KISS1 de forma núcleo-específica, en concordancia con su papel en las vías de retroalimentación positiva y negativa^{154,156}. Éste

también parece ser el caso de hormonas metabólicas, cómo la leptina, cuya modulación de la función de GnRH parece ser se realiza a través de neuronas intermediarias KISS1 ¹⁵⁶.

La idea original de que las kisspeptinas y el GPR54 jugaban un papel fundamental en la maduración puberal ha sido ampliamente confirmada por una combinación de análisis de expresión y de pruebas funcionales que han aportado evidencia suficiente del incremento de expresión de KISS1 y de señales relacionadas con el GPR54 a lo largo de la pubertad en distintas especies de roedores y primates ^{154,157,158}. Además, estos estudios han mostrado la capacidad de las kisspeptinas para activar precozmente el eje gonadotropo en ratas y monos inmaduros ^{154,159} y para reactivar el proceso de maduración puberal en situaciones de balance energético negativo ¹⁶⁰. Sin embargo, aunque su papel como activador de la secreción de GnRh en la pubertad está claro, persiste la duda de si las kisspeptinas son el gatillo primario para el inicio de la pubertad o si operan, junto con otras señales, cómo efectores finales de otros factores reguladores.

1.5.3.2. Papel en la supresión tumoral

El gen KISS-1 fue inicialmente descubierto como un gen supresor de metástasis, implicado en algunos cánceres como el melanoma, tumor papilar de tiroides, cáncer de mama, cáncer de páncreas, y en menor medida en cáncer de vejiga y carcinoma epidermoide de esófago ^{146,161-163}.

La activación del GPR54 a través de las kisspeptinas estimula la hidrólisis del fosfatidil inositol, la movilización del calcio intracelular, la liberación de ácido araquidónico y la fosforilación de ERK1/2MAPK, demostrando su capacidad de inhibir la motilidad celular, la invasión, la proliferación y las metástasis ¹⁶⁴. Sin embargo, el mecanismo preciso todavía no está claro. KISS1 se ha convertido en el factor predictor independiente más importante entre los factores pronósticos convencionales de cáncer gástrico ¹⁶⁵. Hata et al mostraron que niveles menores de expresión de este gen se asociaban a una invasión más agresiva en pacientes con cáncer de ovario, y por tanto con peor pronóstico ¹⁶⁶. Martin demostró que la sobreexpresión de KISS1 incrementaba la progresión del tumor en el cáncer de mama ¹⁶⁷. El papel del gen KISS1 en la progresión de la enfermedad se relacionó con la sobreexpresión de KISS1 y GPR54 en casos avanzados de hepatocarcinoma ^{168,169}. Determinando niveles de KISS en carcinomas endometriales se ha visto su relación de sus niveles con el estadio, grado de invasión y afectación ganglionar ¹⁷⁰.

La delección homocigota, la metilación o diversas mutaciones en el gen KISS1 podrían ser responsables de su regulación a la baja, produciéndose así el incremento en la invasión tumoral. Sin embargo, los mecanismos detrás de estos procesos implicados en la progresión tumoral no están del todo claros, a pesar de ello KISS1 ha surgido en los últimos años como un fuerte candidato cómo diana molecular en el desarrollo de tratamiento antitumorales ¹⁷¹.

1.5.3.3. Papel durante la gestación

Diversos estudios han demostrado que la metastina o kisspeptina-54, producto de la expresión de KISS1, juega un papel importante en la regulación de la invasión trofoblástica a través de la interacción con su receptor GPR54 durante el primer trimestre de embarazo, tanto en humanos como en roedores.

La expresión de KISS1 en tejido placentario humano incrementa gradualmente con las semanas gestacionales ¹⁷², cómo demostró la correlación linealmente positiva entre los niveles de mRNA de KISS1 y los días de gestación. De igual forma, se publicó un incremento en los niveles de mRNA tanto de KISS1 como de GPR54 en trofoblasto de placenta humana y de ratón coincidiendo con la edad gestacional a la cual existe un pico en la oleada de invasión trofoblástica, por tanto un momento crítico en el proceso de implantación ¹⁷³. Además, estudios in vitro han mostrado que la kisspeptina-10 inhibe la migración e invasión de células HTR8SVneo, una línea celular derivada de trofoblastos humanos de primer trimestre ^{173,174}.

Diversos estudios han investigado de qué manera la metastina puede regular la invasión trofoblástica en la decidua. Estudios in vitro han mostrado que KISS1 inhibe la actividad de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) ¹⁷⁵. Las MMPs son moléculas normalmente implicadas en remodelación tisular, implantación embrionaria y desarrollo placentario. Las kisspeptinas parecen estar implicadas en la inhibición de la migración e invasión trofoblástica en el primer trimestre de gestación mediante la actuación sobre las metaloproteinasas, que son inhibidas, evitando la invasión trofoblástica excesiva ^{173,176}. Además, otros mecanismos mediados por kisspeptinas pueden verse implicados como la activación de quinasas de adhesión focal ^{148,149,177}, alteración de inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) o el sistema activador/inhibidor del plasminógeno.

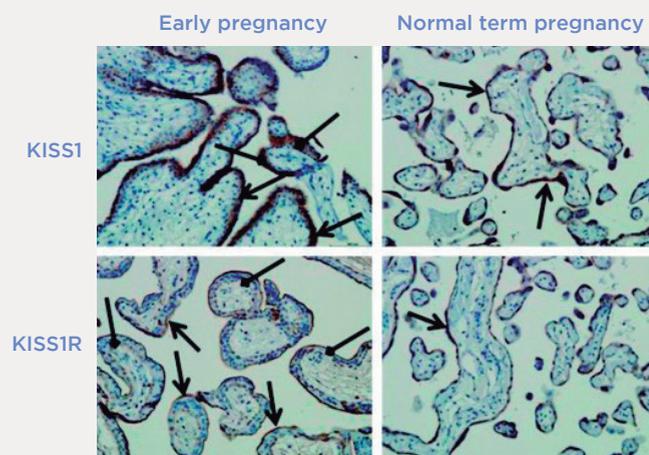
Dentro de este proceso de regulación de la invasión trofoblástica, se ha visto un aumento progresivo de los niveles de metastina a medida que progresa el embarazo ^{162,173}, que también se correlacionan con los valores de hormonas sexuales y lactógeno placentario ¹⁶².

Las células metastina (+) parecen localizarse en el sinciotiotrofoblasto, confirmandose de nuevo que la placenta es un órgano endocrino capaz de producir diferentes hormonas, como la β hCG y el lactógeno placentario ^{162,178}.

Considerando la localización de las células metastina (+) y su aumento progresivo en plasma durante la gestación, es posible que la metastina se encuentre implicada en el mecanismo de regulación de la invasión trofoblástica ^{154,179}, siendo sus niveles proporcionales al grado de una correcta implantación.

/ Figura 6

Microfotografías mostrando expresión de KISS1 y su receptor en tejido placentario en distintas etapas del embarazo normal mediante inmunohistoquímica, mostrándose las células positivas de color marrón.



Extraído de Cratwright y Williams, 2012 ¹⁸⁰.

Diversos estudios han encontrados niveles menores de expresión de kisspeptinas en trofoblasto de pacientes con abortos de repetición ¹⁸¹, probablemente asociado a una disregulación de las células NK que infiltran la decidua; y en pacientes con episodios de sangrados al inicio de la gestación ¹⁸².

También se han demostrado distintos niveles de expresión de KISS1 en placentas de pacientes afectas de preeclampsia con respecto a controles ^{101,172,183,184}, así como un incremento en este tipo de pacientes de los niveles séricos de kisspeptinas circulantes ¹⁸⁵, lo que reforzaría el papel del KISS1-GPR54 en el desarrollo placentario.

1.6. Resultados de estudios preliminares

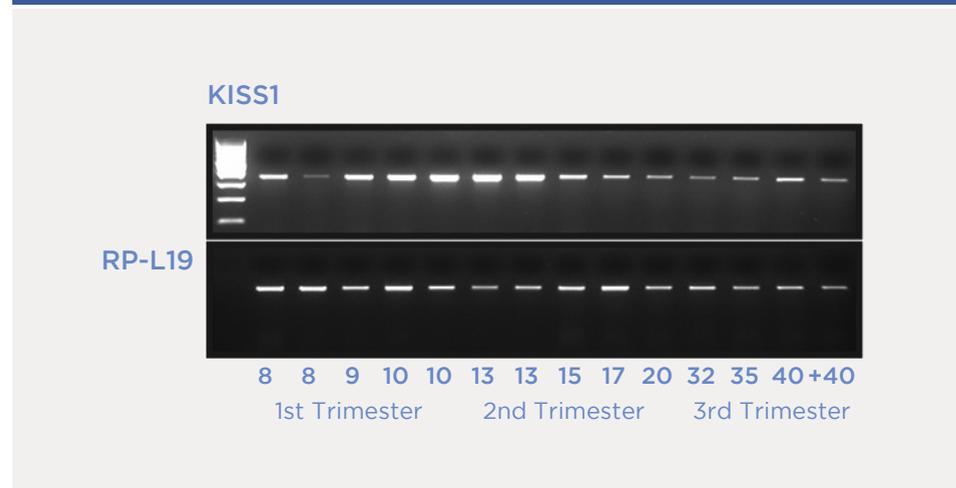
Dados los hallazgos presentados previamente en la literatura referentes a la expresión de KISS1 a lo largo de la gestación, se planteó como un buen candidato a biomarcador predictor del desarrollo placentario.

En una primera aproximación, se analizaron muestras de placenta de diversas etapas de la gestación en humanos; placentas de gestantes sin patología aparente. Estas muestras, transferidas en forma de RNA total ya extraído, no presentaban todas ellas características cuantitativas y cualitativas similares. A modo de ejemplo, la concentración y el índice de calidad del RNA mostraban fluctuaciones muy significativas entre muestras. Por este motivo, se planteó llevar a cabo una pre-selección de las muestras en base a los niveles de expresión del gen control (RP-L19) detectado mediante RT-PCR semi-Q. En su conjunto, se evaluaron muestras de RNA de placentas procedentes de gestaciones de 8, 9, 10, 13, 15, 17, 20, 32, 35, 40 y más de 40 semanas. En la mayoría de los casos, se analizaron de 1 a 3 muestras individuales por edad gestacional (siempre que lo permitiera la disponibilidad de material tisular o RNA).

Estos análisis confirmaron que el gen KISS1 se expresa abundantemente en el tejido placentario humano a todo lo largo de la gestación, lo que concuerda con lo que se ha publicado en la literatura ¹⁸⁶. Como muestra de la abundancia de expresión de esta señal en el tejido placentario, los ensayos de optimización permitieron definir condiciones de amplificación con un número de ciclos de PCR inferior a 30.

Figura 7

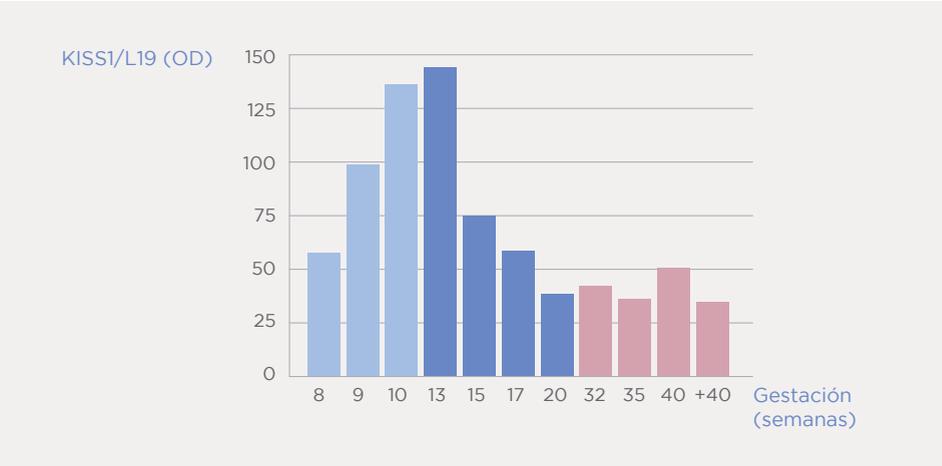
Análisis representativo de la expresión del gen KISS1 en placenta humana en diversas etapas de la gestación. Se emplea como gen control RP-L19.



A pesar de su expresión conservada a lo largo de la gestación, los primeros estudios realizados en RT-PCR semi-Q parecían detectar cambios de expresión según la edad gestacional. Aunque el número de muestras analizadas era aún escaso, un perfil tentativo de los niveles de expresión se ofrece en la figura siguiente:

Figura 8

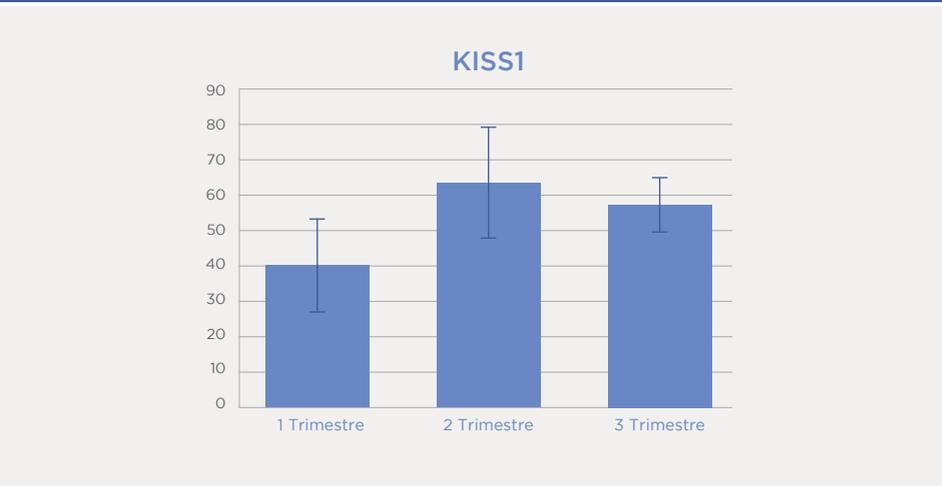
Perfil tentativo de los cambios en los niveles relativos de expresión del gen KISS1 en placenta humana en diversas etapas de la gestación.



A continuación, se muestran los resultados iniciales obtenidos, mediante análisis de RT-PCR, de la expresión de KISS1 en placentas de distintas edades gestacionales.

Figura 9

Perfil tentativo de los cambios en los niveles de expresión del gen KISS1 en placenta humana por trimestres de gestación.



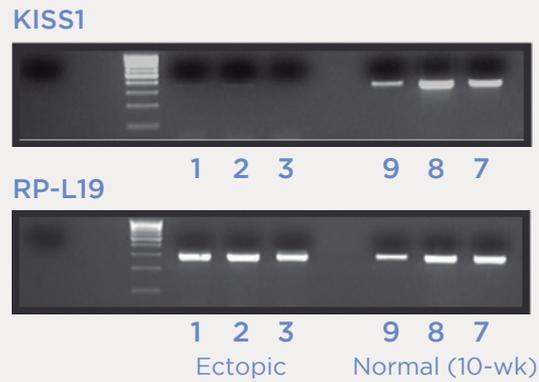
En esta misma línea, se inició el análisis de niveles relativos de expresión del gen KISS1 en placentas de embarazos ectópicos, realizándose los análisis de expresión en estas muestras en paralelo a muestras placentarias de 9 a 10 semanas de gestación.

Aunque el tamaño muestral es aún limitado, los resultados iniciales fueron tremendamente sugestivos, apuntando a la supresión, muy marcada, de la expresión del gen KISS1 en placentas ectópicas; fenómeno no descrito hasta la fecha.

Una imagen representativa de los análisis iniciales mediante RT-PCR semicuantitativa realizados en este punto se encuentra en la *figura 10*.

Figura 10

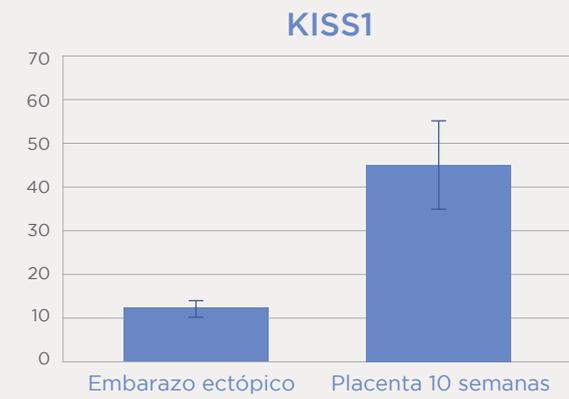
Análisis representativo de la expresión del gen KISS1 en placentas procedentes de gestaciones ectópicas. Con fines comparativos, se ofrecen igualmente datos de expresión del gen KISS1 en muestras de placenta humana normal en la semana 10 de gestación. Se emplea como gen control RP-L19.



A continuación, se muestran los resultados iniciales obtenidos, mediante análisis de RT-PCR, de la expresión de KISS1 en placentas “sanas” versus gestaciones ectópicas.

Figura 11

Perfil tentativo de los cambios en los niveles de expresión del gen KISS1 en placenta humana versus gestaciones ectópicas.



Estos resultados alentadores en los estudios preliminares nos empujaron a plantear la hipótesis de trabajo en la que se basa el presente proyecto de tesis doctoral.

2

Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Los niveles de expresión del gen KISS1 se corresponden proporcionalmente con el grado de correcta implantación placentaria, de forma que aumentan progresivamente durante la gestación normoevolutiva. Del mismo modo, en las gestaciones con alteraciones de la implantación placentaria, los niveles de expresión del gen KISS1 diferirán de los niveles de las gestaciones sin esas alteraciones.

El hecho de poder detectar los productos de expresión de este gen (kisspeptinas) en plasma podría implicar su empleo como marcador para la detección precoz de alteraciones de la implantación, como ocurriría en las gestaciones ectópicas, en caso de confirmarse su patrón diferente de expresión.

Por tanto, la hipótesis de trabajo establece que la expresión de KISS1 en tejido trofoblástico difiere en las gestaciones ectópicas respecto a las gestaciones intrauterinas.

2.2. Objetivos

/ 2.2.1. Objetivos primarios

1. Realizar un análisis de los niveles de expresión de ARN mensajero de KISS1 en tejido placentario de primer trimestre de gestaciones intrauterinas normoevolutivas y de gestaciones ectópicas, para posteriormente compararlos.
2. Correlacionar estos niveles de expresión con los niveles de kisspeptinas circulantes en sangre en ambos tipos de gestación.

/ 2.2.2.

Objetivos secundarios

1. Caracterizar el comportamiento de los niveles circulantes de kisspeptinas en suero como posible herramienta diagnóstica de gestación ectópica.
2. Conocer el rendimiento global del parámetro en estudio (kisspeptinas circulantes) como prueba diagnóstica.
3. Plantear el posible valor de kisspeptinas circulantes que podría discriminar gestaciones normoevolutivas de las de implantación ectópica.

3

Material y métodos

3.1. **Ámbito de estudio**

El reclutamiento de pacientes y la obtención de muestras fue realizada en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario La Fe de Valencia (centro asistencial de nivel terciario dependiente del Servicio Valenciano de Salud) y en la Clínica Mediterránea Médica (centro concertado por la Conselleria de Sanidad para la realización de las interrupciones voluntarias del embarazo previstas en la cartera de servicios).

El estudio posterior de las muestras obtenidas tras su procesamiento se llevó a cabo en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) de Valencia y en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba.

3.2. **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio observacional transversal que compara gestaciones de primer trimestre: gestaciones intrauterinas normoevolutivas con gestaciones ectópicas. Se obtuvo tejido trofoblástico y muestras de sangre periférica (suero) de aquellas pacientes que aceptaron participar en el mismo, tras obtener el consentimiento informado de cada una de ellas.

El cronograma de desarrollo del estudio es el siguiente:

- Marzo 2010 - Mayo 2010: Diseño del proyecto
- Junio 2010 - Diciembre 2012: Reclutamiento de pacientes y recogida de muestras
- Enero 2013 - Diciembre 2015: Procesamiento de muestras
- Enero 2016 - Diciembre 2016: Análisis de resultados
- Enero 2017 - Diciembre 2019: Redacción y publicación
- Mayo 2020: Redacción tesis doctoral

3.3. Consideraciones éticas

Este proyecto fue aprobado por el Comité ético de investigación clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Fe de Valencia, en su sesión del 7 de junio de 2010, con número de registro 2010/0146.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos y garantía de los derechos digitales y en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD).

El proyecto ha contado con la financiación de las becas BFU2014-57581-P & BFU2017-83934-P (M.T.-S.; Ministerio de Economía y Competitividad, España; a su vez financiadas por la Unión Europea a través del programa FEDER); del proyecto PIE-00005 (M.T.-S.; Flexi-Met, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Spain); y de los proyectos P08-CVI-03788 y P12-FQM-01943 (M.T.-S.; Junta de Andalucía, España).

3.4. Población

Se incluyeron pacientes diagnosticadas de gestación ectópica que cumplieran criterios para tratamiento quirúrgico y pacientes con gestaciones normoevolutivas que solicitaron la interrupción voluntaria del embarazo. Cada sujeto debía cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión para participar en el estudio.

3.5. Inclusión de pacientes

Las pacientes se diagnosticaron de gestación ectópica empleando la ecografía transvaginal en combinación con determinaciones seriadas de BhCG en sangre. Las pacientes aportaron la fecha de última regla para datar la gestación.

La confirmación diagnóstica y el tratamiento en todos los casos se efectuó mediante una laparoscopia quirúrgica, que fue el tratamiento de elección ya que las pacientes reclutadas no cumplían criterios para el manejo expectante o con tratamiento médico.

Estos criterios de inclusión para tratamiento quirúrgico incluyeron los descritos en las guías clínicas y los protocolos de actuación en la práctica habitual¹⁸⁷:

- Inestabilidad hemodinámica
- Presencia de hemoperitoneo
- Abdomen agudo con cuadro de dolor severo
- Diámetro de la imagen de gestación ectópica por ecografía mayor de 4 cm

- Presencia de latido embrionario al aplicar ultrasonidos
- Niveles de BhCG en sangre mayores a 5000 UI/L

Los casos control se recogieron a partir de pacientes que solicitaron la interrupción voluntaria del embarazo (IVE) acogiéndose a la Ley Orgánica 2/2010 188, del 3 de marzo, que regula, entre otras, las condiciones para acceder a esta prestación. En este caso, se trata de mujeres que solicitaban interrumpir el embarazo acogiéndose al primer supuesto que establece la ley, que dispone lo siguiente:

A) A petición de la embarazada: Podrá interrumpirse el embarazo dentro de las primeras catorce semanas de gestación, siempre que concurren los requisitos siguientes:

- a)** Que se haya informado a la mujer embarazada sobre los derechos, prestaciones y ayudas públicas de apoyo a la maternidad, en los términos que se establecen en los apartados 2 y 4 del artículo 17 de esta Ley.
- b)** Que haya transcurrido un plazo de al menos tres días, desde la información mencionada en el párrafo anterior y la realización de la intervención.

/ 3.5.1.

Criterios de inclusión de casos

Cada sujeto debía cumplir todos los criterios siguientes para participar en este estudio:

- Mujeres mayores de 18 años
- Mujeres capaces de entender y estar de acuerdo con la toma de muestras propuesta
- Firma de consentimiento informado
- Pacientes diagnosticadas de gestación ectópica subsidiarias de tratamiento quirúrgico de su patología
- Pacientes solicitantes de IVE en el primer supuesto contemplado por la ley

/ 3.5.2.

Criterios de exclusión de casos

Se excluyó de la selección para participar en el proyecto a cualquier sujeto que cumpliera uno de los criterios siguientes:

- Incumplir alguno de los criterios de inclusión arriba descritos
- Pacientes con diagnóstico previo de patologías asociada con posible alteración de la implantación: anomalías uterinas, trombofilias, adenomiosis, endometriosis, HTA...
- Pacientes que hubieran llevado tratamiento previo con metotrexate (en el caso de las gestaciones ectópicas) o cualquier otro medicamento que pudiera interferir con los mecanismos de proliferación celular (en todos los casos)

En todas las pacientes se realizó una anamnesis rigurosa según protocolo de ambos centros implicados.

3.6. Técnicas de obtención de muestras

Todos los diagnósticos de gestación ectópica y su subsiguiente tratamiento quirúrgico se realizaron en el Hospital Universitario La Fe de Valencia, centro sanitario terciario de referencia de la Comunidad Valenciana con amplia experiencia en el manejo de estas patologías.

Todos los tratamientos de IVE se realizaron en la Clínica Mediterránea Médica, centro con sede en Valencia concertado por la Conselleria de Sanidad para llevar a cabo los procedimientos de IVE del primer supuesto según establece la ley, previa remisión desde Atención Primaria / Centro de Salud Sexual y Reproductiva, siempre y cuando las pacientes cumplieran los requisitos para acogerse a este servicio.

/ 3.6.1.

Extracción de tejido

En el caso de las gestaciones ectópicas, tras firmar el consentimiento informado (ANEXO 1) para participar en el estudio y para la intervención, se realizó el procedimiento quirúrgico mediante laparoscopia (vía de elección) o laparotomía según la técnica habitual.

/ **Figura 12**

Imagen de gestación ectópica tubárica intervenida mediante laparoscopia.

Fuente propia.



Las gestaciones ectópicas seleccionadas para este estudio fueron gestaciones ectópicas íntegras localizadas en el istmo o en la porción proximal de la ampolla de la trompa de Falopio. La porción tubárica conteniendo la gestación ectópica fue clampada en ambos extremos (aproximadamente a 1 cm del saco gestacional) y se aplicó coagulación bipolar para la hemostasia. De igual forma, se coaguló mediante energía bipolar el tejido mesenquimal adyacente. A continuación, se practicó la salpingectomía mediante corte con tijeras. Uno de los investigadores del equipo del estudio, presente en el quirófano, realizó la toma de muestra de tejido trofoblástico inmediatamente después de la extracción de la pieza quirúrgica.

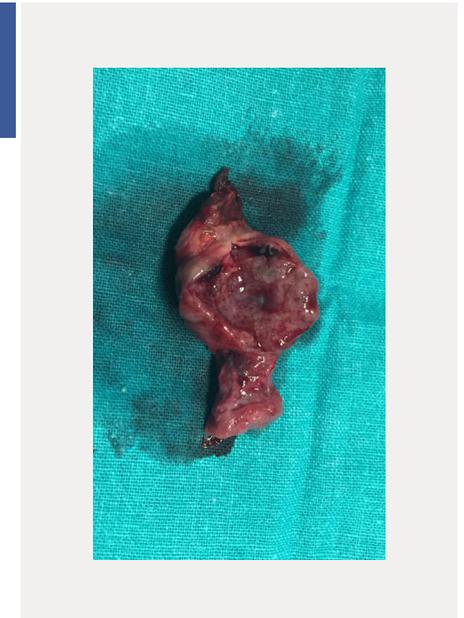
La toma de muestra consistió en la realización de una incisión longitudinal en el borde anti-mesentérico de la superficie tubárica, aplicando posteriormente una suave presión en ambos extremos digitalmente para la extracción del saco gestacional, todo ello bajo condiciones estériles.

El tejido trofoblástico se separó cuidadosamente del tejido tubárico y de los coágulos sanguíneos en la sala de operaciones empleando un estereomicroscopio o microscopio de disección OPTIKA B-191. Las muestras de tejido trofoblástico se colocaron inmediatamente en alicuotas con TRIZol como reagente, siendo a continuación congeladas y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

/ **Figura 13**

Sección longitudinal del saco gestacional de una gestación ectópica tubárica con exposición del tejido trofoblástico.

Fuente propia.



/ 3.6.2.

Extracción de sangre periférica

Tanto en los casos como en los controles, se aprovechó la intervención quirúrgica para obtener una muestra de sangre periférica, de la que el suero fue obtenido y congelado para posteriores determinaciones analíticas.

Para obtener la muestra de suero, se extrajeron 4 ml de sangre periférica de cada paciente, en tubos EDTA. La recogida de muestras de sangre se realizó siguiendo un protocolo riguroso

adhiriéndose a las condiciones publicadas para la mejor preservación de las kisspeptinas para su detección inmunométrica posterior¹⁸⁹.

Las muestras fueron procesadas y almacenadas en las condiciones apropiadas tan pronto como fue posible siguiendo las siguientes recomendaciones^{190,191}:

- Después de la extracción, se permitió que la sangre coagulara durante 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C).
- Se centrifugaron los tubos de sangre dentro de la hora siguiente a la extracción a 1.600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta velocidad, tiempo y temperatura de centrifugación reduce la contaminación con plaquetas.
- El suero obtenido fue alicuotado y almacenado a -80°C.

Todas las muestras fueron inmediatamente congeladas a -20°C en el congelador disponible en el área de quirófanos de los dos centros (modelo Candy CCDS 6172W, Haier Europe, Brugherio (MB) – Italy) y posteriormente trasladadas para su almacenamiento a largo plazo al congelador de muestras a -80°C, modelo Forma 700™ (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE). Este congelador pertenece al grupo de investigación de Medicina Reproductiva y Fertilidad del Instituto de Investigación Sanitaria IIS La Fe, situado en el Biopolo de Investigación, Torre A, 6ª planta.

Todos los traslados de estas muestras congeladas se realizaron sin romper la cadena del frío, según los protocolos establecidos habitualmente, mediante embalajes apropiados y con hielo seco, y a través de servicios de mensajería con experiencia en este tipo de transporte.

/ 3.6.3. Determinaciones en tejido trofoblástico

El ARN fue aislado de las muestras de tejido trofoblástico humano en distintas etapas del embarazo (tanto en los controles como en el embarazo ectópico), utilizando un medio denominado TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo el protocolo del fabricante (ANEXO 2).

El reactivo TRIzol™ Reagent permite realizar la precipitación secuencial de ARN, ADN y proteínas a partir de una sola muestra¹⁹². Después de homogeneizar y lisar la muestra con TRIzol™ Reagent, se añade cloroformo, y el material homogenizado se separa en una fase clara superior acuosa (que contiene ARN), una interfase, y una capa orgánica inferior roja (que contiene el ADN y las proteínas). El ARN se precipita a partir de la capa acuosa con isopropanol. Posteriormente, se lava el ARN precipitado para eliminar las impurezas, y luego se puede re-suspender para su uso en aplicaciones posteriores. El ARN aislado se puede utilizar en RT-PCR, análisis de Northern Blot, hibridación Dot Blot, selección de poli(A)+, traducción in vitro y clonación molecular.

Posteriormente, la calidad y la concentración de este ARN fue determinada por espectrofotometría, empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000™ (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE).

En la espectrofotometría se aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica de cada sustancia química. Esto permite determinar la cantidad de concentración en una solución de algún compuesto. La absorción a 260 nm proporciona ácido nucleico, mientras que la absorbencia en 280 nm determina la pureza de la muestra.

Las muestras de tejido que alcanzaron el nivel de pureza requerido y las muestras de suero fueron remitidas para su posterior análisis.

Para cuantificar el ARNm de KISS1 en el tejido trofoblástico, 1 microgramo de RNA de cada muestra fue tratada con RQ1 RNase-free DNase-I (Promega, Madison, WI) (ANEXO 3), que es una preparación de desoxirribonucleasa que degrada el ADN de una sola cadena o de doble cadena para producir oligonucleótidos 3'-hidroxilo. Esta preparación está calificada para su uso en aplicaciones donde el mantenimiento de la integridad del ARN es primordial.

Posteriormente, la muestra fue retro-transcrita en una reacción de 30 microlitros utilizando iScript™ reverse transcription Super-mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se trata de un reagente que contiene en un tubo todos los componentes necesarios, excepto el ARN a tratar, para la síntesis mediante retrotranscripción de ADNc de primera hebra (ANEXO 4).

Para la posterior amplificación por PCR en tiempo real, se utilizó el SYBR Green qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI). SYBR Green es un fluoróforo de cianuro que se intercala y tiñe el ADN de doble cadena. La medición de la intensidad de fluorescencia SYBR después de cada ciclo de amplificación permite cuantificar la cantidad de ADN. Las soluciones comerciales mastermix, como la empleada, están listas para usar y contienen todos los componentes necesarios, incluyendo polimerasa, tinte, dNTP y tampón. Simplemente precisa añadir la plantilla de ARN y los primers o cebadores (ANEXO 5).

Se realizaron PCR en tiempo real sobre las muestras de tejido válidas usando un sistema Bio-Rad SFX 96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)¹⁹³.

La PCR cuantitativa en tiempo real, o RT-qPCR, es un método estándar para detectar y cuantificar una secuencia génica de destino específica o cuantificar los niveles de expresión génica en una muestra. El uso de tintes fluorescentes de unión al ADN, como SYBR® Green en nuestro caso, es uno de los enfoques de RT-qPCR más sencillos. Se añade un tinte a la reacción y la fluorescencia se mide en cada ciclo de PCR. Debido a que la fluorescencia de estos tintes aumenta drásticamente en presencia de ADN de doble cadena, la síntesis de ADN puede ser monitoreada como un aumento en la señal fluorescente.

La salida primaria de un experimento de PCR en tiempo real es una curva de amplificación que muestra la acumulación de producto amplificado como señal fluorescente frente al número de ciclo.

La cuantificación de la cantidad de material de partida se realiza utilizando el ciclo de cuantificación (Cq, también conocido como Ct). Cq o Ct (ciclo de umbral) es el ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia detectada alcanza un umbral de amplificación en un pozo específico. El umbral de amplificación se calcula en función de la fluorescencia de fondo sobre la región de línea base de todas las curvas del grupo y representa el punto en el que la señal del emisor buscado es significativamente mayor que los niveles de fondo. Cq está inversamente

relacionado con la cantidad de plantilla de inicio en la reacción y es una medida relativa de la concentración de la secuencia objetivo en la reacción PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se llevó a cabo con las siguientes secuencias de primers o cebadores:

/ **Tabla 4**

Técnicas aplicadas (RT-PCR; señales, primers y condiciones).		
Nombre	Secuencia	Condiciones
L19 sense	5' - GAAATCGCCAATGCCAACTC - 3'	40 Ciclos
L19 as	5' - ACCTTCAGGTACAGGCTGTG - 3'	55 ° C
(290 pb)		
1RTkiss1H sense	5' - AGCTGCCACCCCTCTGGACA - 3'	40 Ciclos
1RTkiss1H as	5' - GCTTGCCTCAGTCTGGCCTG - 3'	63 ° C
(93 pb)		
Primers utilizados para estudios de RT-PCR Real Time.		

Se empleó TG-3' para la amplificación de un fragmento de 290 pares de bases del ARNm de la proteína ribosómica L19, usada como control interno para la eficiencia de la reacción y de la carga de muestra.

La PCR se inició con un ciclo de 3 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, de 30 segundos a 62°C, de 10 segundos a 72°C, y finalmente un ciclo de 1 minuto a 72°C.

El cálculo de los niveles relativos de expresión de KISS1 se llevó a cabo mediante el método del ciclo umbral (CT)¹⁹⁴. El valor de CT de cada muestra y ARNm diana (KISS1 y L19) se calculó empleando el software Bio-Rad CFX manager 2.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) aplicando un sistema automático de ajuste del umbral de fluorescencia.

La expresión final de los datos de qPCR para mRNA se obtuvieron mediante el método $2^{\Delta\Delta C_T}$, de acuerdo a la fórmula original de qPCR (ecuación = $2^{-\{\Delta C_T \text{ reference} - \Delta C_T \text{ target}\}}$), donde el incremento de C_T (ΔC_T) en cada muestra se obtiene mediante la substracción al valor específico de C_T del objetivo (KISS1) del valor de L19 (empleado como control interno), mientras el valor $\Delta\Delta C_T$ se obtiene sustrayendo al valor de ΔC_T de cada muestra problema el valor de la muestra de referencia control. De esta forma, se consigue la normalización de los niveles relativos de mRNA de KISS1 frente a la expresión de los niveles del control interno L19, expresándose las diferencias como veces de cambio (*fold-increase*) respecto a las muestras control.

Para la presentación de resultados, los datos finales se multiplicaron por 100.

/ 3.6.4. Determinaciones en suero

Los niveles plasmáticos de kisspeptinas (KP) fueron analizados mediante un radioinmuno-ensayo (RIA) específico, desarrollado por un colaborador externo^{195,196}.

Esta técnica se utiliza para detectar y cuantificar sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas y mezcladas con muchas otras. Es por tanto una técnica muy sensible y muy específica. Utilizando anticuerpos de gran afinidad se pueden detectar hasta picogramos de antígeno. El fundamento es muy sencillo:

- Se mezcla una cantidad constante de antígeno marcado radioactivamente y una cantidad constante de un anticuerpo para ese antígeno.
- Se produce la reacción entre antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac).
- Se separa la fracción de antígeno que se ha unido de la que permanece libre .
- Se determina la radioactividad.

Si la muestra contiene además antígeno frío (no marcado), éste competirá con el marcado para unirse al anticuerpo, y se observará un descenso en la medida de la radioactividad. Este descenso es proporcional a la concentración de antígeno frío en la muestra

En ausencia de antígeno frío (no radioactivo), todos los complejos Ag-Ac serán radioactivos. La radioactividad medida es máxima.

En presencia de antígeno frío (no radioactivo), éste compite con el antígeno radioactivo para unirse al anticuerpo. Por tanto, la radioactividad medida es menor. El descenso es proporcional a la concentración de Ag frío presente en la muestra.

Se construye una curva de calibrado (color rojo) que relacione la medida de radioactividad (cuentas por minuto, cpm) con la concentración de antígeno frío en la muestra. Si se realiza el ensayo con una muestra que contiene una cantidad desconocida del antígeno no marcado y se mide la radioactividad asociada a los anticuerpos, por interpolación sobre la curva de calibrado se puede estimar la concentración del antígeno frío en la muestra.

El anticuerpo primario para dicho ensayo fue generado en oveja tras inmunización con el péptido humano, KP-54 conjugado con albúmina de suero bovina (BSA). El anticuerpo policlonal así generado (GQ2), que se empleó finalmente a una dilución de 1:3.500.000, ha sido validado, según lo recogido en referencias previas¹⁹⁷, presentando una reactividad del 100% con la KP-54 humana, y otros fragmentos de menor tamaño, tales como KP-14, KP-13 y KP-10, pero menos de un 0.01% de reactividad cruzada con péptidos estructuralmente relacionados, tales como los péptidos de la familia de las RF-amidas, RFRP1, RFRP2 y RFRP3, además del péptido liberador de prolactina (PrIRP), y los neuropéptidos NPPF y NPAF. Por tanto, permitiría medir el número total de kisspeptinas circulantes.

Para el RIA, se llevó a cabo la iodación de KP-54 (¹²⁵I-KP-54) mediante el empleo de tubos Iodogen (Lund, Suiza), según las indicaciones del productor, siendo purificada la ¹²⁵I-KP-54 mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en un gradiente de acetonitrilo.

Las muestras problema (casos y controles) fueron analizadas en duplicado, en alícuotas de 700 microL conteniendo buffer fosfato 0.06 M y BSA al 0.3%, incubadas durante 3 días a -4°C. La sensibilidad del ensayo permite la detección de cambios de magnitud igual o superior a 2 pmol/L con un límite de confianza del 95%. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo para este RIA fueron de 8.3 y 10.2%, respectivamente.

3.7.

Análisis estadístico y obtención de resultados

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software Prism-GraphPad (La Jolla, California, USA). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Debido a tratarse de una primera aproximación al sistema KISS1 / kisspeptinas en las gestaciones ectópicas, se estimó un tamaño muestral de 45 pacientes por rama de estudio (gestaciones ectópicas versus gestaciones normoevolutivas sometidas a IVE), basándose en los tamaños muestrales con resultados publicados previamente en la literatura con una aproximación similar a este proyecto de tesis pero en otras patologías (abortos de primer trimestre, preeclampsia, etc).

Los datos clínicos de las poblaciones a estudio se presentan como la media más/menos el error estándar de la media, o como números absolutos y su porcentaje. Tras comprobar la distribución de las variables en las poblaciones a estudio (mediante los test D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk), las semanas de amenorrea (en semanas + días), la gravidez, el número de partos, la historia previa de abortos espontáneos o IVEs y el número de abortos fueron evaluados mediante el test U de Mann-Whitney, mientras que la historia previa de embarazo ectópico fue evaluada mediante el test exacto de Fisher.

Posteriormente, los datos de expresión de KISS1 en tejidos y las concentraciones plasmáticas de kisspeptinas se presentan como la media más/menos el error estándar de la media (EEM). Del mismo modo que se ha descrito previamente con las características clínicas de las pacientes a estudio (mediante los test D'Agostino-Pearson y Shapiro-Wilk), se comprobó la distribución de las variables de las muestras a estudio para aplicar correctamente los estudios estadísticos posteriormente.

Las comparaciones entre dos grupos se realizaron mediante el test de Mann-Whitney. Cuando se compararon varios grupos o subgrupos, los resultados se analizaron estadísticamente

mediante la prueba de ANOVA de una vía (para estudios de perfiles de expresión a lo largo de la gestación) y secundariamente mediante el test de Kruskal-Wallis. Cuando se identificaron diferencias estadísticas mediante la prueba de ANOVA, los resultados fueron analizados adicionalmente mediante sistemas de comparación post-hoc, a través de la aplicación del test de Dunn, a fin de identificar efectos individuales.

Los datos recogidos se emplearon para valorar la capacidad de los niveles circulantes de las kisspeptinas para predecir el diagnóstico de gestación ectópica. Adicionalmente, se procedió a una regresión lineal bajo interacción en base logarítmica para evaluar la evolución de los niveles de kisspeptinas circulantes en cada grupo de estudio.

Para caracterizar el comportamiento de los niveles circulantes de kisspeptinas en suero como posible herramienta diagnóstica de gestación ectópica, se elaboró una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) presentando la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte.

A continuación, se calculó el área bajo la curva (AUC en sus siglas inglesas) para conocer el rendimiento global del parámetro en estudio (kisspeptinas circulantes) como prueba diagnóstica.

Se obtuvieron diversos puntos de corte tentativos de los niveles de kisspeptinas circulantes que podrían discriminar gestaciones normoevolutivas de las de implantación ectópica, a partir de los hallazgos de la curva ROC, para los que se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo correspondientes.

4 Resultados

4.1. Inclusión de pacientes

Entre junio de 2010 y diciembre de 2012 se procedió al reclutamiento de pacientes participantes y a la recogida de muestras.

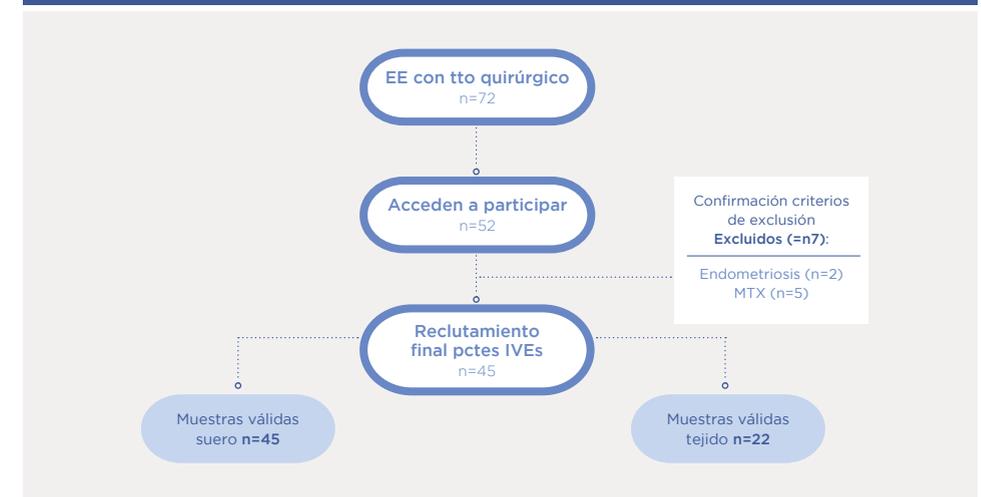
Durante esta fase de 30 meses, un total de 72 mujeres fueron diagnosticadas de gestación ectópica subsidiaria de recibir tratamiento quirúrgico de la misma en el Hospital Politécnico y Universitario La Fe, mientras que en la clínica concertada Mediterránea Médica se llevaron a cabo 812 interrupciones voluntarias del embarazo.

De estas, un total de 45 mujeres con gestaciones evolutivas normales que optaron por una interrupción voluntaria del embarazo (IVE) y un total de 45 mujeres con el diagnóstico de embarazo ectópico fueron finalmente incluidas en el estudio.

El proceso de reclutamiento se muestra en los siguientes diagramas de flujo:

/ **Figura 14**

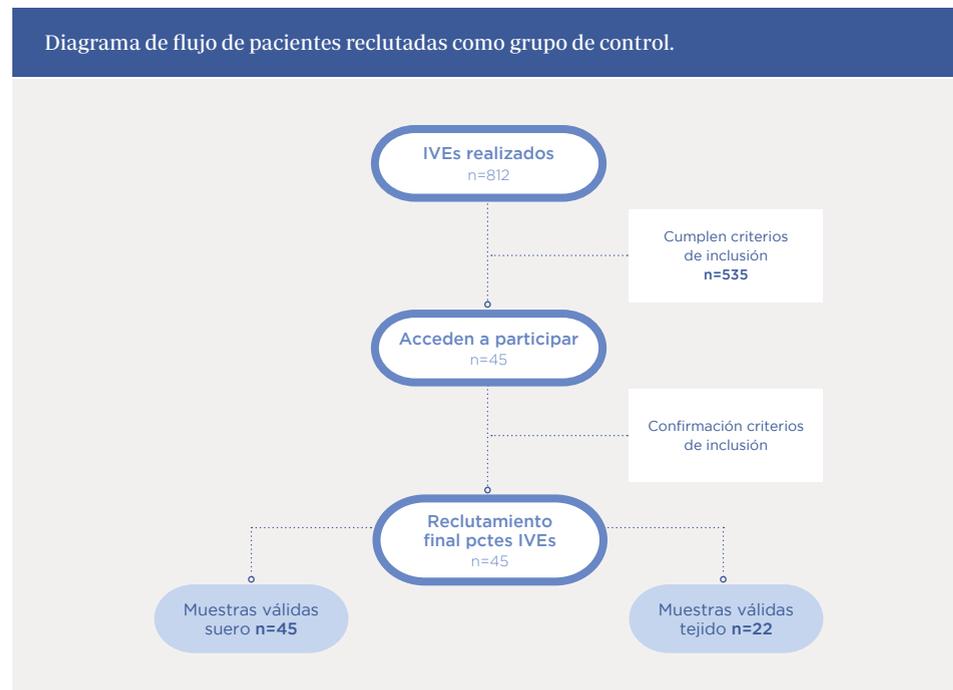
Diagrama de flujo de pacientes diagnosticadas de EE e incluidas en el estudio.



Como se aprecia en el diagrama de flujo previo (tabla 1), de las 52 pacientes diagnosticadas de gestación ectópica candidatas que aceptaron participar en el estudio, siete fueron finalmente descartadas tras una segunda comprobación de los criterios de inclusión, cinco por haber llevado tratamiento con metotrexate previo a la cirugía y dos por antecedentes de endometriosis.

Del total de 812 IVEs realizados durante el periodo de estudio, 45 pacientes accedieron a participar en el mismo, cumpliendo todos criterios de inclusión, tal y como se muestra en el siguiente diagrama de flujo (tabla 2):

Figura 15



En ambos grupos fue posible obtener suero de las 45 pacientes para el estudio de kisspeptinas circulantes.

Por dificultades inherentes al tipo de material estudiado y a la técnica, sólo fue posible recuperar ARN viable para estudio en 22 pacientes de ambos grupos, de las 45 muestras de tejido extraídas, respectivamente.

4.2. Análisis descriptivo

Al analizar clínicamente aquellas pacientes de las cuales se obtuvieron muestras válidas para estudio de tejido, las mujeres incluidas en el grupo de gestaciones ectópicas presentaron características similares a aquellas pertenecientes al grupo control respecto a edad, gravidez, paridad, edad gestacional y antecedentes de embarazo ectópico. Cabe destacar que de las 22 pacientes del grupo control ninguna había tenido un aborto espontáneo previamente.

En el caso de las muestras válidas para estudio serológico, las pacientes presentaron características similares en ambos grupos respecto a gravidez, paridad, edad gestacional estimada basada en la fecha de última menstruación e historia obstétrica previa. Las pacientes del grupo control (IVEs) tendieron a ser más jóvenes, con significación estadística.

Las características clínicas de las participantes con material válido para estudio de tejido y de suero se muestran a continuación en las tablas 3 y 4.

Tabla 5

Características de las pacientes reclutadas con muestra válida para estudio de tejido (n=22).							
	Edad	Semanas de amenorrea	Gravidez	Paridad	Hª previa AE	Nº AE	Hª previa EE
EE	30,7±1,7	7+1	3,3±0,9	0,5	4 (18,18%)	1,7	3 (13,63%)
CONTROL (IVEs)	26±3,1	7+6	2,1±0,2	0,5	0	0	1 (4,54%)
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

AE: aborto espontáneo, EE: embarazo ectópico, IVE: interrupción voluntaria del embarazo, ns: no significativo.

Tabla 6

Características de las pacientes reclutadas con muestra válida para estudio de suero (n=45).							
	Edad	Semanas de amenorrea	Gravidez	Paridad	Hª previa AE	Nº AE	Hª previa EE
EE	30,8±1,5	6+6	2,1±0,3	0,3	7 (15,55%)	0,8	3 (6,67%)
CONTROL (IVEs)	24,6±1,8	7+4	2,1±0,3	0,4	5 (11,11%)	0,2	1 (2,22%)
	*p=0,002	ns	ns	ns	ns	ns	ns

AE: aborto espontáneo, EE: embarazo ectópico, IVE: interrupción voluntaria del embarazo, ns: no significativo.

4.3. Análisis de variables a estudio

4.3.1. Determinaciones de KISS1 en tejido trofoblástico

Un total de 22 pacientes con embarazo ectópico y 22 controles sometidos a IVE proporcionaron un tejido de suficiente calidad para la extracción del ARN y posterior determinación de la expresión del gen KISS 1 en tejido trofoblástico.

En la siguiente tabla se recogen los datos de expresión de KISS1 en los dos grupos de estudio:

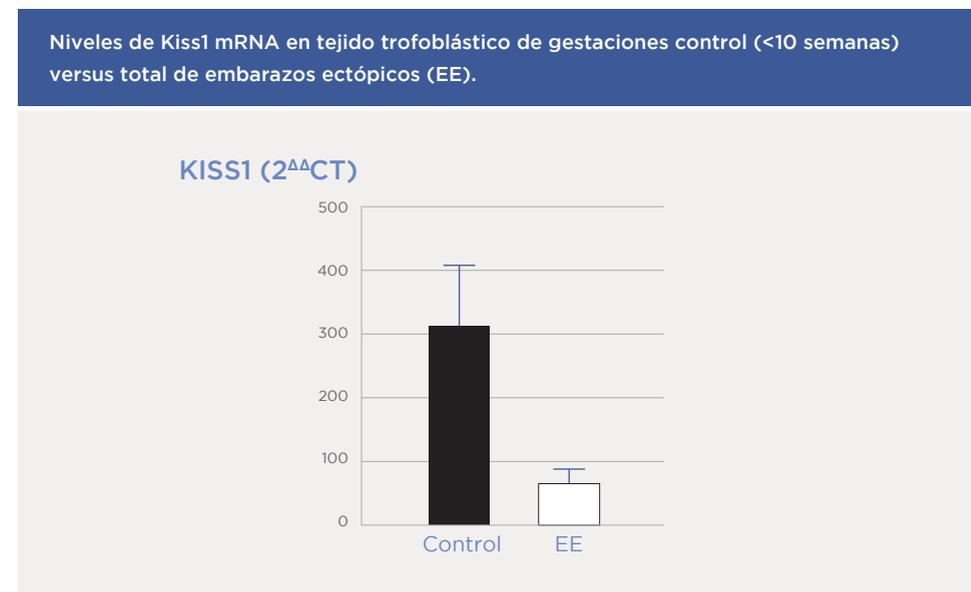
Tabla 7

Datos de expresión de KISS1 en tejido trofoblástico.		
KISS1 (2 ^{ΔΔCT})	Control (n=22)	EE (n=22)
Mínimo	0,01	0,02
Máximo	1345,00	439,20
Media	314,70	67,72
EEM	96,10	23,28

EE: embarazo ectópico, EEM: error estándar de la media.

La *figura 16* muestra de forma gráfica estos resultados globales de expresión del KISS1, donde se observa una disminución de la expresión de KISS1 en las gestaciones ectópicas en comparación con los embarazos normales que acabaron en IVE, sin alcanzar la significación estadística (p=0.07).

Figura 16



4.3.1.1. KISS1 en gestaciones control (IVEs)

Si nos centramos en la evolución por semanas de los valores de expresión del KISS1 en el grupo control, es decir, en gestaciones interrumpidas de forma voluntaria, los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8

Datos de expresión de KISS1 en tejido trofoblástico de gestaciones sometidas a IVE.				
KISS1 (2 ^{ΔΔCT})	Control <6 semanas (n=6)	Control 7 semanas (n=4)	Control 8 semanas (n=8)	Control 9 semanas (n=4)
Mínimo	0,01	100,00	0,46	212,90
Máximo	28,72	548,30	1221,00	1345,00
Media	10,78	259,90	366,60	721,80
EEM	5,32	99,44	188,00	276,40

EE: embarazo ectópico, EEM: error estándar de la media.

Tal y como muestra la *figura 17*, existe una evolución ascendente de la expresión de KISS1 en los tejidos de las gestaciones control, separadas por semanas y hasta la semana 10, que es la máxima edad gestacional hasta la que los casos con embarazo ectópico evolucionaron clínicamente. Como se puede observar, la expresión de KISS1 aumenta a medida que progresa el embarazo normal en las primeras etapas de su evolución, siendo este resultado estadísticamente significativo.

Figura 17

Niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario de gestaciones control.

Figura 17A

Expresión de KISS1 en estadios más precoces de la gestación vs estadios más avanzados. ** p=0.004.

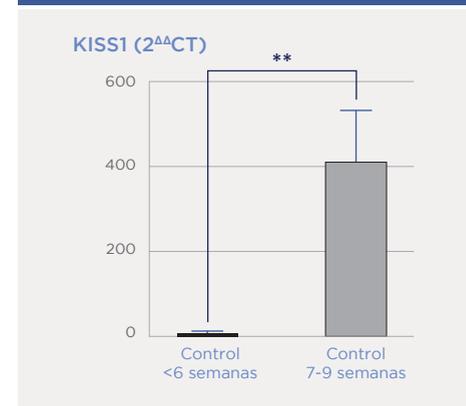
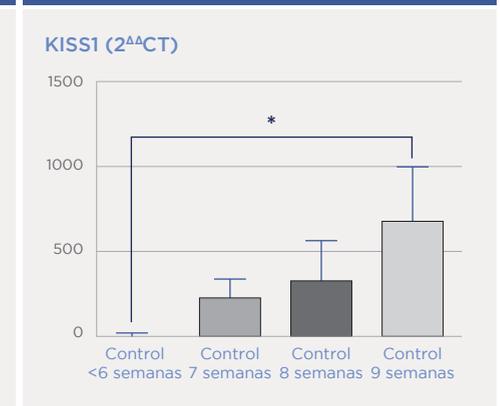


Figura 17B

Expresión de KISS1 separando por semanas de gestación: 6, 7, 8, y 9. * p=0.01.



4.3.1.2. KISS1 en gestaciones ectópicas (EE)

En este caso, los valores obtenidos al analizar las muestras provenientes de tejido de gestaciones ectópicas queda reflejado, por semanas, en la siguiente tabla:

Tabla 9

Datos de expresión de KISS1 en tejido trofoblástico de gestaciones ectópicas.				
KISS1 (2 ^{ΔΔCT})	EE <6 semanas (n=14)	EE 7 semanas (n=3)	EE 8 semanas (n=2)	EE 9 semanas (n=3)
Mínimo	0,02	23,25	10,88	1,40
Máximo	439,20	206,30	11,15	52,85
Media	71,06	138,90	11,02	18,73
EEM	33,09	58,11	0,13	17,06

EE: embarazo ectópico, EEM: error estándar de la media.

La representación gráfica de estos datos se muestra en la *figura 18*. En el panel *18A*, la evolución de niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario de embarazo ectópico se presenta diferenciado en dos grupos: hasta 6 semanas y entre 7-9 semanas de gestación. En el panel *18B* se realiza el mismo análisis, pero discriminando por semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación. En estos resultados no se aprecian diferencias estadísticamente significativas en su evolución a lo largo de las primeras semanas de gestación ($p=0,42$).

Figura 18

Evolución de la expresión de KISS1 en gestaciones ectópicas.

Figura 18A

Evolución de niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario de gestación ectópica (EE) diferenciado en <6 semanas y entre 7-9 semanas de gestación.

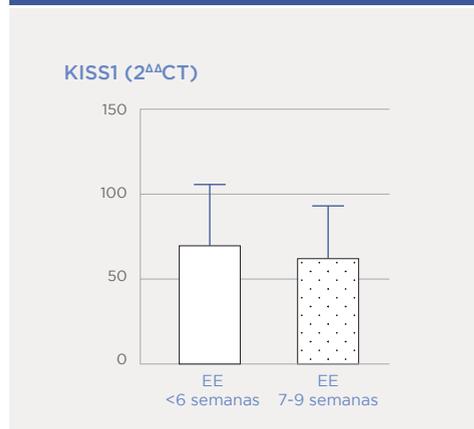
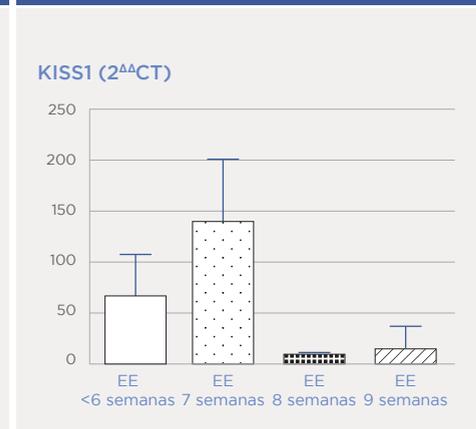


Figura 18B

Mismo análisis, pero discriminando semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación.

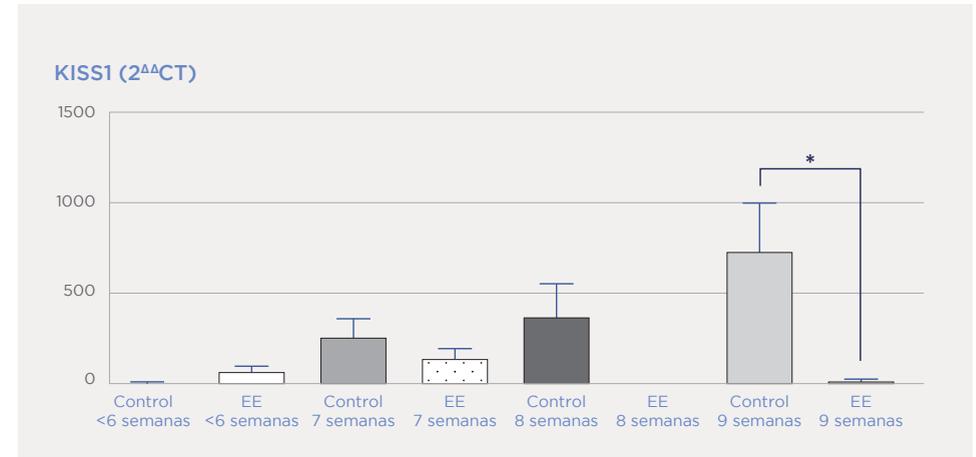


4.3.1.3. Comparación de expresión de KISS1 en EE vs IVEs

Por último, en la *figura 19* se observa la evolución de niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario control comparado con los embarazos ectópicos discriminando por semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación. Se observan diferencias estadísticamente significativas sólo en las gestaciones de 9 semanas entre ambos grupos, aunque se objetiva un perfil de menor expresión de KISS1 en gestación ectópica.

Figura 19

Evolución de niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario control versus gestación ectópica (EE) discriminando por semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación. * $p=0,01$.



4.3.2.

Determinaciones de kisspeptinas en suero

Los valores globales obtenidos al analizar los niveles de kisspeptinas circulantes en suero en ambos grupos de estudio se muestran en la *tabla 10*:

Tabla 10

Niveles de kisspeptinas circulantes en ambos grupos de estudio.

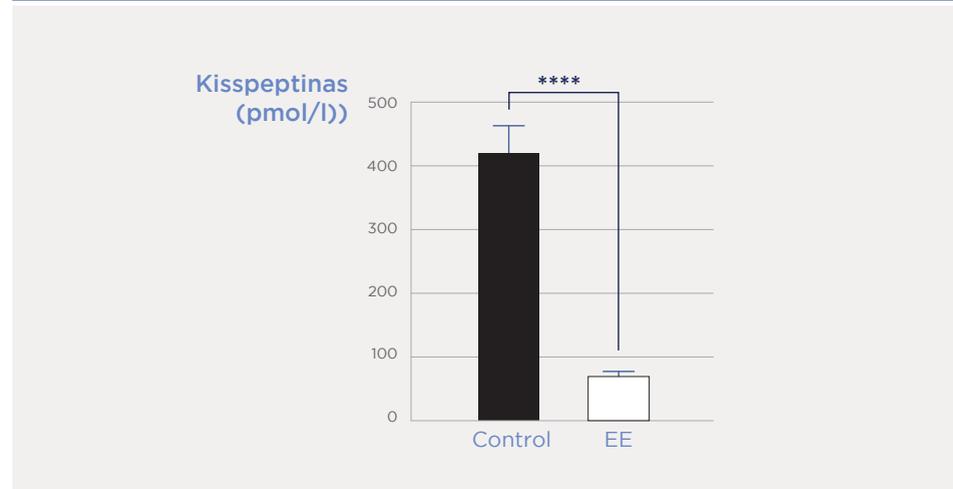
Kisspeptinas (pmol/l)	Control (n=45)	EE (n=45)
Mínimo	50,00	50,00
Máximo	1121	228,7
Media	427,8	79,68
EEM	46,20	8,030

EE: embarazo ectópico, EEM: error estándar de la media.

La *figura 20* representa los niveles plasmáticos de kisspeptinas (KPs) en mujeres con gestación normoevolutiva (con edades gestacionales de menos de 10 semanas) frente al total de embarazos ectópicos. Se observa una disminución estadísticamente significativa de los niveles de kisspeptinas en el grupo de embarazos ectópicos comparados con los controles.

Figura 20

Niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control (<10 semanas) vs. total de embarazos ectópicos (EE). **** p<0.0001.



4.3.2.1. Kisspeptinas en gestaciones control (IVEs)

Por último, en la *figura 19* se observa la evolución de niveles de KISS1 mRNA en tejido placentario control comparado con los embarazos ectópicos discriminando por semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación. Se observan diferencias estadísticamente significativas sólo en las gestaciones de 9 semanas entre ambos grupos, aunque se objetiva un perfil de menor expresión de KISS1 en gestación ectópica.

Tabla 11

Niveles de kisspeptinas circulantes, por semanas de gestación, en gestaciones control (IVEs).

Kisspeptinas (pmol/l)	Control <6 semanas (n=9)	Control 7 semanas (n=18)	Control 8 semanas (n=8)	Control 9 semanas (n=6)
Mínimo	50,00	77,58	209,60	50,00
Máximo	271,20	950,10	1015,00	1121,00
Media	146,40	406,30	578,50	612,50
EEM	29,59	63,61	77,20	177,10

EEM: error estándar de la media.

Si mostramos estos resultados de forma gráfica, en la *figura 21*, panel *A*, se observan los niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control, separados por semanas de gestación según fueran más precoces o más avanzadas, y cómo existe un aumento significativo a medida que aumenta el tiempo gestacional. El panel *B* muestra los niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres controles, separados por semanas de gestación: 6, 7, 8 y 9. En ella se vuelve a encontrar un aumento significativo en los niveles circulantes de kisspeptinas en gestaciones normoevolutivas conforme avanza la gestación.

Figura 21

Evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en gestaciones control.

Figura 21A

Niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control, comparando <6 semanas con gestaciones más avanzadas. * p=0.01.

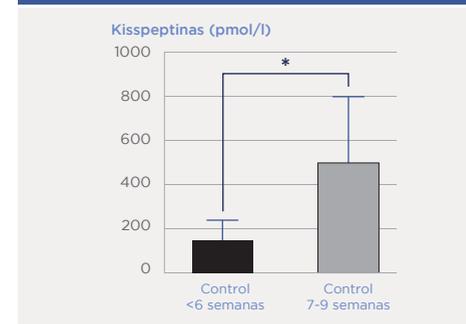
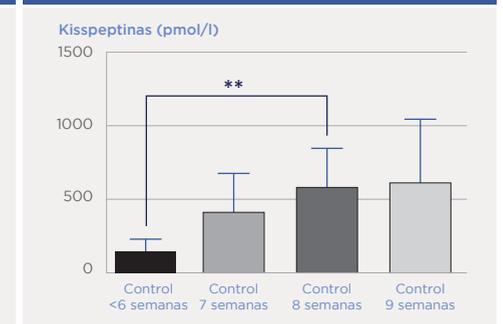


Figura 21B

Mismo análisis, pero separando por semanas de gestación: 6, 7, 8 y 9. ** p=0.004.



4.3.2.2. Kisspeptinas en gestaciones ectópicas (EE)

Del mismo modo, la *tabla 12* muestra los resultados de los niveles circulantes en sangre de kisspeptinas en gestaciones ectópicas:

Tabla 12

Niveles de kisspeptinas circulantes, por semanas de gestación, en gestaciones ectópicas.				
Kisspeptinas (pmol/l)	EE <6 semanas (n=27)	EE 7 semanas (n=7)	EE 8 semanas (n=5)	EE 9 semanas (n=6)
Mínimo	50,00	50,00	50,00	50,00
Máximo	184,60	225,20	228,70	191,10
Media	72,31	75,02	121,00	83,77
EEM	8,20	25,02	38,18	22,13

EE: embarazo ectópico, EEM: error estándar de la media.

Al mostrar estos resultados en forma de diagrama, la *figura 22* muestra la evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con embarazo ectópico, separado por semanas de gestación: hasta 6 semanas y entre 7-9 semanas. El análisis realizado no muestra diferencias significativas en la evolución de este marcador en los embarazos ectópicos en las primeras semanas ($p=0.2$).

Figura 22

Evolución de los niveles plasmáticos por semanas de gestación en gestaciones ectópicas (EE).

Figura 22A

Evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación ectópica, separado por semanas de gestación: hasta 6 semanas; entre 7-9 semanas.

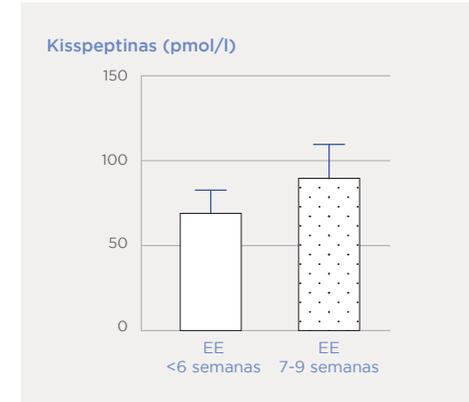
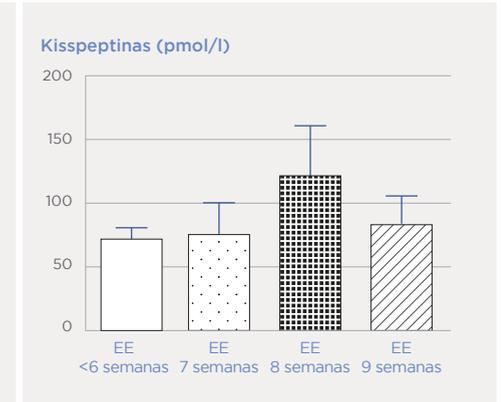


Figura 22B

Mismo análisis que en A, pero discriminando semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación.



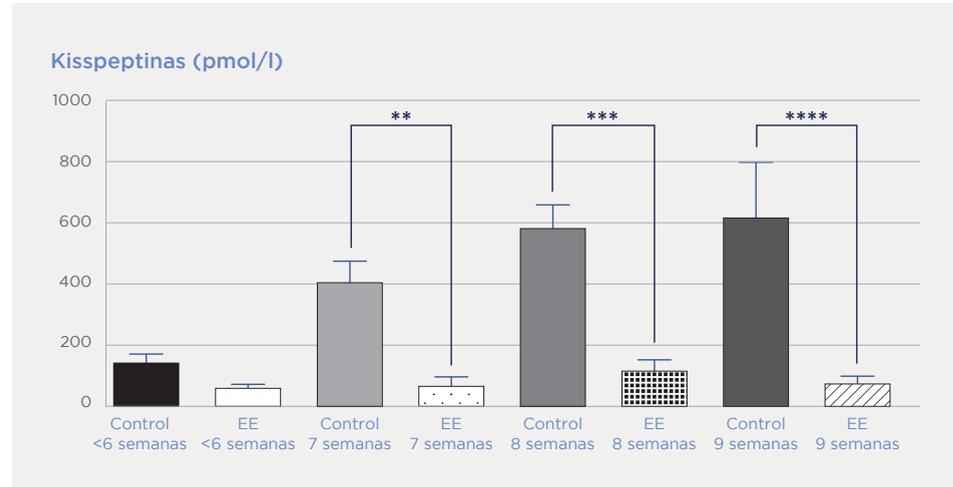
4.3.2.3. Comparación niveles de kisspeptinas circulantes en EE vs IVEs

Para terminar, la *figura 23* muestra la evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control comparadas con los embarazos ectópicos, discriminando por semanas de gestación: menos de 6 semanas, 7, 8 y 9 semanas de gestación. La figura muestra diferencias significativas a partir de la semana 7 entre gestaciones normales y ectópicas.

Figura 23

Evolución de niveles plasmáticos de kisspeptinas en mujeres con gestación control vs ectópico (EE), discriminando entre semanas 6, 7, 8 y 9 de gestación.

** p=0.001, *** p=0.0001, **** p<0.0001

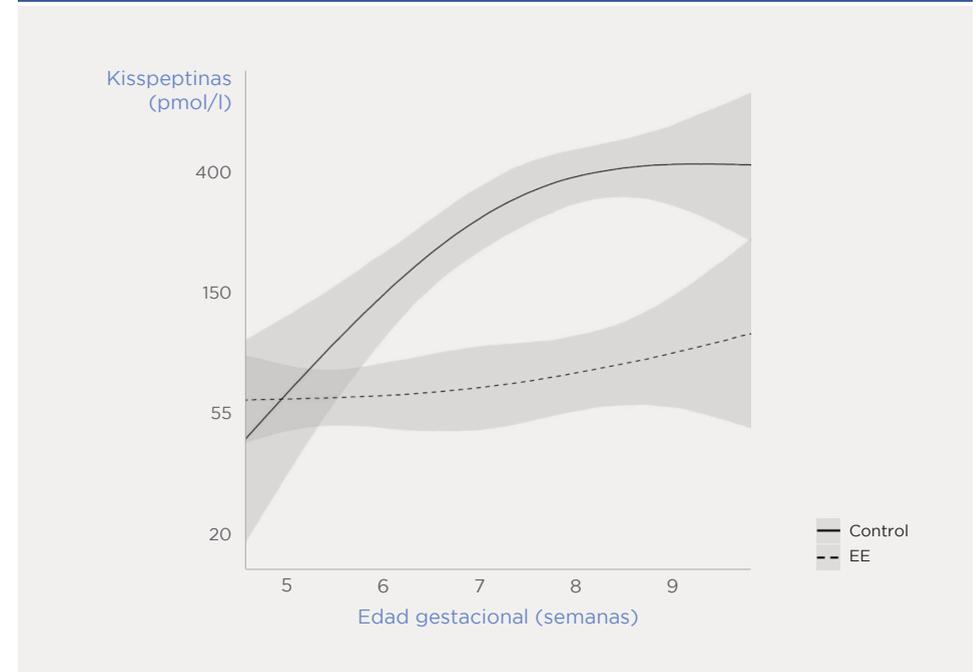


A continuación, dados los resultados obtenidos en kisspeptinas circulantes, se procedió a analizar los mismos mediante una regresión lineal bajo interacción para mostrar de forma gráfica (figura 24) la evolución de estos niveles en ambos grupos de estudio.

En este caso se representa como el paso de las semanas se asocia a un aumento de la concentración de kisspeptinas circulantes en las gestaciones normovolútivas (controles): 0.396 IC95%[0.025; 0.56], con un p valor < 0.001. A su vez, el efecto del paso de las semanas en las gestaciones ectópicas es 0.31 menor que en los controles (-0.311 IC95%[-0.052; -0.09]), con un p valor igual a 0.05.

Figura 24

Evolución de los niveles de kisspeptinas circulantes en gestación control vs EE



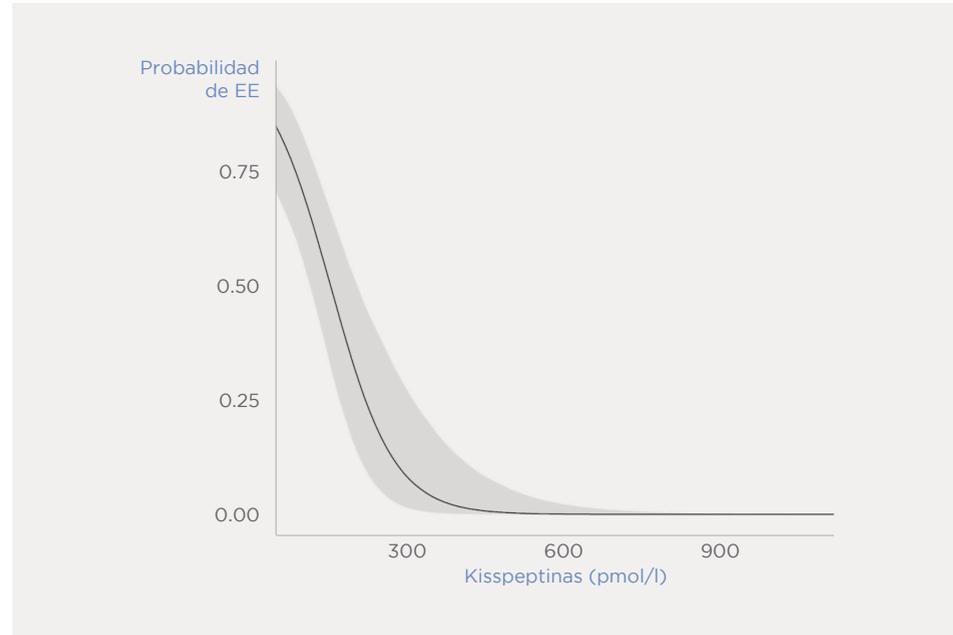
/ 4.3.3.

Kisspeptinas como herramienta diagnóstica de gestación ectópica

Siguiendo con el análisis de los datos obtenidos, la siguiente gráfica (figura 25) muestra el valor predictivo de los valores de kisspeptinas circulantes como posible marcador diagnóstico de gestación ectópica. Como se aprecia reflejado en la curva, a menor valor de concentración sérica de kisspeptinas séricas, mayor es la probabilidad de que nos encontremos ante una gestación ectópica. A la inversa, valores mayores de 400 pmol/l de kisspeptinas en suero hacen que la probabilidad de encontrarnos frente a un embarazo ectópico ronde el 0%.

Figura 25

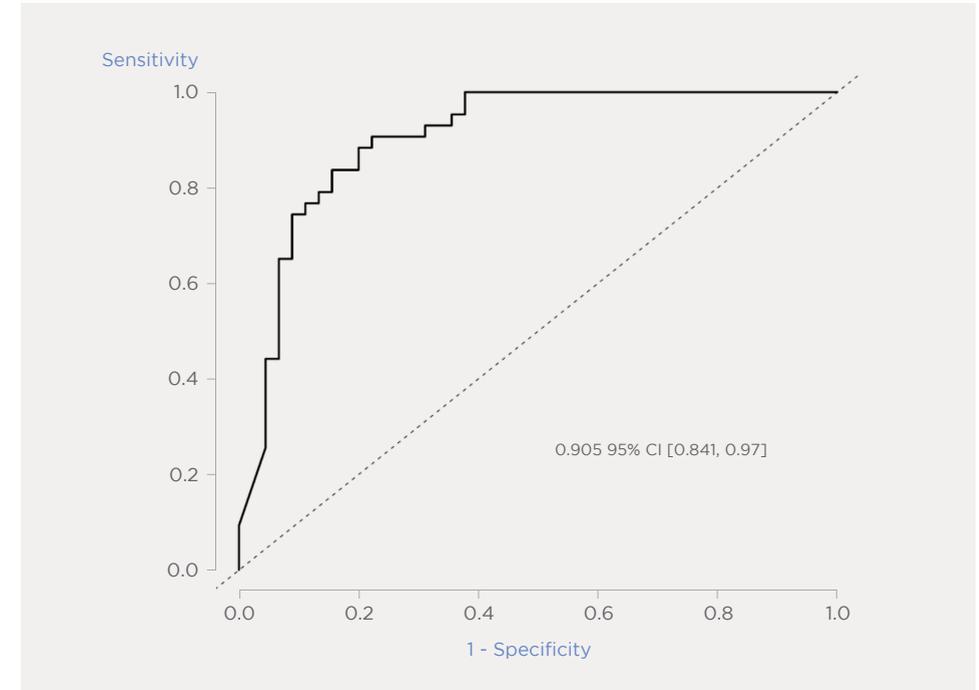
Representación del valor predictivo de los niveles de kisspeptinas en suero como posible marcador diagnóstico de gestación ectópica.



La curva ROC, o prueba de rendimiento diagnóstico, para los valores de kisspeptinas circulantes en sangre de las pacientes diagnosticadas de gestación ectópica, realizada con los datos extraídos, se muestra a continuación (figura 26).

Figura 26

Curva ROC de los niveles plasmáticos de kisspeptinas como prueba diagnóstica para gestación ectópica.



El área bajo la curva calculada (AUC) muestra un valor de 0.905 con 95% CI [0.841, 0.97], lo que sugiere que los niveles de kisspeptinas circulantes en sangre podrían ser empleados como método diagnóstico de gestación ectópica con buen rendimiento.

Tentativamente, se realizó una aproximación a posibles valores de corte de estos niveles de kisspeptinas circulantes, que pudieran emplearse para el diagnóstico de esta patología.

Valores de kisspeptinas en sangre inferiores a 150 pmol/l tendrían una S = 80% y una E = 83%, con un VPP = 0.83 y un VPN = 0.8. Si aumentamos a valores inferiores a 200 pmol/ml, obtendríamos una S = 73% y una E = 95%, con un VPP = 0.94 y un VPN = 0.75.

5 Discusión

Las gestaciones ectópicas tubáricas suponen 1-2% del total de embarazos y siguen siendo una de las causas principales de muerte relacionada con el embarazo en el primer trimestre en los países desarrollados¹. La gestación ectópica tubárica es también causa de morbilidad materna: a corto plazo, encontramos dolor pélvico, necesidad de transfusión sanguínea y complicaciones derivadas del tratamiento. A largo plazo, puede tener efectos sobre la fertilidad, que dependen tanto de las características clínicas del embarazo ectópico como del tratamiento elegido².

Se trata de una de las pocas situaciones clínicas en las que el manejo, en función de la presentación clínica de la misma, puede ser expectante o activo, a su vez mediante tratamiento médico o mediante cirugía.

Aunque no se conoce su número con exactitud, es sabido que algunas gestaciones ectópicas se resuelven espontáneamente, a menudo sin grandes manifestaciones clínicas. Por tanto, el manejo expectante es una opción en casos muy seleccionados: mujeres clínicamente estables, asintomáticas, con niveles decrecientes de gonadotropina coriónica humana (β hCG) por debajo de las 1000 UI/ml, sin imagen ecográfica concluyente y que sean capaces de seguir el protocolo de visitas con un tiempo de acceso al hospital razonable en caso de posibles complicaciones.

Al tratarse de una entidad potencialmente letal, el tratamiento quirúrgico siempre ha sido el gold standard. Afortunadamente, los avances en la detección precoz en los años 80 (principalmente gracias al manejo de la ecografía y las determinaciones séricas de β hCG) permitieron la introducción del metotrexato como terapia médica, abriendo la puerta al manejo conservador de esta patología en casos seleccionados.

El tratamiento médico se basa en el empleo de agentes que farmacológicamente inducen el aborto tubárico o que disgregan la gestación ectópica en crecimiento. Una dosis única (o un régimen de múltiples dosis) de metotrexato, un antagonista del ácido fólico, ha sido el tratamiento habitual para estos casos, con amplia experiencia durante los últimos 25 años³. Este tratamiento correctamente aplicado en pacientes seleccionadas presenta tasas de éxito en el 90% de los casos¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

Los resultados, en términos de efectividad y tasas de fertilidad posterior, son similares al tratamiento quirúrgico, siempre hablando de salpingostomía (incisión longitudinal en la trompa

afectada y extracción del saco gestacional), sin aumentar el riesgo de rotura tubárica y sin afectación de la reserva ovárica.

No obstante, también las pacientes subsidiarias de tratamiento médico deben estar bien seleccionadas y cumplir una serie de requisitos para aumentar las posibilidades de éxito del tratamiento, entre los que se incluyen: tamaño ecográfico de la gestación menor de 3-4 cm, niveles de gonadotropina coriónica humana (β hCG) por debajo de las 5000 UI/ml, ausencia de latido fetal, estabilidad hemodinámica y, por supuesto, cumplidoras con el régimen de visitas de seguimiento con un tiempo de acceso a las urgencias hospitalarias rápido en caso de complicación.

A pesar de una correcta selección de las pacientes subsidiarias de tratamiento médico, hasta un 15% van a precisar de más de una dosis de metotrexato y hasta el 75% referirán dolor abdominal moderado o severo, además de los posibles efectos secundarios de esta medicación por afectación de otros órganos (conjuntivitis, estomatitis y molestias gastrointestinales). Aun teniendo en cuenta sus altas tasas de efectividad, hay que recordar que el porcentaje de pacientes que sufren una rotura tubárica tras haber instaurado el tratamiento médico alcanza el 7%, precisando asistencia médica y quirúrgica urgente.²⁰¹⁻²⁰³

Si hablamos de tratamiento quirúrgico, la salpingectomía laparoscópica es el tratamiento quirúrgico de elección, debido al riesgo teórico de recurrencia en una trompa dañada. Se puede plantear, consensuado con la paciente, la salpingostomía, en el caso de anomalías en la trompa contralateral y deseo genésico no cumplido².

Ya sea expectante, médico o quirúrgico, es importante que la decisión de tratamiento se instaure lo antes posible para reducir la morbilidad y mortalidad asociada. Sin embargo, el diagnóstico de la gestación ectópica tubárica (actualmente mediante la combinación de la imagen ecográfica y la determinación de β hCG sérica) sigue siendo un problema, resultando a menudo en un retraso del inicio del tratamiento. Menos del 50% de los casos se diagnostican en la primera consulta⁵.

A pesar de los avances en las técnicas de imagen, la ecografía es no concluyente hasta en un 18% de los casos, en los que el control seriado de β hCG e imagen es necesario para orientar el manejo. Pero existen ciertas dificultades, ya que la determinación hormonal seriada no puede diferenciar si la gestación, aunque evolutiva, se encuentra intraútero o en la trompa. Por otro lado, niveles

descendentes en la concentración de hCG no permiten discriminar entre un aborto en una gestación intrauterina o una gestación ectópica. Además, ocasionalmente se puede necesitar recurrir a la laparoscopia para confirmar el diagnóstico, no sin riesgo para la paciente. Las inevitables múltiples visitas y los exámenes necesarios suponen un gran gasto para los servicios sanitarios.

Debido al elevado número de visitas clínicas a que han de someterse las mujeres con embarazo ectópico, y al alto número de complicaciones producidas en los embarazos ectópicos, ya sea por la rotura del mismo (la posible hemorragia asociada sigue siendo la principal causa de mortalidad en el primer trimestre de embarazo) o por el uso de la cirugía como método de confirmación diagnóstica y de tratamiento, resulta necesario encontrar un método diagnóstico no invasivo que permita realizar un diagnóstico precoz del embarazo ectópico.

Diferenciar la gestación normal de la anómala y conocer la causa fundamental de la misma y los mecanismos por los que se produce es todavía, a día de hoy, un desafío clínico. Sería por tanto conveniente el estudio y evaluación de perfiles de expresión tisulares y potencialmente bioquímicos en el torrente materno para el diagnóstico certero y precoz de esta patología, evitándose de esta manera accidentes o intervenciones quirúrgicas innecesarias.

En los últimos años, se han identificado más de 20 marcadores séricos como potenciales candidatos para la detección precoz de esta patología, facilitando la instauración rápida de tratamiento y reduciendo los costes sanitarios. Como se ha comentado ampliamente en la introducción de este trabajo, se han propuesto ciertos marcadores, con utilidad limitada, moléculas que pueden diferenciar un ectópico tubárico de una gestación viable intrauterina, pero no de una gestación no viable (aborto) u otros marcadores que han mostrado resultados contradictorios, por lo que no se ha llegado a emplear ninguno en la práctica clínica habitual⁵⁸.

La utilidad clínica de estos marcadores es limitada debido a la variedad de resultados, sobre todo por limitaciones en el diseño de los estudios. En muchos de ellos, la cohorte examinada era demasiado pequeña y la prevalencia de gestación ectópica en la población de estudio no era constante. En otros, los pacientes no fueron correctamente emparejados por edad gestacional, lo que refleja la dificultad de calcular ésta en los embarazos ectópicos. Algunos de los marcadores incluso limitaron su propio uso, al no seguir un patrón identificable durante la gestación normal (incrementando o disminuyendo)⁵⁸.

Es por todo ello que, para tener un impacto significativo en las tasas de mortalidad y morbilidad asociadas a la gestación ectópica, necesitamos un marcador que sea precisa y rápidamente analizado, preferentemente en el contexto de un laboratorio de urgencia. Además, esta prueba debería tener un bajo coste para tener una verdadera utilidad clínica.

Al tiempo que la búsqueda de marcadores precoces para la predicción de resultados en los casos de gestación de localización desconocida avanza, surgen nuevos retos. Para empezar, la mayoría de marcadores que han sido estudiados pueden variar con la edad gestacional. La datación gestacional puede ser difícil de establecer con precisión en un escenario de seguimiento prospectivo, y puede ser desconocida hasta en un 10% de las pacientes que consultan con síntomas de gestación inicial. Esta variable quizá deba ser tenida en cuenta para la aplicación de estas pruebas en la práctica clínica. Como posible solución, incluir marcadores independientes de la edad gestacional, como ciertos microRNAs, podría ser útil ²⁰⁴.

En segundo lugar, se debe considerar el impacto de otros procesos patofisiológicos ligados al embarazo, como los trastornos hipertensivos y las aneuploidías, y como pueden interferir en los resultados y su interpretación.

Además, algunos marcadores, como la progesterona, podrían estar alterados en un embarazo obtenido mediante técnicas de reproducción asistida. Por tanto, cualquier herramienta clínica debería ser validada de forma separada en este subgrupo.

La introducción de un marcador precoz de gestación ectópica podría suponer un cambio dramático en el manejo clínico de esta entidad. Existen en este momento un gran número de sustancias candidatas a ser uno de estos marcadores en mujeres con sospecha de gestación ectópica o aquellas con gestación de localización incierta. Un panel de marcadores exitoso probablemente surgirá de la combinación de diversas vías biológicas, suplementadas con algún marcador no sesgado. También parece probable que estos paneles contendrán marcadores que puedan orientar sobre la viabilidad de la gestación o sobre la localización de la implantación. Por tanto, estas pruebas puede que acaben no sólo indicando la localización y la viabilidad del embarazo, sino también, que identifiquen cuáles se van a beneficiar de un manejo expectante, médico o quirúrgico.

Sin embargo, ninguno de los marcadores comentados previamente en la introducción de este trabajo está listo para el uso clínico y necesitan ser validados mediante estudios prospectivos de cohortes representativos de gestaciones ectópicas, gestaciones viables y no viables intrauterinas y gestaciones de localización incierta en resolución. Aunque se ha avanzado mucho en el descubrimiento y validación de nuevos marcadores en este campo, todavía queda mucho por hacer antes que un marcador pueda ser empleado de forma rutinaria en la práctica clínica.

Quizá la sustancia que ha mostrado resultados más alentadores y que se ha incorporado de forma más o menos regular a la práctica clínica ha sido la progesterona, debido a sus valores estables e independientes de la edad gestacional durante el primer trimestre, siendo estos menores en gestaciones ectópicas o abortos ²⁰⁵. En cualquier caso, a día de hoy, todo método propuesto para el diagnóstico precoz de la gestación ectópica debe ser usado en combinación con otros biomarcadores ^{206,207}.

Se trata de un campo de estudio que todavía ofrece muchas posibilidades, ya que actualmente se encuentran en progreso diversos estudios para identificar nuevos marcadores, como muestran recientes publicaciones respecto a la calponina 2 sérica ²⁰⁸ o el estudio AMBER (Assesment of Biomarkers in Ectopic Pregnancy) ²⁰⁹, que pretende identificar un panel diagnóstico basado en microRNA y el microbioma.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el sistema KISS1/GPR54 para ver su implicación en los periodos iniciales de la implantación en humanos y estudiar la determinación de los niveles de kisspeptinas en suero como marcador precoz del embarazo ectópico para utilizarse como ayuda clínica diagnóstica.

Para ello se analizó la expresión del KISS-1 en tejido placentario de diferentes semanas de gestación de embarazos ectópicos durante la etapa precoz del embarazo, y se comparó con la expresión de KISS-1 en tejido placentario de embarazos normales, también durante las primeras semanas del embarazo.

Se eligieron interrupciones voluntarias del embarazo (IVEs) como controles ya que se trataba de gestaciones viables, con un tejido trofoblástico en crecimiento teóricamente sano, eliminando de esta manera factores externos como tóxicos, enfermedades cromosómicas, trombofilias no

diagnosticadas, etc., que podrían ser la causa subyacente, por ejemplo, de los abortos espontáneos, en los que las diferencias observadas podrían deberse a diferencias en la viabilidad del tejido y no a la implantación anómala, como ocurre en el caso del embarazo ectópico.⁵⁷

Aunque algunos estudios han demostrado con anterioridad la expresión diferencial de genes en las trompas de Falopio de pacientes con embarazo ectópico⁵⁷, ninguno de ellos ha empleado tejido embrionario de interrupciones voluntarias del embarazo (IVEs) como controles hasta la fecha.

Como objetivo primario se planteó realizar un análisis de los niveles de expresión de ARN mensajero de KISS1 en tejido placentario de primer trimestre de gestaciones intrauterinas normoevolutivas y de gestaciones ectópicas, para posteriormente compararlas.

Los resultados de este estudio muestran, de forma novedosa, que la expresión del KISS-1 en el tejido trofoblástico humano se encuentra reducida en el embarazo ectópico en comparación con los embarazos de evolución normal. Por lo tanto, se confirma que el sistema KISS-1/GPR54 presenta un papel importante en la regulación de la implantación trofoblástica normal.

Asimismo, como segundo objetivo se analizaron los niveles séricos de kisspeptinas en suero durante diferentes semanas de gestación de embarazos ectópicos también en la etapa precoz del embarazo, y se compararon con los niveles séricos en embarazos normales durante las primeras semanas del embarazo.

En la población femenina, el incremento de kisspeptinas circulantes a lo largo del embarazo se ha publicado previamente en la literatura²¹⁰, llegando a alcanzar hasta niveles 200 veces mayores en tercer trimestre de gestación comparado con mujeres no gestantes²¹¹. Tentativamente, se habla de niveles que rondan los 1000 pmol/ml en primer trimestre en gestaciones normoevolutivas, existiendo una correlación positiva con otras hormonas de síntesis placentaria como el lactógeno placentario, el estradiol y la progesterona, no así con la β hCG.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los niveles séricos de kisspeptinas son significativamente menores en los embarazos ectópicos, comparado con los embarazos normales. En este estudio no se ha correlacionado estos valores con otras determinaciones séricas, como por ejemplo los niveles de β hCG, ya que se trataba de una primera aproximación del sistema KISS1 / kisspeptinas en la gestación ectópica, pero podría ser un proyecto interesante de cara al futuro.

De confirmarse la hipótesis a estudio planteada, era interesante de forma secundaria caracterizar las posibilidades de los valores de kisspeptinas circulantes como herramienta diagnóstica en esta patología.

Los hallazgos de una reducción significativa tanto en los niveles de expresión del KISS1 como de secreción de kisspeptinas en el embarazo ectópico respecto a la gestación normal, son coincidentes con las investigaciones publicadas sobre el sistema KISS-1 /GPR54 y las kisspeptinas en abortos, en los que se han observado unos niveles más bajos que en gestaciones control normales, hasta el punto de que se ha planteado utilizar los niveles séricos de kisspeptinas como marcadores de viabilidad embrionaria, y así poder establecer un pronóstico sobre la gestación ya de forma precoz al identificar los casos con elevado riesgo de aborto²¹¹. Otras investigaciones también han demostrado una disminución de expresión de KISS-1 en aquellas mujeres con abortos de repetición²¹².

El estudio de Jayasena propone un valor predictivo de kisspeptinas menor a 1630 pmol/l como marcador diagnóstico de aborto²¹¹, ya que las pacientes que sufren abortos muestran niveles menores en sangre de esta molécula de hasta el 60% al comparar con gestaciones de evolución normal.

En este caso, se planteó la posibilidad de un punto de corte en los valores de kisspeptinas circulantes en sangre que implique un alto valor predictivo del diagnóstico de gestación ectópica para así establecer su seguimiento y tratamiento precoz en caso de confirmación diagnóstica.

Ante los resultados presentados previamente, mostrando una curva ROC con una área bajo la curva (AUC) igual a 0.905, resulta razonable plantear que los niveles de kisspeptinas circulantes podrían suponer un test diagnóstico con una capacidad aceptable de discriminar pacientes con y sin gestación ectópica.

Como se ha mostrado en los resultados, la probabilidad de presentar una gestación viable intrauterina con niveles de kisspeptinas circulantes en sangre inferiores a 400 pmol/l, independientemente de la edad gestacional, es muy baja.

En una gestación incipiente, y como se extrae de los resultados obtenidos, valores de kisspeptinas en sangre inferiores a 150 pmol/l tendrían una S = 80% y una E = 83%, con un VPP = 0.83 y un

VPN = 0.8. Si aumentamos este umbral a 200 pmol/ml, obtendríamos una S = 73% y una E = 95%, con un VPP = 0.94 y un VPN = 0.75.

La limitación en la interpretación de estos datos y su integración en la práctica clínica viene dada por otras patologías de la placentación que se han estudiado en la literatura y que implican también bajos niveles de kisspeptinas séricas al inicio del embarazo, como son los abortos espontáneos y las preeclampsias. Esto plantea una interesante línea de investigación futura, abriendo la posibilidad de estudios comparativos entre estas patologías.

Poder introducir la medición sérica de kisspeptinas en el algoritmo diagnóstico de embarazo ectópico es, si cabe, aún más interesante clínicamente por las posibilidades de desenlace fatal de las gestaciones extrauterinas. Sin embargo, estudios posteriores deberían ser capaces de discernir entre dos evoluciones desfavorables, el aborto y el embarazo ectópico, ya que el segundo conlleva mucho mayor riesgo clínico. Del mismo modo, el manejo y la toma de decisiones difiere entre las dos posibles entidades clínicas, de ahí la importancia de una herramienta precoz de diagnóstico.

Adicionalmente, también se han reportado niveles disminuidos de kisspeptinas en las mujeres con preeclampsia, en comparación con mujeres sin embarazos complicados^{211,213,214}. Estos descubrimientos, en su conjunto, apoyan la teoría de que las kisspeptinas presentan un papel fundamental en la invasión trofoblástica, que una disminución en plasma de los mismos podría significar un defecto en la invasión e implantación trofoblástica, y que por tanto podrían utilizarse como marcadores de diagnóstico precoz de complicaciones en las mismas.

Además, la expresión de KISS-1 en la placenta en las primeras fases del embarazo también se han relacionado con una restricción en el crecimiento intrauterino²¹³ y con el nacimiento de recién nacidos pequeños para la edad gestacional²¹⁵.

Por otro lado, quizá el papel de la expresión del KISS1 y las kisspeptinas no se encuentre en su uso como marcador único discriminatorio de la gestación intrauterina de evolución normal versus la gestación de localización ectópica, sino como un elemento más a integrar con el conjunto de las herramientas actuales del diagnóstico del embarazo extrauterino. Los niveles de kisspeptinas, combinados con los datos de los hallazgos ecográficos, los niveles de β hCG y con

los niveles de progesterona, quizá proporcionarían mayor información diagnóstica en estadios más precoces de la gestación combinándose que al emplearse por separado.

Como ya ha sido descrito en otras publicaciones, que corroboran estos resultados, la expresión de KISS-1 mRNA y los niveles de kisspeptidos en suero aumentan semana tras semana en las gestaciones normales durante el primer trimestre^{100,151,172,216}.

Por ello se postula que la medición de kisspeptinas en sangre materna durante el primer trimestre de embarazo podría utilizarse como marcador precoz de embarazo ectópico.

A pesar de haberse encontrado en este estudio una disminución significativa, tanto en la expresión de KISS-1 en el tejido embrionario como en los niveles séricos de kisspeptinas, en aquellas mujeres con embarazo ectópico, el número de pacientes utilizado en este estudio es limitado. Por ello, se hacen necesarios estudios prospectivos con un mayor número de pacientes, además de realizar una validación externa de los resultados, procedentes de servicios externos al Hospital Politécnico y Universitario La Fe.

Por otro lado, la expresión de KISS-1 y los niveles de kisspeptinas no se han comparado con los niveles de β HCG en el embarazo ectópico en este trabajo. El sumatorio de ambos marcadores podría aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico y esta es una hipótesis que se debería contrastar en estudios futuros.

Otra limitación es la dificultad de extracción del tejido embrionario para obtener el RNA. Con frecuencia, los ectópicos son una amalgama de coágulos, fragmentos de la trompa de Falopio y tejido embrionario. Por este motivo, resulta muy laboriosa la separación del tejido embrionario del resto de tejidos y en ocasiones es difícil discernir si el tejido obtenido es materno o embrionario. En este estudio, sin embargo, se tomaron todas las precauciones para evitar la contaminación materna en las muestras analizadas.

En la misma línea de obtención de muestras, obtener ARN intacto, de alta calidad es la primera etapa y a menudo la más crítica para realizar muchos experimentos fundamentales en biología molecular. Extraer ARN no siempre es sencillo, se trata de una molécula menos estable que el ADN y la presencia de contaminantes como ARNasas, proteínas, polisacáridos y ADN genómico

pueden desafiar su obtención²¹⁷. Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de estos contaminantes puede interferir con la amplificación posterior de los ácidos nucleicos²¹⁸.

De todos modos, desde el punto de vista clínico, son más interesantes los estudios en suero, y utilizando la medición de las kisspeptinas como marcadores precoces de la existencia de un embarazo ectópico, ya que el análisis de la expresión de Kiss-1 mRNA en tejido embrionario sería un procedimiento mucho más invasivo y costoso, sin interés clínico.

De todos modos, el uso de los niveles de kisspeptinas en sangre periférica como marcador del embarazo ectópico podrá tener utilidad si somos capaces de detectarlos en épocas más precoces de la gestación y de notar las diferencias entre los embarazos normales y los embarazos ectópicos. Esto es, detectar los niveles de kisspeptinas antes de la semana 6 de gestación. La razón es obvia, ya que la ecografía sería una prueba diagnóstica mucho más eficiente a partir de la semana 6-7 de embarazo. Los datos hallados en este estudio no animan a ser demasiado optimistas, pues es a partir de la semana 7 cuando se hallan diferencias más importantes. Pero, como hemos apuntado anteriormente, hace falta aumentar el número de pacientes en nuestros estudios para sacar conclusiones definitivas y, quizás, desarrollar métodos de detección (RIAs) específicos para algunas fracciones de kisspéptidos que sean más sensibles y detectables en etapas más precoces de la gestación.

En resumen, hemos encontrado un patrón diferencial de expresión de KISS-1 RNA en tejidos embrionarios derivados de gestaciones eutópicas y ectópicas, y hemos identificado como biomarcador candidato su producto de expresión, las kisspeptinas, que podrían estar implicadas en los procesos de implantación y placentación tempranas, aunque el significado y aplicación real de estos resultados en la práctica clínica habitual en el manejo de las gestaciones ectópicas es todavía desconocido.

6

Conclusiones tesis

1. La expresión de KISS1 en tejido trofoblástico difiere en las gestaciones ectópicas respecto a las gestaciones intrauterinas normoevolutivas, siendo significativamente inferior.

2. Los niveles séricos circulantes de kisspeptinas, su producto, son también significativamente inferiores en embarazos ectópicos comparados con los embarazos normales.

3. Los niveles de kisspeptinas circulantes en sangre podrían ser empleados como método diagnóstico de gestación ectópica con buen rendimiento.

4. Niveles menores de kisspeptinas séricas se correlacionan con una mayor probabilidad de que nos encontremos ante una gestación ectópica.

7 Bibliografía

1. Hasan, R. *et al.* Patterns and predictors of vaginal bleeding in the first trimester of pregnancy. *Ann Epidemiol* **20**, 524–531 (2010).
2. Hoover, K. W., Tao, G. & Kent, C. K. Trends in the diagnosis and treatment of ectopic pregnancy in the United States. *Obs. Gynecol* **115**, 495–502 (2010).
3. Botella Llusia, Jose; Clavero Núñez, J. A. *Tratado de Ginecología*. (Ediciones Díaz de santos, 1993).
4. Barnhart, K. T. Clinical practice. Ectopic pregnancy. *N Engl J Med* **361**, 379–387 (2009).
5. Barnhart, K. *et al.* Prompt diagnosis of ectopic pregnancy in an emergency department setting. *Obs. Gynecol* **84**, 1010–1015 (1994).
6. Nyberg, D. A. *et al.* Early gestation: correlation of HCG levels and sonographic identification. *AJR Am J Roentgenol* **144**, 951–954 (1985).
7. Kadar, N., DeVore, G. & Romero, R. Discriminatory hCG zone: its use in the sonographic evaluation for ectopic pregnancy. *Obs. Gynecol* **58**, 156–161 (1981).
8. Peisner, D. B. & Timor-Tritsch, I. E. The discriminatory zone of beta-hCG for vaginal probes. *J Clin Ultrasound* **18**, 280–285 (1990).
9. Romero, R. *et al.* Diagnosis of ectopic pregnancy: value of the discriminatory human chorionic gonadotropin zone. *Obs. Gynecol* **66**, 357–360 (1985).
10. Banerjee, S., Aslam, N., Zosmer, N., Woelfer, B. & Jurkovic, D. The expectant management of women with early pregnancy of unknown location. *Ultrasound Obs. Gynecol* **14**, 231–236 (1999).
11. Barnhart, K. T. Early pregnancy failure: beware of the pitfalls of modern management. *Fertil Steril* **98**, 1061–1065 (2012).
12. Beer, L. A., Tang, H. Y., Sriswasdi, S., Barnhart, K. T. & Speicher, D. W. Systematic discovery of ectopic pregnancy serum biomarkers using 3-D protein profiling coupled with label-free quantitation. *J Proteome Res* **10**, 1126–1138 (2011).
13. ACOG Practice Bulletin No. 94: Medical management of ectopic pregnancy. *Obs. Gynecol* **111**, 1479–1485 (2008).
14. de Sá de Oliveira Aline, García Andrea, S. D. Embarazo ectópico abdominal: Dificultad en el diagnóstico. A propósito de un caso. *Rev Obs. Ginecol Venez* **76**, 295–299 (2016).
15. Marion, L. L. & Meeks, G. R. Ectopic pregnancy: History, incidence, epidemiology, and risk factors. *Clin. Obstet. Gynecol.* **55**, 376–386 (2012).
16. Walker, J. J. Ectopic pregnancy. *Clin Obs. Gynecol* **50**, 89–99 (2007).
17. Varma, R. & Gupta, J. Tubal ectopic pregnancy. *Clin Evid* **2009**, (2009).
18. Nkusu Nunyalulendho, D. & Einterz, E. M. Advanced abdominal pregnancy: case report and review of 163 cases reported since 1946. *Rural Remote Health* **8**, 1087 (2008).
19. Nama, V. & Manyonda, I. Tubal ectopic pregnancy: diagnosis and management. *Arch Gynecol Obs.* **279**, 443–453 (2009).
20. Goffin, F. *et al.* Evidence of a limited contribution of fetomaternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway. *Tissue Antigens* **62**, 104–116 (2003).
21. Vassiliadou, N. & Bulmer, J. N. Characterization of tubal and decidual leukocyte populations in ectopic pregnancy: evidence that endometrial granulated lymphocytes are absent from the tubal implantation site. *Fertil Steril* **69**, 760–767 (1998).
22. Laskarin, G. *et al.* Phenotype of NK cells and cytotoxic/apoptotic mediators expression in ectopic pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **64**, 347–358 (2010).

- 23.** Kemp, B. *et al.* Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochem Cell Biol* **117**, 401–414 (2002).
- 24.** Emmer, P. M. *et al.* Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* **17**, 1072–1080 (2002).
- 25.** von Rango, U., Classen-Linke, I., Kertschanska, S., Kemp, B. & Beier, H. M. Effects of trophoblast invasion on the distribution of leukocytes in uterine and tubal implantation sites. *Fertil Steril* **76**, 116–124 (2001).
- 26.** Kemp, B. *et al.* Different placentation patterns in viable compared with nonviable tubal pregnancy suggest a divergent clinical management. *Am J Obs. Gynecol* **181**, 615–620 (1999).
- 27.** Saito, S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* **52**, 15–33 (2001).
- 28.** Hess, A. P. *et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* **76**, 102–117 (2007).
- 29.** Earl, U., Wells, M. & Bulmer, J. N. The expression of major histocompatibility complex antigens by trophoblast in ectopic tubal pregnancy. *J Reprod Immunol* **8**, 13–24 (1985).
- 30.** Turco, M. Y. & Moffett, A. Development of the human placenta. *Development* **146**, (2019).
- 31.** Corpa, J. M. Ectopic pregnancy in animals and humans. *Reproduction* **131**, 631–640 (2006).
- 32.** Lyons, R. A., Saridogan, E., Djahanbakhch, O. & Jansen, R. P. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum. Reprod. Update* **12**, 525–551 (2006).
- 33.** Knoll, M., Shaoulain, R., Magers, T. & Talbot, P. Ciliary beat frequency of hamster oviducts is decreased in vitro by exposure to solutions of mainstream and sidestream cigarette smoke. *Biol. Reprod.* **53**, 29–37 (1995).
- 34.** McGee, Z. A. *et al.* Gonococcal infection of human fallopian tube mucosa in organ culture: relationship of mucosal tissue TNF-alpha concentration to sloughing of ciliated cells. *Sex. Transm. Dis.* **26**, 160–165 (1999).
- 35.** Popescu, L. M., Ciontea, S. M. & Cretoiu, D. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1101**, 139–165 (2007).
- 36.** Dixon, R. E. *et al.* Chlamydia infection causes loss of pacemaker cells and inhibits oocyte transport in the mouse oviduct. *Biol. Reprod.* **80**, 665–673 (2009).
- 37.** Refaat, B., Al-Azemi, M., Geary, I., Eley, A. & Ledger, W. Role of activins and inducible nitric oxide in the pathogenesis of ectopic pregnancy in patients with or without Chlamydia trachomatis infection. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 1493–1503 (2009).
- 38.** Gawronska, B., Paukku, T., Huhtaniemi, I., Wasowicz, G. & Ziecik, A. J. Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig Fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. *J. Reprod. Fertil.* **115**, 293–301 (1999).
- 39.** Velasquez, L. A., Aguilera, J. G. & Croxatto, H. B. Possible role of platelet-activating factor in embryonic signaling during oviductal transport in the hamster. *Biol. Reprod.* **52**, 1302–1306 (1995). **52**, 1302–1306 (1995).
- 40.** Jabbour, H. N., Sales, K. J., Catalano, R. D. & Norman, J. E. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* **138**, 903–919 (2009).
- 41.** Mor, G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1127**, 121–128 (2008).
- 42.** Koga, K. & Mor, G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. *Reprod. Sci.* **15**, 231–242 (2008).
- 43.** Shaw, J. L. V *et al.* Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. *Fertil. Steril.* **94**, 1601–8.e1 (2010).
- 44.** Shaw, J. L. V *et al.* Cotinine exposure increases Fallopian tube PROKR1 expression via nicotinic AChR α -7: a potential mechanism explaining the link between smoking and tubal ectopic pregnancy. *Am. J. Pathol.* **177**, 2509–2515 (2010).
- 45.** Fouladi-Nashta, A. A. *et al.* Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev. Biol.* **281**, 1–21 (2005).
- 46.** Li, R., Hartley, L. & Robb, L. Cloning of rat interleukin 11 and interleukin 11 receptor alpha chain and analysis of their expression in rat uterus in the peri-implantation period. *Reproduction* **122**, 593–600 (2001).
- 47.** Evans, J. *et al.* Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 2165–2175 (2009).
- 48.** Hvid, M. *et al.* Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during Chlamydia trachomatis infection. *Cell. Microbiol.* **9**, 2795–2803 (2007).
- 49.** Savaris, R. F., da Silva, L. C., Moraes Gda, S. & Edelweiss, M. I. Expression of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril* **89**, 1015–1017 (2008).
- 50.** Horne, A. W. *et al.* Placental growth factor: a promising diagnostic biomarker for tubal ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, E104-8 (2011).
- 51.** Cartwright, J. E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A. E. & James, J. L. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction* **140**, 803–813 (2010).
- 52.** Croy, B. A. *et al.* Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. *J Reprod Immunol* **59**, 175–191 (2003).
- 53.** Tabiasco, J. *et al.* Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review. *Placenta* **27 Suppl A**, S34-9 (2006).
- 54.** JL, S. *et al.* Chlamydia trachomatis infection increases fallopian tube PROKR2 via TLR2 and NF κ B activation resulting in a microenvironment predisposed to ectopic pregnancy. *Am. J. Pathol.* **178**, 253–260 (2011).
- 55.** S, U. *et al.* Identification of estrogen receptor beta-positive intraepithelial lymphocytes and their possible roles in normal and tubal pregnancy oviducts. *Hum. Reprod.* **21**, 2281–2289 (2006).
- 56.** Robson, S. J. & O'Shea, R. T. Undiagnosed ectopic pregnancy: a retrospective analysis of 31 'missed' ectopic pregnancies at a teaching hospital. *Aust N Z J Obs. Gynaecol* **36**, 182–185 (1996).
- 57.** Brown, J. K. & Horne, A. W. Laboratory models for studying ectopic pregnancy. *Curr Opin Obs. Gynecol* **23**, 221–226 (2011).
- 58.** Senapati, S. & Barnhart, K. T. Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril* **99**, 1107–1116 (2013).
- 59.** Rothman, N., Stewart, W. F. & Schulte, P. A. Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4**, 301–311 (1995).
- 60.** Pepe, M. S. *et al.* Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1054–1061 (2001).
- 61.** McMichael, A. J. & Hall, A. J. The use of biological markers as predictive early-outcome measures in epidemiological research. *IARC Sci Publ* 281–289 (1997).
- 62.** Hall, J. A., Brown, R. & Paul, J. An exploration into study design for biomarker identification: issues and recommendations. *Cancer Genomics Proteomics* **4**, 111–119 (2007).
- 63.** Bonassi, S., Neri, M. & Puntoni, R. Validation of

biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res* **480–481**, 349–358 (2001).

64. Barnhart, K. *et al.* Decline of serum human chorionic gonadotropin and spontaneous complete abortion: defining the normal curve. *Obs. Gynecol* **104**, 975–981 (2004).

65. Morse, C. B. *et al.* Performance of human chorionic gonadotropin curves in women at risk for ectopic pregnancy: exceptions to the rules. *Fertil Steril* **97**, 101–6 e2 (2012).

66. Condous, G., Lu, C., Van Huffel, S. V., Timmerman, D. & Bourne, T. Human chorionic gonadotrophin and progesterone levels in pregnancies of unknown location. *Int J Gynaecol Obs.* **86**, 351–357 (2004).

67. Condous, G. *et al.* Prediction of ectopic pregnancy in women with a pregnancy of unknown location. *Ultrasound Obs. Gynecol* **29**, 680–687 (2007).

68. Barnhart, K. T. *et al.* Does a prediction model for pregnancy of unknown location developed in the UK validate on a US population? *Hum Reprod* **25**, 2434–2440 (2010).

69. Cole, L. A. Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta* **31**, 653–664 (2010).

70. Sutton-Riley, J. M., Khanlian, S. A., Byrn, F. W. & Cole, L. A. A single serum test for measuring early pregnancy outcome with high predictive value. *Clin Biochem* **39**, 682–687 (2006).

71. Sasaki, Y., Ladner, D. G. & Cole, L. A. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures. *Fertil Steril* **89**, 1781–1786 (2008).

72. Bearfield, C., Jauniaux, E., Groome, N., Sargent, I. L. & Muttukrishna, S. The secretion and effect of inhibin A, activin A and follistatin on first-trimester trophoblasts in vitro. *Eur J Endocrinol* **152**, 909–916 (2005).

73. Florio, P. *et al.* Single serum activin a testing to predict ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 1748–1753 (2007).

74. Rausch, M. E. *et al.* Development of a multiple marker test for ectopic pregnancy. *Obs. Gynecol* **117**, 573–582 (2011).

75. Warrick, J. *et al.* Serum activin A does not predict ectopic pregnancy as a single measurement test, alone or as part of a multi-marker panel including progesterone and hCG. *Clin Chim Acta* **413**, 707–711 (2012).

76. Kirk, E. *et al.* The use of serum inhibin A and activin A levels in predicting the outcome of ‘pregnancies of unknown location’. *Hum Reprod* **24**, 2451–2456 (2009).

77. Nicolaides, K. H., Spencer, K., Avgidou, K., Faiola, S. & Falcon, O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obs. Gynecol* **25**, 221–226 (2005).

78. Bischof, P., Reyes, H., Herrmann, W. L. & Sizonenko, P. C. Circulating levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and human chorionic gonadotrophin (hCG) in intrauterine and extrauterine pregnancies. *Br J Obs. Gynaecol* **90**, 323–325 (1983).

79. Mueller, M. D. *et al.* Novel placental and nonplacental serum markers in ectopic versus normal intrauterine pregnancy. *Fertil Steril* **81**, 1106–1111 (2004).

80. Dumps, P. *et al.* Accuracy of single measurements of pregnancy-associated plasma protein-A, human chorionic gonadotropin and progesterone in the diagnosis of early pregnancy failure. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* **100**, 174–180 (2002).

81. Ugurlu, E. N. *et al.* The value of vascular endothelial growth factor, pregnancy-associated plasma protein-A, and progesterone for early differentiation of ectopic pregnancies, normal intrauterine pregnancies, and spontaneous miscarriages. *Fertil Steril* **91**, 1657–1661 (2009).

82. Daponte, A. *et al.* The value of a single combined measurement of VEGF, glycodelin, progesterone, PAPP-A, HPL and LIF for differentiating between

ectopic and abnormal intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* **20**, 3163–3166 (2005).

83. Horne, C. H., Towler, C. M., Pugh-Humphreys, R. G., Thomson, A. W. & Bohn, H. Pregnancy specific beta1-glycoprotein—a product of the syncytiotrophoblast. *Experientia* **32**, 1197 (1976).

84. Tornehave, D. *et al.* Placental proteins in peripheral blood and tissues of ectopic pregnancies. *Gynecol Obs. Invest* **23**, 97–102 (1987).

85. Witt, B. R., Wolf, G. C., Wainwright, C. J., Johnston, P. D. & Thorneycroft, I. H. Relaxin, CA-125, progesterone, estradiol, Schwangerschaft protein, and human chorionic gonadotropin as predictors of outcome in threatened and nonthreatened pregnancies. *Fertil Steril* **53**, 1029–1036 (1990).

86. Lu, X., Lu, D., Scully, M. F. & Kakkar, V. V. Snake venom metalloproteinase containing a disintegrin-like domain, its structure-activity relationships at interacting with integrins. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* **3**, 249–260 (2005).

87. McLane, M. A., Sanchez, E. E., Wong, A., Paquette-Straub, C. & Perez, J. C. Disintegrins. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **4**, 327–355 (2004).

88. Huppertz, B., Bartz, C. & Kokozidou, M. Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* **37**, 509–517 (2006).

89. Spencer, K. & Cowans, N. J. ADAM12 as a marker of trisomy 18 in the first and second trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* **20**, 645–650 (2007).

90. Topping, N. *et al.* First trimester screening for trisomy 21 in gestational week 8–10 by ADAM12-S as a maternal serum marker. *Reprod Biol Endocrinol* **8**, 129 (2010).

91. Horne, A. W., Brown, J. K., Tong, S. & Kaitu'u-Lino, T. Evaluation of ADAM-12 as a diagnostic biomarker of ectopic pregnancy in women with a pregnancy of unknown location. *PLoS One* **7**, e41442 (2012).

92. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* (80-.). **294**, 853–858 (2001).

93. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-.). **294**, 862–864 (2001).

94. Takacs, P. *et al.* Placental mRNA in maternal plasma as a predictor of ectopic pregnancy. *Int J Gynaecol Obs.* **117**, 131–133 (2012).

95. Lo, Y. M. *et al.* Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* **13**, 218–223 (2007).

96. Ng, E. K. *et al.* mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4748–4753 (2003).

97. Zhao, Z. *et al.* Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem* **58**, 896–905 (2012).

98. Dominguez, F. *et al.* Embryonic miRNA profiles of normal and ectopic pregnancies. *PLoS One* **9**, (2014).

99. Lozoya, T. *et al.* The Lin28/Let-7 system in early human embryonic tissue and ectopic pregnancy. *PLoS One* **9**, (2014).

100. Romero-Ruiz, A. *et al.* Deregulation of miR-324/KISS1/kisspeptin in early ectopic pregnancy: mechanistic findings with clinical and diagnostic implications. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **220**, 480.e1–480.e17 (2019).

101. Qiao, C., Wang, C., Zhao, J., Liu, C. & Shang, T. Elevated expression of KISS-1 in placenta of Chinese women with early-onset preeclampsia. *PLoS One* **7**, e48937 (2012).

102. al-Sebai, M. A., Kingsland, C. R., Diver, M., Hipkin, L. & McFadyen, I. R. The role of a single progesterone measurement in the diagnosis of early pregnancy failure and the prognosis of fetal viability. *Br J Obs. Gynaecol* **102**, 364–369 (1995).

- 103.** Buck, R. H., Joubert, S. M. & Norman, R. J. Serum progesterone in the diagnosis of ectopic pregnancy: A valuable diagnostic test? *Fertil. Steril.* **50**, 752–755 (1988).
- 104.** Choe, J. K., Check, J. H., Nowroozi, K., Benveniste, R. & Barnea, E. R. Serum progesterone and 17-hydroxyprogesterone in the diagnosis of ectopic pregnancies and the value of progesterone replacement in intrauterine pregnancies when serum progesterone levels are low. *Gynecol Obs. Invest* **34**, 133–138 (1992).
- 105.** Dart, R., Dart, L., Segal, M., Page, C. & Brancato, J. The ability of a single serum progesterone value to identify abnormal pregnancies in patients with beta-human chorionic gonadotropin values less than 1,000 mIU/mL. *Acad Emerg Med* **5**, 304–309 (1998).
- 106.** Katsikis, I. *et al.* Receiver operator characteristics and diagnostic value of progesterone and CA-125 in the prediction of ectopic and abortive intrauterine gestations. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* **125**, 226–232 (2006).
- 107.** El Bishry, G. & Ganta, S. The role of single serum progesterone measurement in conjunction with beta hCG in the management of suspected ectopic pregnancy. *J Obs. Gynaecol* **28**, 413–417 (2008).
- 108.** Mol, B. W., Lijmer, J. G., Ankum, W. M., van der Veen, F. & Bossuyt, P. M. The accuracy of single serum progesterone measurement in the diagnosis of ectopic pregnancy: a meta-analysis. *Hum Reprod* **13**, 3220–3227 (1998).
- 109.** Treetampinich, C., O'Connor, A. E., MacLachlan, V., Groome, N. P. & de Kretser, D. M. Maternal serum inhibin A concentrations in early pregnancy after IVF and embryo transfer reflect the corpus luteum contribution and pregnancy outcome. *Hum Reprod* **15**, 2028–2032 (2000).
- 110.** Seifer, D. B., Lambert-Messerlian, G. M., Canick, J. A., Frishman, G. N. & Schneyer, A. L. Serum inhibin levels are lower in ectopic than intrauterine spontaneously conceived pregnancies. *Fertil Steril* **65**, 667–669 (1996).
- 111.** Segal, S. *et al.* Inhibin A: marker for diagnosis of ectopic and early abnormal pregnancies. *Reprod Biomed Online* **17**, 789–794 (2008).
- 112.** Rausch, M. E. *et al.* A disintegrin and metalloprotease protein-12 as a novel marker for the diagnosis of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **95**, 1373–1378 (2011).
- 113.** Carmeliet, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435–439 (1996).
- 114.** Daniel, Y. *et al.* Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with ectopic pregnancy: is this a novel marker? *Fertil Steril* **72**, 1013–1017 (1999).
- 115.** Plaisier, M. *et al.* Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertil Steril* **88**, 176–187 (2007).
- 116.** Daponte, A. *et al.* Soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and serum placental growth factor (PlGF) as biomarkers for ectopic pregnancy and missed abortion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1444–1451 (2011).
- 117.** Senturk, L. M. & Arici, A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol* **39**, 144–151 (1998).
- 118.** Wegner, N. T. & Mershon, J. L. Evaluation of leukemia inhibitory factor as a marker of ectopic pregnancy. *Am J Obs. Gynecol* **184**, 1074–1076 (2001).
- 119.** Iyibozkurt, A. C. *et al.* Evaluation of serum levels of interleukin-10, interleukin-11 and leukemia inhibitory factor in differentiation of eutopic and tubal ectopic pregnancies. *Clin Exp Obs. Gynecol* **37**, 217–220 (2010).
- 120.** Kiran, G. *et al.* Tuba uterina leukemia inhibitory factor concentration does not increase in tubal pregnancy: a preliminary study. *Fertil Steril* **83**, 484–486 (2005).
- 121.** Vigne, J. L., Hornung, D., Mueller, M. D. & Taylor, R. N. Purification and characterization of an immunomodulatory endometrial protein, glycodeilin. *J Biol Chem* **276**, 17101–17105 (2001).
- 122.** Foth, D. & Romer, T. Glycodeilin serum levels in women with ectopic pregnancy. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* **108**, 199–202 (2003).
- 123.** Aplin, J. D. & Hey, N. A. MUC1, endometrium and embryo implantation. *Biochem Soc Trans* **23**, 826–831 (1995).
- 124.** Al-Azemi, M., Refaat, B., Aplin, J. & Ledger, W. The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod* **24**, 2582–2587 (2009).
- 125.** Refaat, B. *et al.* Why does the fallopian tube fail in ectopic pregnancy? the role of activins, inducible nitric oxide synthase, and MUC1 in ectopic implantation. *Fertil. Steril.* **97**, 1115–1123 (2012).
- 126.** Liao, S. B. *et al.* Possible role of adrenomedullin in the pathogenesis of tubal ectopic pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 2105–2112 (2012).
- 127.** Soriano, D., Hugol, D., Quang, N. T. & Darai, E. Serum concentrations of interleukin-2R (IL-2R), IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha in patients with ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **79**, 975–980 (2003).
- 128.** Sadovsky, Y., Pineda, J. & Collins, J. L. Serum CA-125 levels in women with ectopic and intrauterine pregnancies. *J Reprod Med* **36**, 875–878 (1991).
- 129.** Brumsted, J. R., Nakajima, S. T., Badger, G., Riddick, D. H. & Gibson, M. Serum concentration of CA-125 during the first trimester of normal and abnormal pregnancies. *J Reprod Med* **35**, 499–502 (1990).
- 130.** Condous, G. *et al.* Do levels of serum cancer antigen 125 and creatine kinase predict the outcome in pregnancies of unknown location? *Hum Reprod* **20**, 3348–3354 (2005).
- 131.** Kuscu, E. *et al.* The hormonal profile in ectopic pregnancies. *Mater Med Pol* **25**, 149–152 (1993).
- 132.** Schmidt, T. *et al.* Prognostic value of repeated serum CA 125 measurements in first trimester pregnancy. *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* **97**, 168–173 (2001).
- 133.** Birkhahn, R. H., Gaeta, T. J., Leo, P. J. & Bove, J. J. The utility of maternal creatine kinase in the evaluation of ectopic pregnancy. *Am J Emerg Med* **18**, 695–697 (2000).
- 134.** Duncan, W. C., Sweeting, V. M., Cawood, P. & Illingworth, P. J. Measurement of creatine kinase activity and diagnosis of ectopic pregnancy. *Br J Obs. Gynaecol* **102**, 233–237 (1995).
- 135.** Lavie, O. *et al.* Maternal serum creatine kinase: a possible predictor of tubal pregnancy. *Am J Obs. Gynecol* **169**, 1149–1150 (1993).
- 136.** Darai, E. *et al.* Is maternal serum creatine kinase actually a marker for early diagnosis of ectopic pregnancy? *Eur J Obs. Gynecol Reprod Biol* **68**, 25–27 (1996).
- 137.** Korhonen, J., Alftan, H., Stenman, U. H. & Ylostalo, P. Failure of creatine kinase to predict ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **65**, 922–924 (1996).
- 138.** Lincoln, S. R., Dockery, J. R., Long, C. A., Rock Jr., W. A. & Cowan, B. D. Maternal serum creatine kinase does not predict tubal pregnancy. *J Assist Reprod Genet* **13**, 702–704 (1996).
- 139.** Plewa, M. C., Ledrick, D., Buderer, N. F. & King, R. W. Serum creatine kinase is an unreliable predictor of ectopic pregnancy. *Acad Emerg Med* **5**, 300–303 (1998).
- 140.** Shaw, J. L. & Horne, A. W. The paracrinology of tubal ectopic pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* **358**, 216–222 (2012).
- 141.** Gebeh, A. K., Willets, J. M., Marczylo, E. L., Taylor, A. H. & Konje, J. C. Ectopic pregnancy is associated with high anandamide levels and aberrant expression of FAAH and CB1 in fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, 2827–2835 (2012).

- 142.** Horne, A. W. *et al.* CB1 expression is attenuated in Fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy. *PLoS One* **3**, e3969 (2008).
- 143.** Guillaume, J. *et al.* Serum estradiol as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obs. Gynecol* **76**, 1126–1129 (1990).
- 144.** Hu, K. L. *et al.* Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. *Hum. Reprod. Update* **25**, 326–343 (2019).
- 145.** Radovick, S. & Babwah, A. V. Regulation of Pregnancy: Evidence for Major Roles by the Uterine and Placental Kisspeptin/KISS1R Signaling Systems. *Semin. Reprod. Med.* **37**, 182–190 (2019).
- 146.** Janneau, J. L. *et al.* Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by norn and tumoral trophoblast cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5336–5339 (2002).
- 147.** Funes, S. *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1357–1363 (2003).
- 148.** Ohtaki, T. *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**, 613–617 (2001).
- 149.** M, K. *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* **276**, 34631–34636 (2001).
- 150.** MD, R. *et al.* Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2399–2399 (2002).
- 151.** Navarro, V. M. *et al.* Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **146**, 1689–1697 (2005).
- 152.** De Roux, N. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS-1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10972–10976 (2003).
- 153.** Seminara, S. B. Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: Critical pathway modulating GnRH secretion. *Front. Neuroendocrinol.* **26**, 131–138 (2005).
- 154.** Navarro, V. M. *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* **145**, 4565–4574 (2004).
- 155.** Gottsch, M. L. *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* **145**, 4073–4077 (2004).
- 156.** Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* **146**, 3686–3692 (2005).
- 157.** Shahab, M. *et al.* Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2129–2134 (2005).
- 158.** Han, S. K. *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* **25**, 11349–11356 (2005).
- 159.** Plant, T. M. The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *Eur. J. Endocrinol. Suppl.* **155**, (2006).
- 160.** Castellano, J. M. *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146**, 3917–3925 (2005).
- 161.** Bischof, P., Meisser, A. & Campana, A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion - A review. *Placenta* **21**, (2000).
- 162.** Navarro, V. M. *et al.* Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* **146**, 156–163 (2005).
- 163.** Qiao, C., Cheng, D. L., Zhang, S. L., Wang, C. H. & Lin, Q. De. The role of KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 in regulation of invasion of trophoblasts. *Natl. Med. J. China* **85**, 839–842 (2005).
- 164.** Babwah, A. V., Pampillo, M., Min, L., Kaiser, U. B. & Bhattacharya, M. Single-cell analyses reveal that KISS1R-expressing cells undergo sustained kisspeptin-induced signaling that is dependent upon an influx of extracellular CA2+. *Endocrinology* **153**, 5875–5887 (2012).
- 165.** Dhar, D. K. *et al.* Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* **111**, 868–872 (2004).
- 166.** Hata, K., Dhar, D. K., Watanabe, Y., Nakai, H. & Hoshiai, H. Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* **43**, 1452–1459 (2007).
- 167.** Martin, T. A., Watkins, G. & Jiang, W. G. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **22**, 503–511 (2005).
- 168.** Ikeguchi, M., Hirooka, Y. & Kaibara, N. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **129**, 531–535 (2003).
- 169.** Zang, S., Liu, J. F., Wang, B., Gao, L. & Huang, A. Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Anat. Rec.* **292**, 1128–1134 (2009).
- 170.** Kang, H. S. *et al.* GPR54 is a target for suppression of metastasis in endometrial cancer. *Mol Cancer Ther* **10**, 580–590 (2011).
- 171.** Prabhu, V. V., Sakhivel, K. M. & Guruvayoorappan, C. Kisspeptins (KiSS-1): essential players in suppressing tumor metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**, 6215–6220 (2013).
- 172.** Qiao, C., Wang, C. hui, Shang, T. & Lin, Q. de. Clinical significance of KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 expression in trophoblasts of women with preeclampsia and their relation to perinatal outcome of neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **40**, 585–590 (2005).
- 173.** Bilban, M. *et al.* Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J. Cell Sci.* **117**, 1319–1328 (2004).
- 174.** Roseweir, A. K., Katz, A. A. & Millar, R. P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. *Placenta* **33**, 408–415 (2012).
- 175.** Yan, C., Wang, H. & Boyd, D. D. KiSS-1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-κB binding to the promoter as a consequence of IκBα-induced block of p65/p50 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* **276**, 1164–1172 (2001).
- 176.** Terao, Y. *et al.* Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1678**, 102–110 (2004).
- 177.** Ilić, D. *et al.* Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion in vivo and in vitro. *Am. J. Pathol.* **159**, 93–108 (2001).
- 178.** Muir, A. I. *et al.* AXOR12, a Novel Human G Protein-coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 28969–28975 (2001).
- 179.** Lee, J. H. & Welch, D. R. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after

transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res.* **57**, 2384–2387 (1997).

180. Cartwright, J. E. & Williams, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. *J. Endocrinol.* **214**, 79 (2012).

181. Park, D. W. *et al.* Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* **67**, 132–139 (2012).

182. Kavvasoglu, S., Ozkan, Z. S., Kumbak, B., Simsek, M. & Ilhan, N. Association of kisspeptin-10 levels with abortus imminens: A preliminary study. *Arch. Gynecol. Obstet.* **285**, 649–653 (2012).

183. Vazquez-Alaniz, F. *et al.* Comparative expression profiles for KiSS-1 and REN genes in preeclamptic and healthy placental tissues. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **159**, 67–71 (2011).

184. Kapustin, R. V. *et al.* Placental protein expression of kisspeptin-1 (KISS1) and the kisspeptin-1 receptor (KISS1R) in pregnancy complicated by diabetes mellitus or preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* **301**, 437–445 (2020).

185. EJ, M., JJ, M., RE, K. & AP, D. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* **151**, 1143–1153 (2007).

186. Hu, K. L., Zhao, H., Yu, Y. & Li, R. Kisspeptin as a potential biomarker throughout pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* vol. 240 261–266 (2019).

187. Marion, L. & Meeks, G. *Embarazo Ectópico: Historia, incidencia, epidemiología y factores de riesgo.* *Clinical Obstetrics and Gynecology* vol. 55 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22510618> (2012).

188. *Ley Orgánica 2/2010, de 3 de marzo, de salud sexual y reproductiva y de la interrupción voluntaria del embarazo.* («BOE» núm. 55, de 04/03/2010).

189. R, R. *et al.* Preanalytical factors affecting RIA measurement of plasma kisspeptin. *Clin. Chem.* **54**, 615–617 (2008).

190. Guerin, J. S. *et al.* Molecular Medicine Ireland guidelines for standardized biobanking. *Biopreservation and Biobanking* vol. 8 3–63 (2010).

191. 2012 Best Practices for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research. *Biopreserv. Biobank.* **10**, 79–161 (2012).

192. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532–537 (1993).

193. Sangiao-Alvarellos, S. *et al.* Changes in hypothalamic expression of the Lin28/let-7 system and related MicroRNAs during postnatal maturation and after experimental manipulations of puberty. *Endocrinology* **154**, 942–955 (2013).

194. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* **11**, 1026–1030 (1993).

195. Dhillon, W. S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6609–6615 (2005).

196. Dhillon, W. S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 3958–66 (2007).

197. WS, D. *et al.* Plasma kisspeptin is raised in patients with gestational trophoblastic neoplasia and falls during treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**, (2006).

198. Barnhart, K. T., Gosman, G., Ashby, R. & Sammel, M. The medical management of ectopic pregnancy: A meta-analysis comparing ‘single dose’ and ‘multidose’

regimens. *Obstetrics and Gynecology* vol. 101 778–784 (2003).

199. Farquhar, C. M. Ectopic pregnancy. in *Lancet* vol. 366 583–591 (Elsevier BV, 2005).

200. Morlock, R. J., Lafata, J. E. & Eisenstein, D. Cost-effectiveness of single-dose methotrexate compared with laparoscopic treatment of ectopic pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **95**, 407–412 (2000).

201. Lipscomb, G. H. *et al.* Analysis of three hundred fifteen ectopic pregnancies treated with single-dose methotrexate. in *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 178 1354–1358 (Mosby Inc., 1998).

202. Sowter, M. C., Farquhar, C. M., Petrie, K. J. & Gudex, G. A randomised trial comparing single dose systemic methotrexate and laparoscopic surgery for the treatment of unruptured tubal pregnancy. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **108**, 192–203 (2001).

203. Dudley, P. S., Heard, M. J., Sangi-Haghpeykar, H., Carson, S. A. & Buster, J. E. Characterizing ectopic pregnancies that rupture despite treatment with methotrexate. *Fertil. Steril.* **82**, 1374–1378 (2004).

204. Galliano, D. & Pellicer, A. MicroRNA and implantation. *Fertility and Sterility* vol. 101 1531–1544 (2014).

205. Bustillo, M., Stern, J. J., King, D. & Coulam, C. B. Serum progesterone and estradiol concentrations in the early diagnosis of ectopic pregnancy after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil. Steril.* **59**, 668–670 (1993).

206. Buck, R. H., Joubert, S. M. & Norman, R. J. Serum progesterone in the diagnosis of ectopic pregnancy: a valuable diagnostic test? *Fertil Steril* **50**, 752–755 (1988).

207. Gelder, M. S., Boots, L. R. & Younger, J. B. Use of a single random serum progesterone value as a diagnostic aid for ectopic pregnancy. *Fertil Steril* **55**, 497–500 (1991).

208. Li, H., Liu, Y., Wen, S., Jia, H. & Du, Y. Evaluation of serum biomarkers and efficacy of MTX in women with ectopic pregnancy. *Mol. Med. Rep.* **20**, 2902–2908 (2019).

209. AMBER.

210. Horikoshi, Y. *et al.* Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 914–919 (2003).

211. Jayasena, C. N. *et al.* The identification of elevated urinary kisspeptin-immunoreactivity during pregnancy. *Ann. Clin. Biochem.* **52**, 395–398 (2015).

212. Park, D. W. *et al.* Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* **67**, 132–139 (2012).

213. Armstrong, R. A. *et al.* Decreased serum levels of kisspeptin in early pregnancy are associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia. *Prenat Diagn* **29**, 982–985 (2009).

214. JJ, L. *et al.* Evaluation of kisspeptin levels in obese pregnancy as a biomarker for pre-eclampsia. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **76**, 887–893 (2012).

215. EM, S. *et al.* Decreased plasma levels of metastin in early pregnancy are associated with small for gestational age neonates. *Prenat. Diagn.* **28**, 299–303 (2008).

216. L, P, E, A., C, D., RP, M. & M, T.-S. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **92**, 1235–1316 (2012).

217. Z, Z. *et al.* An alternate method for DNA and RNA extraction from clotted blood. *Genet. Mol. Res.* **12**, 302–311 (2013).

218. J, V. *et al.* Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **39**, (2011).

8 Anexos

/ Anexo 1

Modelo de hoja de información y consentimiento informado para el paciente.

/ Anexo 2

Protocolo de extracción de ARN TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

/ Anexo 3

Protocolo de cuantificación de ARNm RQ1 RNase-free DNase-I (Promega, Madison, WI).

/ Anexo 4

Protocolo de retrotranscripción de ARN iScript™ reverse transcription Super-mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

/ Anexo 5

Protocolo de RT-qPCR SYBR Green qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI).

/ Anexo 1

Modelo de hoja de información y consentimiento informado para el paciente

INFORMACION CLINICA A LA PACIENTE**DETERMINACIÓN DE KISS/GPR54 EN PLACENTAS A LO LARGO DEL EMBARAZO**

Iniciales de la paciente: _____

Nº de paciente: _____

Nombre del Investigador Principal: _____

METODOLOGIA: DESCRIPCION Y PROPOSITO DEL ESTUDIO

Se le ha propuesto que participe en un estudio piloto para la determinación de KISS/GPR54 en las placentas a lo largo del embarazo.

El KISS/GPR54 es una sustancia, que se cree pueda estar asociada con la implantación del saco gestacional en el interior del útero durante las primeras semanas de gestación.

El propósito de este estudio es determinar los niveles de la sustancia explicada anteriormente (KISS/GPR54) a lo largo del embarazo y compararlos con pacientes que tienen algún tipo de alteración de la implantación, como son mujeres con gestaciones ectópicas, que son aquellas en las que el saco gestacional está fuera del útero.

Con el fin de que pueda decidir si desea participar en este estudio, usted debe comprender las ventajas e inconvenientes del mismo para que sea capaz de tomar una decisión informada al respecto. Este proceso es lo que se conoce como consentimiento informado.

Este consentimiento informado le da información detallada sobre el estudio y además, su médico comentará esta información con usted. Cuando haya comprendido el estudio se le solicitará que firme este

consentimiento informado si desea participar en él. Se le dará una copia de este documento para que pueda guardarlo.

Su participación en este estudio es voluntaria.

Antes del estudio:

Su doctor le informará del estudio y si desea participar en él. El hecho de participar supone que acepta donar un pequeño fragmento de placenta (2cm) de su gestación. Las placentas actualmente no tienen ningún destino específico, siendo finalmente incineradas. La placenta sólo va a ser utilizada para estudiar sus características morfológicas y de expresión génica y proteica. En ningún caso va a ser empleada para cultivo y, bajo ningún concepto, para ser trasplantada a otras personas. Tampoco va a ser utilizadas con carácter comercial o lucrativo.

Asimismo, se practicará una extracción sanguínea con el objeto de analizar la presencia en el plasma del producto de la sustancia mencionada previamente (KISS/GPR54) para validar su uso como marcador precoz.

La posibilidad de que usted done la placenta se ampara en la Ley 42/1988, de 28 de diciembre, sobre donación y utilización de embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos u órganos.

No existen contraindicaciones para participar en este estudio, únicamente que se trate de gestaciones sin patología.

Si participa en el estudio:

Se recogerá el fragmento de placenta necesario para el estudio (2cm), y el resto seguirá su curso normal, bien envío a anatomía patológica o bien se desechará. El embrión, feto o recién nacido no será manipulado en ningún momento.

Se realizará la extracción sanguínea en el mismo momento.

RIESGO ASOCIADO AL ESTUDIO

No existe ningún riesgo asociado al estudio.

Nueva información:

Si se comunica cualquier nueva información que pudiera afectar su participación en el estudio se le notificará por su médico.

BENEFICIOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Su participación en el estudio puede ayudar a determinar nuevos marcadores de placentación anómala que ayuden a clarificar el diagnóstico. También podría ayudar a diagnosticar gestaciones ectópicas (fuera del útero) de forma precoz, siendo necesarias menor número de intervenciones quirúrgicas para su tratamiento.

Puede solicitar al investigador una mayor información acerca del estudio.

PERMISO PARA LA REVISIÓN DE SUS DATOS / CONFIDENCIALIDAD

Su identidad y todos los datos referentes a su información personal serán confidenciales, salvo que se solicite lo contrario por la ley. No se publicará ninguna información que lo identifique en los informes o publicaciones resultantes de este estudio. Se permitirá el acceso para la revisión de sus registros médicos al Comité Ético, y a las Autoridades Sanitarias. Firmando este documento usted está de acuerdo con este documento.

Sus datos se encontrarán protegidos por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos Personales.

DERECHO A PREGUNTAR SOBRE EL ESTUDIO Y A ABANDONARLO

Si tiene cualquier pregunta relativa al estudio o a sus derechos como paciente, contacte al Dr. _____ en _____.

Tiene el derecho de abandonar el estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su tratamiento. Le será comunicada cualquier nueva información que pueda afectar a su buena disposición para continuar su participación en el estudio.

COSTES

Usted no cobrará cantidad alguna por participar en este estudio.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Nº de paciente

TITULO DEL ESTUDIO: **"KISS-1/GPR54 Y EMBARAZO"**

Yo _____ (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del participante

Firma del Investigador

Fecha:

Fecha:

Anexo 2

Protocolo de extracción de ARN TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

invitrogen

USER GUIDE

TRIzol™ Reagent

Catalog Numbers 15596026 and 15596018

Doc. Part No. 15596026.PPS Pub. No. MAN0001271 Rev. B.0

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Product description

Invitrogen™ TRIzol™ Reagent is a ready-to-use reagent, designed to isolate high quality total RNA (as well as DNA and proteins) from cell and tissue samples of human, animal, plant, yeast, or bacterial origin, within one hour. TRIzol™ Reagent is a monophasic solution of phenol, guanidine isothiocyanate, and other proprietary components which facilitate the isolation of a variety of RNA species of large or small molecular size. TRIzol™ Reagent maintains the integrity of the RNA due to highly effective inhibition of RNase activity while disrupting cells and dissolving cell components during sample homogenization. TRIzol™ Reagent allows for simultaneous processing of a large number of samples, and is an improvement to the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987).

TRIzol™ Reagent allows to perform sequential precipitation of RNA, DNA, and proteins from a single sample (Chomczynski, 1993). After homogenizing the sample with TRIzol™ Reagent, chloroform is added, and the homogenate is allowed to separate into a clear upper aqueous layer (containing RNA), an interphase, and a red lower organic layer (containing the DNA and proteins). RNA is precipitated from the aqueous layer with isopropanol. DNA is precipitated from the interphase/organic layer with ethanol. Protein is precipitated from the phenol-ethanol supernatant by isopropanol precipitation. The precipitated RNA, DNA, or protein is washed to remove impurities, and then resuspended for use in downstream applications.

- Isolated RNA can be used in RT-PCR, Northern Blot analysis, Dot Blot hybridization, poly(A)+ selection, in vitro translation, RNase protection assay, and molecular cloning.
- Isolated DNA can be used in PCR, Restriction Enzyme digestion, and Southern Blots.
- Isolated protein can be used for Western Blots, recovery of some enzymatic activity, and some immunoprecipitation.

For DNA isolation, see the *TRIzol™ Reagent (DNA isolation) User Guide* (Pub. No. MAN0016385).

TRIzol™ Reagent can also be used with Phasemaker™ Tubes (Cat. No. A33248) to isolate RNA. Phasemaker™ Tubes creates a solid barrier between the organic and aqueous phases of the TRIzol™ Reagent following sample homogenization which makes separation of phases easier. See the *TRIzol™ Reagent and Phasemaker™ Tubes Complete System User Guide* (Pub. No. MAN0016163) for the full protocol.

TRIzol™ Reagent can also be used with the PureLink™ RNA Mini Kit (Cat. No. 12183018A) which uses spin columns instead of ethanol precipitation to purify the RNA. For additional information, see the *PureLink™ RNA Mini Kit User Guide* (Pub. No. MAN0000406).

Contents and storage

Contents	Cat. No. 15596026 (100 reactions)	Cat. No. 15596018 (200 reactions)	Storage
TRIzol™ Reagent	100 mL	200 mL	15–30°C

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Required materials not supplied

Unless otherwise indicated, all materials are available through thermofisher.com. MLS: Fisher Scientific (fisherscientific.com) or other major laboratory supplier.

Table 1 Materials required for all isolations

Item	Source
Equipment	
Centrifuge and rotor capable of reaching 12,000 × g and 4°C	MLS
Tubes	
Polypropylene microcentrifuge tubes	MLS
Reagents	
Chloroform	MLS

Table 2 Materials required for RNA isolation

Item	Source
Equipment	
Water bath or heat block at 55–60°C	MLS
Reagents	
Isopropanol	MLS
Ethanol, 75%	MLS
RNase-free water of 0.5% SDS	MLS
[Optional] RNase-free glycogen	MLS

Table 3 Materials required for protein isolation

Item	Source
Equipment	
[Optional] Dialysis membranes	MLS
Reagents	
Isopropanol	MLS
Ethanol, 100%	MLS
0.3 M Guanidine hydrochloride in 95% ethanol	MLS
1% SDS	MLS

Input sample requirements

IMPORTANT! Perform RNA isolation immediately after sample collection or quick-freeze samples immediately after collection and store at –80°C or in liquid nitrogen until RNA isolation.

Sample type	Starting material per 1 mL of TRIzol™ Reagent
Tissues ^[1]	50–100 mg of tissue
Cells grown in monolayer	1 × 10 ⁵ –1 × 10 ⁷ cells grown in monolayer in a 3.5-cm culture dish (10 cm ²)
Cells grown in suspension	5–10 × 10 ⁸ cells from animal, plant, or yeast origin or 1 × 10 ⁷ cells of bacterial origin

^[1] Fresh tissues or tissues stored in RNAlater™ Stabilization Solution [Cat. No. AM7020].

Procedural guidelines

- Perform all steps at room temperature (20–25°C) unless otherwise noted.
- Use cold TRIzol™ Reagent if the starting material contains high levels of RNase, such as spleen or pancreas samples.
- Use disposable, individually wrapped, sterile plastic ware and sterile, disposable RNase-free pipettes, pipette tips, and tubes.
- Wear disposable gloves while handling reagents and RNA samples to prevent RNase contamination from the surface of the skin; change gloves frequently, particularly as the protocol progresses from crude extracts to more purified materials.
- Always use proper microbiological aseptic techniques when working with RNA.
- Use RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Cat. no. AM9780) to remove RNase contamination from work surfaces and non-disposable items such as centrifuges and pipettes used during purification.
- Ensure that all materials that come into contact with TRIzol™ Reagent are compatible with phenol, guanidine isothiocyanate, and chloroform.

Lyse samples and separate phases

- Lyse and homogenize samples in TRIzol™ Reagent according to your starting material.
 - Tissues:** Add 1 mL of TRIzol™ Reagent per 50–100 mg of tissue to the sample and homogenize using a homogenizer.
 - Cell grown in monolayer:**
 - Remove growth media.
 - Add 0.3–0.4 mL of TRIzol™ Reagent per 1 × 10⁵–10⁷ cells directly to the culture dish to lyse the cells.
 - Pipet the lysate up and down several times to homogenize.
 - Cells grown in suspension:**
 - Collect the cells by centrifugation and discard the supernatant.

- Add 0.75 mL of TRIzol™ Reagent per 0.25 mL of sample (5–10 × 10⁶ cells from animal, plant, or yeast origin or 1 × 10⁷ cells of bacterial origin) to the pellet.

Note: Do not wash cells before addition of TRIzol™ Reagent to avoid mRNA degradation.

- Pipet the lysate up and down several times to homogenize.

Note: The sample volume should not exceed 10% of the volume of TRIzol™ Reagent used for lysis.

STOPPING POINT Samples can be stored at 4°C overnight or at –20°C for up to a year.

- (Optional)* If samples have a high fat content, centrifuge the lysate for 5 minutes at 12,000 × g at 4–10°C, then transfer the clear supernatant to a new tube.
- Incubate for 5 minutes to allow complete dissociation of the nucleoproteins complex.
- Add 0.2 mL of chloroform per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis, securely cap the tube, then thoroughly mix by shaking.
- Incubate for 2–3 minutes.
- Centrifuge the sample for 15 minutes at 12,000 × g at 4°C. The mixture separates into a lower red phenol-chloroform, an interphase, and a colorless upper aqueous phase.
- Transfer the aqueous phase containing the RNA to a new tube by angling the tube at 45° and pipetting the solution out.

IMPORTANT! Avoid transferring any of the interphase or organic layer into the pipette when removing the aqueous phase.

Proceed directly to “Isolate RNA” on page 2.

To isolate DNA or protein, save the interphase and organic phase. See the *TRIzol™ Reagent (DNA isolation) User Guide* (Pub. No. MAN0016385) or see “Isolate proteins” on page 3 for detailed procedures. The organic phase can be stored at 4°C overnight.

Isolate RNA

- Precipitate the RNA**
 - (Optional)* If the starting sample is small (<10⁶ cells or <10 mg of tissue), add 5–10 µg of RNase-free glycogen as a carrier to the aqueous phase. **Note:** The glycogen is co-precipitated with the RNA, but does not interfere with subsequent applications.
 - Add 0.5 mL of isopropanol to the aqueous phase, per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis.
 - Incubate for 10 minutes at 4°C.
 - Centrifuge for 10 minutes at 12,000 × g at 4°C. Total RNA precipitate forms a white gel-like pellet at the bottom of the tube.
 - Discard the supernatant with a micropipettor.
- Wash the RNA**
 - Resuspend the pellet in 1 mL of 75% ethanol per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis. **Note:** The RNA can be stored in 75% ethanol for at least 1 year at –20°C, or at least 1 week at 4°C.
 - Vortex the sample briefly, then centrifuge for 5 minutes at 7500 × g at 4°C.
 - Discard the supernatant with a micropipettor.
 - Vacuum or air dry the RNA pellet for 5–10 minutes. **IMPORTANT!** Do not dry the pellet by vacuum centrifuge. Do not let the RNA pellet dry, to ensure total solubilization of the RNA. Partially dissolved RNA samples have an A_{230/280} ratio <1.6.
- Solubilize the RNA**
 - Resuspend the pellet in 20–50 µL of RNase-free water, 0.1 mM EDTA, or 0.5% SDS solution by pipetting up and down. **IMPORTANT!** Do not dissolve the RNA in 0.5% SDS if the RNA is to be used in subsequent enzymatic reactions.
 - Incubate in a water bath or heat block set at 55–60°C for 10–15 minutes. Proceed to downstream applications, or store the RNA at –70°C.

4 Determine the RNA yield		Determine the RNA yield using one of the following methods.
Method	Procedure	
Absorbance Absorbance at 260 nm provides total nucleic acid content, while absorbance at 280 nm determines sample purity. Since free nucleotides, RNA, ssDNA, and dsDNA absorb at 260 nm, they all contribute to the total absorbance of the sample.	<ol style="list-style-type: none"> Dilute sample in RNase-free water, then measure absorbance at 260 nm and 280 nm. Calculate the RNA concentration using the formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$. Calculate the A_{260}/A_{280} ratio. A ratio of ~2 is considered pure. RNA samples can be quantified by absorbance without prior dilution using the NanoDrop[®] Spectrophotometer. Refer to the instrument's instructions for more information. 	
Fluorescence Fluorescence selectively measures intact RNA, but does not measure protein or other contaminant present in the sample	<ul style="list-style-type: none"> Quantify RNA yield using the appropriate Qubit[™] or Quant-iT[™] RNA Assay Kit [Cat. Nos. Q32852, Q10210, Q33140, or Q10213]. Refer to the kit's instructions for more information. 	

Table 4 Typical RNA [A_{260}/A_{280} of >1.8] yields from various starting materials

Starting material	Quantity	RNA yield
Epithelial cells	1×10^6 cells	8–15 μg
New tobacco leaf	—	73 μg
Fibroblasts	1×10^6 cells	5–7 μg
Skeletal muscles and brain	1 mg	1–1.5 μg
Placenta	1 mg	1–4 μg
Liver	1 mg	6–10 μg
Kidney	1 mg	3–4 μg

Isolate proteins

Isolate the proteins from the organic phase saved from "Isolate RNA" on page 2 using either "Precipitate the proteins" on page 3 or "Dialyse the proteins" on page 4.

1	Precipitate the proteins	<ol style="list-style-type: none"> Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase. Add 0.3 mL of 100% ethanol per 1 mL of TRIzol[™] Reagent used for lysis. Cap the tube, mix by inverting the tube several times. Incubate for 2–3 minutes. Centrifuge for 5 minutes at $2000 \times g$ at 4°C to pellet the DNA. Transfer the phenol-ethanol supernatant to a new tube. Add 1.5 mL of isopropanol to the phenol-ethanol supernatant per 1 mL of TRIzol[™] Reagent used for lysis. Incubate for 10 minutes. Centrifuge for 10 minutes at $12,000 \times g$ at 4°C to pellet the proteins. Discard the supernatant with a micropipettor.
		<ol style="list-style-type: none"> Prepare a wash solution consisting of 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol. Resuspend the pellet in 2 mL of wash solution per 1 mL of TRIzol[™] Reagent used for lysis. Incubate for 20 minutes. Note: The proteins can be stored in wash solution for at least 1 month at 4°C or for at least 1 year at –20°C. Centrifuge for 5 minutes at $7500 \times g$ at 4°C. Discard the supernatant with a micropipettor. Repeat step 2b–step 2e twice. Add 2 mL of 100% ethanol, then mix by vortexing briefly. Incubate for 20 minutes. Centrifuge for 5 minutes at $7500 \times g$ at 4°C. Discard the supernatant with a micropipettor. Air dry the protein pellet for 5–10 minutes. <p>IMPORTANT! Do not dry the pellet by vacuum centrifuge.</p>
3	Solubilize the proteins	<ol style="list-style-type: none"> Resuspend the pellet in 200 μL of 1% SDS by pipetting up and down. Note: To ensure complete resuspension of the pellet, we recommend that you incubate the sample at 50°C in a water bath or heat block. Centrifuge for 10 minutes at $10,000 \times g$ at 4°C to remove insoluble materials. Transfer the supernatant to a new tube. <p>Measure protein concentration by Bradford assay (SDS concentration must be <0.1%), then proceed directly to downstream applications, or store the sample at –20°C.</p>

Dialyse the proteins

- Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase.
- Add 0.3 mL of 100% ethanol per 1 mL of TRIzol[™] Reagent used for lysis.
- Cap the tube, mix by inverting the tube several times.
- Incubate for 2–3 minutes.
- Centrifuge for 5 minutes at $2000 \times g$ at 4°C to pellet the DNA.
- Load the phenol-ethanol supernatant into the dialysis membrane.
Note: The phenol-ethanol solution can dissolve some types of dialysis membranes (cellulose ester, for example). Test dialysis tubing with the membrane to assess compatibility before starting.
- Dialyze the sample against 3 changes of 0.1% SDS at 4°C. Make the first change of solution after 16 hours, the second change 4 hours later (at 20 hours), and the final change 2 hours later (at 22 hours).
Note: A SDS concentration of at least 0.1% is required to resolubilize the proteins from the pellet. If desired, the SDS can be diluted after solubilization.
- Centrifuge the dialysate for 10 minutes at $10,000 \times g$ at 4°C.
- Transfer the supernatant containing the proteins to a new tube.
- (Optional) Solubilize the pellet by adding 100 μL of 1% SDS and 100 μL of 8 M urea.

Proceed directly to downstream applications, or store the sample at –20°C.

Troubleshooting

Troubleshooting and FAQs

Visit our online FAQ database for tips and tricks for conducting your experiment, troubleshooting information, and FAQs. The online FAQ database is frequently updated to ensure accurate and thorough content.

- For troubleshooting information and FAQs for this product: <https://www.thermofisher.com/trizolfaq>

- To browse the database and search using keywords: [thermofisher.com/faq](https://www.thermofisher.com/faq)

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

References

- Chomczynski, P. 1993. *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. *BioTechniques* 15, 532-537
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987 *Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
- Hummon, A. B., Lim S. R., Difilippantonio, M. J., and Ried, T. 2007 *Isolation and solubilization of proteins after TRIzol[®] extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage*. *BioTechniques* 42, 467-472

Life Technologies Corporation | 5781 Van Allen Way | Carlsbad, CA 92008
For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to thermofisher.com/symbols-definition.

The information in this guide is subject to change without notice.
DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Revision history: Pub. No. MAN0001271

Revision	Date	Description
B.0	28 January 2020	<ul style="list-style-type: none"> Moved troubleshooting topics to thermofisher.com. Added note to ensure that materials that come into contact with the Trizol Reagent are compatible. Updated step 4 of "Lyse samples and separate phases" on page 2 to include shaking the sample.
A.0	09 November 2016	Added references to Phasemaker [™] Tubes.
—	13 December 2012	Baseline for revision.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

28 January 2020

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Anexo 3

Protocolo de cuantificación de ARNm RQ1 RNase-free DNase-I (Promega, Madison, WI).

Certificate of Analysis

RQ1 RNase-Free DNase (Cat. # M6101):

Contents		
Part No.	Name	Size (units)
M610A	RQ1 RNase-Free DNase	1,000
M199A	Stop Solution	1ml
M198A	RQ1 DNase 10X Reaction Buffer	1ml

Storage Conditions: Store at -20°C. Avoid exposure to frequent temperature changes. See the expiration date on the Product Information Label.

Description: RQ1 (RNA-Qualified) RNase-Free DNase is a DNase I (endonuclease) that degrades both double-stranded and single-stranded DNA, producing 3'-OH oligonucleotides (1). (RQ1 RNase-Free DNase may be used in applications where maintaining RNA integrity is critical.) This DNase is suited for applications such as nick translation (2), production of random fragments (3), cleavage of genomic DNA for footprinting (3), removal of DNA template after in vitro transcription (4) and removal of DNA from RNA samples prior to applications such as RT-PCR (5).

Unit Definition: One unit of RQ1 RNase-Free DNase is defined as the amount required to completely degrade 1 µg of lambda DNA in 10 minutes at 37°C in 50 µl of a buffer containing 40mM Tris-HCl (pH 7.9), 10mM NaCl, 6mM MgCl₂ and 10mM CaCl₂. See the unit concentration on the Product Information Label.

Biological Source: Bovine pancreas.

Requirement: Ca²⁺ and Mg²⁺ or Mn²⁺ (6).

Inhibitors: EGTA; EDTA (6); salt concentrations >100mM will reduce DNase activity.

RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (M198A): 400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO₄ and 10mM CaCl₂.

Stop Solution (M199A): 20mM EGTA (pH 8.0).

Enzyme Storage Buffer: RQ1 DNase is supplied in 10mM HEPES (pH 7.5), 50% glycerol (v/v), 10mM CaCl₂ and 10mM MgCl₂.

Usage Notes:

- This DNase solution does not contain an RNase inhibitor. Observe caution in handling the product to avoid contaminating it with RNase.
- Under different buffer conditions the amount of DNase required to completely digest a given amount of DNA may need to be empirically determined. For example, salt concentrations >100mM will reduce DNase activity.
- To inactivate, heat for 10 minutes at 65°C in the presence of Stop Solution.

Quality Control Assays

Contaminant Activity

RNase Assay: To test for RNase activity, 50ng of [³H]RNA is incubated with 5 units of RQ1 RNase-Free DNase in Transcription Optimized 1X Buffer (Cat.# P1181, diluted fivefold) for 1 hour at 37°C, and the release of radiolabeled nucleotides is monitored by scintillation counting of TCA-soluble material. The specification is <3% release.

Part# 9PIM610
Revised 4/18



AF9PIM610 0418M610



Promega

Promega Corporation
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711-5399 USA
Telephone 608-274-4330
Toll Free 800-356-9526
Fax 608-277-2516
Internet www.promega.com

PRODUCT USE LIMITATIONS, WARRANTY, DISCLAIMER
Promega manufactures products for a number of intended uses. Please refer to the product label for the intended use statements for specific products. Promega products contain chemicals which may be harmful if misused. Due care should be exercised with all Promega products to prevent direct human contact.

Each Promega product is shipped with documentation stating specifications and other technical information. Promega products are warranted to meet or exceed the stated specifications. Promega's sole obligation and the customer's sole remedy is limited to replacement of products free of charge in the event products fail to perform as warranted. Promega makes no other warranty of any kind whatsoever, and SPECIFICALLY DISCLAIMS AND EXCLUDES ALL OTHER WARRANTIES OF ANY KIND OR NATURE WHATSOEVER, DIRECTLY OR INDIRECTLY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, AS TO THE SUITABILITY, PRODUCTIVITY, DURABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR USE, MERCHANTABILITY, CONDITION, OR ANY OTHER MATTER WITH RESPECT TO PROMEGA PRODUCTS. In no event shall Promega be liable for claims for any other damages, whether direct, incidental, foreseeable, consequential, or special (including but not limited to loss of use, revenue or profit), whether based upon warranty, contract, tort (including negligence) or strict liability arising in connection with the sale or the failure of Promega products to perform in accordance with the stated specifications.

Riboprobe is a registered trademark of Promega Corporation.

© 1996-2018 Promega Corporation. All Rights Reserved.

All specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

Part# 9PIM610
Printed in USA. Revised 4/18

Signed by:

R. Wheeler, Quality Assurance



Usage Information

I. DNase Treatment of RNA Samples Prior to RT-PCR

1. Set up the DNase digestion reaction as follows:

RNA in water or TE buffer	1-8 µl
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 µl
RQ1 RNase-Free DNase	1 µg RNA
Nuclease-free water to a final volume of	10 µl

Note: Use 1 unit of RQ1 RNase-Free DNase per microgram of RNA. For smaller amounts of RNA, use 1 unit of RQ1 RNase-Free DNase per reaction.

2. Incubate at 37°C for 30 minutes.

Note: If analyzing RNA samples by gel electrophoresis, perform a phenol:chloroform extraction and ethanol precipitation before loading the samples on the gel because salts in the RQ1 DNase Reaction Buffer and Stop Solution may cause aberrant migration or smearing of RNA on gels. Steps 3 and 4 may be omitted if a phenol:chloroform extraction is performed.

3. Add 1 µl of RQ1 DNase Stop Solution to terminate the reaction.

4. Incubate at 65°C for 10 minutes to inactivate the DNase.

5. Add all, or a portion of, the treated RNA to the RT-PCR. See the *Access RT-PCR System Technical Bulletin #TB220* (5).

Note: The RQ1 RNase-Free DNase digestion contains a final concentration of 10mM MgSO₄. When adding DNase-treated RNA to an RT-PCR, carryover of magnesium must be considered. For example, adding 1 µl of treated RNA to a 50 µl RT-PCR will raise the magnesium concentration by 0.2mM, and adding 5 µl of treated RNA will raise the magnesium concentration by 1mM. The requirement for magnesium may be different in the RQ1 DNase digestion step and the amplification reaction.

- RQ1 DNase activity increases as Mg²⁺ concentration increases up to 5-10mM. At a concentration of 1mM Mg²⁺, RQ1 DNase is expected to be at least fourfold less active than at the optimal Mg²⁺ concentration.
- For some templates, the yield from the amplification reaction is highly dependent on Mg²⁺ concentration, and the optimal Mg²⁺ concentration may be as low as 1mM.

If an increased Mg²⁺ concentration is not tolerable in the amplification reaction, the following alternatives may be used.

- The RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer may be diluted 1:10 with 400mM Tris (pH 8.0), 10mM CaCl₂ prior to DNase digestion. (Note that under these conditions, the RQ1 DNase will be approximately fourfold less active than under standard reaction conditions.)
- An alternative DNase reaction buffer may be used (such as the RT or PCR reaction buffer) if that buffer contains at least 1mM Mg²⁺.
- The RNA sample may be diluted in water prior to RT-PCR, allowing dilution of the MgSO₄ to a concentration that is compatible with this application.
- The RNA may be purified with a standard phenol:chloroform extraction followed by an ethanol precipitation.

II. Other Applications

RQ1 RNase-Free DNase may be used in a number of other applications where maintaining RNA integrity is important. These include in vitro transcription, nick translation and DNase I footprinting.

A. In Vitro Transcription

To remove template DNA, RQ1 RNase-Free DNase may be added directly to the transcription reaction. Refer to the *Riboprobe® in vitro Transcription Systems Technical Manual #TM016* (4) for specific protocol information.

B. Nick Translation

For protocol information on the use of RQ1 RNase-Free DNase for this application, refer to the *Protocols and Application Guide* (2).

C. Production of Random Fragments

For protocol information on the use of DNase I for random fragmentation of DNA, see reference 7.

Note: Under different buffer conditions, the amount of RQ1 RNase-Free DNase required to completely digest a given amount of DNA must be empirically determined. For example, salt concentrations >100mM will result in reduced DNase activity. Ca²⁺ and Mg²⁺ are essential for RQ1 DNase activity.

III. References

- Moore, S. (1981) Pancreatic DNase I: *The Enzymes*, Volume 14A, P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York, 281.
- Protocols and Applications Guide* (1996) Promega Corporation.
- Cobianchi, F. and Wilson S.H. (1987) *Meth. Enzymol.* **152**: 94-110.
- Riboprobe® in vitro Transcription Systems Technical Manual #TM016*, Promega Corporation.
- Access RT-PCR System Technical Bulletin #TB220*, Promega Corporation.
- Ausubel, F.M. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 3.12.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Part# 9PIM610
Printed in USA. Revised 4/18

Promega Corporation • 2800 Woods Hollow Road-Madison, WI 53711-5399 U.S.A. • Toll Free in the USA 800-356-9526 • Telephone 608-274-4330 • www.promega.com

Anexo 4

Protocolo de retrotranscripción de ARN iScript™ reverse transcription Super-mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).



iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR

Catalog #	Description
1708840	iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, 100 µl of 5x supermix, 25 reactions
1708841	iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, 4 x 100 µl of 5x supermix, 100 reactions

For research purposes only.

Introduction

The iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (iScript RT Supermix) is a sensitive, fast, and convenient reagent for gene expression analysis using real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and standard RT-PCR. The preblended 5x supermix contains in one tube all the necessary components, except RNA template, for first-strand cDNA synthesis.

- **Simple and fast** — short protocol time (40 min) and 1-tube master mix format allow easy setup and fast qPCR results
- **Data reproducibility** — 1-tube supermix format reduces pipetting steps and promotes consistent and reproducible results
- **Broad dynamic range** — works with a broad linear dynamic range of input total RNA (1 µg–1 pg) and allows sensitive detection of target genes with low expression levels
- **Primer design flexibility** — includes an optimum blend of oligo(dT) and random primers to provide unbiased representation of the 5' and 3' regions of target genes for freedom in qPCR primer design

Storage and Stability

Store at –20°C. Guaranteed for 12 months at –20°C in a constant temperature freezer (this reagent will not freeze at –20°C).

Kit Contents

Reagent	Description
iScript RT Supermix (gray cap, 25 or 100 reactions)	5x RT supermix with RNase H+, Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase, RNase inhibitor, dNTPs, oligo(dT), random primers, buffer, MgCl ₂ , and stabilizers
iScript No-RT Control Supermix (clear cap, 50 reactions)	5x no-RT control supermix formulated to serve as a no-enzyme control, contains all components of iScript RT Supermix except reverse transcriptase
Nuclease-free water	—

Reaction Setup

Reaction Setup for a Single cDNA Synthesis Reaction

For optimal results, reactions should be assembled on ice using appropriate reaction vessels.

Component	Volume per Reaction, µl
iScript RT Supermix	4
RNA template (1 µg–1 pg total RNA)	Variable
Nuclease-free water	Variable
Total volume	20

Reaction Setup for Multiple cDNA Synthesis Reactions

The following table shows an example of a master mix preparation for ten reactions with 5 µl input RNA (1 µg–1 pg) and enough excess master mix to accommodate loss during pipetting.* For optimal results, reactions should be assembled on ice using appropriate reaction vessels.

Component	Volume per Reaction, µl
iScript RT Supermix	48
Nuclease-free water	132
Total volume	180

1. Prepare the reverse transcription master mix as indicated in the table above. Mix thoroughly by pipetting up and down several times.
2. Add 15 µl master mix to 5 µl RNA for each reverse transcription reaction.
3. Adjust the volume of water if the input RNA volume is not 5 µl input RNA (1 µg–1 pg), as stated in the example above.

* If more reactions are required, scale up appropriately. The volume of supermix provided in 25- and 100-reaction kits does not take into account the preparation of excess master mix.

Reaction Protocol

Incubate the complete reaction mix in a thermal cycler using the following protocol:

Priming	5 min at 25°C
Reverse transcription	20 min at 46°C
RT inactivation	1 min at 95°C

iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR

Recommendations for the Use of No-RT Control

- Interference of gene expression analysis by genomic DNA carryover in RNA samples can be tested using the no-RT control supermix
- Setting up a no-RT control reaction with the same amount of total RNA as the reverse transcription reaction is recommended to allow similar carryover of cDNA synthesis components in qPCR for accurate detection of genomic DNA amplicons

Recommendations for qPCR

- cDNA generated with this kit can be used directly in qPCR
- The volume of cDNA synthesis reaction used must not exceed 10% of the qPCR volume
- cDNA can be diluted in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA prior to use in qPCR. The optimum cDNA dilution must be determined based on target gene abundance and qPCR chemistry

Related Products

Catalog #	Description
Reverse Transcription Reagents for Real-Time qPCR	
1725037	iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR
1708890	iScript cDNA Synthesis Kit
1708896	iScript Select cDNA Synthesis Kit
1725034	iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit
Reagents for Real-Time qPCR	
1725270	SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix
1725280	SsoAdvanced Universal Probes Supermix
1725120	iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix
1725130	iTaq Universal Probes Supermix
1725160	SsoAdvanced PreAmp Supermix

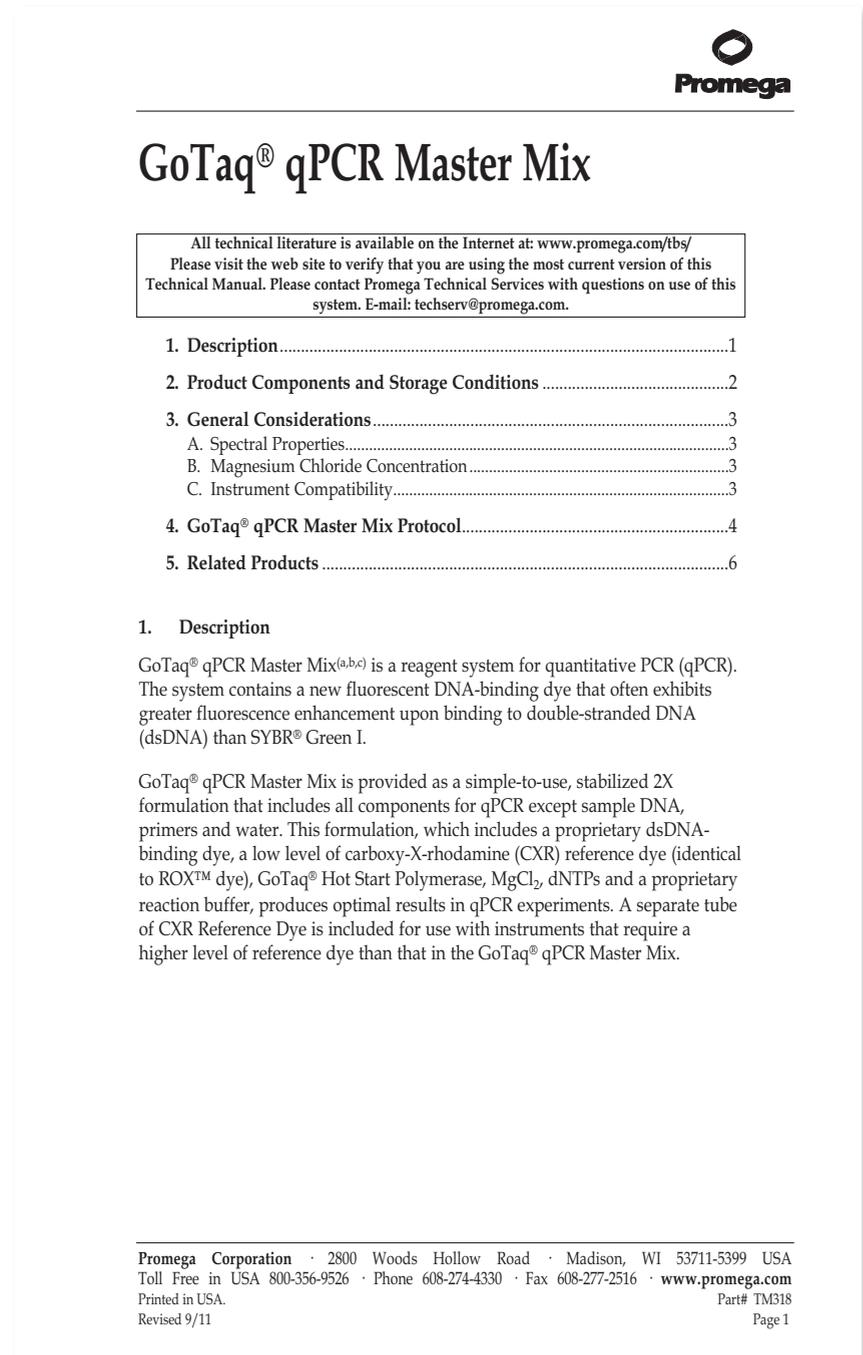
Visit bio-rad.com/web/iscrptRTsmx for more information.

SYBR is a trademark of Life Technologies Corporation. Bio-Rad Laboratories, Inc. is licensed by Life Technologies Corporation to sell reagents containing SYBR Green I for use in real-time PCR, for research purposes only.

The use of iTaq and SsoAdvanced Supermixes is covered by one or more of the following U.S. patents and corresponding patent claims outside the U.S.: 5,804,375; 5,994,056; and 6,171,785. The purchase of these products includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. These products are for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Anexo 5

Protocolo de RT-qPCR SYBR Green qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI).





Advantages of the GoTaq® qPCR Master Mix

Dye: The proprietary dye provides brighter dsDNA-dependent fluorescence than SYBR® Green I, with less PCR inhibition than SYBR® Green. The dye enables efficient amplification, resulting in earlier quantification cycle (C_q) values and an expanded linear range using the same filters and settings as SYBR® Green I. The CXR reference dye can be detected using the same filters and settings as those used for ROX™.

! Quantification cycle is formerly known as cycle threshold (C_t).

Polymerase/Buffer Formulation: GoTaq® Hot Start Polymerase contains full-length *Taq* DNA polymerase bound to a proprietary antibody that prevents polymerase activity at room temperature. Thermal activation is achieved by incubating the assembled reaction at 95°C for 2 minutes. The proprietary polymerase/buffer formulation accommodates extended cycle numbers (45–50 cycles) and is compatible with thermal cycling programs that require extended activation (95°C for 10 minutes).

Performance: You can expect reliable performance with minimal lot-to-lot variation: efficient, sensitive and linear qPCR amplification over a wide dynamic range.

2. Product Components and Storage Conditions

Product	Size	Cat.#
GoTaq® qPCR Master Mix	200 reactions	A6001

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Includes:

- 5 × 1ml GoTaq® qPCR Master Mix, 2X
- 100µl CXR Reference Dye
- 2 × 13ml Nuclease-Free Water

Product	Size	Cat.#
GoTaq® qPCR Master Mix	1,000 reactions	A6002

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Includes:

- 25 × 1ml GoTaq® qPCR Master Mix, 2X
- 5 × 100µl CXR Reference Dye
- 10 × 13ml Nuclease-Free Water

Storage Conditions: GoTaq® qPCR Master Mix is shipped at -20°C. Upon arrival, store all components at -20°C, protected from light. For immediate use, components may be stored at 2–8°C, protected from light, for up to 3 months.



3. General Considerations

3.A. Spectral Properties

The proprietary dye in the GoTaq® qPCR Master Mix has spectral properties similar to those of SYBR® Green I: Excitation at 493nm and emission at 530nm. Instrument optical settings established for SYBR® Green I assays should be used with GoTaq® qPCR Master Mix. The CXR reference dye has the same spectral properties as ROX™: Excitation at 580nm and emission at 602nm. Use the instrument settings for ROX™ for reactions containing GoTaq® qPCR Master Mix.

3.B. Magnesium Chloride Concentration

The MgCl₂ concentration of the GoTaq® qPCR Master Mix has been determined to be optimal for performance. If desired, the MgCl₂ concentration may be adjusted using a PCR-grade stock solution (not provided).

3.C. Instrument Compatibility

GoTaq® qPCR Master Mix can be used with any real-time instrument capable of detecting SYBR® Green I or FAM™ dye. GoTaq® qPCR Master Mix contains a low level of CXR reference dye.

! If you are using any of the following instruments, supplement the GoTaq® qPCR reaction mix with 0.5µl of CXR Reference Dye per 50µl reaction.

- Applied Biosystems 7000 Sequence Detection System
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System
- Applied Biosystems 7700 Sequence Detection System
- Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System



4. GoTaq® qPCR Master Mix Protocol

If you are currently performing dye-based qPCR, the GoTaq® qPCR Master Mix can simply be substituted for your current master mix. For consistency within an experimental set, prepare a sufficient volume of reaction mix without template DNA for the DNA standard reactions and experimental sample reactions.

The protocol for a 50µl reaction is outlined below. Component volumes may be scaled as appropriate. This protocol assumes that 20% of the reaction volume is DNA template (e.g., 10µl of DNA template added to 40µl of reaction mix). If the volume of DNA template is more or less than 10µl, adjust the volume of Nuclease-Free Water accordingly so that the final reaction volume is 50µl.

Materials to be Supplied by the User

- qPCR primers
- DNA template, positive control template standards
- barrier pipette tips
- sterile, nuclease-free, DNA-free tubes for reaction mix setup
- optical multiwell reaction plates and adhesive film covers
- real-time thermal cycler
- optional: sterile MgCl₂ stock solution
- alternative normalization dye, if required (e.g., fluorescein for BioRad instruments)

1. Prepare the standard DNA dilution series and experimental samples in nuclease-free water. Store on ice until use. Carefully add 10µl of template (or water for no-template control reactions) to the appropriate wells of the reaction plate. Store plate at room temperature or on ice.
2. Thaw the GoTaq® qPCR Master Mix at room temperature. Gently vortex to ensure it is adequately mixed. Take care to avoid foaming or extended exposure to light. Store on ice until use.
3. Prepare the reaction mix, without template DNA, by combining the reagents in the order listed in Table 1. See Notes 1 and 2. Gently vortex to mix. Take care to avoid foaming.

Table 1. Preparation of the Reaction Mix.

Component	Volume per 50µl Reaction	Final Concentration
GoTaq® qPCR Master Mix, 2X	25µl	1X
Nuclease-Free Water	to a final volume of 40µl	
upstream and downstream PCR primers	_____µl	0.2µM or 0.05–0.9µM each

Notes

1. See Section 3.C for a list of instruments that require addition of the CXR Reference Dye.
2. Some instruments such as the BioRad instruments require addition of a normalization dye (e.g., fluorescein).



4. Carefully add the appropriate volume of reaction mix prepared in Step 3 (e.g., 40µl of reaction mix for a 50µl reaction) to the appropriate wells of the reaction plate prepared in Step 1. Take care to avoid cross-contamination.
5. Seal the reaction plate, and centrifuge at low speed for 1 minute to bring all reaction components together and eliminate air bubbles.
6. Program the thermal cycler as per the manufacturer's instructions using the following guidelines:
 - a. Select SYBR® or FAM™ as the detection dye for the entire plate.
 - b. Select the ROX™ channel to detect CXR as the reference dye for the entire plate.
 - c. Select a standard or fast, two-step, 40-cycle qPCR and dissociation program. Please note that the cycling parameters given below are offered as a guideline and may be modified as necessary.

	# Cycles	Standard Cycling Program	Fast Cycling Program
Hot-Start Activation	1	95°C for 2 minutes	95°C for 2 minutes
Denaturation	40	95°C for 15 seconds	95°C for 3 seconds
Annealing/Extension		60°C for 60 seconds	60°C for 30 seconds
Dissociation	1	60–95°C	60–95°C

- d. Designate that data will be collected during the annealing step of each cycle.
7. Place the plate into the instrument, and press "Start".
When the run is complete, analyze the data using your usual procedures.



5. Related Products

DNA Purification

Product	Size	Cat.#
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	100 isolations × 300µl	A1120
	500 isolations × 300µl	A1125
	100 isolations × 10ml	A1620
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	50 preps	A2360
	250 preps	A2361
MagneSil® Blood Genomic, Max Yield System	1 × 96 preps	MD1360
MagneSil® ONE, Fixed Yield Blood Genomic System	1 × 96 preps	MD1370
MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System	100 samples	MD1490
MagneSil® Genomic, Large Volume System	8 preps	A4080
	48 preps	A4082
	96 preps	A4085
Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit	48 preps	AS1010
Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit	48 preps	AS1020
Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit	48 preps	AS1030
PureYield™ Plasmid Miniprep System	100 preps	A1223
	250 preps	A1222
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 preps	A2492
	100 preps	A2495
	300 preps	A2496
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	10 preps	A2392
	25 preps	A2393

Accessory Products

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 Instrument	1 each	AS2000
Maxwell® 16 SEV Hardware Kit	1 each	AS1200
Maxwell® 16 LEV Hardware Kit	1 each	AS1250



RNA Purification

Product	Size	Cat.#
PureYield™ RNA Midiprep System	10 preps	Z3740
	50 preps	Z3741
SV Total RNA Isolation System	10 preps	Z3101
	50 preps	Z3100
	250 preps	Z3105
Maxwell® 16 Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1050
Maxwell® 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1220
Maxwell® 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1225

For Laboratory Use.

Product	Size	Cat.#
Reverse Transcription System	100 reactions	A3500
AMV Reverse Transcriptase	300u	M5101
M-MLV Reverse Transcriptase	10,000u	M1701
	50,000u	M1705
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus*	10,000u	M5301
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutation*	2,500u	M3681
	10,000u	M3682
	50,000u	M3683
ImProm-II™ Reverse Transcription System	100 reactions	A3800
ImProm-II™ Reverse Transcriptase	10 reactions	A3801
	100 reactions	A3802
	500 reactions	A3803

*Not available in Canada and United States.



® U.S. Pat. No. 6,242,235, Australian Pat. No. 761757, Canadian Pat. No. 2,335,153, Chinese Pat. No. ZL99808861.7, Hong Kong Pat. No. HK 1040262, Japanese Pat. No. 3673175, European Pat. No. 1088060 and other patents pending.

® Licensed under U.S. Pat. Nos. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

® **NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE**

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 USA.

© 2009-2011 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GoTaq is a registered trademark of Promega Corporation.

FAM and ROX are trademarks of Applied Biosystems. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA
Toll Free in USA 800-356-9526 · Phone 608-274-4330 · Fax 608-277-2516 · www.promega.com
Part# TM318 Printed in USA.
Page 8 Revised 9/11

